

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des sciences biologiques**

## **THESE**

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Ès Sciences**

**Spécialité : Biologie**

**Option : Biochimie et Analyse des Bioproduits**

## **THEME**

**Activités biologiques des épices constitutives d'un mélange  
« Ras el hanout » utilisé par les habitants de Ouargla**

Présentée par **ANNOU Ghania**

**Le / /**

Devant le jury

Président	SIBOUKEUR Oum El Kheir	Pr.	Univ. Ouargla
Directeur de thèse	OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Pr.	Univ. Ouargla
Co-directeur	DADAMOUSA Belkhir	Pr.	Univ. Ghardaïa
Examineurs	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Pr.	Univ. Ouargla
	SAIDI Fairouz	Pr.	Univ. Blida
	BOURAS Noureddine	MCA	Univ. Ghardaïa

**Année Universitaire : 2017/2018**

## **Remerciements**

*Je remercie tout d'abord **Allah**, le tout puissant de m'avoir accordé la santé et le courage afin de réaliser ce modeste travail.*

*Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un axe de recherche du laboratoire de protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides. Je remercie infiniment son directeur, le Professeur OULD EL HADJ Mohamed Didi, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait bénéficier de votre vision de la recherche scientifique.*

*Ces travaux de recherche ont été effectués sous la direction de Madame OULD EL HADJ Khelil Aminata. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre encadrement de qualité et pour m'avoir accordé votre confiance. Merci d'avoir toujours été disponible et pour avoir été à mon écoute, de m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix. Merci de m'avoir enseigné la rigueur de la démarche expérimentale, Merci tout particulièrement pour votre soutien scientifique mais aussi humain dans la dernière ligne droite de la rédaction. Mes sincères remerciements pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent travail.*

*J'exprime toute ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Monsieur **DADAMOUSA Belkhir**, professeur à l'université de Ghardaïa pour le co-encadrement de ce travail.*

*Je remercie vivement Madame **SIBOUKEUR Oum El Kheir**, Professeur au Département de Biologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir assuré la présidence de ce jury de thèse. Veuillez accepter ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements et profondes grâtes s'adressent également à Monsieur Ould El Hadj Mohamed Didi, Professeur au Département de Biologie à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Kasdi Merbah Ouargla, pour avoir accepté d'examiner ce travail. J'exprime tout ma reconnaissance et mes sincères remerciements aussi à Madame SAIDI Fairouz, Professeur de l'Université de Blida et Monsieur BOURAS Noureddine Maître de conférences-HDR, à l'Université de Ghardaïa pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier les membres de l'équipe de laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, particulièrement son chef M<sup>r</sup> EL-AICHE.*

*Je remercie vivement les membres de l'équipe du laboratoire de Bioressources Sahariennes, Préservation et Valorisation de l'Université Kasdi Merbah Ouargla.*

*Je présente mes remerciements également aux membres de l'équipe du Laboratoire des génies des Procédés de l'Université Kasdi Merbah Ouargla.*

*Mes remerciements vont aussi à tous les membres de l'équipe de laboratoire interne de l'hôpital Mohammed Boudiaf-Ouargla. En particulier à son directeur M<sup>r</sup> DADAMOUSA de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon oncle et mon frère Mouloud pour leur précieuse aide, ainsi que pour leur soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi ma chère mère, mon époux et mes enfants.*

*Enfin, que toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes remerciements.*

## Abréviation

<b>AFNOR</b>	Association Française de Normalisation
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>CCM</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CMI</b>	Concentration d'inhibition minimale
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DPPH•</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
<b>DZI</b>	Diamètre des zones d'inhibition
<b>EAG/gES</b>	Equivalent Acide Gallique par gramme d'extrait sec
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentration efficace
<b>EC/g ES</b>	Equivalent cyanidine par gramme d'extrait sec
<b>EQ/gES</b>	Equivalent quercétine par gramme d'extrait sec
<b>ES</b>	Effet synergique
<b>FRAP</b>	Ferric reducing antioxidant power
<b>HEs</b>	Huiles essentielle
<b>ISO</b>	Organisation International de Normalisation
<b>mm</b>	Millimètre
<b>M1 et M2</b>	Mélange "Ras el hanout" 1 et 2
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>Rf</b>	Facteur de rétention
<b>RONS</b>	Espèces réactives oxygénées et azotées
<b>ROS</b>	Espèces réactives oxygénées
<b>R</b>	Rendement
<b>Rf</b>	Facteur de rétention
<b>Sig.</b>	Significatif
<b>T.</b>	Tanins

## Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
<b>I</b>	Classification et description botanique de différentes épices sélectionnées	10
<b>II</b>	Mélanges binaires et équimolaires des épices étudiées.	16
<b>III</b>	Taxonomie et caractéristiques des souches microbiennes testées	29
<b>IV</b>	Principaux constituants des différents mélanges "Ras el hanout" selon les herboristes	38
<b>V</b>	Criblage phytochimique de la fraction hexanique	40
<b>VI</b>	Criblage phytochimique de la fraction chloroformique	41
<b>VII</b>	Criblage phytochimique de la fraction d'acétate d'éthyle	42
<b>VIII</b>	Criblage phytochimique de la fraction n-butanolique	43
<b>IX</b>	Matrice de corrélation entre les variables étudiés	52
<b>X</b>	Diamètres d'inhibition des souches testées et CMI des différents extraits bruts	59
<b>XI</b>	Matrice de corrélation entre les métabolites dosés et les activités biologiques évaluées	66
<b>XII</b>	Concentrations des mélanges binaires équimolaires des épices en polyphénols et leurs effets synergiques	80
<b>XIII</b>	Concentrations des mélanges binaires équimolaires des épices flavonoïdes et leurs effets synergiques	81
<b>XIV</b>	Concentrations des mélanges binaires équimolaires des épices en tanins condensés et en tanins hydrolysables et leurs effets synergiques	82
<b>XV</b>	Concentrations inhibitrices efficaces (EC <sub>50</sub> ) des mélanges binaires et équimolaires des épices et leurs effets synergiques	83
<b>XVI</b>	Diamètres des zones d'inhibition des souches testées par les mélanges binaires et équimolaires et leurs effets synergiques	84
<b>XVII</b>	Indices physiques des huiles essentielles des épices étudiés	90
<b>XVIII</b>	Indices chimiques des huiles essentielles des épices étudiées.	92
<b>XIX</b>	Diamètres des zones d'inhibition des souches testées et CMI des HEs des épices	99

## Liste des figures

Numéro	Titre	Page
<b>01</b>	Piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup>	26
<b>02</b>	Dispositif expérimental adopté	33
<b>03</b>	Fréquence d'utilisation du mélange "Ras el hanout"	35
<b>04</b>	Importance des différentes épices dans la préparation de "Ras el hanout"	35
<b>05</b>	Mode d'utilisation de "Ras el hanout"	36
<b>06</b>	Rendement en extraits bruts des différentes épices étudiées et de leurs mélanges	
<b>07</b>	Teneur des épices étudiées et leurs mélanges en polyphénols	46
<b>08</b>	Teneurs des épices et leurs mélanges en flavonoïdes	48
<b>09</b>	Teneur des épices en tanins condensés et tanins hydrolysables	50
<b>10</b>	EC <sub>50</sub> obtenues avec les extraits bruts des épices et leurs mélanges	53
<b>11</b>	Profils des courbes des différentes épices et de leurs mélanges (test FRAP)	54
<b>12</b>	Photographie de quelques aromatogrammes obtenus avec les différentes souches testées.	57
<b>13</b>	Diamètres des zones d'inhibition des souches testées par extraits brutes des épices	59
<b>14</b>	Pourcentages d'inhibition de la thermo-hémolyse	63
<b>15</b>	Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en polyphénols	68
<b>16</b>	Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en flavonoïdes	69
<b>17</b>	Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en tanins condensés	70
<b>18</b>	Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en tanins hydrolysables	71
<b>19</b>	Effet du traitement thermique sur l'activité antioxydante des épices et leurs mélanges	72

<b>20</b>	Effet du traitement thermique sur l'activité anti <i>E. coli</i> des épices étudiées et de leurs mélanges	<b>73</b>
<b>21</b>	Effet du traitement thermique sur l'activité anti <i>P. aeruginosa</i> des épices étudiées et de leurs mélanges.	<b>74</b>
<b>22</b>	Effet du traitement thermique sur l'activité anti <i>S.aureus</i> des épices étudiées et de leurs mélanges	<b>74</b>
<b>23</b>	Effet du traitement thermique sur l'activité anti <i>C. albicans</i> des épices étudiées et de leurs mélanges	<b>75</b>
<b>24</b>	Rendement d'extraction des huiles essentielles des différentes épices	<b>84</b>
<b>25</b>	EC <sub>50</sub> obtenues avec les huiles essentielles des épices étudiées	<b>98</b>
<b>26</b>	Photographie de quelques aromatogrammes obtenus avec les différentes souches testées.	<b>98</b>
<b>27</b>	Diamètres des zones d'inhibition des souches testées par les huiles essentielles des épices	<b>100</b>

### Liste des photos

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Traitement thermique des extraits	<b>15</b>
<b>02</b>	Dispositif d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	<b>22</b>

## Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Matériels et méthodes</b>	<b>10</b>
1. Enquête ethnobotanique.....	10
2. Investigation au niveau des herboristes.....	10
3. Obtention, traitements et caractérisation des extraits bruts des épices étudiées	14
3. 1. Obtention des extraits bruts.....	14
3.2. Traitement thermique des extraits.....	15
3.3. Préparation des mélanges binaires et équimoléculaires .....	15
3.4. Criblage phytochimique des extraits par chromatographie sur couche mince .....	17
3.4.1. Fractionnement des extraits par extraction liquide-liquide.....	17
3.4.2. Caractérisation des différentes fractions par CCM.....	18
3.4.3. Conditions opératoires .....	18
3.4.4. Expression des résultats .....	19
3.5. Dosage quantitatif des polyphénols.....	20
3.6. Dosage quantitatif des flavonoïdes.....	20
3.7. Dosage des tanins.....	21
3.7.1. Dosage des tanins condensés .....	21
3.7.2. Dosage des tanins hydrolysables .....	21
4. Extraction et caractérisation des huiles essentielles.....	22
4.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	22
4.2. Détermination des indices physico-chimiques des huiles essentielles .....	23
4.2.1. Détermination des indices physiques .....	23
4.2.1.1. Densité à 20°C .....	23
4.2.1.2. Indice de réfraction.....	23



4.2.2. Détermination des indices chimiques.....	24
4.2.2.1. Indice d'acide (I <sub>a</sub> ).....	24
4.2.2.2. Indice de saponification (I <sub>s</sub> ).....	24
4.2.2.3. Indice d'iode (I <sub>i</sub> ).....	25
5. Evaluation des activités biologiques des épices .....	26
5.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	26
5.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH.....	26
5.1.1.1. Calcul des concentrations efficaces EC <sub>50</sub> .....	27
5.1.2. Test de réduction du fer (FRAP).....	27
5.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	28
5.2.1. Présentation des souches microbiennes testées.....	28
5.2.2. Milieux de cultures utilisés.....	30
5.2.3. Réalisation des aromatoigrammes.....	30
5.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	31
5.3. Evaluation de l'activité anti inflammatoire.....	31
6. Analyses statistiques .....	32

35

## Chapitre II. Résultats et discussions

35

1. Enquête ethnobotanique.....	35
1.1. Fréquence d'utilisation de "Ras el hanout" .....	35
1.2. Principales épices constitutives de "Ras el hanout".....	35
1.3. Mode d'utilisation.....	36
Discussion .....	36
2. Investigation auprès des herboristes .....	37
3. Rendements d'extraction.....	39
Discussion.....	39
4. Criblage phytochimique des différentes fractions des extraits bruts.....	40

4.1. Criblage phytochimique de la fraction hexanique.....	40
4.2. Criblage phytochimiques de la fraction chloroformique.....	41
4.3. Criblage phytochimiques de la fraction d'acétate d'éthyle.....	42
4.5. Criblage phytochimique de la phase n-butanolique.....	43
Discussion.....	44
5. Teneur des épices en métabolites secondaires .....	46
5.1. Teneur en polyphénols totaux.....	46
Discussion.....	46
5.2. Teneur en Flavonoïdes.....	48
Discussion.....	48
5.3. Teneurs des épices en tanins condensés et en tanins hydrolysables.....	50
Discussion.....	50
5.4. Corrélation entre les différents métabolites dosés .....	51
Discussion.....	52
6. Activités biologiques des épices étudiées .....	53
6.1. Activité antioxydante des extraits bruts.....	53
6.1.1. Activité antioxydante par piéage du radical libre DPPH • .....	53
6.1.2. Activité antioxydante par réduction de Fer (FRAP).....	54
Discussion.....	54
6.2. Activité antimicrobienne des extraits bruts.....	57
Discussion.....	61
6.3. Activité anti-inflammatoire des extraits bruts.....	63
Discussion.....	64
6.4. Corrélation entres les métabolites dosés et les activités biologiques étudiées.....	66
7. Effet du traitement thermique sur les extraits des épices et leurs mélanges.....	68
7.1. Effet du traitement thermique sur le contenu des épices en métabolites secondaires	67
7.1. 1. Effet du traitement thermique sur les teneurs en polyphénols .....	67
7.1.2. Effet du traitement thermique sur les teneurs en flavonoïdes.....	69
7.1.3. Effet du traitement thermique sur les teneurs en tanins hydrolysables et en tanins condensés.....	79
7.2. Effet du traitement thermique sur les activités biologiques.....	71

7.2.1. Effet du traitement thermique sur l'activité antioxydante des extraits bruts.	71
7.2.2. Effet du traitement thermique sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts	73
Discussion.....	75
8. Effet synergique des métabolites secondaires et des activités biologiques des mélanges binaires et équimolaires.....	80
8.1. Effet synergique des mélanges en métabolites.....	80
8.1.1. Effet synergique des polyphénols.....	80
8.1.2. Effet synergique des flavonoïdes.....	81
8.1.3. Effet synergique des tanins condensés et des tanins hydrolysables.....	81
8.2. Effets synergiques des Activité biologiques des mélanges binaires équimolaires....	82
8.2.1. Effet synergique de l'activité antioxydante des mélanges.....	82
8.2.2. Effet synergique de l'activité antimicrobiennes des mélanges binaires et Equimolaires.....	83
Discussion .....	85
9. Etude des huiles essentielles des épices de "Ras el hanout".....	88
9.1. Rendement et caractéristiques <b>organoleptiques</b> des huiles essentielles des épices .....	88
Discussion.....	88
9.2. Indices physico-chimiques des huiles essentielles étudiées.....	89
9.2.1. Indices physiques.....	89
Discussion.....	91
9.2.2. Indices chimiques des huiles essentielles des épices .....	91
9.3. Activité antioxydante des huiles essentielles des épices étudiées.....	94
Discussion.....	94
9.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles des épices.....	96
Discussion.....	101
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>105</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>111</b>

# **INTRODUCTION**

## Introduction

L'histoire des épices a débuté 4 000 ans avant notre ère au sud-ouest de l'Inde. Le premier homme qui cueillit du poivre pour parfumer son riz fut à l'origine d'une course folle de nouvelles saveurs permettant d'agrémenter la nourriture de base. Ces épices, dont la plupart sont exotiques sont parmi les produits commerciaux les plus coûteux durant l'Antiquité et le Moyen-âge (Heers, 2008).

Provenant du mot latin « spices » signifiant tout simplement espèce ou substance, les épices sont des parties de plantes aromatiques à la saveur forte ou des préparations, notamment des mélanges faits à partir de ces plantes, utilisées en petite quantité en cuisine et servant à l'assaisonnement des mets. Elles sont destinées à relever, parfumer, conserver et colorer tout en procurant une saveur particulière (Alix, 2012; Hertog *et al.*, 1993 ; Groff et Gropper, 2000 ; Bremness, 2002 ; Carole, 2011 ; Przygodzka, 2016).

Les épices sont généralement composés de fibres, hydrates de carbone, protéines, gomme, cendres, substances aromatiques volatiles (huiles essentielles) et non volatiles. Ces composants répandent à chaque épice des caractéristiques organoleptiques et thérapeutiques particulières (Raghavan, 2007). Néanmoins, pour garder ces caractéristiques, le traitement des épices après la récolte est recommandé. Ce processus s'effectue généralement en détachant la structure végétale voulue et en la séchant dans de bonnes conditions (Redhead, 1990).

D'autres produits utilisés pour parfumer les plats, tels que les herbes aromatiques ou les fruits, recevant l'appellation d'épices communes sont à différencier des épices. Le basilic, le romarin, le thym, le persil et l'estragon en sont de bons exemples (Figueredo, 2012 ; Droniou, 2012).

Plusieurs mélanges d'épices sont utilisés en gastronomie, pour associer les propriétés gustatives ou produire un effet esthétique. On connaît par exemple le « curry » et « grama-massala » caractéristique de la cuisine Indienne (Bahorun, 1997) et « Ras el Hanout » originaire d'Afrique du Nord.

Etymologiquement, « Ras el Hanout » signifie, « en haut de la boutique » indiquant que, c'est un produit noble et trop demandé (Zette, 2009). Ce

mélange a la particularité d'être différent dans la composition d'un marchand d'épices à l'autre (Ruth, 2009 ; Tyler, 2001).

Cinquante différentes épices peuvent intervenir dans la constitution de « Ras el hanout ». Parmi ces épices, environ une vingtaine sont sélectionnées pour préparer le mélange. Ceci donne une diversité constitutionnelle au « Ras el hanout » variant d'une région à l'autre. On trouve également des mélanges simplifiés, contenant moins de 10 épices. Les épices essentielles de ce mélange sont : la coriandre, le cumin, le paprika, le curcuma, le fenouil, le gingembre, le poivre noir, le romarin, l'origan, les pétales de rose, la cannelle...etc. (Samuel *et al.*, 2007).

Il n'est guère aisé de sélectionner des critères de classification des épices ; celles-ci appartiennent aux différentes familles végétales, et au sein de ces familles, différentes parties de la plante peuvent donner des épices (Redhead, 1990). Des graines, comme le cumin (*Ombellifère*), le poivre (*Iridacée*) et le cardamome (*Zingibéracée*) ; des fleurs, comme le clou de girofle (*Myrtaceae*) et le safran (*Iridacée*) ; des fruits, le cas de noix de muscade (*Myristicacées*), le piment (*Solanacée*) et la vanille (*Orchidaceae*) ; des racines, comme le curcuma et le gingembre (*Zingibéracée*) ; de feuilles, comme laurier (*Lauraceae*) et de l'écorce comme la cannelle (*Lauraceae*) (Farrell, 1990 ; Alix, 2012 ; Droniou, 2012).

Cependant, dans le domaine des industries alimentaires et de la gastronomie, il est intéressant de regrouper les épices en fonction de leurs propriétés organoleptiques (couleur, odeur, arômes et saveur) (Richard, 1987).

Différents domaines font appel à l'utilisation des épices. Ces dernières étant utilisées parcimonieusement, elles ne contribuent pas, d'un point de vue nutritionnel, au régime alimentaire, mais elles contiennent souvent des principes actifs qui permettent de protéger les denrées contre la dégradation microbienne et oxydative. Comme elles apportent de la variété et du goût aux denrées de base et aux sauces, ce qui excite l'appétit et permet de manger plus (Redhead, 1990).

Certaines épices supportent la cuisson, d'autres ne doivent pas cuire longtemps, sous peine de perdre toutes leurs qualités. En effet, Sophie (2006) conseille l'ajout des épices aux trois quarts de la cuisson.

Les épices sont classées parmi les plantes médicinales (Lejale et Lejale, 2012). Aux doses utilisées en cuisine, toutes les épices sont bonnes pour la santé. Certaines

facilitent la digestion des mets lourds, soit par les tanins contenus qui favorisent la sécrétion biliaire, soit parce qu'elles contiennent des lipases ou des protéases qui pré-digèrent les aliments qu'elles accompagnent (Bahorun, 1997). Les épices ont aussi de nombreuses indications thérapeutiques et préventives : antiinflammatoire et anticancéreux (curcuma), contre la jaunisse (le fenugrec), antidiabétique (la cannelle), contre les rhumatismes et les névralgies (la noix de muscade), vermifuge, anti rages de dents (le clou de girofle), contre les refroidissements en accélérant la circulation sanguine (cannelle, moutarde et piment), soulagement des douleurs dues aux règles mensuelles (l'anis vert), contre l'hypercholestérolémie, l'indigestions, les nausées, les flatulences, cohques (gingembre), contre l'insomnie (coriandre et clou de girofle)...etc. (Häfliger, 1999 ; Iserin, 2001 ; Guilloton, 2005).

Le domaine cosmétique fait appel également aux épices, les plus utilisées sont le curcuma, la vanille, le clou de girofle, le gingembre, l'anis, la noix de muscade et la cannelle. Ces épices sont employées pour leurs propriétés antiseptiques, antioxydantes et parfumante (Mountagud, 2014). L'exemple le plus frappant, les huiles essentielles de la cannelle et du clou de girofle, largement impliquées dans la fabrication des dentifrices (Sophie, 2006).

Les vertus médicinales et thérapeutiques des épices sont dues à leur richesse en métabolites secondaires dits principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Farak *et al.*, 1989 ; Bulduk, 2004 ; Al-Gabbiesh, 2015).

Les recherches récentes sur les métabolites secondaires sont très poussées, particulièrement dans les domaines de la phytothérapie et de l'hygiène alimentaire, en raison de leurs diverses propriétés biologiques : antioxydant, antimicrobiennes, hypoglycémiantes, anti-inflammatoires...etc. (Leong et Shui, 2002). En outre, ces métabolites peuvent avoir des effets physiologiques favorables dans la prévention des cancers et de nombreuses maladies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires (Middleton *et al.*, 2000 ; Raja et Sreenivasulu, 2015).

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement ces dernières années. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles y compris les épices (Tylkowski, 2009).

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister au stress oxydant. Ce dernier est un type d'agression des constituants de la cellule, dû aux espèces réactives oxygénées (ROS) et aux espèces réactives oxygénées et azotées (RONS). Ces espèces sont, par définition, des radicaux libres. Dont on connaît, le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , l'ion hypochlorite  $ClO^-$ , le radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$ , les radicaux peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ) et alkoxyde ( $RO^{\bullet}$ ) où R est une chaîne carbonée, le peroxynitrite  $ONOO^{\bullet}$ , le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  et l'oxygène singulet  $^1O_2$  (Sarma *et al.*, 2010 ; Kanti Das *et al.*, 2015).



La production de ROS et RONS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques dont, la plupart se forment au cours de métabolisme de l'oxygène dans les mitochondries "flambée respiratoire", lors de la défense antibactérienne par les cellules phagocytaires, macrophages et neutrophiles, activées pendant la réaction inflammatoire et au cours de la régulation des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée (apoptose) (Haleng, 2002 ; Valko *et al.*, 2007).

Le stress oxydant devient une situation pathologique dès que le système de protection est submergé par les ROS et les RONS (perte de la balance antioxydant - radicaux libres en faveur de ces derniers). Une alimentation saine et équilibrée (légumes, fruits, poissons, huile de soja...etc.) doit théoriquement être suffisante pour apporter à notre organisme les antioxydants et les oligoéléments nécessaires pour limiter au maximum l'effet nocif de ces espèces (Haleng *et al.*, 2007).

La situation devient d'autant plus inquiétante avec la vie moderne qui nous confronte toutefois à des habitudes alimentaires de plus en plus mauvaises. L'exposition aux rayonnements UV, les radiations ionisantes, l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels) pénétrant l'organisme *via* le système respiratoire, l'ingestion d'alcool, certains médicaments anticancéreux et antibiotiques...etc. sont aussi des facteurs provoquant dans l'organisme des réactions chimiques de type radicalaires dans des proportions non prévues par la nature (Pincemail *et al.*, 1999 ; Favier, 2003, Sarma *et al.*, 2010).

Ce stress est un facteur d'inflammation et de mutagenèse, mais il est aussi considéré comme une des principales causes de cancer et jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer, comme dans plusieurs affections plus courantes telles que les maladies cardio-vasculaires, les accidents cérébro-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes (Castellani *et al.*, 2013 ; Shirazi, 2014 ).

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la protection contre le développement de ces diverses pathologies dégénératives nécessite une alimentation encore plus riche en polyphénols. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à achever les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de

protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Leopoldini *et al.*, 2011).

Les polyphénols sont des supports majeurs de cette activité, ces métabolites incluent les flavonoïdes, telles que la quercétine, la rutine, le kampférol, l'épigallocatechin gallate trouvés dans la cannelle, le carvi, l'anis vert, le gingembre et autres épices (Brewer, 2011), les acides phénoliques, comme l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide férulique et l'acide chlorogénique identifiés dans le cumin, la coriandre, le fenouil...etc. (Dias *et al.*, 2011), les coumarines comme les ombelliférones trouvés dans le carvi, le fenouil, la cannelle...etc. (Hoult et Paya, 1996 ; Charles, 2013), les phénylpropanoïdes, telles que la myristicine de la noix de muscade et le gingérol du gingembre, les tanins et les lignanes identifiés dans la noix de muscade, la cannelle et d'autres épices. Ces molécules sont caractérisées par leur efficacité chélatrice des radicaux libres les plus prooxydants impliqués dans la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Les alcaloïdes, telles que la pipérine caractéristique du poivre noir et la capsaïcine du piment sont également des molécules préventives de l'oxydation (Charles, 2013).

Cette prévention est également donnée par les composés terpéniques constitutifs des huiles essentielles, comme le geranial, le geraniol, le b-bisabolène présents dans le gingembre, le cinnamaldehyde, l'eugénol, l'eugénolacetate, le cinnamylacetate, le cinnamylalcool, l'estragole, le limonène et le camphène de la cannelle (Przygodzka *et al.*, 2016).

Les propriétés antioxydantes des épices sont bien établies contre l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ainsi, elles pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), qui ont montré des effets nuisibles (Favier, 2003).

Par ailleurs, les infections microbiennes sont également impliquées dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies qui sont maintenant considérées comme l'un des problèmes majeurs de santé publique. Il est devenu indispensable à l'Homme de mener une lutte contre l'envahissement des microorganismes, pour conserver ses biens, son potentiel industriel, son patrimoine artistique et même pour protéger son existence (Leclerc, 1995).

Les moyens de lutte contre ces agents sont nombreux. Ils peuvent être physiques (température, rayonnements...) ou chimiques (métaux lourds, chlore et dérivés, alcools...). Ces moyens sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales. D'autres moyens possédant une toxicité sélective, s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, ce sont les antibiotiques (Leclerc *et al.*, 1995).

Malgré l'importance des antibiotiques et leur utilité dans le traitement de diverses maladies infectieuses, plusieurs obstacles se sont manifestés comme la résistance et la toxicité ayant provoqué leur évitement et le choix de la médecine douce qui s'est montrée aussi efficace que les remèdes chimiques et moins nuisibles par une utilisation à long terme (Abdallah, 2011).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, ce n'est qu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle, que les scientifiques ont commencé à s'y intéresser (Yano *et al.*, 2006).

Les épices sont considérées comme d'excellents antibactériens au niveau de l'organisme ainsi que pour la préservation des aliments contre les microorganismes pathogènes (Arora et Kaur, 1999 ; Essawi et Srour, 2000). Mahfuzul Hoquea *et al.* (2008), Mihața (2009), Mithra *et al.* (2012), Dua *et al.* (2013), Kaiser (2013) et Islam *et al.* (2014) ont également signalé le haut pouvoir antimicrobien des épices telles que le cumin, le gingembre, la coriandre, le curcuma, les clous de girofle, la cannelle et le piment. Le pouvoir antifongique des épices a également été mis en évidence par de nombreux auteurs, contre les moisissures allergisantes (Ouraini *et al.*, 2005), et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (Tixeira, 2005).

Ces activités sont expliquées par la richesse des épices en composés à large spectre antimicrobien. Parmi ces composés, les flavonoïdes, les tanins et les terpènes oxygénés (thymol, carvacrol, eugénolnéral, géraniol, citronnellal, cuminal...etc.) sont les plus cités (Zhiri, 2006).

Le mode d'action des épices sur les cellules microbiennes n'est pas clairement élucidé, compte-tenu de la diversité des molécules présentes. L'activité antimicrobienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Guinoiseau, 2010) telles que l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, la séquestration des substrats nécessaires à la

croissance microbienne, la chélation de métaux comme le fer, l'inhibition du métabolisme microbien (Faleiro 2011), la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique causant une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des lipides et de la fonction mitochondriale des bactéries (Malecky, 2007). Ainsi que, la formation des complexes avec la paroi bactérienne (Guinoiseau, 2010).

Une autre affection pouvait toucher l'organisme et qui n'est pas moins pernicieuse que les précédentes, c'est l'inflammation ou plutôt les conséquences de l'inflammation (Prasad et Aggarwal, 2014).

La réponse inflammatoire est une réponse immunitaire adaptative engendrée aux stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, conduisant à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (Prasad et Aggarwal, 2014).

Une régulation défectueuse ou mal contrôlée causée par une immunodéficience, peut engendrer des dommages irréversibles locaux ou généralisés menant à des pathologies plus ou moins graves tels qu'une infection secondaire, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le diabète ou même un cancer (Nathan, 2002 ; Barton, 2008 ; Slavich et Irwin, 2014).

Le nombre de composés phytochimiques trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés antiinflammatoires. La recherche médicale récente a témoigné le pouvoir anti inflammatoire de certaines épices comme le curcuma, le gingembre, le poivre noir, le cardamome, le fenugrec et le piment (Grosogoeat et Compper, 2009 ; Prasad et Aggarwal, 2014).

Deodhar *et al.* (1980), ont signalé que l'administration de curcuma à une dose journalière de 1200 mg chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, réduit les signes inflammatoires (Bisht *et al.*, 2010 ; Basnet et Skalko-Basnet, 2011). L'activité anti-inflammatoire de la curcumine et ces analogues extraites du curcuma est mise en évidence aussi bien sur l'inflammation aiguë (œdème de patte de rat induit par carragénine) (Grosogoeat et Compper, 2009 ; He *et al.*, 2015 ; Vetvicka et Vetvickova, 2016) que sur des modèles d'inflammation chronique (arthrite au formol et granulomes) (Laty et Bernard, 2004 ; Jurenka, 2009).

Souto (2015), a signalé l'utilisation du gingembre comme anti-inflammatoires pour réduire le ventre qui se voit souvent affecté par des inflammations ou par une mauvaise digestion et aussi pour soulager les douleurs reliées à l'arthrite et aux autres rhumatismes inflammatoires.

De part sa popularité ancestrale, le mélange "Ras el hanout" a, non seulement des valeurs sensorielles mais il est aussi porteur des vertus thérapeutiques. Toutefois, aucune étude sur ce mélange et ses effets antioxydant, antimicrobien et antiinflammatoire n'a été signalée.

C'est à ce niveau d'appréhension que s'inscrit notre travail dont l'objectif principal réside dans la mise en valeur du mélange "Ras el hanout" utilisé par les habitants de Ouargla et de ses épices constitutives, en mettant le point sur leurs teneurs en métabolites secondaires et leurs activités antioxydante, antimicrobienne et antiinflammatoire. Cette étude peut ainsi contribuer à l'amélioration du mode d'utilisation du mélange "Ras el hanout", à son utilisation plus rationnelle et la valorisation de ses activités biologiques.

La réalisation de notre travail s'est basée sur les points suivants :

- Sélection des épices constitutives de « Ras el hanout » utilisé dans la gastronomie Algérienne et plus particulièrement la gastronomie Ouarglie, par une enquête ethnobotaniques et une investigation au niveau de différents herboristes de la commune de Ouargla.
- Évaluation de la teneur des épices sélectionnées en métabolites secondaires par un criblage phytochimique permettant d'identifier la présence des substances chimiques principalement, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpènes et les saponines.
- Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins des épices sélectionnées et leurs mélanges.
- Evaluation des activités antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire des épices sélectionnées et leurs mélanges.

- Effet du traitement thermique sur le contenu des épices en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins. Ainsi que sur les activités antioxydante et antimicrobienne.
- Recherche des synergies et d'antagonismes éventuels entre les épices en mélange binaires et équimolaires.
- Détermination des paramètres physico-chimiques et évaluation des activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) des huiles essentielles des épices étudiées.

# **MÉTHODOLOGIE DE TRAVAIL**

# Chapitre I. Méthodologie de travail

## 1. Enquête ethnobotanique


Afin de rechercher la fréquence, l'intérêt, le mode d'utilisation ainsi que la composition de base du mélange "Ras el hanout", nous nous sommes proposés à travers notre étude d'effectuer une enquête ethnobotanique au niveau des différentes ethnies de la région de Ouargla. Des fiches d'enquêtes comportant toutes ces informations sont distribuées à 200 personnes dont la presque totalité sont des femmes au foyer.

## 2. Investigation au niveau des herboristes





Le choix des épices pour l'étude est basé également sur une investigation effectuée au niveau de six herboristes dans la région de Ouargla de chez qui des échantillons de "Ras el hanout" ont été achetés et examinés, en insistant sur l'odeur forte et la couleur éclatante caractéristique de chaque épice. Les épices achetées sont bien nettoyées, lavées rapidement à l'eau distillée, séchées dans un endroit aéré à l'abri du soleil puis broyées grossièrement dans un moulin électrique.

Sur la base des investigations effectuées, notre choix s'est porté sur les épices communes aux différents mélanges "Ras El hanout" citées par les personnes questionnées et procurés au niveau des différents herboristes. Ainsi, la description botanique et taxonomique des épices retenues pour l'étude est consignée dans le tableau I.



**Tableau I : Classification et description botanique de différentes épices sélectionnées**

Epice	Classification	Description botanique et composition chimique
<b>Coriandre</b> 	<b>Règne</b> Plantae <b>Division</b> Tracheophyta <b>Classe</b> Magnoliopsida <b>Ordre</b> Apiales <b>Famille</b> Apiaceae <b>Genre</b> Coriandrum <b>Espèce</b> <i>Coriandrum sativum</i> L. (Peter <i>et al.</i> , 2006)	La coriandre est une plante herbacée annuelle, aromatique cultivée dans les zones tempérées du monde entier. Elle atteint une hauteur de 30 à 90 cm. Les feuilles sont vert clair et luisantes, les fleurs sont minuscules blanches, roses ou violettes, regroupées en ombelles. Les graines qui représentent la partie consommée comme épice, succédant aux fleurs, sont petites, sphériques et côtelées, parfumées avec une note poivrée (Grieve, 1971). La composition chimique des graines en g/100g est estimée à 12.37 de Protéines, 17.77 de lipide totale, 54.90 de carbohydrate, 41.9 de fibre, 0.709 de Ca <sup>++</sup> , 0.021 de vitamine C, 0.90 d'acides gras saturés, 15.33 d'acide gras insaturés (Charles, 2013).



<b>Cumin</b> 	<p><b>Règne</b> Plantae</p> <p><b>Division</b> Magnoliophyta</p> <p><b>Classe</b> Equisetopsida</p> <p><b>Ordre</b> Apiales</p> <p><b>Famille</b> Apiaceae</p> <p><b>Genre</b> <i>Cuminum</i></p> <p><b>Espèce</b> <i>Cuminum cyminum L.</i> (Quezel et Santa ,1963).</p>	<p>Le cumin est une petite plante herbacée annuelle prend son origine en Orient, d'une hauteur de 30 cm, à feuilles parfumées, finement divisées, ombelles de petites fleurs blanches ou roses (Bremness, 2002).</p> <p>Les graines fusiformes représentent la partie consommée comme épice, velu, strié variant du vert au gris-brun, d'une odeur aromatique et un goût épicé et amer (Vican, 2001). La composition chimique des graines en g/100g est estimé à 17.81 de protéines, 22.27 de lipides totales, 44.24 de carbohydrates, 10.5 de fibre, 0.931 de Ca<sup>++</sup>, 0.0077 de vitamine C, 1.27 en IU de vit A, 1.53 d'acides gras saturés, 17.31 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).</p>
<b>Carvi</b> 	<p><b>Règne</b> plantae</p> <p><b>Division</b> Magnoliophyta</p> <p><b>Classe</b> Magnoliopsida</p> <p><b>Ordre</b> Apiales</p> <p><b>Famille</b> Apiaceae (Umbelliferae)</p> <p><b>Genre</b> <i>Carum</i></p> <p><b>Espèce</b> <i>Carum carvi L.</i> (Paloma, 2012 ; Agrahari et Singh, 2014)</p>	<p>Le carvi est une plante herbacée bisannuelle, de 30-60 cm, à racine charnue, longuement pivotante en fuseau, tige sillonnée anguleuse, feuilles oblongues, bipennatiséquées, à lanières linéaires, Les graines représentent la partie utilisée comme épice sont des diakènes ovoïdes, légèrement arquées, de couleur brune ou brun-jaunâtre (Chevallier, 1997). La composition chimique des graines du carvi en g/100g est estimé à 19.77 de protéines, 14.59 de lipide totale, 49.90 de carbohydrates, 3.8 de fibre, 0.689 de Ca<sup>++</sup>, 0.021 de vitamine C, 0.62d'acides gras saturés, 10.39 d'acides gras insaturés Charles, 2013).</p>
<b>Gingembre</b> 	<p><b>Règne</b> Plantae</p> <p><b>Division</b> Tracheophyta</p> <p><b>Classe</b> Magnoliopsida</p> <p><b>Ordre</b> Zingiberales</p> <p><b>Famille</b> Zingibéraceae</p> <p><b>Genre</b> Zingiber</p> <p><b>Espèce</b> <i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Ghosh, 2011)</p>	<p>Le gingembre est une plante originaire d'Asie, vivace tropicale herbacée d'environ 0,9 m de haut issue d'un rhizome. Les feuilles persistantes sont lancéolées, bisériées, longues et odorantes. Les fleurs sont blanches et jaunes ponctuées de rouge sur les lèvres. Après la floraison, un court épi axillaire renfermant les graines noires enfermées dans des capsules trivalves apparaît au bout d'une tige couverte d'écailles. Le rhizome qui représente la partie consommée comme épice, d'un aspect fibreuse, granuleuse, beige pâle et sa chaire est jaune pâle juteuse d'odeur aromatique avec une saveur chaude et piquante (Ghosh, 2011). La composition chimique de rhizome de gingembre en g/100g est estimé à 8.98 protéines, 4.24 de lipides totales, 71.62 de carbohydrates, 14.1 de fibre, 0.114 de Ca<sup>++</sup>, vitamine C (0.007), 30 en UI de vitamine, d'acides gras 2.59 saturés, d'acides gras insaturés 1.39 (Charles, 2013).</p>
<b>Curcuma</b> 	<p><b>Règne</b> Plantae</p> <p><b>Division</b> Tracheophyta</p> <p><b>Classe</b> Magnoliopsida</p> <p><b>Ordre</b> Zingibérales</p>	<p>Le curcuma est une épice originaire du sud-est de l'Asie, c'est une plante herbacée, vivace pouvant atteindre un mètre de hauteur (Araujo et Leon, 2001).</p> <p>Le rhizome donne naissance à une tige portant à la base des gaines foliaires et de très grandes feuilles ; les rhizomes secondaires pouvant atteindre 15 mm d'épaisseur. Ces rhizomes qui représente la partie consommée, à odeur</p>

	<p><b>Famille</b> Zingiberaceae</p> <p><b>Genre</b> Curcuma</p> <p><b>Espèce</b> <i>Curcuma longa</i> L. (Wichtl et Anton, 2003)</p>	spécifique, aromatique et épicée et à saveur Chaude, âpre mais aromatique (Duvoix <i>et al.</i> , 2005). La composition chimique du rhizome en g/100g est estimé à 7.83 de protéines, 9.88 de lipides totales, 64.93 de carbohydrates, 21.1 de fibre, 0.183 de Ca <sup>++</sup> , 0.0 de vitamine C, 547 en IU de vitamine A, 1.39 d'acides gras saturés, 1.73 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).
<p><b>Anis vert</b></p> 	<p><b>Règne</b> Plantae</p> <p><b>Division</b> Magnoliophyta</p> <p><b>Classe</b> Equisetopsida</p> <p><b>Ordre</b> Apiales</p> <p><b>Famille</b> Apiaceae (ombellifère)</p> <p><b>Genre</b> Pimpinella</p> <p><b>Espèce</b> <i>Pimpinella anisum</i> L. (Yar Khan, 2012).</p>	L'anis vert est une plante herbacée cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles et ses graines aromatiques, il est originaire du pourtour méditerranéen et d'Afrique du Nord, elle s'est largement répandue par la culture dans les régions tempérées (John, 2003). Cette petite ombellifère annuelle de 30 à 40 cm de hauteur, porte des tiges dressées creuses, et des fleurs jaunes en ombelles qui donneront ces graines grises vertes et aromatiques représentant la partie utilisée comme épice (Rahim (Yar Khan, 2012). La composition chimique de ces graines en g/100g est estimé à 17.60 de protéines, 15.90 de lipides totales, 50.02 de carbohydrates, 14.60 de fibre, 0.646 de Ca <sup>++</sup> , 0.021 de vitamine C, 311 en IU de vitamine A, 0.586 d'acides gras saturés et 9.99 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).
<p><b>Fenouil</b></p> 	<p><b>Règne</b> plantae</p> <p><b>Division</b> Magnoliophyta</p> <p><b>Classe</b> Equisetopsida</p> <p><b>Ordre</b> Apiales</p> <p><b>Famille</b> Apiaceae</p> <p><b>Genre</b> <i>Foeniculum</i></p> <p><b>Espèce</b> <i>Foeniculum officinale</i> Mill. (Shamkant <i>et al.</i>, 2014)</p>	Le fenouil est une plante bisannuelle atteint 2 m de hauteur originaire du bassin méditerranéen (Jolad <i>et al.</i> , 2005). les feuilles filiformes, divisées en lanières étroites et allongées à goût aromatique, les fleurs sont jaunes réunies en ombelles au bout des tiges, elles donnent des graines vertes allongées, très parfumées qui représentent la partie consommée comme épice. (Shamkant <i>et al.</i> , 2014). La composition chimique des graine en g/100g est estimée à 15.80 de protéines, 14.87 de lipides totales, 52.29 de carbohydrates, 39.8 de fibre, 0.001 de Ca <sup>++</sup> , 0.021 de vitamine C, 135 en UI de vitamine A, 0.48 d'acides gras saturés et 11.6 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).
<p><b>Cannelle</b></p> 	<p><b>Règne</b> Plantae</p> <p><b>Division</b> Tracheophyta</p> <p><b>Classe</b> Magnoliopsida</p> <p><b>Ordre</b> Laurales</p> <p><b>Famille</b> Lauraceae</p> <p><b>Genre</b> Cinnamomum</p> <p><b>Espèce</b> <i>Cinnamomum cassia</i> L. (Vangalapati, 2012)</p>	La cannelle est la plus ancienne des épices connues, originaire du Sri-Lanka ou de Birmanie. Elle est issue du cannelier, arbre de 10 à 15m à l'état sauvage, ses feuilles sont simples et en hélice, les fleurs sont blanchâtres, régulières à six pétales et se présentent en grappes très ramifiées, les fruites se présentent en forme des baies. L'écorce intérieure du cannelier qui représente la partie consommée comme épice, se présente sous forme de petits tubes. Leur parfum est plus fort, piquant et moins sucré (Vangalapati, 2012). La composition chimique de la cannelle en g/100g est estimé à 3.99 de protéines, 1.24 de lipides totales, 80.59 de carbohydrates, 53.1 de fibre, 0,001 de Ca <sup>++</sup> , 0.0038 de vitamine C, 295 en IU de vitamine A, 0.345d'acides gras saturés et 0.29 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).

<b>Poivre noir</b> 	<b>Règne</b> Plantae <b>Division</b> Tracheophyta <b>Classe</b> Magnoliopsida <b>Ordre</b> Piperales <b>Famille</b> Piperaceae <b>Genre</b> Piper <b>Espèce</b> <i>Piper nigrum</i> L. (Meghwal et Goswami, 2012)	Le poivrier est une plante grimpante et vivace de 8-10m, ses tiges ligneuses et volubiles sont articulées rondes et lisses. Après fécondation, les fleurs se développent en baies à une graine chacune sont regroupées en épis retombants. Les baies vertes sont les fruits immatures de la plante, les grains de poivre noirs et blancs proviennent de la même plante, mais sont cueillis à des stades différents de la maturité (Meghwal et Goswami, 2012). La composition chimique des graines de poivre en g/100g est estimé à 10.39 de protéines, 3.26 de lipide totale, 63.95 de carbohydrate, 25.3 de fibre, 0.443 de Ca <sup>++</sup> , 0.0 de vitamine C, 547 en IU de vitamine A, 1.39 d'acides gras saturés et 1.73 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).
<b>Noix de muscade</b> 	<b>Règne</b> Plantae <b>Division</b> Tracheophyta <b>Classe</b> Magnoliopsida <b>Ordre</b> Magnoliales <b>Famille</b> Myristicaceae <b>Genre</b> Myristica <b>Espèce</b> <i>Myristica fragrans</i> Houtt. (Parthasarathy <i>et al.</i> , 2008).	Le muscadier est un arbre vivace atteint jusqu'à 15 m de hauteur, ses branches sont nombreuses, étalées, dont l'écorce est brune grisâtre, de la famille des myristicacées qui est une famille de plantes dicotylédones que l'on trouve dans les pays chauds et humides tels l'Indonésie et Ceylan. Les fleurs se développent en fruit rond, jaune pâle strié de rouge et vert à la taille d'un abricot. Il est composé de 4 couches : la chair du fruit qui est pâle, l'arille (le macis) rouge, la coque (noir intense) et enfin l'amande qui est la noix de muscade et représente la partie utilisée (Parthasarathy <i>et al.</i> , 2008). La composition chimique de la noix en g/100g est estimé à 5.84 de protéines, 136.319 de lipides totales, 49.29 de carbohydrate, 3.8 de fibre, 0.184 de Ca <sup>++</sup> , 0.003 de vitamine C, 102 en UI de vitamine A,  25.94 d'acides gras saturés, 3.57 d'acides gras insaturés (Charles, 2013).

### 3. Obtention, traitements et caractérisation des extraits bruts des épices étudiées

#### 3. 1. Obtention des extraits bruts

Les extraits bruts des épices étudiées sont obtenus par macération selon la méthode de Motamed et Naghibi (2010). Le principe d'extraction repose sur un simple contact entre le support solide et le solvant (Penchev, 2010).

Pour se faire, les poudres des épices étudiées sont mises à macérer pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange méthanol-eau (80:20 V/V). le méthanol est le solvant approprié, il permet une haute récupération de polyphénols, surtout les flavonoïdes aglycones (Falleh *et al.*, 2008). L'eau extrait particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins (Marston et Hostettmann, 2006). L'extraction est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macéras sont réunis et filtrés sur

papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapeur (Heidolf). Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation, le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée, permettant donc une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite, évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés (Penchev, 2010). Les extraits secs obtenus sont conservés hermétiquement au frais jusqu'à leur utilisation.

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé *via* l'équation:

$$R(\%) = (Me / Mv) \times 100$$

**R(%)** : Rendement en %.

**Me** : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

**Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (Harborne, 1998).

### 3.2. Traitement thermique des extraits

L'effet de la température sur le contenu des épices en métabolites et leurs activités biologiques fait partie de notre objectif. L'extrait brut méthanolique de chaque épice ainsi que les mélanges sont déposés dans des tubes à essai non complètement fermés, le niveau de l'extrait est repéré par des bandes adhésives pour vérifier une éventuelle évaporation. Les tubes sont portés à ébullition à 200°C pendant des durées différentes, 30, 60, 90 et 120 minute (photos 01). Une fraction non traitée pour chaque épice sert de témoin.



**Photos 01** : Traitement thermique des extraits.



### 3.3. Préparation des mélanges binaires et équimoléculaires

Des mélanges binaires et équimolaires sont préparés afin de mettre en évidence l'effet de l'association des épices sur les teneurs en métabolites secondaires et les activités biologiques.

Pour la détermination des contenus des mélanges en métabolites et à l'étude de l'activité antioxydante, les extraits secs des épices sont solubilisés dans du méthanol. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de ces épices est réalisée à partir des extraits secs solubilisés dans le DMSO. Les différentes épices ont permis d'aboutir à quarante-cinq (45) combinaisons binaires possibles (Tableau II).

**Tableau II : Mélanges binaires et équimolaires des épices étudiées.**

	CO	N	CR	P	FE	CU	CA	CN	G	A
Coriandre (CO)										
Noix de muscade (N)	CO/N									
Curcuma (CR)	CO/CR	N/CR								
Poivre noire (P)	CO/P	N/P	CR/P							
Fenouil (FE)	CO/FE	N/FE	CR/FE	P/FE						
Cumin (CU)	CO/CU	N/CU	CR/CU	P/CU	FE/CU					
Carvi (CA)	CO/CA	N/CA	CR/CA	P/CA	FE/CA	CU/CA				
Cannelle (CN)	CO/CN	N/CN	CR/CN	P/CN	FE/CN	CU/CN	CA/CN			
Gingembre (G)	CO/G	N/G	CR/G	P/G	FE/G	CU/G	CA/G	CN/GI		
Anis vert (A)	CO/A	N/A	CR/A	P/A	FE/A	CU/A	CA/A	CN/A	GI/A	

Pour mettre en évidence les éventuels synergismes ou antagonismes donnés par les mélanges binaires et équimolaires des épices, un facteur nommé **effet synergique (ES)** est calculé d'après la méthode décrite par Payrat-Maillard *et al.*, (2003) avec certaines modifications.

L'effet synergique des épices en mélanges, concernant les teneurs en métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes ou tanins) est calculé *via* la formule :

$$ES = [\text{métabolite du mélanges}]_{\text{exp}} \times 2 / \sum [\text{métabolite}]_{\text{cal}}$$

$[\text{métabolite du mélanges}]_{\text{exp}}$ : La concentration du mélange binaire et équimolaire en métabolites donnée expérimentalement

$\sum [\text{métabolites}]_{\text{cal}}$ : La somme calculée des concentrations en métabolites des extraits constitutifs du mélange

L'effet synergique des mélanges sur l'activité antimicrobienne est calculé *via* la formule:

$$ES = (\text{DI du mélange})_{\text{exp}} \times 2 / \sum (\text{DI})_{\text{cal}}$$

$(\text{DI du mélange})_{\text{exp}}$ : Diamètre d'inhibition du mélange binaire et équimolaire donné expérimentalement.

$\sum (\text{DI})_{\text{cal}}$ : La somme calculée des diamètres d'inhibitions obtenus avec les extraits constitutifs du mélange.

L'effet synergique des mélanges sur l'activité antioxydante est calculé *via* la formule :

$$ES = (\text{EC}_{50} \text{ du mélange})_{\text{exp}} \times 2 / \sum (\text{EC}_{50})_{\text{cal}}$$

$(\text{EC}_{50} \text{ du mélange})_{\text{exp}}$ :  $\text{EC}_{50}$  du mélange donnée expérimentalement.

$\sum (\text{EC}_{50})_{\text{cal}}$ : la somme calculée des  $\text{EC}_{50}$  des extraits constitutifs du mélange.

D'après les ES calculés on peut déterminer l'effet du mélange sur les teneurs en métabolites et sur les activités antimicrobienne et antioxydante. En effet,

si ES (ou  $\text{ES}^{-1}$  pour l'activité antioxydante)  $> 1$ , il s'agit d'un effet synergique ;

si ES (ou  $\text{ES}^{-1}$  pour l'activité antioxydante)  $< 1$ , il s'agit d'un effet antagonique ;

si ES (ou  $\text{ES}^{-1}$  pour l'activité antioxydante)  $= 1$ , il s'agit d'un effet d'indifférence (ni synergie ni antagonisme).

### 3.4. Criblage phytochimique des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

D'après Azzi (2013), le criblage phytochimique représente des tests qualitatifs qui permettent la caractérisation des différents groupes chimiques (Alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides...) contenus dans un organe végétal.

Dans notre étude, le criblage est réalisé sur des extraits fractionnés afin de faciliter l'identification des différentes molécules présentes dans chaque extrait par chromatographie sur couche mince (CCM), une technique appréciée en phytochimie car elle fournit une empreinte chromatographique des extraits étudiés (Sine, 2003).

#### **3.4.1. Fractionnement des extraits par extraction liquide-liquide**

Le fractionnement des extraits bruts s'effectue selon la méthode de Markham (1982). Il s'agit d'une extraction liquide-liquide par des solvants de polarité croissante permettant le partage des molécules selon leurs propriétés physicochimiques entre deux phases liquides immiscibles appelées solvant, et retenues pour leurs capacité à extraire sélectivement l'un des éléments du mélange (Robert et *al.*, 1997).

L'extraction a été réalisée successivement par quatre solvants. L'extrait brut est initialement dissout dans de l'eau tiède, puis une quantité équivalente d'hexane est ajoutée. Après décantation, la phase organique est récupérée et la phase aqueuse est soumise aux autres fractionnements par le chloroforme puis l'acétate d'éthyle puis le n-butanol, en suivant les mêmes étapes. En conséquence, les fractions butanolique, chloroformique, acétate d'éthyle, et butanolique sont obtenues.

#### **3.4.2. Caractérisation des différentes fractions par CCM**

La CCM repose principalement sur la distribution des substances à séparer entre deux phases. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire solide fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi solide de matière plastique ou d'aluminium. Selon leur affinité, les substances en solution sont plus ou moins retenues par la phase stationnaire par le phénomène d'adsorption.

Après avoir déposé puis séché les échantillons sur des points repérés à environ 2 cm du bord inférieur de la plaque, cette dernière est introduite dans une cuve de migration dont l'enceinte est préalablement saturée. L'éluant monte à travers la phase

stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front de solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile (Sine, 2003).

Des révélateurs spécifiques aux différents métabolites sont appliqués après la séparation, indiquant directement la présence ou non de ces molécules. La révélation des plaques est effectuée chimiquement par des révélateurs, et par les radiations UV à deux longueurs d'onde (254 et 366 nm). Ce qui permet de délimiter les spots colorés correspondant à certains composés (Marston et Hostettmann, 2006).

#### 4.4.3. Conditions opératoires

Dans la présente étude, les échantillons sont analysés en utilisant des plaques commerciales prêtes à l'emploi, de gel de silice 60F 254, sur feuille d'aluminium (20x20 cm).

Quatre systèmes de solvant ont été utilisés, selon les différentes fractions, et pour chacune une de celles-ci, plusieurs plaques ont été développées afin de les révéler différemment.

La fraction hexanique est éluée par le système : nbutanol / acétate d'éthyle (8/1,9; v/v) et révélée par :

- **Le réactif de Godin**, composé de vanilline sulfurique (1%) dans un mélange acide sulfurique concentré / éthanol à 95% (2ml : 98ml). Après pulvérisation, la plaque est chauffée à l'étuve à 110°C pendant quelques minutes.

- **Le réactif de Libermann-Buchard**, préparé à basse température par un mélange de 5ml d'anhydride acétique, 5ml d'acide sulfurique concentré et 50ml d'éthanol (Ladyguina *et al.*, 1983 ; Bruneton. 1999 ; Mamyrbekova-Bekro *et al.*, 2013).

La fraction chloroformique est éluée par le système cyclohexane/acétate d'éthyle (10/8 ; v/v) et révélée par :

- **Le réactif de carr-price** composé de 4g de trichlorure d'antimoine  $SbCl_3$  solubilisé dans 20 ml de méthanol.

- **Le réactif de drangeroff**, composé d'un mélange équimolaire de deux solutions A et B (A est composée de 0.85g de nitrate basique de bismuth, 10g d'acide tartrique dissous dans 10ml d'eau distillée. B est composée de 16g d'iodure de potassium dissous dans 40 ml d'eau distillée).



- **La solution de KOH à 1%** dans l'éthanol.
- **L'ammoniaque (NH<sub>3</sub>)** (Ladyguina *et al.*, 1983 ; Georgievskii, 1990 ;

Mamyrbekova-Bekro *et al.*, 2013).

La fraction d'acétate d'éthyle est éluée par le système : acétate d'éthyle / chloroforme / acétone (8/7/0.5;v/v/v) et révélée par :

- **L'ammoniaque (NH<sub>3</sub>)**.
- **La solution de KOH à 1%** dans l'éthanol.
- **La solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 1%** dans l'éthanol

(Ladyguina *et al.*, 1983 ; Georgievskii, 1990 ; Mamyrbekova-Bekro *et al.*, 2013).

La fraction n-butanolique est éluée par le système : toluène/acétone/acide formique (3/5/1 ; v/v/v) et révélée par

- **La solution de trichlorure d'aluminium(AlCl<sub>3</sub>) à 1%** dans l'éthanol.
- **Le révélateur de carr-price (Sbcl<sub>3</sub>)**.
- **La solution de trichlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) à 10%** dans le méthanol

(Mamyrbekova-Bekro *et al.*, 2013)

#### 4.4.4. Expression des résultats

Après migration et révélation, chaque spot est caractérisé par sa fluorescence sous UV, sa coloration après la révélation et son facteur de rétention (**R<sub>f</sub>**), ceci est calculé *via* l'équation **R<sub>f</sub> = d/D**

**d** : Distance parcourue par le constituant.

**D** : Distance parcourue par le front de l'éluant.

### 3.5. Dosage quantitatif des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton et Rossi (1965).

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par 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 lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux, cette coloration possède un maximum d'absorption à 765 nm.

Le test est réalisé selon le protocole décrit par Li *et al.* (2007). Un volume de 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) est ajouté à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué dans l'eau distillée. Les solutions sont mélangées et incubées pendant 4 minutes. Puis, 800 µl de la solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 75g/l) est ajoutée. Le mélange final est agité puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre (HACH DR5000) à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec le standard acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons étudiés. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES) (Wong *et al.*, 2006).

### **3.6. Dosage quantitatif des flavonoïdes**

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) cité par Bahorun (1996) et Djeridane *et al.*, (2006) est adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

Le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes (OH) des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm. Pour réaliser le test, 1 ml d'extrait ou de standard, dilué dans le méthanol est ajouté à un volume égal d'une solution de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à raison de 2% dans le méthanol. Le mélange est vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm est lue dans un spectrophotomètre (HACH DR5000) après 10 minutes d'incubation à température ambiante.

Une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par le standard quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons testés permet la quantification des flavonoïdes. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g ES).

### **3.7. Dosage des tanins**

#### **3.7.1. Dosage des tanins condensés**

Le dosage des tanins condensés est réalisé suivant la méthode de Swain et Hillis (1956), basée sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Le test est réalisé en mélangeant 1 ml d'extrait dilué dans le méthanol avec 2 ml d'une solution préparée par la vanilline à 1% dans l'acide sulfurique à 70%. Le mélange est vigoureusement agité, incubé au bain Marie à 20°C pendant 15 minutes puis lu à 500 nm dans un spectrophotomètre HACH DR 5000.

La quantification des tanins condensés est rendue possible grâce à une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par le standard cyanidine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent cyanidine par gramme d'extrait sec (mg EC/g ES).

### **3.7.2. Dosage des tanins hydrolysables**

Le dosage des tanins hydrolysables est réalisé par la méthode de Mole et Watrman (1987), basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif chlorure ferrique provoque la coloration rouge-violet du complexe, d'où la formation des ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Pour se faire, 1 ml de l'extrait est ajouté à 3.5 ml d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  0.01M dans l'HCl 0.001M (V/V). Le mélange est vigoureusement agité et la densité optique est lue à 660 nm au spectrophotomètre (HACH DR 5000).

La teneur des extraits en tanins hydrolysables est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions expérimentales que les échantillons testés. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

## **4. Extraction et caractérisation des huiles essentielles**

### **4.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation**

L'hydrodistillation est la méthode la plus recommandée pour extraire les huiles essentielles des produits végétaux. C'est une technique basée sur le changement d'état liquide-vapeur des espèces chimiques.

Le principe de la méthode consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau en immergeant directement le matériel végétal à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon (Sans pour autant remplir le ballon, pour éviter le débordement à l'ébullition). Les vapeurs chargées d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité (Photo 2) (Hajji *et al.*, 1984).

Les huiles essentielles recueillies sont conservées à basse température dans des flacons en verre bruns afin d'éviter leur dégradation.



**Photos 2 :** Dispositif d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Le rendement d'extraction des huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal traité (Belyagoubi, 2006). Ce rendement est calculé *via* l'équation :

$$R_{HE} \% = m_{HE} / m_S \times 100$$

**R<sub>HE</sub> % :** Rendement d'extraction en %

**m<sub>HE</sub> :** masse d'huile récupérée exprimée en gramme.

**m<sub>S</sub> :** masse de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en gramme.

#### **4.2. Détermination des indices physico-chimiques des huiles essentielles**

De nos jours, les propriétés physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire) et chimiques (indice d'acide, indice d'iode, Indice de saponification...etc.) sont exigées pour l'évaluation commerciale des huiles essentielles. Ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire sa qualité et ses critères. Les

méthodes utilisées sont déterminées selon un protocole précis qui obéi à des normes publiées par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000), elles-mêmes identiques aux normes internationales de l'Organisation International de Normalisation (ISO, 1998).

#### **4.2.1. Détermination des indices physiques**

##### **4.2.1.1. Densité à 20°C**

La densité de l'huile essentielle est déterminée par le rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence et la masse du même volume d'eau distillée pris à 20°C. La mesure est effectuée à l'aide d'un densimètre électronique.

La densité à 20°C est calculée par la formule

$$d^{20} = dt + (t - 20) \times 0.00068$$

**dt** : densité à la température ambiante

**t** : température ambiante

**d<sup>20</sup>** : densité à 20°C

##### **4.2.1.2. Indice de réfraction**

L'indice de réfraction est le sinus de l'angle d'incidence de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante 20°C.

Les indices de réfraction des huiles essentielles sont déterminés dans l'intervalle de 1,300 à 1,700. Sa mesure est mentionnée avec 3 ou 4 chiffres après la virgule. L'appareil le plus couramment utilisé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre d'Abbe qui est préalablement étalonner à l'eau distillée dont l'indice de réfraction est connu ( $I_{r(eau)} = 1,335$ ) à 20°C. Les prismes sont ensuite séchés et quelques gouttes d'HE sont déposées entre les deux faces des prismes. A l'aide de l'oculaire et le bouton de réglage, l'interface entre la zone sombre et éclairée est amenée au centre du réticule. Les irisations sont supprimées pour obtenir une ligne nette entre les deux zones puis la valeur de l'indice est notée par l'échelle de lecture. On effectue la correction à 20°C par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0.00045 (t - 20^\circ C)$$

**I<sub>20</sub>** : Indice à 20°C.

**I<sub>t</sub>** : Indice à la température ambiante ou de mesure.

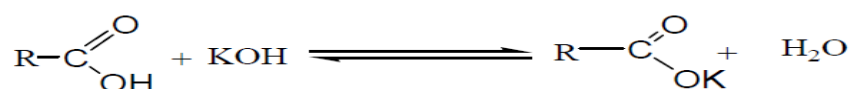
**T** : température ambiante.

## 4.2.2. Détermination des indices chimiques

### 4.2.2.1. Indice d'acide ( $I_a$ )

La teneur en acides gras libres d'une HE s'exprime par l'indice d'acide ( $I_a$ ) qui représente le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres renfermés dans un gramme d'HE.

La neutralisation d'un monoacide par la potasse se traduit par la réaction chimique suivante :



Pour se faire, 0.125g d'HE est ajouté à 2,5ml d'éthanol à 96% puis 2 gouttes d'indicateur coloré, phénolphthaléine sont additionnées. L'ensemble est introduit dans un erlenmeyer et titré par une solution éthanolique de potasse (KOH) 0,1N jusqu'au virement de la couleur au rose.

L'indice d'acide ( $I_a$ ) est déterminé par la formule :

$$I_a = \frac{5,61 \times v\text{KOH} (0,1 \text{ N})}{m\text{H.E}}$$

$v\text{KOH}$  : volume de KOH

$m \text{ H.E}$  : masse de l'huile essentielle

### 4.2.2.2. Indice de saponification ( $I_s$ )

L'indice de saponification représente la quantité de potasse (KOH) ou de la soude (NaOH) en mg, nécessaire pour saponifier un gramme d'huile essentielle.

La réalisation de ce test se fait en introduisant 0.25g d'H.E et 5 ml de potasse alcoolique (0.5 N) dans un Erlenmeyer de 500 ml. Le mélange est chauffé au bain Marie pendant 30 minutes. Après refroidissement, 10 ml d'eau distillée et 5 ml de potasse alcoolique 0.5N sont ajoutés puis le mélange est remis au bain Marie pendant une demi-heure. Après refroidissement, trois (03) gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées et la solution savonneuse est titrée par l'HCl (0,5N). Parallèlement, dans une autre Erlenmeyer, qui servira de témoin, les mêmes étapes sont réalisées mais en absence de l'huile essentielle.

L'indice de saponification  $I_s$  est déterminé par la formule :

$$I_s = \frac{(V_0 - V_1) \times M \times N \times F}{m}$$

$V_0$  : volume en ml de la solution d'HCl à 0.5 N utilisée pour le témoin.

$V_1$  : volume en ml de la solution d'HCl à 0.5 N utilisée pour la prise d'essai.

$M$  : masse molaire de KOH (56,11 g/mole).

$N$  : normalité de la solution de potasse (0.5 N).

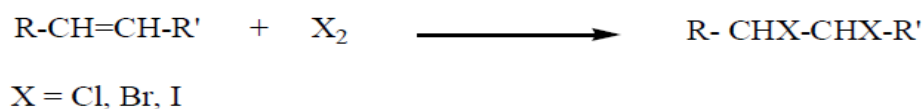
$F$  : facteur de correction de la normalité de la solution de potasse.

$m$  : masse de la prise d'essai.

#### 4.2.2.3. Indice d'iode ( $I_i$ )

L'indice d'iode est le nombre de gramme d'iode que peuvent fixer les doubles liaisons de 100 g d'une substance. Quel que soit le réactif halogène utilisé, le principe est le même.

Les liaisons éthyléniques fixent les halogènes d'après la réaction suivante :



Pour la détermination de cet indice, une prise d'essai de 0.20g d'huile est introduite dans une fiole de 500 ml et mélangé avec 10ml de chloroforme pour dissoudre l'huile et 20ml d'halogénure d'iode. La fiole bouchée et agitée est placée dans un endroit sombre pendant une heure. Après ce temps d'incubation, 15ml de la solution d'iodure de potassium et 100 ml d'eau sont ajoutés. Le mélange est titré par la solution de thiosulfate de sodium (0.1N) en présence d'empois d'amidon jusqu'à ce que la couleur jaune due à l'iode ait pratiquement disparu. La dernière étape consiste à rajouter quelques gouttes de la solution d'amidon en poursuivant le titrage avec l'agitation vigoureux du contenu jusqu'au moment où la couleur bleue disparaît. Un essai à blanc en suivant les mêmes étapes mais sans la prise d'essai, est préparé en parallèle.

L'indice d'iode est exprimé *via* l'équation :

$$I_i = [12,96.C (V_1 - V_2)] / m$$

$C$  : concentration, en moles par litre, de la solution de thiosulfate de sodium utilisée.

**V1** : volume en ml de la solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) utilisée pour l'essai à blanc.

**V2** : volume, en ml, de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour la détermination.

**m** : masse en gramme de la prise d'essai.

## **5. Evaluation des activités biologiques des épices**

### **5.1. Evaluation de l'activité antioxydante**

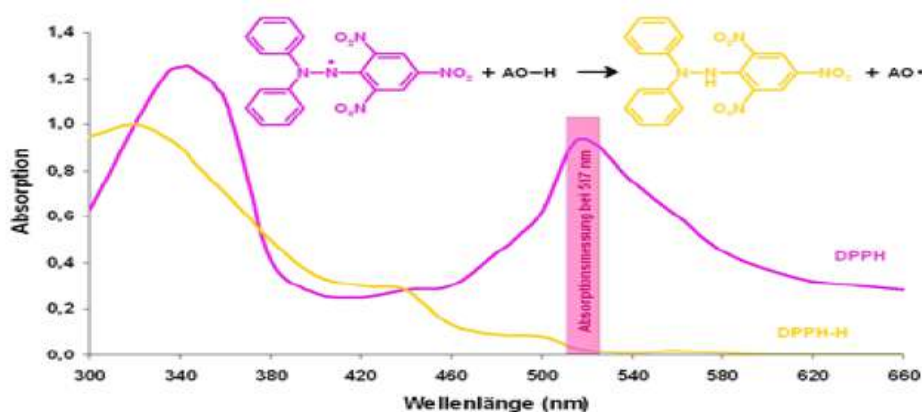
#### **5.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH**

La méthode DPPH•, simple, fortement sensible et rapide est employée pour évaluer l'activité antiradicalaire dans une durée relativement brève. Presque 90% des études sur l'activité antioxydante utilisent cette méthode (Kulisic *et al.*, 2004 ; Moon et Shibamoto, 2009).

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant pourrait être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515 nm provoquée par la présence des extraits.

Le DPPH, initialement violé, se décolore lorsque son électron célibataire est apparié. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. le radical stable DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) coloré en jaune avec perte de son absorbance caractéristique à 515 nm (Fig. 1) (Villano *et al.*, 2007). Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu méthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants.





**Figure 1 :** Piégeage du radical libre DPPH• (Villano *et al.*, 2007).

Le test DPPH est réalisé suivant la procédure décrite par Sanchez-Moreno (1998). Un volume de 50 µl d'extrait à différentes concentrations est ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0,024 g/l) fraîchement préparée. Un contrôle négatif est préparé en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH. Le témoin positif utilisé est l'acide ascorbique. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (HACH DR 5000).

Pour exprimer les résultats, des pourcentages d'inhibition sont calculés par la formule :

$$I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100$$

**Ac:** absorbance à 515 nm du contrôle négatif.

**At:** absorbance à 515 nm de l'extrait testé.

#### 5.1.1.1. Calcul des concentrations efficaces EC<sub>50</sub>

Les pourcentages du DPPH résiduels en fonction des concentrations des extraits et leurs mélanges, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de DPPH initiale de 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace (EC<sub>50</sub>) ou concentration inhibitrice (IC<sub>50</sub>) (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999). Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées. Elle est exprimée en milligramme d'extrait par gramme de DPPH (Prakash *et al.*, 2007 ; Sanchez-Moreno *et al.*, 1999).

### **5.1.2. Test de réduction du fer (FRAP : *Ferric reducing antioxidant power*)**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet, le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Le pouvoir réducteur est déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). Un volume de 2.5 ml de différentes concentrations de chaque extrait dilué dans le méthanol est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 7.4) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%), 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml  $\text{FeCl}_3$  0,1%) sont additionnés au milieu réactionnel. L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

Pour explorer les résultats obtenus, les courbes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations sont tracées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

## **5.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

Comme pour l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne a été évaluée sur les extraits de dix épices et leurs mélanges binaires et équimolaires, les extraits traités thermiquement ainsi que sur les huiles essentielles.



L'activité antimicrobienne est déterminée *via* des aromatogrammes qui imite le principe de l'antibiogramme, couramment utilisé en bactériologie médicale. Ce principe est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien en milieu gélosé. Cette technique se caractérise par sa simplicité et son efficacité dans la détermination de la sensibilité ou la résistance d'un microbe *vis-à-vis* d'un extrait.



### **5.2.1. Présentation des souches microbiennes testées**

Quatre souches de référence ATCC (American Type Culture Collection), ont été testées.

Ces souches sont classés comme pathogènes et « food borne bacterial pathogens », signifiant des bactéries pathogènes qui infectent les denrées alimentaires. La taxonomie et les caractéristiques de chaque souche sont rapportées dans le tableau III.

**Tableau III : Taxonomie et caractéristiques des souches microbiennes testées**

Aspect microscopique de la souche	Taxonomie	Caractéristiques
<b><i>Escherichia coli</i></b> <b>(ATCC 25622)</b> 	<b>Règne</b> Bacteria <b>Classe</b> Gamma Proteobacteria <b>Ordre</b> Enterobacteriales <b>Famille</b> Enterobacteriaceae <b>Genre</b> Escherichia <b>Espèce</b> <i>Escherichia coli</i> (Kaper, 2004).	<b><i>Escherichia coli</i></b> est l'espèce type des entérobactéries. Cette espèce qui fait l'objet d'un très grand nombre d'étude constitue le modèle des bacilles à gram négatif aérobies. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, allongées et à bords réguliers (Joly et Reynaud, 2002). C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. Elle est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Berche, 2003).
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> <b>(ATCC 27853)</b> 	<b>Règne</b> Bacteria <b>Classe</b> Gammaproteobacteria <b>Ordre</b> Pseudomonadales <b>Famille</b> Pseudomonadaceae <b>Genre</b> Pseudomonas <b>Espèce</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Delarras, 2007)	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> , autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie gram-négative du genre <i>Pseudomonas</i> . Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries de Gram négatif de plus en plus souvent responsables d'infection nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50% chez les patients vulnérables (immunodéprimés) (Delarras, 2007; Meyer et Zimmerman, 1993).
		Les <i>staphylocoques</i> sont des cocci de Gram positif qui tendent à se grouper en amas irréguliers à la façon d'une

<p><i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</p> 	<p><b>Règne</b> Bacteria  <b>Division</b> Firmicutes  <b>Classe</b> Bacilli  <b>Ordre</b> Bacillales  <b>Famille</b> Staphylococcaceae  <b>Genre</b> Staphylococcus  <b>Espèce</b> <i>Staphylococcus aureus</i> (Leclerc, 1995).</p>	<p>grappe de raisin. <i>Staphylococcus aureus</i> est un germe aérobic-anaérobic facultatif. Il doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales et possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de <i>staphylocoques</i> (Singh <i>et al.</i>, 2007).</p>
<p><i>Candida</i></p>  <p><i>Candida albicans</i></p>	<p><b>Règne</b> Fungi  <b>Division</b> Ascomycota  <b>Classe</b> Saccharomycetes  <b>Ordre</b> Saccharomycetales  <b>Famille</b> Saccharomycetaceae  <b>Genre</b> Candida  <b>Espèce</b> <i>Candida albicans</i> (Moulinier, 2003).</p>	<p>La levure <i>C. albicans</i> est naturellement présente chez l'être humain dans la bouche, le tube digestif et les voies génitales. Elle n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme particulier. C'est un organisme commensal saprophyte. Toutefois, lorsque les fonctions immunitaires de l'organisme baissent (traitements immunodépresseurs, patients infectés par le V.I.H.), elle se multiplie et devient pathogène. Elle provoque alors des infections fongiques (candidoses) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique (Laverdière, 2006).</p>

### 5.2.2. Milieux de cultures utilisés

Pour tester l'effet de nos extraits et HE sur les différentes souches microbiennes, trois milieux de cultures ont été utilisés, la gélose nutritive pour l'isolement des bactéries et de la levure *Candida albicans*, le milieu de Mueller Hinton pour la réalisation des aromatoigrammes des bactéries et le milieu de Sabouraud pour les aromatoigrammes de la levure.

### 5.2.3. Réalisation des aromatoigrammes

La réalisation des aromatoigrammes passe par plusieurs étapes. En premier lieu, une suspension bactérienne dans l'eau physiologique d'une opacité de 0.5 Mc Farland ( $10^6$  à  $10^8$  UFC /ml (unités formant colonie /ml) est préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure). Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 à 0.1 est lue à 600 nm. L'inoculum sert à ensemercer le milieu de Mueller Hinton et de Sabouraud coulés dans des boîtes de Pétri avec une épaisseur de 4 mm correspondant à 20 ml pour les boîtes de 90 mm de diamètre. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 37°C avant leur emploi.

L'ensemencement est effectué par inondation, en tournant les boîtes légèrement pour assurer une distribution homogène de l'inoculum. L'excès de la suspension est aspiré à l'aide d'un écouvillon de coton stérile.

La dernière étape consiste, dans des conditions aseptiques, à déposer à l'aide d'une pince des disques de 6mm de diamètre (en papier Wathman N°03) imbibés d'environ 10µl de l'échantillon à tester (dilués dans le diméthyl sulfoxide : DMSO) à la surface de la gélose préalablement ensemencée. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure à 37°C.

Après incubation, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, dont le diamètre dit d'inhibition est mesuré en mm à l'aide d'une règle ou d'un pied de coulisse (Baser et Buchbauer, 2010). Ce diamètre est proportionnel à l'activité antimicrobienne de l'échantillon sur le germe testé (Guerin et Carret, 1999). La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur à 8 mm. Le germe est sensible pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, très sensible pour un diamètre entre 14 et 20 mm et pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm, le germe est extrêmement sensible (Durauffourd *et al.*, 1990)

#### **5.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24<sup>H</sup>. La CMI explore donc seulement l'effet bactériostatique, ce qui n'est pas limitatif sachant qu'en bactériologie clinique, le but le plus souvent recherché est l'inhibition de la prolifération bactérienne, dans la mesure où l'organisme est capable de se défendre contre les bactéries (Mann et Markham, 1998). La CMI est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible.

La méthode par dilution successive en milieu solide qui est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité microbienne aux extraits et HE est adoptée.

### **5.3. Evaluation de l'activité anti inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire des extraits est évaluée *in vitro* via la méthode basée sur la déstabilisation des membranes des globules rouges induite par la chaleur.

Pour réaliser ce test, le sang de volontaires jugés sains est collecté sur des tubes héparinés puis centrifugé à 3000 rpm et lavé 03 fois avec un volume égal d'eau physiologique (0.9 % de NaCl). Le volume du culot après lavage est mesuré et reconstitué en suspension à 10 % dans de l'eau physiologique (Sadique *et al.*, 1989 ; Shinde *et al.*, 1999 ; Oyedapo, 2010).

Un volume de 1ml de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1ml de suspension des globules rouges. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en substituant l'extrait par l'eau physiologique et le témoin positif est réalisé en présence d'un anti inflammatoire, le diclofénac. Après incubation pendant 30 min à 56°C, les tubes sont centrifugés 5min à 2500 rpm. L'absorbance des surnagent est effectuée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (HACH DR 5000).

Les pourcentages d'inhibition sont calculés par la formule :

$$I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100$$

**Ac:** absorbance du contrôle négatif

**At:** absorbance de l'extrait testé (Shinde *et al.*, 1999 ; Oyedapo, 2010).

## 6. Analyses statistiques

Les résultats des analyses biochimiques sont illustrés comme étant les valeurs moyennes de trois mesures indépendantes accompagnées de l'écart type. Les données des expériences ont été analysées en utilisant Excel (Microsoft Inc.) et IBM SPSS Statistics logiciel version 21.0. L'analyse de corrélation entre les différents paramètres étudiés a été réalisée par le coefficient de corrélation de Pearson, "r". Une valeur de P <0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences significatives entre les échantillons ont été analysées en utilisant l'analyse de variance (ANOVA).

# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

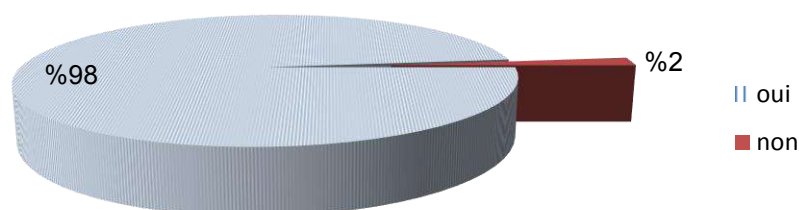
## Chapitre II. Résultats et discussions

### 1. Enquête ethnobotanique

L'enquête ethnobotanique menée auprès de la population de la région de Ouargla a révélé une multitude d'informations sur la fréquence d'utilisation de "Ras el hanout", le mode d'utilisation, les épices constitutives ainsi que les effets thérapeutiques.

#### 1.1. Fréquence d'utilisation de "Ras el hanout"

La fréquence d'utilisation du mélange d'épices "Ras el hanout" est consignée dans la figure 3.



**Figure 3 : Fréquence d'utilisation du mélange "Ras el hanout"**

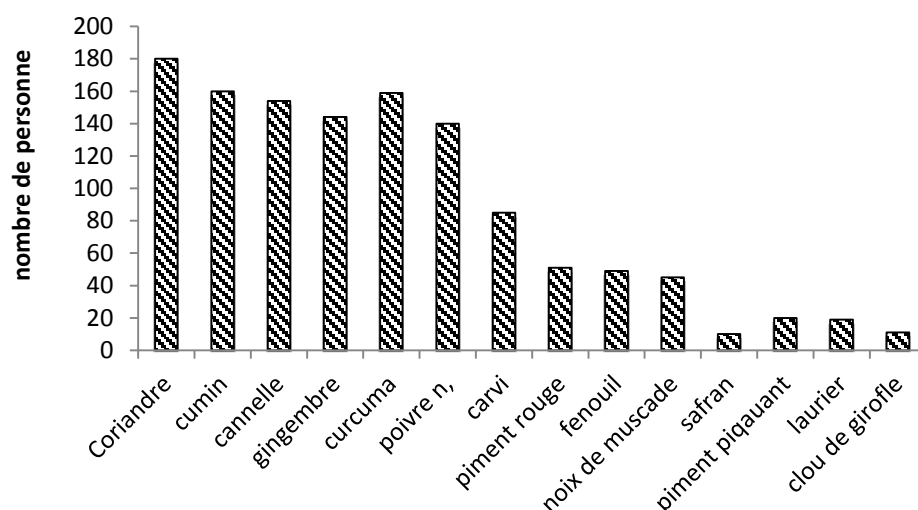
D'après l'enquête entreprise auprès de 200 personnes, 98% affirment utiliser le mélange d'épices « Ras el hanout » et seulement 2% signalent son non utilisation (Fig. 3).

L'enquête ethnobotanique indique, à partir de la fréquence d'utilisation, que le mélange "Ras el hanout" constitue un patrimoine précieux pour la gastronomie Ouarglie. Il apparaît au fil de cette enquête, que le mélange est utilisé pour satisfaire la qualité gustative des plats, précisément les plats traditionnels, mais également et pour la plupart des questionnés, le mélange d'épices représente une ressource naturelle possédant des propriétés thérapeutiques importantes.



## 1.2. Principales épices constitutives de "Ras el hanout"

Le mélange "Ras el hanout" est constitué de plusieurs épices. L'importance donnée à chaque épice dépend du nombre de fois qu'elle a été citée par les personnes questionnées (Fig.4).



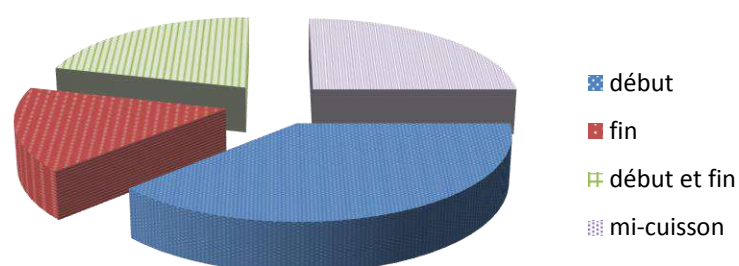
**Figure 4 : Importance des différentes épices dans la préparation de "Ras el hanout"**

Parmi les constituants de ce mélange, la coriandre est de loin l'épice la plus citée. En effet, 180 personnes sur les 200 questionnées l'ont signalé dans la préparation de "Ras el hanout". Le cumin, la cannelle, le gingembre, le curcuma et le poivre noir sont aussi largement cités par les personnes concernées par notre enquête. Un nombre important de personnes (140 à 160) les ont cités (Fig. 4). Le carvi (85), le poivron rouge (51), le fenouil (49) et la noix de muscade (45) sont moins cités. Les épices les plus faiblement citées sont le safran, le piment, laurier et le clou de girofle. Le nombre de personnes les ayant cités ne dépassant pas les 20 personnes.

Il a été rapporté que "Ras el hanout" englobe les vertus de chacune des épices qui le constituent : Le cumin, le fenouil et l'anis vert calment les douleurs des diarrhées, facilitent la digestion et combattent la flatulence. La cannelle améliore la circulation sanguine, la coriandre chasse les toxines, le curcuma est un anti-inflammatoire, nettoie le foie et combat le stress causé par l'inquiétude. Le clou de girofle parfume l'haleine et la majorité des épices améliorent la résistance aux maladies.

### 1.3. Mode d'utilisation

Le mélange "Ras el hanout" est différemment utilisé par la population approchée. Près de la moitié de ces personnes, soit 43% affirment l'utiliser en début de cuisson, d'autres (12%) le préfèrent à la fin de la cuisson, 15% des personnes signalent son utilisation en deux temps, au début et à la fin de la cuisson et 30% l'introduisent à la mi-cuisson (Fig. 5).



**Figure 5 : Mode d'utilisation de "Ras el hanout"**

Concernant le mode d'utilisation, certaines des questionnées préféraient l'ajout de "Ras el hanout" au début de la cuisson, afin que, les aliments caractérisés par un goût fade puissent bien absorber les saveurs des épices. Mais d'autres l'ajoutent vers la fin pour minimiser la perte des propriétés organoleptiques de ces épices. Cette connaissance des propriétés et usages des épices sont pour la plupart, acquise suite à une longue expérience ou accumulée et transmise d'une génération à l'autre.

### Discussion

L'enjeu de l'enquête réalisée était d'inventorier les épices utilisées dans la préparation du mélange "Ras el hanout" et de savoir leur fréquence et mode d'utilisation, mais aussi de ressortir les raisons pour lesquelles le mélange est utilisé.

Les personnes questionnées ont citées 13 épices pouvant rentrer dans la préparation du mélange "Ras el hanout". Toutefois, les données littéraires ont indiqué que le mélange "Ras el hanout" présente une plus large diversité en épices. En effet, **il existe** autant de "Ras-el-hanout" que de marchands, ce mélange d'épices est propre à chaque marchand et celui-ci peut également être adapté à l'envie de l'acheteur. Le mélange varie également selon les régions (Ruth, 2009 ; Tyler, 2001).

L'utilisation de "Ras el hanout" pour les questionnées représente un fabuleux moyen de s'initier à la découverte et à l'utilisation des épices. Car, utiliser un mélange tout prêt à l'emploi est bien plus facile à doser qu'utiliser une épice toute seule. De plus, le mélange offrira une pléiade de possibilités en cuisine, d'astuces et de recettes vu qu'il assure l'harmonisation des différents goûts et saveurs des épices constitutives. Son préparation donc, fait appel à des épices amères telles que le cumin et le carvi, des épices piquantes comme le gingembre, le piment et la noix de muscade, des épices aromatiques telles que la cannelle, la cardamome, le clou de girofle et l'anis vert et des épices liantes comme le curcuma, le fenouil et la coriandre

Une multitude des vertus thérapeutiques ont été citées par les personnes questionnées qui concordent étroitement la littérature (Häfliger, 1999 ; Iserin, 2001 ; Guilloton, 2005). La consommation des épices peut procurer encore sur le plan physiologique un plus large spectre préventif contre l'oxydation, contre les infections bactériennes, contre l'inflammation, contre le cancer, contre l'hyperglycémie, contre l'hypercholestérolémie, contre les intoxications ...etc. (Iserin, 2001).

## **2. Investigation auprès des herboristes**

La détermination des épices constituant "Ras el hanout", afin de l'étudier, est rendue possible grâce à l'investigation effectuée auprès des herboristes. Après l'examen des échantillons de "Ras el hanout" collectés, les pourcentages de chaque épice dans chaque préparation sont calculés et consignés dans le tableau IV.

**Tableau IV : Principaux constituants des différents mélanges "Ras el hanout" selon les herboristes.**

mélanges Taux % d'épices	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 4	Mélange 5	Mélange 6
<b>Noix de muscade</b>	1.15	4.35	1.99	2.37	0.12	0.8
<b>Poivre</b>	4.97	8.28	9.79	3.80	4.56	3.66
<b>Cannelle</b>	3.94	4.02	6.94	5.29	5.68	3.85
<b>Curcuma</b>	5.21	5.45	5.56	4.01	4.23	5.89
<b>Gingembre</b>	5.17	7.63	6.93	4.30	7.01	5.98
<b>Fenouil</b>	4.2	12.60	5.74	3.79	3.66	1.00
<b>Cumin</b>	3.89	13.10	8.30	4.77	5.24	3.58
<b>Anis vert</b>	3.81	8.43	3.68	5.61	/	3.55
<b>Coriandre</b>	62.06	22.79	45.56	60.80	56.85	53.11
<b>Carvi</b>	5.49	13.30	5.46	4.69	3.95	4.35
<b>Poivre long</b>	/	/	/	/	2.81	/
<b>Rose</b>	/	/	/	/	/	1.36
<b>Absinthe</b>	/	/	/	/	/	6.54
<b>Cardamome</b>	/	/	/	/	2.5	2.31
<b>Clous de girofle</b>	/	/	/	/	1.02	/
<b>Piment</b>	/	/	/	1.23	/	2.22
<b>Cubèbe</b>	/	/	/	/	3.74	/
<b>Laurier</b>	/	/	0.78	/	0.19	2.19

Plusieurs épices sont utilisées pour la préparation du mélange "Ras el hanout" (tableau IV). La coriandre, le carvi, le cumin, le fenouil, l'anis vert, le poivre, le gingembre, le curcuma, la cannelle, et la noix de muscade sont les plus citées. A l'opposé, le poivre long, la rose, l'absinthe, la cardamome, les clous de girofle, cubèbe et laurier sont les moins citées. La coriandre représente l'épices majoritaire, avec des proportions proches entre le premier (62.36%), le troisième (45.56%), le quatrième (60.80%), le cinquième (56.85%) et le sixième mélange (53.11%). Cette épice ne représente que 22.79% du deuxième mélange qui est plus riche en noix de muscade, gingembre, fenouil, cumin, anis vert et carvi, comparativement aux cinq autres mélanges.

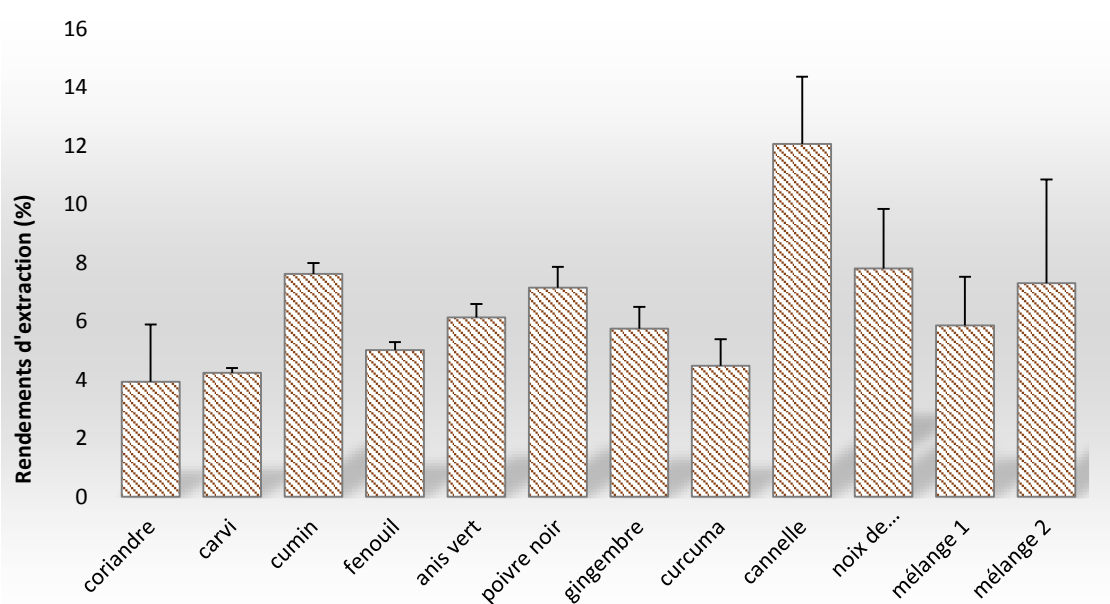
On peut également relever du tableau que dix épices sont communes entre les six mélanges. Ce sont la coriandre (*Coriandrum sativum*), le gingembre (*Zingiber officinale*), le poivre noir (*Piper nigrum*), le curcuma (*Curcuma longa*), l'anis vert

(*Pimpinella anisum*), la cannelle (*Cinnamomum cassia*), la noix de muscade (*Myristica fragans*), le fenouil (*Foeniculum officinale*), le carvi (*Carum carvi*) et le cumin (*Cuminum cyminum*). En comparaison avec les résultats de l'enquête ethnobotanique, on trouve que ces dix épices sont communément les plus sélectionnées par les questionnées pour la préparation de "Ras el hanout" et sont ainsi choisies pour l'étude.

Puisque les mélanges 1 et 2 présentent une similarité qualitative et non pas quantitative, ces deux préparations sont retenues pour l'étude.

### 3. Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction de différentes épices sont calculés et illustrés dans la figure 6.



**Figure 6: Rendements en extraits bruts des différentes épices étudiées et de leurs mélanges**

Le rendement d'extraction varie selon l'épice étudiée. Celui de la cannelle est évalué à  $12.07 \pm 2.30\%$ . Il est moins important chez la noix de muscade ( $7.81\% \pm 2.04$ ), le cumin ( $7.62 \pm 0.38\%$ ), le poivre noir ( $7.15 \pm 0.71\%$ ) et l'anis vert ( $6.13 \pm 0.46\%$ ). Les plus faibles rendements d'extraction sont ceux du gingembre, du fenouil, du carvi, du

curcuma et de la coriandre chez lesquelles les taux d'extraction non significativement différents oscillent entre  $5.75 \pm 0.75\%$  et  $3.93 \pm 1.96\%$  ( $p > 0.05$ ) (Fig. 6).

Le rendement d'extraction du mélange 2 évalué à 7,3 % est plus important que celui du mélange 1 qui n'est que de 5.86 % ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6).

## Discussion

L'extraction des composés bioactifs à haute valeur ajoutée à partir de matière végétale sèche ou fraîche représente l'étape préliminaire dans l'utilisation des composés phytochimiques pour la recherche, l'identification et la préparation de produits nutraceutiques, pharmaceutiques et cosmétiques (Dai et Mumper, 2010).

Le rendement d'extraction des principes actifs à partir d'épices révèle un grand écart d'une espèce à l'autre. En effet, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction de métabolites de source végétale. La solubilité de ces composés dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, tanins et autres. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé (Mohammdi *et al.*, 2013). Lee *et al.* (2003) rajoutent que le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des plantes, leurs origines géographiques, les conditions et la durée de la récolte et de stockage.

Grâce à son indice de polarité moyen, estimé de 5.1, le méthanol représente le solvant généralement utilisé pour l'extraction des composés bioactifs polaires et légèrement apolaires, tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes, les glycosides et les terpénoïdes. Ce solvant est également choisi parce qu'il a un point d'ébullition faible ( $65^{\circ}\text{C}$ ) permettant son évaporation facile après l'extraction. Sun *et al.* (2007) ont montré que le méthanol reste le meilleur solvant pour extraire les antioxydants d'une plante.

En examinant la composition des mélanges étudiés, on estime que le deuxième remporte le meilleur rendement grâce à leur richesse en épices ayant donné des rendements relativement importants.

## 4. Criblage phytochimique des différentes fractions des extraits bruts

### 4.1. Criblage phytochimique de la fraction hexanique

L'hexane extrait les matières grasses et certains métabolites secondaires tels que les stérols et les terpènes (Ladiguina *et al.*, 1983 ; Bruneton, 1993). Ces métabolites sont mis en évidence par le réactif de Godin et de Libermann-Bürchard. Le tableau V consigne les résultats obtenus.

**Tableau V : Criblage phytochimique de la fraction hexanique**

Extrait	Facteurs de rétention (Rf), couleur des spots et composés possibles
Coriandre	0.54 : r. <i>L. B. à 366</i> et bl. <i>L. B. à 254</i> (2), 0.90, 0.83, 0.08 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4), 0.93, 0.75 : j. <i>Godin à 366</i> (5)
Carvi	0.94 et 0.70 : j. o. <i>L. B. à 366</i> (1), 0.12 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4)
Cumin	0.95, 0.84, 0.63 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4), 0.94 : j. <i>Godin à 366</i> (5), 0.88 : r. <i>L. B. à 366</i> (2), 0.1 : j. o. <i>L. B. à 366</i> (1)
Fenouil	0.92 et 0.63 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4)
Cannelle	0.97, 0.88, 0.81 : j. o. <i>L. B. à 366</i> (1), 0.34, 0.55, 0.88 : r. <i>L. B. à 366</i> et bl. <i>L. B. à 254</i> (2), 0.19, 0.66 : bl. <i>Godin à 366</i> (3), 0.65 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4). 0.76 et 0.43 : j. <i>Godin à 366</i> (5)
Poivre noir	0.97 : bl. <i>Godin à 366</i> (3), 0.88 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4), 0.90 : j. <i>Godin à 366</i> (5)
Gingembre	0.67 : j. o. <i>L. B. à 366</i> (1), 0.11, 0.06 : j. v. <i>L. B. à 366</i> (4)
Curcuma	0.92 et 0.65 : j. o. <i>L. B. à 366</i> (1), 0.87, 0.95 : bl. <i>Godin à 366</i> (3), 0.67, 0.97 : j. <i>Godin à 366</i> (5),
Anis vert	0.9 : j. o. <i>L. B. à 366</i> (1), 0.61, 0.72, 0.83 : j. <i>Godin à 366</i> (5),
Noix de muscade	0.78 : bl. <i>Godin à 366</i> (3), 0.53, 0.65, 0.84, 0.91 : j. <i>Godin à 366</i> (5),

j./jaune, j. o. /jaune orangé, bl./bleu, br./brune, L.B./ Libermann-Bürchard.

Les chiffres indiquent les composés phytochimique identifiés : 1/triterpènes de type lupane, 2/triterpènes de type oléane et ursane, 3/stérols, 4/ stéroïdes, 5/ génine terpénique.

Des spots à facteurs de rétentions (Rf) de (0.88 et 0.55), 0.54 et 0.88 sont observés chez l'anis vert, la coriandre et le cumin respectivement, ces spots sont colorés en rouge sous UV à 366 nm et en bleu sous UV à 254 nm après révélation par le réactif de Liebermann-Bürchard. Selon Dohou *et al.* (2003) ; Mamyrbékova-Békro *et al.* (2012), ils représentent des triterpènes de type oléane et ursane. Ce même révélateurs

détecte également les triterpènes de type lupane en jaune-orangé ou orange sous UV à 366 nm, c'est le cas des taches observées chez les extraits de l'anis vert, de la cannelle, du gingembre, du carvi, du cumin et du curcuma avec des Rf de 0.90, (0.81, 0.88, 0.97), 0.67, (0.94,0.70), 0.10 et 0.65 respectivement (Tableau V).

Des taches jaune-vertes à Rf de 0.65, (0.90, 0.83 et 0.08), (0.11, 0.06), 0.12, (0.95, 0.84, 0.63), 0.88, 0.31 et (0.92 ;0.63) respectives aux extraits de la cannelle, de la coriandre, du gingembre, du carvi, du cumin, du poivre noire, du curcuma et du fenouil sont observées après révélation par le réactif de Liebermann-Bürchard. Ces taches selon Chaaib (2004) et Lagnika (2005) représentent des stéroïdes (tableau V).

Des spots de couleur bleue sous UV à 366 nm après pulvérisation par le réactif de Godin montrent la présence des stérols (Mamyrbekova-Bekro, 2012). C'est le cas des spots à Rf de 0.97, 0.78, (0.87 et 0.95) et (0.19, 0.66) observés dans poivre, la noix de muscade, le curcuma et de la cannelle (tableau V)

Cependant, les spots colorés en jaune avec le même révélateur sous UV à 366 nm représentent des terpènes (Mamyrbekova-Bekro, 2012). Ce type des taches avec des Rf de 0.43, (0.93 et 0.75), 0.90 et (0.53, 0.65, 0.84, 0.91) sont décelées chez les extraits de la cannelle, de la coriandre, du poivre noir et la noix de muscade respectivement (tableau V).

#### **4.2. Criblage phytochimiques de la fraction chloroformique**

Dans la phase chloroformique on cherche à identifier les saponines, les coumarines, les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes. À cet effet, des révélateurs polyvalents (Carr-Price et l'ammoniaque NH<sub>3</sub>) et spécifiques tels que l'hydroxyde de potassium (KOH), le trichlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>), le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) et le réactif de Dragendorff ont été utilisés, Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.

**Tableau VI : Criblage phytochimique de la fraction chloroformique**



épice	Facteurs de rétention (Rf), couleur des spots et composés possibles
Coriandre	0.45 : j. <sup>Carrprice à 366</sup> (2), 0.15, 0.24 : g. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.16, 0.24, 0.4, 0.45 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.12 : j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6).
Carvi	0.44 : 0.54, 0.56 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5)
Cumin	0.51, 0.58, 0.75 : n. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.32, 0.40, 0.45, 0.69, 0.84, 0.92 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.38, 0.48, 0.58 : j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6)
Fenouil	0.19 : n. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.21, bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5)
Cannelle	0.26, bl. <sup>Carrprice366</sup> (1), 0.74, 0.32 : j. <sup>Carrprice366</sup> (2), 0.54, 0.6, 0.81, 0.97 : n. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.7 : o. <sup>Dragendoff à 366</sup> (4), 0.24 et 0.22, 0.27, 0.33, 0.41, 0.44, 0.48, 0.53, 0.68, 0.72, 0.87 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.39, 0.60, 0.85, 0.25, 0.49, 0.75 j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6).
Poivre noir	0.45, 0.49 : j. <sup>Carr price à 366</sup> (2), 0.4, 0.51 : n. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.42, 0.50 : o. <sup>Dragendoff à 366</sup> (4), 0.33, 0.37 0.42 bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.42, 0.44 j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6).
Gingembre	0.18, 0.42, 0.05, 0.07 : n. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.16, 0.19, 0.35 : o. <sup>Dragendoff à 366</sup> (4), 0.34, 0.4, 0.45, 0.67 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.08, 0.16, 0.2, 0.39, 0.48, 0.10 : j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6).
Anis vert	0.2, 0.28, 0.48 : j. <sup>Carrprice à 366</sup> (2), 0.2, 0.23, 0.27, 0.33, 0.45, 0.6, 0.64 : n. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.19, 0.35 : o. <sup>Dragendoff à 366</sup> (4), 0.15, 0.19, 0.22 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.29, 0.80, 0.92 : j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6).
Curcuma	0.3, 0.72, 0.64 : g. <sup>FeCl3</sup> (3), 0.19, 0.29, 0.3, 0.49, 0.53, 0.6, 0.67, 0.76, 0.92 : bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5), 0.16, 0.2, 0.26, 0.33, 0.4, 0.42, 0.64 : j. <sup>AlCl3 visible</sup> et br. <sup>NH3 à 366</sup> (6).
Noix de muscade	0.35 : o. <sup>Dragendoff à 366</sup> (4), 0.21, 0.4 bl.* <sup>NH3 à 366</sup> et en j.* <sup>KOH à 366</sup> (5),

j. /jaune, j.\* /jaune fluorescent, bl. /bleu, bl.\* /bleu fluorescent, br./brun; o. / orange, g./gris, n./noire.

Les chiffres indiquent les composés phytochimique identifiés : 1/saponines triterpéniques, 2/saponines stéroïdiens, 3/tanins, 4/alcaloïdes, 5/coumarines, 6/flavonoïdes.

La présence des coumarines dans un extrait est mise en évidence sous UV à 366 nm en donnant des spots bleus fluorescents après traitement par le NH<sub>3</sub> et jaunes fluorescents après traitement par le KOH (Merck, 1980 ; Dekker, 2002 ; Mamyrbékova-Békro *et al.*, 2012). Ce genre de taches est observé comme montre le tableau VI chez toutes les épices mais à fréquence particulière chez la cannelle.

Des spots colorés en jaune dans le visible après avoir pulvérisé par le  $\text{AlCl}_3$ , et en marron sous UV366 après la révélation par le  $\text{NH}_3$  sont observés chez la cannelle, le curcuma, l'anis vert, le cumin, le gingembre et le poivre noir avec des Rf de (0.39, 0.6, 0.85, 0.25, 0.49, 0.75), (0.16, 0.26, 0.33, 0.64, 0.2, 0.4, 0.42), (0.29, 0.8, 0.92), (0.1, 0.5, 0.6), (0.08, 0.2) et 0.44 respectivement (tableau V). Selon Lagnika (2005) et N'gaman (2009), ils représentent des flavonoïdes.

Le réactif de Dragendorff détecte spécifiquement les alcaloïdes en donnant de tâches colorées en orange sous UV à 366nm (N'gaman, 2009 ; Ouattara *et al.*, 2016). Ces métabolites comme montre le tableau VI sont révélés dans les extraits de la cannelle, du poivre noir, du curcuma et de la noix de muscade avec des Rf de 0.70, (0.42, 0.5) et (0.19, 0.35) et 0.35.

Les saponines, sont décelés par le réactifs de Carr-Price, qui peut mettre en évidence les saponines stéroïdiens en les colorant en jaune ou orange dans le visible et sous lumière UV/366 nm. C'est le cas des spots à Rf de (0.74, 0.32) ; 0.45 ; (0.45, 0.49) ; (0.2, 0.28, 0.48) respectives à la cannelle, la coriandre, le poivre noir, le curcuma. Le réactif de Carr-Price peut identifier également les coumarines triterpéniques en bleu sous UV à 366 nm. Ce genre de taches est détecté seulement chez la cannelle à Rf de 0.26 (Tableau VI).

Par ailleurs, les tanins sont révélés spécifiquement en gris ou en noir par le trichlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) (Lagnika, 2005). Ce type de spots est observé chez les extraits de l'anis vert, de la cannelle, du gingembre, du curcuma, du poivre noir, du cumin et de la coriandre avec des Rf de (0.3, 0.72, 0.64), (0.54, 0.61, 0.81, 0.97, 0.11), (0.18, 0.42, 0.05, 0.07), (0.2, 0.23, 0.27, 0.33, 0.60, 0.64), 0.4, (0.51, 0.58, 0.75), (0.15, 0.24) respectivement (tableau VI).

#### **4.3. Criblage phytochimiques de la fraction d'acétate d'éthyle**

Les métabolites principalement recherchés dans la fraction d'acétate d'éthyle sont les flavonoïdes et les coumarines. Pour ce faire, le  $\text{AlCl}_3$ , le  $\text{NH}_3$  et le KOH sont utilisés. Les résultats sont montrés dans le tableau VII.

**Tableau VII : Criblage phytochimique de la fraction d'acétate d'éthyle**

Extrait	Facteurs de rétention (Rf), couleur des spots et composés possibles
Coriandre	0.12, 0.22, 0.28, 0.31, 0.40 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.13, 0.19, 0.29, 0.32 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Carvi	0.36 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.33 : 0.36 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Cumin	0.15 et 0.35 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.14, 0.36 : 0.36 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Fenouil	0.36 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Cannelle	0.25, 0.33, 0.40, 0.47, 0.48, 0.58, 0.75 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.13, 0.27, 0.33 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Poivre noir	/
Gingembre	0.12, 0.23, 0.31 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.5, 0.14, 0.26, 0.32 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Curcuma	0.31, 0.35, 0.38 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.34, 0.41 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)
Anis vert	0.11, 0.38 : bl.* $NH_3$ à 366 et en j.* $KOH$ à 366 (1), 0.9 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2),
Noix de muscade	0.61, 0.73 : j. visible et bl. $NH_3$ à 366 (1), 0.60, 0.85, 0.91 : j. $AlCl_3$ visible et br. $NH_3$ à 366 (2)

j/jaune, j.\*/ jaune fluorescent, bl/bleu, bl.\*/bleu fluorescent, br/brun.

Les chiffres indiquent les composés phytochimique identifiés : 1/ coumarines, 2/flavonoïdes

Lorsque les flavonoïdes sont en contact de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), ils apparaissent sur le chromatogramme en jaune dans le visible, cette coloration s'intensifie sous lumière UV à 366 nm (Lagnika, 2005). Ces mêmes composés donnent des taches marron sous UV après traitement par le  $NH_3$ . C'est le cas donc, des spots à Rf de 0.9 ; 0.27 ; (0.3, 0.19, 0.29, 0.32) ; (0.5, 0.14, 0.26, 0.32) ; 0.35 ; (0.14, 0.36) ; (0.31, 0.34, 0.41) ; 0.36 colorés en jaune dans le visible observés chez les extraits de la cannelle, de l'anis vert, de la coriandre, du gingembre, du carvi, du cumin, du curcuma et du fenouil respectivement (tableau VII).

Les coumarines sont colorés en bleu sous UV à 366 nm après révélation par le  $NH_3$  et en jaune après révélation par le  $NH_3$  (Dekker, 2002). Cette caractérisation est observée avec des spots à Rf de (0.11, 0.38), (0.25, 0.33, 0.40, 0.48, 0.58), (0.12, 0.28, 0.31), 0.32, 0.36, (0.15, 0.35), (0.31, 0.35, 0.38) respectives aux extraits de la cannelle,

de l'anis vert, de la coriandre, du gingembre, du carvi, du cumin et du curcuma (tableau VII).

#### 4.5. Criblage phytochimique de la phase n-butanolique

Dans la fraction n-Butanolique, nous avons cherché la présence des polyphénols tels que les tanins et les flavonoïdes et des saponines. La révélation est effectuée par le  $\text{AlCl}_3$ , le réactif de Carr price et le  $\text{FeCl}_3$ . Les résultats sont montrés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII : Criblage phytochimique de la fraction n-butanolique**

Epices	Facteurs de rétention (Rf), couleur des spots et composés possibles
Coriandre	0.26, 0.38, 0.44 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.26, 0.38, 0.44, j. Carr price UV 366 (2), 0.28, 0.41, 0.44 : g. $\text{FeCl}_3$ visible (4)
Carvi	0.56, 0.6, 0.77, 0.86, 0.95, 0.98 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.47 : j. Carr price (2), 0.5, 0.6 : g. $\text{FeCl}_3$ (4)
Cumin	0.2, 0.5, 0.59, 0.64, 0.69 et 0.89 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.47 : j. Carr price UV 366 (2), 0.56, 0.6, 0.88 : bl. Carrprice UV 366 (3), 0.19, 0.21, 0.52, 0.6 : n. $\text{FeCl}_3$ visible (4)
Fenouil	0.56, 0.66, 0.98 j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.36, 0.46 : n. $\text{FeCl}_3$ visible (4)
Cannelle	0.34, 0.44, 0.49, 0.59, 0.73 0.89 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.91 : j. Carr price UV 366 (2), 0.21, 0.33, 0.48, 0.58, 0.87 : bl. Carrprice UV 366 (3), 0.19, 0.25, 0.28, 0.37, 0.45, 0.50 et 0.86 : n. $\text{FeCl}_3$ visible (4)
Poivre noir	0.28, 0.86 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.25 : n. $\text{FeCl}_3$ (4), 0.21 : j. Carrprice UV 366 (2)
Gingembre	0.48, 0.72, 0.87 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1), 0.39 : n. $\text{FeCl}_3$ visible (4)
Curcuma	0.03, 0.46, 0.69, 0.77, 0.87, 0.88, 0.96 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1)
Anis vert	0.61, 0.7, 0.8, 0.85, 0.95 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1)
Noix de muscade	0.83 : j. $\text{AlCl}_3$ visible (1)

j. /jaune, bl. /bleu, n/noir

Les chiffres indiquent les composés phytochimique identifiés : 1/flavonoïde, 2/saponine stéroïdiens, 3/saponine triterpénique, 4/tanins

Des taches colorées en jaunes dans le visible qui virent en bruns sous la lumière UV à 366 nm après révélation par le  $\text{AlCl}_3$ , ces taches ont des Rf de (0.22, 0.34, 0.44,

0.49, 0.59, 0.73, 0.89), (0.26, 0.38, 0.44), (0.56, 0.6, 0.77, 0.86, 0.95, 0.98), (0.2, 0.5, 0.59, 0.64, 0.69, 0.89), (0.28, 0.86), (0.03, 0.46, 0.69, 0.77, 0.87, 0.88, 0.96) respectives à la cannelle, la coriandre, le carvi, le cumin, le poivre noire et le curcuma (tableau VIII). Selon Lagnika (2005) ces taches représentent des flavonoïdes.

Comme pour la fraction chloroformique, l'existence des saponines dans la fraction butanolique est décelée par le réactif de Carr price. Les saponines de type stéroïdien sont représentées par les spots à Rf de 0.91, (0.26, 0.38, 0.44), 0.47 et 0.47 identifiés chez les extraits de l'anis vert, la coriandre, le carvi et le cumin. Alors que, ceux de type triterpénique sont caractérisés chez le cumin et la cannelle avec des Rf de (0.56, 0.6, 0.88) et (0.48, 0.58, 0.87) respectivement (tableau VIII).

Le réactif trichlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) colore les tanins en noir ou en gris. Ce genre de spots est observé chez les extraits de la cannelle, de la coriandre, du gingembre, du cumin, du poivre noir et du fenouil avec des Rf de (0.19, 0.25, 0.28, 0.37, 0.45, 0.50, 0.86), (0.28, 0.41, 0.44), 0.39, (0.50, 0.60), (0.19, 0.21, 0.52, 0.60, 0.64), 0.25 et (0.36, 0.46) respectivement (tableau VIII).

## Discussion

Le criblage phytochimique réalisé a permis de mettre en évidence la présence de diverses métabolites secondaires au niveau des épices étudiées.

Les résultats montrent que la cannelle, l'anis vert et le gingembre sont les plus riches en coumarines et en tanins. En effet, Archer (1988) a signalé la richesse de la cannelle en coumarines avec un taux atteignant 45% de l'extrait sec.

Les coumarines attribuent aux épices qu'elles renferment des effets bactériostatiques, anti fongiques (Hostettmann, 1992), anti-œdémateux et antioxydants (Hoult et Paya, 1996). Son action anti-œdémateuse résulte de l'augmentation du drainage lymphatique et de la stimulation de l'activité protéolytique des macrophages (Casley-Smith *et al.*, 1993).

Les flavonoïdes sont présents dans toutes nos épices particulièrement dans le curcuma, la cannelle, l'anis vert et le cumin. En effets, plusieurs études ont été menée sur l'identification de ces métabolites au niveau des plantes médicinales y compris les épices indiquant que la plus part des activités biologiques et physiologiques des épices sont douées par les flavonoïdes.

Les terpénoïdes sont identifiés au niveau de toutes les épices mais en abondance dans la cannelle, le carvi, et la noix de muscade. Les stéroïdes sont identifiés seulement

dans le cumin et le gingembre ; les stérols au niveau de la cannelle, le poivre noir, la noix de muscade et le curcuma. Alors que les saponines sont présents dans la cannelle, le curcuma, le poivre noir et la coriandre.

Comme pour les autres métabolites, les terpénoïdes et leurs dérivés ont des vertus thérapeutiques diverses. Les terpénoïdes sont beaucoup plus utilisés en raison de leurs qualités aromatiques. Exemple de caryophyllène chez la cannelle, le limonène et le pinène chez le cumin, le carvone, l'eugénol et le thymol chez le carvi, le myrcène chez la noix de muscade, le curcuma, le gingembre et le fenouil; le géraniol, le terpénol et le linalool chez la coriandre. Ces molécules font l'objet de recherche pour découvrir des effets antibactériens, antinéoplasiques, anti-inflammatoires et bien que d'autres effets pharmaceutiques (Denys, 2013).

Les saponines tritérpéniques et stéroïdiens sont dérivés des terpénoïdes, ces molécules sont identifiées seulement chez la cannelle, le curcuma, le poivre noir et la coriandre confirmant ainsi, les résultats de Mazimba *et al.* (2015) ; Ikpeama-Ahamefula, (2014) et Shannugapriya (2012).

Les saponines ont de multiples approches thérapeutiques. En outre, la nature amphipathique de cette classe leur donne une activité tensioactive qui peut être utilisée pour accroître la pénétrabilité membranaire. Des saponines ont aussi été utilisées comme adjuvants de vaccins (Skene, 2006). Cependant, à froid avec des fortes doses sont considérés comme toxiques vu qu'elles ont une activité hémolytique douée par leurs interactions avec les stérols de la membrane érythrocytaire (Amini *et al.*, 2014).

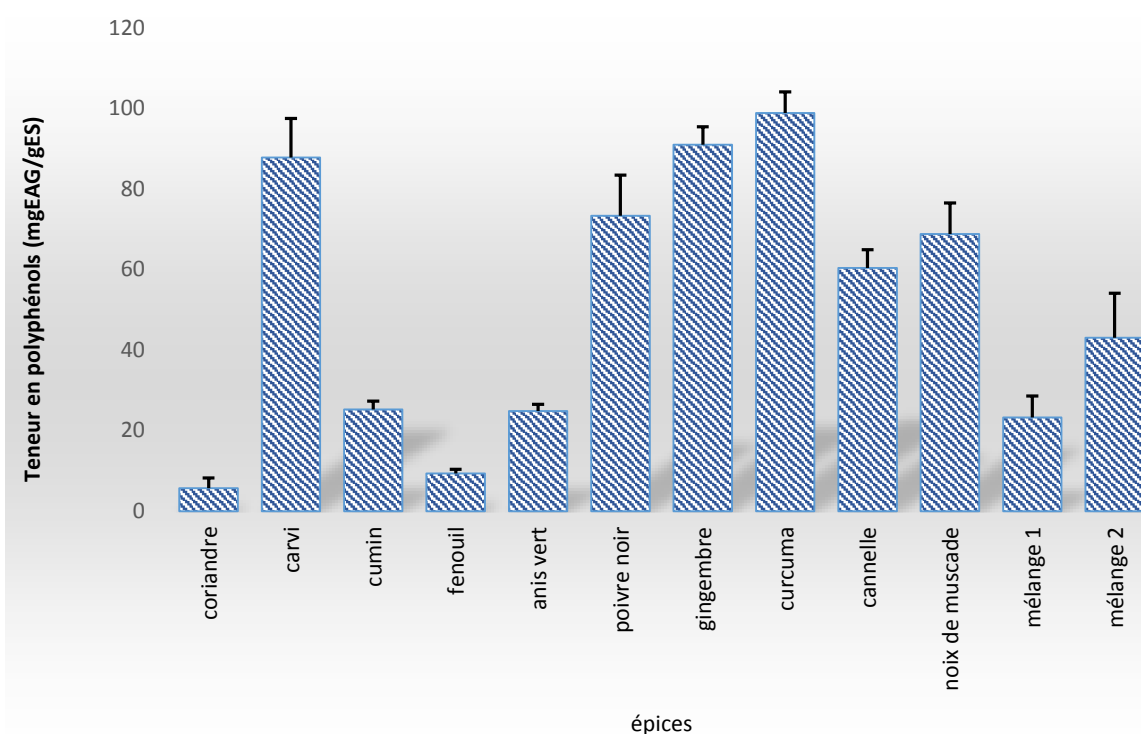
Nos résultats révèlent l'existence des alcaloïdes chez le gingembre, le curcuma, le poivre noir, la noix de muscade et la cannelle. Cependant, ils montrent une contradiction avec les résultats de Sibi *et al.* (2013), qui ont jugé par une étude sur une gamme d'épices, la présence des alcaloïdes au niveau de *Myristica fragrans* (noix de muscade) et du *Piper nigrum* (poivre noir) seulement. D'autre part, Shiney et Ganesh (2012), par une étude sur *Cinnamomum cassia* (cannelle), ont montré la richesse de cette épice en alcaloïdes. Diverses actions pharmacologiques sont douées par ces molécules même à faible dose. elles agissent comme psychotropes, psychoactives, stimulantes, dopantes, toniques, vomitives, calmantes, dormitives, et analgésiques (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007). Le poivre noir renferme un alcaloïde appelé la pipérine responsable de la sensation de pseudo-chaud lors de la consommation de cette épice. Les propriétés de la pipérine sont particulièrement nombreuses,

antimicrobiennes, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices. De plus, elle favorise l'absorption ainsi que la biodisponibilité de nombreuses molécules (vitamines, minéraux, médicament, polyphénols, etc.) dans le corps (Shoba *et al.*, 1998).

## 5. Teneur des épices en métabolites secondaires

### 5.1. Teneur en polyphénols totaux

Les concentrations en polyphénols totaux de diverses épices et leurs mélanges sont calculées et illustrées dans la figure 7.



**Figure 7: Teneur des épices étudiées et leurs mélanges en polyphénols**

L'examen de la figure (7) laisse constater que le curcuma suivi du gingembre représentent les épices les plus riches en polyphénols avec des teneurs de  $98.8 \pm 5.29$  et  $90.93 \pm 4.48$  mgEAG/gES respectivement. Le carvi, le poivre, la noix de muscade et la cannelle sont également riches donnant par ordre décroissant des teneurs comprises entre  $87.77 \pm 9.67$  et  $64.71 \pm 4.55$  mgEAG/gES. Le cumin et l'anis vert présentent une similitude quantitative en ces principes actifs ( $P > 0.05$ ) (Fig. 7). L'épice le moins doté en polyphénols est la coriandre, avec une concentration qui ne dépasse pas  $5.72 \pm 0.51$

mgEAG/gES (Fig. 7). Statiquement, les teneurs phénoliques des épices étudiées montrent des écarts significatifs ( $p < 0.05$ ) hormis entre le cumin et l'anis vert ( $p > 0.05$ ).

Le dosage des polyphénols des mélanges préparés fait ressortir des différences significatives entre les deux mélanges ( $p < 0.05$ ). En effet, le contenu phénolique du mélange 1 est de  $23.27 \pm 2.5$  EAG/gES, alors qu'il est de  $43.04 \pm 3.56$  EAG/gES pour le deuxième mélange.

## Discussion

Le dosage des polyphénols des différentes épices étudiées fait ressortir que certaines d'entre elles sont riches en ces métabolites alors que d'autres en sont moins pourvues. Le classement de nos épices selon leur richesse en polyphénols est en accord avec celui de Denre (2014) ayant travaillé sur le cumin, curcuma, gingembre et cannelle. En revanche, Maizure (2011) a signalé que le gingembre est plus riche en polyphénols que le curcuma. L'étude Kim *et al.* (2011) sur une gamme d'épices fait ressortir que la coriandre est plus riche en polyphénols que le carvi, le curcuma, le fenouil et le cumin. IlSuk *et al.* (2011) ont signalé que le curcuma est le plus riche en polyphénols avec 67.9 mg/g ES, suivie de l'anis vert, la noix de muscade, le gingembre, la cannelle, le cumin, le carvi, le fenouil, la coriandre et le poivre noire.

Les teneurs phénoliques différant d'une étude à l'autre peut être expliquée par l'influence d'un certain nombre de facteurs à savoir, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte, les conditions de stockage et les conditions climatiques (la température élevée, exposition au soleil, sécheresse, salinité...), sachant que, ces molécules exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (Podsedeck, 2007; Falleh *et al.*, 2008; Kabera, 2014)

La différence des concentrations des polyphénols totaux peut également être expliquée par l'interférence de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles, non seulement ceux des composés phénoliques, mais également ceux de certains sucres et protéines...etc. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Djeridane *et al.* (2006) signalent aussi que le solvant d'extraction entraîne d'autres substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation du contenu phénolique.



Les faibles contenus phénoliques des deux mélanges "Ras el hanout", comparé à celui de certaines épices qui les constituent est sans doute en relation avec les proportions de celles-ci. En effet, les épices ayant un contenu phénolique important ne sont que faiblement représentées dans les mélanges. C'est le cas du curcuma, gingembre, carvi, poivre noir et la noix de muscade, par rapport à la coriandre dont la proportion dépasse les 50% dans le premier mélange et 20% dans le deuxième. Cette faible proportion en coriandre, épice faiblement pourvue en polyphénols et l'importance des autres épices expliquerait également la richesse du mélange 2 en polyphénols.

Les composés phénoliques sont dotés d'un grand nombre de propriétés biologiques, ce qui confère aux épices les renfermant des intérêts exploités dans de nombreux domaines.

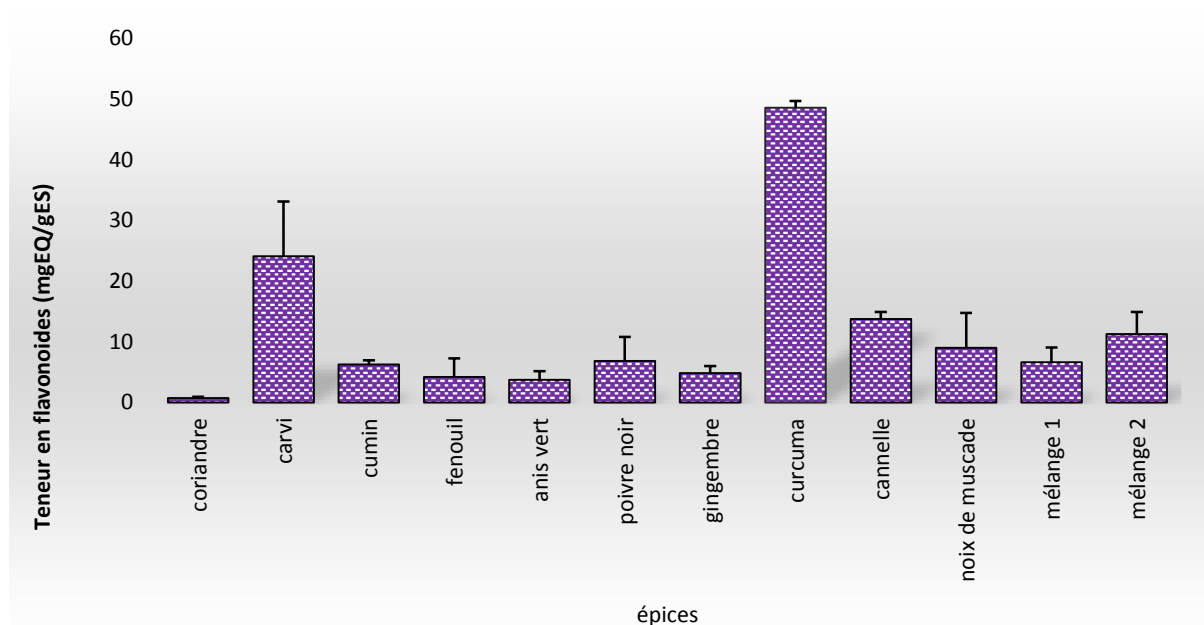
Selon la littérature les polyphénols sont des agents antioxydants, antimicrobiens, antitumoraux, anti-radicalaires, anti-inflammatoires, analgésiques, antiallergiques, antispasmodiques, hépatoprotectrices, et estrogéniques (Diebolt, 2003).

Il faut noter que ces effets sont indissociables de notion de biodisponibilité, car la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des polyphénols dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif (Borel, 2014).

Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des polyphénols chez l'Homme. Il est tout d'abord important de rappeler qu'il est extrêmement rare de trouver des polyphénols sous forme non glycosylés ou non estérifiés dans les aliments. Cette grande variabilité dans la nature des formes alimentaires de polyphénols s'accompagne d'une grande variabilité des mécanismes et des sites de leur absorption (Borel, 2014). Seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liés tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement à partir de l'estomac. Les aglycones de polyphénols (ex : les flavanols) et les O- $\beta$ -D-glucosides peuvent être notablement absorbés dans l'intestin grêle. Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le côlon, puis sont catabolisés par la microflore colique, avant d'être absorbés (ex. les tanins condensés) (Guzun-Cojocaru *et al.*, 2010 ; Achat, 2013).

## **5.2. Teneur en Flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (Djeridane *et al.*, 2006). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 8.



**Figure 8 : Teneurs des épices et leurs mélanges en flavonoïdes**

Parmi les épices étudiées, le curcuma est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de  $48.62 \pm 1.07$  mg EQ/gES, suivi du carvi dont la teneur est de  $24.13 \pm 9.03$  mg EQ/gES. Les contenus de la cannelle et de la noix de muscade en flavonoïdes sont plus faibles ( $13.76 \pm 1.16$  et  $9.02 \pm 5.78$  mg EQ/gES respectivement), mais restent cependant plus importants que ceux des autres épices, n'excédant pas  $6.32 \pm 0.65$  mg EQ/gES (cumin). La coriandre étant la moins riche en ces métabolites ( $0.77 \pm 0.19$  mg EQ/gES) (Fig. 8).

La différence de la teneur en flavonoïdes des épices étudiées est significative ( $p < 0.05$ ), sauf entre le cumin et poivre et entre le gingembre et le fenouil où elle n'est pas significative ( $p > 0.05$ ) (Fig. 8).

Les mélanges "Ras el hanout" sélectionnés présentent des teneurs en flavonoïdes significativement différentes. Le contenu du mélange 2 étant de  $11.32 \pm 3.63$  mg EQ/gES et celui du mélange 1 n'est que de  $6.65 \pm 2.44$  mg EQ/gES (Fig. 8).

## Discussion

Les flavonoïdes représentent la sous classe des polyphénols la plus abondante dans notre alimentation. La forte teneur du curcuma en flavonoïde corrobore les résultats de Kim *et al.* (2011). Chez cette épice, une famille des molécules sous le nom

de curcuminoïdes comprenant le curcumine, le desméthoxycurcumine, le bidesméthoxycurcumine et le dihydrocurcumine sont classés parmi les flavonoïdes dérivés de phénylpropanoïdes, responsable de la coloration jaune de curcuma.

L'ensemble des expériences menées avec la curcumine ont permis d'observer qu'elle contribue à inhiber la prolifération cellulaire et l'angiogenèse à différentes étapes du développement de différents cancers. Elle possède aussi un fort pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et immuno-modulateur (Li, 2011 ; Priyadarsini, 2014).

Toutes les études qui ont été menées *in vivo* sur l'Homme ont montré que la curcumine lorsqu'elle est utilisée seule, est très rapidement éliminée par l'organisme. Mais, en présence de la pipérine (alcaloïde contenu dans le poivre noir), sa biodisponibilité se multiplie par un facteur de 15 à 20 (Shoba, 1998).

L'analyse quantitative des flavonoïdes avait renseigné également sur la richesse du carvi en flavonoïdes, ceci corrobore les résultats de Agrahari et Singh (2014). Ces flavonoïdes incluant le 3-O-méthyl quercétine, l'isoquercétine, la quercétine 3-O-caffeylglucoside, et le kaempferol 3-glucoside conférant à l'épice une multitude d'activités biologiques, antidiarrhéique (Galvez *et al.*, 1993 ; Laribi *et al.*, 2010), antimicrobienne, antifongiques, anti-hyperglycémique, anti-hyperlipidémique, anti-tumoral et autres (Iacobellis *et al.*, 2005 ; Mehdi *et al.*, 2009).

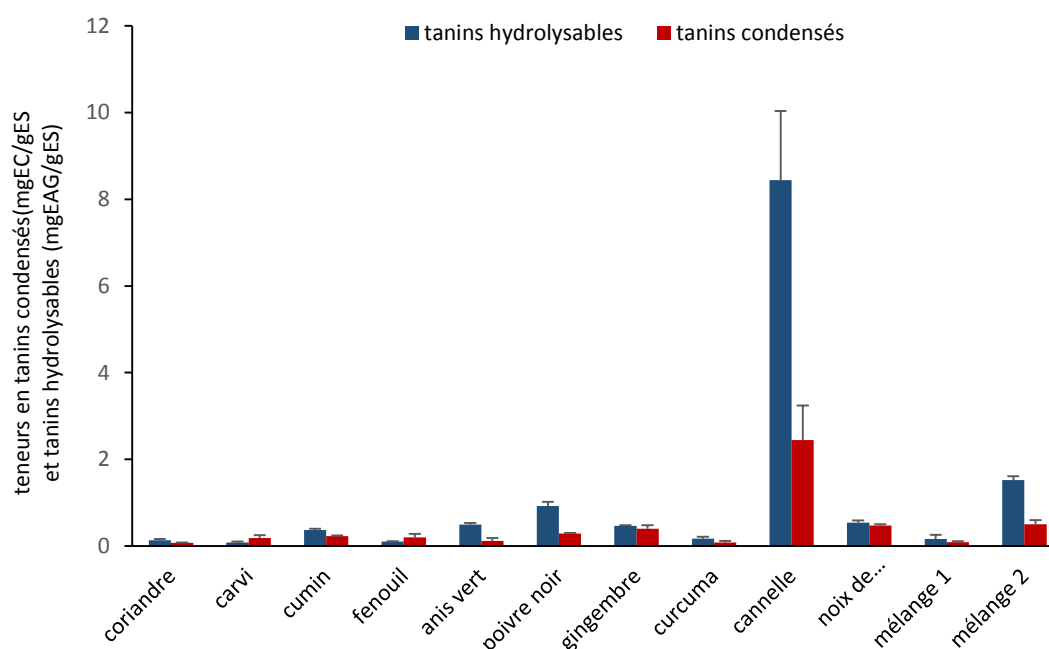
L'existence des flavonoïdes dans les autres épices, même en faibles quantités, leur confèrent des vertus médicinales propres à la nature des flavonoïdes qu'elles renferment. La quercétrine, la quercétine et le kaempferol sont contenus dans la cannelle (Prasad *et al.*, 2009) ; la flavone glycoside et la rutine dans le gingembre (Ghasemzadeh *et al.*, 2010) ; la quercetin, isoquercetin, isorhamnetin 3-b-d-rutinoside, le kaempferol 3-arabinoside, le kaempferol-3-o-b-galactoside et la quercetin-3-o-b-d-rutinoside dans le poivre noir (Parmar *et al.*, 1997) ; la quercetin-3-glucuronide, la rutine, le luteolin-7-glucoside, l'isoorientine, l'isovitexine, et l'apigenin-7-glucoside dans l'anis vert (Charles, 2013), la quercétine et le kaempferol dans le fenouil (Dua *et al.*, 2013) et les flavonols dans le coriandre (Dias *et al.*, 2011).

Il est remarqué en examinant la constitution de chaque épice en flavonoïdes, que des épices différentes pourraient partager des analogues en flavonoïdes et que ces derniers se trouvent fréquemment sous forme de glycosides.

Comme pour les polyphénols, on suggère que le deuxième mélange "Ras el hanout", comparé au premier, a acquis sa richesse en flavonoïdes grâce à sa plus forte teneur en épices riches en ces composés. La coriandre, fortement présente dans le premier mélange serait à l'origine de la faible teneur de ce mélange en flavonoïdes.

### 5.3. Teneurs des épices en tanins condensés et en tanins hydrolysables

Les teneurs des épices et leurs mélanges en tanins condensés (tanins catéchiques) et tanins hydrolysables (galliques ou éllagiques) sont calculées et présentées dans la figure 9.



**Figure 9 : Teneur des épices en tanins condensés et en tanins hydrolysables**

L'examen des résultats fait ressortir que les concentrations en tanins hydrolysables sont souvent supérieures à celles des tanins condensés chez les épices étudiées (Fig. 9). La cannelle semble significativement la plus riche ( $p < 0.05$ ), avec des

concentrations de  $8.44 \pm 1.6$  mg EAG/ES et de  $2.44 \pm 0.8$  mgEC/ES en tanins hydrolysables et condensés respectivement (Fig. 9).

Concernant les autres épices, les teneurs en tanins sont très faibles car, les meilleures concentrations ne dépassent pas  $0.92 \pm 0.1$  mg EAG/gES en tanins hydrolysables chez le poivre noir et  $0.47 \pm 0.03$  mg EC/gES en tanins condensés chez la noix de muscade (Fig. 9). Les épices les plus dépourvues en ces métabolites sont le curcuma, la coriandre et le carvi dont les teneurs respectives sont de  $0.08 \pm 0.0$ ,  $0.07 \pm 0.01$  et  $0.18 \pm 0.02$  mg EC/gES en tanins condensés et de  $0.17 \pm 0.04$ ,  $0.13 \pm 0.03$  et  $0.08 \pm 0.07$  mg EAG/gES en tanins hydrolysables (Fig. 9).

Les mélanges "Ras el hanout" exhibent à leurs tour des teneurs variées en tanins, avec une dominance non significative enregistrée chez le deuxième avec  $0.69 \pm 0.09$  et  $0.44 \pm 0.01$  mg EAG/gES, alors que les teneurs respectives en tanins hydrolysables et tanins condensés du mélange 1 ne sont que de  $0.27 \pm 0.02$  et  $0.21 \pm 0.05$  mgEC/gES de (Fig. 9).

## Discussion

La richesse de la cannelle en tanins confirme les résultats de Kumar *et al.* (2012), Harsha (2013), Ahmada *et al.* (2013) et Mazimba *et al.* (2015).

Ces composés selon la littérature, s'avèrent très bioactifs, agissant comme des puissants antioxydants (Amarowicz, 2007). En effet, l'action des tanins sur l'ingestion des aliments se produit au niveau de la cavité buccale, lieu des premières interactions entre les tanins et les protéines. Il en résulte un phénomène d'astringence provenant de la formation de complexes entre les tanins et les glycoprotéines salivaires (Mitjavila, 1997).

La précipitation des protéines par les tanins participe positivement à l'activité antidiarrhéique, en protégeant les organes digestifs des attaques nuisibles. Elle contribue aussi à l'action antihémorragique. En concentrations relativement faibles, les tanins stimulent l'activité des enzymes digestives et inhibent la mutagénicité de plusieurs agents cancérogènes (Perchellet, 1996).

Plusieurs tanins hydrolysables oligomériques, et leurs composés apparentés, révèlent une forte activité antitumorale qui peut être due à l'amélioration des réponses immunitaires. Les proanthocyanidines (tanins condensés), sous leurs deux formes libre

et liée aux protéines, possèdent des groupements phénoliques qui diminuent la sensibilité des cellules saines aux agents toxiques (Makkar, 2003).

Néanmoins, les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce à leur grande affinité à se combiner aux protéines endogènes et exogènes (protéines du tractus digestifs et diététiques), aux polymères (cellulose, hémicelluloses et pectine) et aux éléments minéraux, ralentissant ainsi leur digestion ainsi que leur biodisponibilité (Zimmer et Cordesse, 1996).

Face à ce paradoxe, on peut constater que les tanins ainsi que les épices qui les renferment agissent comme des médicaments et représentent des armes à doubles tranchants, leur utilisation parcimonieusement et avec précaution reste toujours recommandée.

#### 5.4. Corrélation entre les différents métabolites dosés

La corrélation en statistique, c'est d'étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre deux variables. La mesure de la corrélation linéaire entre les deux se fait par le calcul du coefficient de corrélation linéaire noté  $r$ . Ce coefficient est égal au rapport de leur covariance et du produit non nul de leurs écarts types. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1. La matrice illustrée dans le tableau IX englobe les corrélations entre les différents paramètres.

**Tableau IX : Matrice de corrélation entre les variables étudiés**

		Polyphénols	flavonoïdes	T. hydrolysables	T. condensés
polyphénols	Corrélation de Pearson	1	0.682**	0.114	0.154
	Signification		0.001	0.633	0.517
flavonoïdes	Corrélation de Pearson		1	0.015	0.007
	Signification			0.950	0.977
T. hydrolysables	Corrélation de Pearson			1	0.992**
	Signification				0.000
T. condensés	Corrélation de Pearson				1
	Signification				

\*\* La corrélation est très significative au niveau 0.01

\* La corrélation est significative au niveau 0.05

Globalement, la corrélation entre les polyphénols et les flavonoïdes des différentes épices est statiquement très forte ( $r=0.68$ ) et hautement significative

( $p < 0.01$ ), traduite par celle marquée chez le curcuma, majoritaire en polyphénols et en flavonoïdes et chez la coriandre, minoritaire en ces deux métabolites. Quelques exceptions sont constatées, surtout chez le gingembre, riche en polyphénols et pauvre en flavonoïdes.

La matrice citée exhibe aussi, une très forte corrélation significative entre les tanins condensés et les tanins hydrolysables ( $r = 0.99^{**}$  avec  $p < 0.01$ ).

Avec les polyphénols, les deux types de tanins sont positivement, mais faiblement corrélés. Les coefficients  $r$  constatés sont de 0.11 et 0.15 pour les tanins hydrolysables et les tanins condensés respectivement. Ces derniers ne sont que très faiblement corrélés avec les flavonoïdes (tableau IX).

## **Discussion**

La faible corrélation des tanins avec les polyphénols et les flavonoïdes paraît logique en examinant leurs voies biosynthétiques, car les tanins sont issus de la conversion des polyphénols tels que l'acide gallique en tanins hydrolysables, et les flavonoïdes de type anthocyane en tanins condensés (Haslam, 1989 ; Conrad *et al.*, 1998; galliSarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les composés phytochimiques se diffèrent en fonction des espèces. Les interrelations métaboliques qui déterminent les contenus qualitatifs et quantitatifs de chaque épice en métabolites secondaires semblent difficiles à mettre en exergue.

Cependant, il est connu que ces molécules interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la co-évolution des plantes avec les organismes vivants, tels que les parasites, les pathogènes et les prédateurs, mais aussi les pollinisateurs et les disséminateurs. Sans oublier d'autres influents importants tels que, le stade de développement (taux de maturité), la déficience en éléments nutritives, la sécheresse, le surchauffage et l'intensité lumineuse. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification quantitative et qualitative des épices en composés secondaires (Pichersky et Gang, 2000).

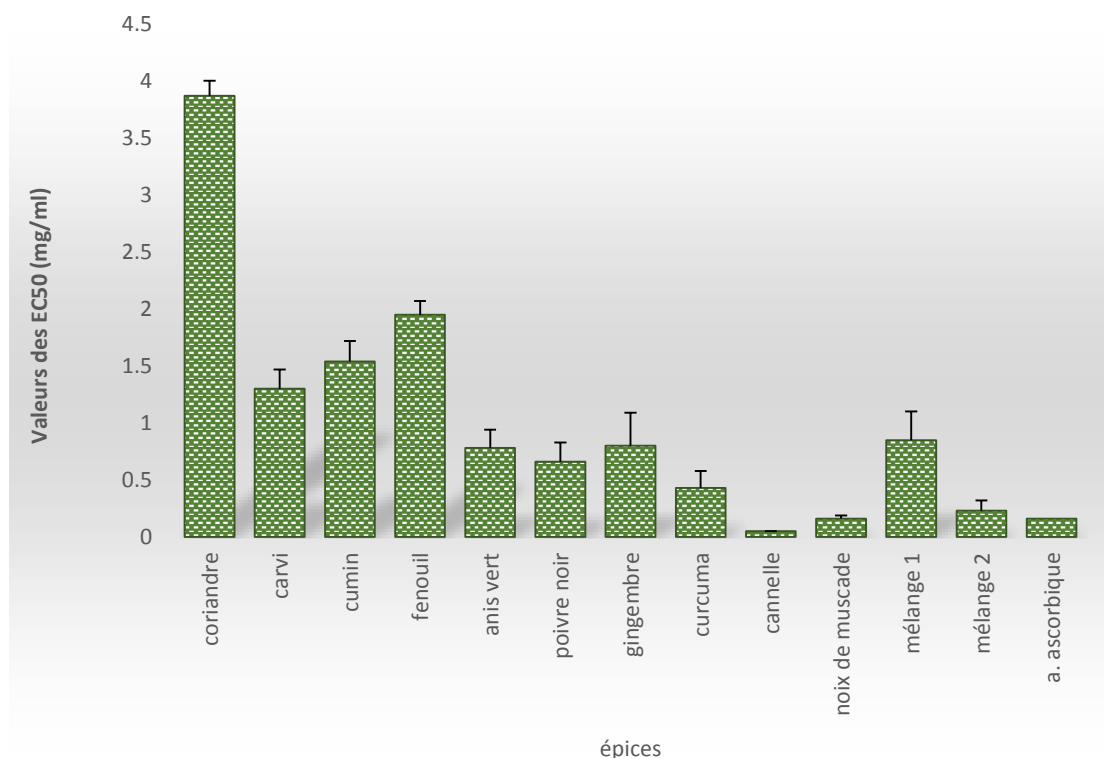
## **6. Activités biologiques des épices étudiées**

### **6.1. Activité antioxydante**

#### **6.1.1. Activité antioxydante par pié sage du radical libre DPPH •**

Les  $EC_{50}$  des extraits des différentes épices et leurs mélanges ainsi que de l'acide ascorbique utilisé comme témoins positif sont calculées et consignées dans la figure 10.

L'activité antioxydante de l'extrait est inversement proportionnelle à la valeur de  $EC_{50}$ .



**Figure 10 :  $EC_{50}$  obtenues avec les extraits bruts des épices et leurs mélanges**

L'examen de la figure 10 laisse constater que la cannelle présente une forte capacité à piéger le radical DPPH • avec une  $EC_{50}$  de  $0.05 \pm 0.0$  mg/ml. La noix de muscade est également plus efficace que le témoin positif (acide ascorbique). Sa concentration efficace à piéger 50% du radical DPPH • ( $EC_{50}$ ) est de  $0.16 \pm 0.02$  mg/ml, alors que celle du témoin est de 0.19 mg/ml (Fig. 10).

Le fenouil, le cumin, le carvi et la coriandre présentent les activités antioxydantes les plus faibles. Leurs  $EC_{50}$  sont de  $1.30 \pm 0.12$ ,  $1.54 \pm 0.15$ ,  $1.95 \pm 0.18$  et  $3.87 \pm 0.13$  mg/ml respectivement.

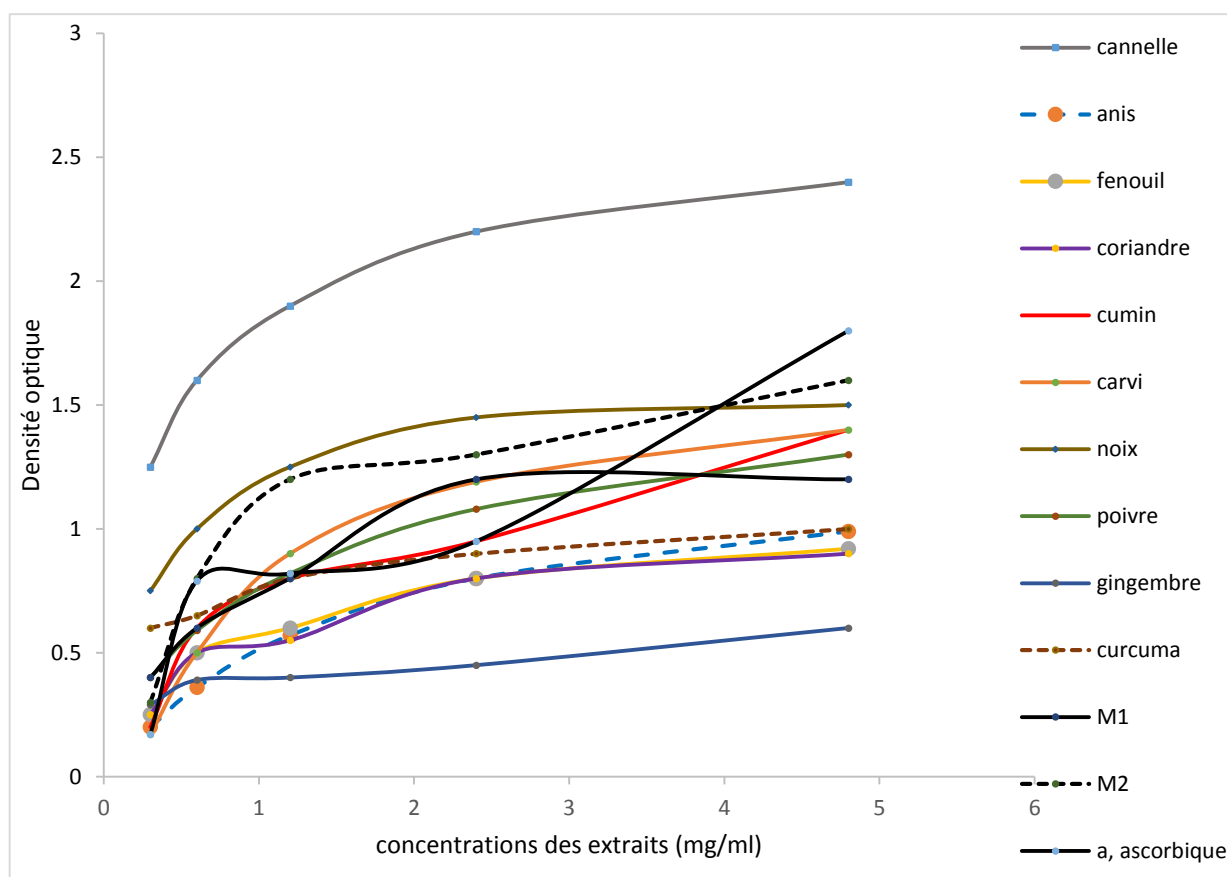
Les autres épices (curcuma, poivre, gingembre et l'anis vert) ont de bonnes capacités à piéger le radical DPPH • mais leurs  $EC_{50}$  sont supérieurs à celui de l'acide ascorbique (Fig. 10).



Le mélange 2 de "Ras el hanout" exhibe une meilleure activité antioxydante que le mélange 1 dont la valeur du  $EC_{50}$  est de  $0.85 \pm 0.12$  mg/ml alors que celle du mélange 2 n'est que de  $0.23 \pm 0.04$  mg/ml (Fig. 10).

### 6.1.2. Activité antioxydante par réduction de Fer (FRAP)

Pour tous les extraits ainsi que le témoin, des dilutions en cascade allant de 0.3 à 4,8 mg/ml sont effectuées. Les valeurs de l'absorbance mesurées ont permis de tracer des courbes de tendance logarithmique qui mettent ainsi en évidence une relation proportionnelle entre l'augmentation de la concentration de l'extrait et la réduction du fer dans les échantillons étudiés (Figure 11).



**Figure 11 : Profils des courbes des différentes épices et de leurs mélanges (test FRAP)**

D'après la figure11, la cannelle, la noix de muscade, le carvi et le poivre présentent une meilleure capacité à réduire le fer que le témoin positif, aux

concentrations allant de 0.3 à 2.4 mg/ml. Au-delà, seule la cannelle, qui s'avère de loin l'épice ayant la plus grande capacité à réduire le fer, atteignant, à la concentration de 4.8 mg/ml une densité optique de 2.4 contre 0.95 du témoin (Fig. 11).

Par ailleurs, le cumin, le curcuma, l'anis vert, le fenouil, la coriandre et le gingembre présentent une activité antioxydante plus faible que celle du témoin positif. En effet, les densités optiques de ces épices à 4.8 mg/ml sont respectivement de 1.4, 1, 0.99, 0.92, 0.90 et 0.6 (Fig. 11).

Depuis les faibles concentrations jusqu'à 2.4 mg/ml, les mélanges "Ras el hanout" sont plus réducteurs de fer que l'acide ascorbique, mais à la concentration de 4.8 mg/ml, le témoin l'est plus.

La figure 11 révèle également, qu'à partir de la concentration de 0.6mg/ml, le mélange 2 est plus efficace dans la réduction du fer ferrique ( $Fe^{+++}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{++}$ ). Les densités optiques de ce mélange varient entre 0.8 et 1.6 et celles du mélange 1 ne dépassent pas 1.2 pour la plus grande concentration.

## Discussion

Les épices sont reconnues être des sources d'antioxydants naturels qui peuvent protéger contre le stress oxydatif et donc jouer un rôle important dans la chimioprévention des maladies résultant de la peroxydation des lipides (Nakatami, 2000). Brewer (2011) ; Przygodzka *et al.* (2014), montrent que les épices sont très riches en métabolites antioxydants tels que l'acide caféique, l'acide gallique, le zingiberene, le geranial, le geraniol et le b-bisabolene pour le gingembre ; l'acide P-hydroxybenzoïque, l'acide vanilique, le cinnamaldehyde, l'eugenol, l'eugenolacetate, le cinnamylacetate, le cinnamylalcool, l'estragole, le limonene, le camphène pour la cannelle ; le curcumine pour le curcuma...etc.

Selon la littérature, les polyphénols sont des supports majeurs de l'activité antioxydante. Cette activité est directement liée à la structure phénolique qui confère à la molécule la capacité de générer des radicaux libres stabilisés par résonance (Yordi, 2012).

Divers mécanismes pourraient être exercés par les polyphénols pour combattre les radicaux libres. Ces métabolites possèdent des groupes hydroxyles phénoliques ( $Ar-OH$ ) qui peuvent donc fournir des hydrogènes pour neutraliser et stabiliser les radicaux superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ), les peroxydes ( $ROO^{\bullet}$ ), les alkoxydes ( $RO^{\bullet}$ ) et l'hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ). Le

composé phénolique « radicalaire » résultant, est stabilisé par la délocalisation des électrons sur le cycle benzénique (Lü *et al.*, 2010).

De nombreux composés phénoliques sont également chélateurs d'ions métalliques de transition tels que le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) responsables de la production du radical  $\text{OH}^\bullet$  par la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lors de la réaction de Fenton (Pietta, 2000 ; Chikhi, 2013). En outre, l'autoxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^+$  est une source de  $\text{O}_2^\bullet$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante (Lü *et al.*, 2010 ; Yordi *et al.*, 2012).

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Cette action est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase, considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde (Lü *et al.*, 2010 ; Yordi *et al.*, 2012).

De nombreux flavonoïdes sont aussi de puissants inhibiteurs des métalloenzymes, lipoxygénase, myéloperoxydase et NADPH oxydase génératrices des radicaux libres (Dangles, 2012).

Les deux tests réalisés ont révélé la forte activité antioxydante de la cannelle et de la noix de muscade. Cependant, le classement des autres épices selon l'importance de leurs activités antioxydantes diffère d'un test à l'autre. En effet, le test DPPH a permis de mettre en évidence la faible activité antioxydante de la coriandre, alors que le test FRAP révèle que c'est le gingembre qui présente l'activité la plus faible. Cette différence pourrait être expliquée par la diversité moléculaire de chaque extrait, la diversité des oxydants ainsi que la diversité des mécanismes antioxydatifs, suggérant que les deux épices possèdent des molécules réagissant différemment avec les deux tests.

L'efficacité antioxydante de la cannelle est estimée par plusieurs auteurs. Asimi *et al.* (2013), ont trouvé que la cannelle est nettement plus efficace que le cumin et le gingembre dans la réduction du radical  $\text{DPPH}^\bullet$ . Cette efficacité, comparée à celle du curcuma et du gingembre a également été signalée par Denre, (2014). Lin, (2003) et Murcia, (2004) rajoutent que l'extrait éthanolique de la cannelle présente une inhibition significative (96,3%) par rapport à l'antioxydant naturel  $\alpha$ -tocophérol.

Le pouvoir antioxydant de la cannelle peut être expliqué par sa richesse en métabolites incluant le cinnamaldehyde et l'acide cinnamique qui ont des propriétés antioxydantes (Pasupuleti et Siew, 2014). Senanayake *et al.*, (2014) ont mentionné le potentiel inhibiteur significatif de la cannelle dans l'oxydation des acides gras et dans la production d'oxyde nitrique *via* l'inhibition de NF-kB (facteur nucléaire kappa B). Le cinnamaldehyde (E) extrait de *C. cassia* est le composé principal présent dans l'écorce (68-80.7%) (Dong *et al.*, 2013). Ce composé est bien connu pour son activité antityrosinase (Marongiu *et al.*, 2007, Shi *et al.*, 2005).

Actuellement, une grande attention est accordée aux inhibiteurs de tyrosinase en raison de leurs actions dans la suppression de l'hyperpigmentation ainsi que des effets de brunissement disgracieux observés dans les champignons, les fruits et les légumes exposés à la lumière ou à l'air. Par conséquent, les agents antityrosinase ont un large éventail d'applications dans les domaines cosmétiques, médicaux et diététiques (Pasupuleti and Siew, 2014).

La cannelle a également été utilisée avec d'autres herbes par Jain *et al.*, (2011) pour formuler une préparation à base de plantes contre l'oxyde nitrique et les dérivés des radicaux libres oxygénés afin de prévenir les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'arthrite... etc.

La richesse de la cannelle en tanins suggère leur contribution dans l'activité antioxydante de cette épice. En effet, ces métabolites sont connus pour leur forte activité antioxydante (Amarowicz, 2007).

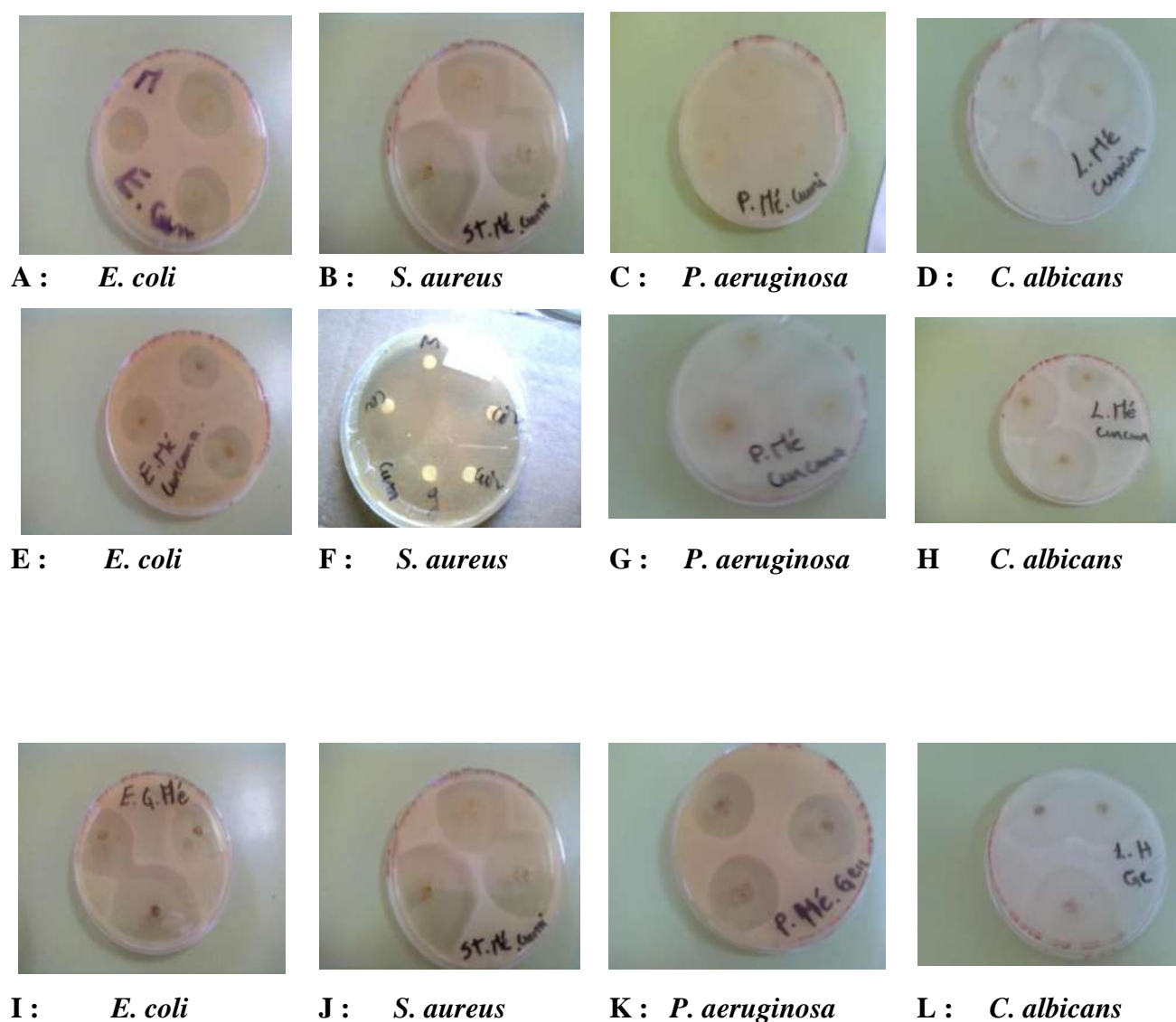
L'activité antioxydante de la noix de muscade est également confirmée par la littérature. Gupta et Rajpurohit, (2011) ont attribué cette activité à la richesse de la noix de muscade en composés antioxydants, essentiellement la myristicine, l'acide caféique, et d'autres composés. Néanmoins, une surdose en noix de muscade est toxique. L'ingestion d'une quantité de 20 grammes peut être mortelle. Les molécules responsables de cette toxicité sont la myristicine et le safrole (Rahman *et al.*, 2015).

Cette notion de toxicité est sans doute prise en considération par les anciens dans la préparation des mélanges d'épices tel que "Ras el hanout" où l'on remarque que les "fortes" épices ne sont présentes qu'en faibles proportions. De ce fait, avant d'utiliser et de combiner des épices, on doit savoir comment elles sont répertoriées et à quelles catégories elles appartiennent afin de maximiser leurs bienfaits et de minimiser leurs méfaits.

## 6.2. Activité antimicrobienne des extraits bruts

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des différents épices étudiées et de leurs mélanges est réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, traduite en diamètres des zones d'inhibition formées au tour des disques imbibés de ces extraits.

La figure 11 illustre quelques aromatoigrammes obtenus.



**Figure 11 :** Photographie de quelques aromatoigrammes obtenus avec les différentes souches testées. A, B, C, D pour le cumin, E, F, G, H pour le curcuma et I, J, K, L pour le gingembre.

Pour la détermination de la concentration inhibitrice minimale (CMI), différentes concentrations des extraits ont été testées : 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 mg/ml. Le tableau X englobe les valeurs des diamètres d'inhibition obtenus avec la concentration maximale (50 mg/ml) et les valeurs des CMI.

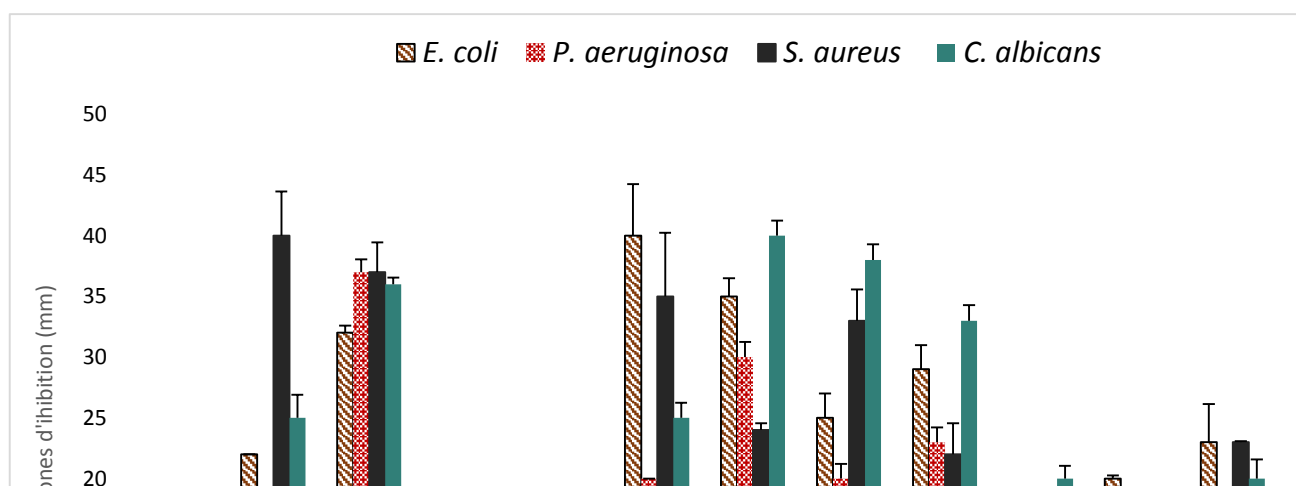
**Tableau X :** Diamètres d'inhibition des souches testées et CMI des différents extraits bruts

Souche Epice	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	Diamètre (mm) à 50mg/ml	CMI (C) (mg/ml)	Diamètre (mm) à 50mg/ml	CMI (mg/ml)	Diamètre (mm) à 50mg/ml	CMI (mg/ml)	Diamètre (mm) à 50mg/ml	CMI (mg/ml)
Coriandre	16±0.05	25<C<50	10±1.02	25<C<50	7±0.01	25<C<50	6	-
Carvi	22±0.0	6.25<C<12.5	10±0.0	25<C<50	40±3.65	1.56<C<3.12	25±1.89	12.5<C<25
Cumin	32±0.6	C<1.56	37±1.05	3.12<C<6.25	37±2.44	1.56<C<3.12	36±0.56	C<1.56
Fenouil	16±0.4	25<C<50	6	-	16±0.58	25<C<50	6	-
Anis vert	11±0.0	25<C<50	6	-	11±0.0	25<C<50	12±0.0	25<C<50
Poivre noir	40±4.25	1.56<C<3.12	20±0.0	6.25<C<12.5	35±5.23	1.56<C<3.12	25±1.25	6.25<C<12.5
Gingembre	35±1.5	C<1.56	30±1.25	6.25<C<12.5	24±0.54	12.5<C<25	40±1.25	C<1.56
Curcuma	25±1.99	3.12<C<6.25	20±1.2	3.12<C<6.25	33±2.56	1.56<C<3.12	38±1.29	C<1.56
Cannelle	29±1.55	3.12<C<6.25	23±1.33	6.25<C<12.5	22±0.21	6.25<C<12.5	33±2.60	C<1.56
Noix de muscade	19±0.0	25<C<50	6	-	14±0.45	25<C<50	20±1.05	25<C<50
Mélange 1	20±0.25	6.25<C<12.5	12±0.25	25 <C< 50	14± 2.4	12.5 <C< 50	14±2.3	12.55 <C<50
Mélange 2	23±3.14	6.25<C<12.5	16±1.2	25 <C< 50	23±0.07	6.25<C<12.5	20±1.56	6.25<C<12.5

C : CMI (concentration minimale inhibitrice)

Un diamètre égale à 6mm (correspond au diamètre du disque), indique une activité nulle

Pour comparer le pouvoir antimicrobien de nos épices contre les différentes souches testées, des histogrammes récapitulatifs des diamètres d'inhibition sont tracés et illustrés dans la figure 13.



**Figure 13 : Diamètres des zones d'inhibition des souches testées par extraits brutes des épices**

Pour tous les extraits, l'activité antimicrobienne est dose dépendante, ce qui a permis de déterminer la fourchette où se situe la concentration inhibitrice minimale.

Les extraits extrêmement actifs contre *E.coli* (G-), sont ceux du poivre noir, du gingembre et du cumin, ayant conduit, en contact de cette souche à l'apparition de grandes zones d'inhibition évaluées respectivement à  $40 \pm 4.25$ ,  $35 \pm 1.5$  et  $32 \pm 0.6$  mm. Les CMI de ces extraits sont comprises entre 3.12 et 6.25 mg/ml pour le poivre noir et inférieur à 1.56 mg/ml pour le cumin et le gingembre (Fig. 13 et tableau X). Cette bactérie semble également très sensible aux extraits de la cannelle, du curcuma et du carvi ayant provoqué des zones d'inhibition de  $29 \pm 1.55$ ,  $25 \pm 1.99$  et  $22 \pm 0.0$  respectivement.

L'activité anti *E. coli* de la noix de muscade, de la coriandre, du fenouil et de l'anis vert est moins importante que celle des épices déjà citées. Des zones d'inhibition comprises entre 11 et 19 mm ont été observées au contact des extraits de ces épices (Fig. 13 et tableau X).

Concernant l'effet des extraits bruts contre *P. aeruginosa* (G-), il apparait que l'extrait du cumin est exclusivement le plus inhibiteur de cette souche, formant un halo à diamètre de  $37 \pm 1.05$  mm avec une CMI située entre 3.12 et 6.25 mg/ml (Fig. 13 et tableau X). Les extraits bruts de la cannelle et du poivre noir sont aussi très actifs contre *P. aeruginosa* aboutissant à l'apparition des zones d'inhibition à diamètre de  $23 \pm 1.33$  et  $20 \pm 0.0$  mm respectivement (Fig. 13 et tableau X). Néanmoins, cette souche est très

résistante vis-à-vis les extraits du fenouil, de l'anis vert et de la noix de muscade (Fig. 13 et tableau X).

Le tableau X et la figure 13 montrent que *S. aureus* se distingue par une extrême sensibilité vis-à-vis des extraits du carvi, du cumin, du poivre noir et du curcuma. Les diamètres des zones d'inhibition atteignent  $40 \pm 3.65$ ,  $37 \pm 2.44$ ,  $35 \pm 5.23$  et  $33 \pm 2.56$  mm respectivement. Les CMI de ces épices contre cette souche sont comprises entre 1.56 et 3.12 mg/ml. Cette souche semble très sensible aux extraits de la cannelle et du gingembre ( $22 \pm 0.21$  et  $24 \pm 0.54$ ), moyennement sensible aux extraits du fenouil et de l'anis vert ( $16 \pm 0.58$  et  $11 \pm 0.0$ ) et résistante à l'extrait de la coriandre (Fig. 13 et tableau X).

La levure *C. albicans* est extrêmement sensible aux extraits du gingembre, du curcuma, du cumin et la cannelle, qui conduisent à la formation des halos de diamètres situés entre  $40 \pm 1.29$  mm pour le curcuma et  $33 \pm 2.60$  mm pour la cannelle, avec des CMI inférieures à 1.56 mg/ml. Cette levure est très sensible à l'extrait de l'anis vert, du carvi et de la noix de muscade et résistante à l'extrait du fenouil et de la coriandre (Fig. 13 et tableau X).

Concernant les mélanges "Ras el hanout" étudiés, il apparaît que l'extrait du deuxième mélange est plus inhibiteur que celui du premier, et ceci au contact de toutes les souches testées (Fig. 13 et tableau X). Cette différence est significative ( $p > 0.05$ ) avec la souche *S. aureus*, autour de laquelle les diamètres d'inhibition sont de  $14 \pm 2.4$  et  $23 \pm 0.07$  mm pour le premier et le deuxième mélange respectivement. Cette différence est également observée avec la levure *C. albicans* dont les zones d'inhibition au contact des deux extraits sont de  $14 \pm 2.3$  et  $20 \pm 1.56$  mm (Fig. 13 et tableau X).

Il ressort des résultats obtenus que, les extraits bruts du gingembre, du cumin, du poivre noir, du curcuma, de la cannelle et du carvi présentent une activité antimicrobienne plus importante que les autres épices. Cependant, l'efficacité de ces extraits diffère en fonction des souches testées. En effet, l'extrait brut du poivre noir suivi de celui du gingembre sont extrêmement actifs contre *E. coli*, les extraits du gingembre et du cumin sont les meilleurs inhibiteurs de *P. aeruginosa*. Au contact de *S. aureus*, c'est l'extrait du carvi et du cumin qui sont plus inhibiteurs. La levure *C. albicans* est particulièrement sensible aux extraits du gingembre et du curcuma (Fig. 13 et tableau X).



## Discussion

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des épices et leur pouvoir antimicrobien pouvant rivaliser ou remplacer celui des antibiotiques. L'efficacité du cumin, gingembre, cannelle, poivre et du curcuma contre les germes testés corrobore avec la littérature. En effet, Dua *et al.* (2013) ont signalé un effet significativement important du cumin envers *E.coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. L'étude de Islam *et al.* (2014) a aussi signalé un puissant effet antimicrobien du gingembre contre une gamme de bactéries pathogènes incluant *Escherichia coli*, *Pseudomonas aruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Un criblage antimicrobien évalué par Mahfuzul-Hoquea *et al.* (2008) a montré une extrême activité de l'extrait de la cannelle contre plusieurs germes contaminant les aliments. L'extrait du curcuma est un inhibiteur par excellence de *S. aureus* et *E. coli* et de *C. albicans* (Qaiser, 2013 ; Mithra *et al.*, 2012).

Beaucoup de métabolites secondaires, en particulier les produits phénoliques incluant les flavonoïdes, les tanins et autres, sont connus pour avoir des activités antimicrobiennes (Cowan, 1999 ; Bernonville, 2009). Les flavonoïdes, cas de flavan-3-ol (nommé également flavonol ou catéchine) et des flavones, exemple de l'apégénine contenu dans le cumin ont été trouvés efficaces contre *V. cholerae*, *S. mutans*, *C. jejuni*, *C. perfringes*, *E. coli*, *B. Cereus*, *H. pylori*, *S. aureus*, *L. acidophilus*, *A. naeslundii*, *P. oralis*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica*, *F. nucleatum*, *C. pneumonia* (Borris, 1996 ; Ahmada *et al.*, 2013). Les acides phénoliques comme l'acide cinnamique contenu dans la cannelle agissent contre *S.aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (Hinneburg *et al.*, 2006). Les tannins hydrolysable sont efficaces envers *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *E. coli*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Campylobacter* *Listeria* et *Candida parapsilosis*. Les tannins condensés sont des bactéricides de *S. mutans*, *E. coli*, *S. aureus*. Les lignanes agissent contre les différentes souches de *Mycobacterium tuberculosis* (Scalbert, 1991 ; Daglia, 2012).

Lorsqu'on compare la sensibilité des bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa*, et malgré qu'elles appartiennent à la même catégorie (Gram négatif), il apparait que les extraits bruts agissent plus efficacement sur *E.Coli* que sur *P. aeruginosa*. Cette dernière est trouvée complètement résistante à l'extrait brut du fenouil, de l'anis vert et de la noix de muscade. Par ailleurs, il a été constaté que *E. coli* (Gram négatif) est plus sensible aux extraits du gingembre, de la cannelle, du poivre noir, de la noix de muscade, et de la

coriandre que *S. aureus* (bactérie à Gram positif). Cette constatation abjure les données littéraires mentionnant la forte résistance des bactéries Gram négatif par rapport à celles de Gram positif causée par la différence structurale entre les deux types. Ces paradoxes pourraient être interprétés par de nos épices, compte tenu de la diversité de leurs constituants et plus particulièrement, les métabolites secondaires. Cette diversité des groupes structuraux et fonctionnels permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus avec des mécanismes variés (Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons et Coll., 2008; chikhi, 2013).

De plus chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Une étude effectuée sur plusieurs bactéries signale que l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fortement sensibles à ce flavonoïde. Par contre, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants *vis-à-vis* de cette molécule (Martini *et al.*, 2004 ; Akroum, 2011).

Plusieurs mécanismes pourraient être exercés par les métabolites pour tuer les microorganismes. Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les flavonoïdes, les tanins voire même les alcaloïdes pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par conséquent des lésions irréversibles induisant la mort du germe (Rhayour, 2002).

L'ADN bactérien représente également une cible importante. En effet, selon les travaux de Dadi et ses collaborateurs (2009), la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes : elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme, bloquant ainsi son activité, soit elle bloque le site de fixation de l'ATP où se trouve l'ADN gyrase. Dans les deux cas, l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

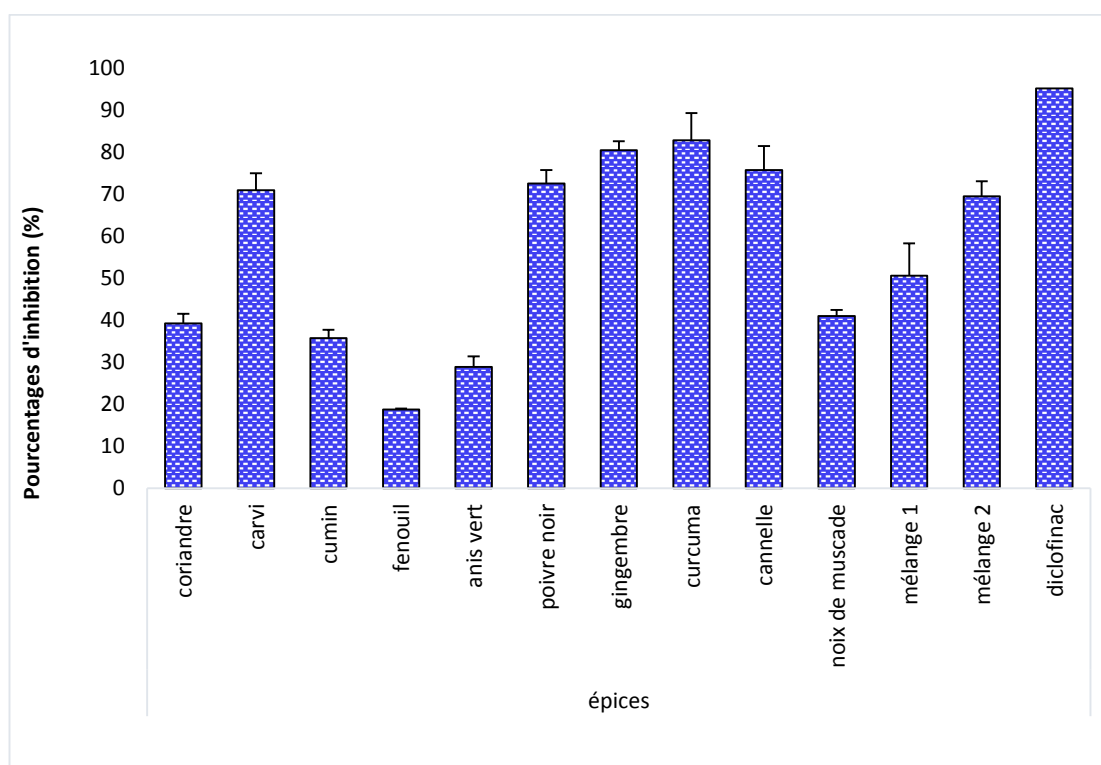
Mila et Scalbert (1994) et Kebieche (2009), rajoutent que le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe, vue la complexité et la diversité structurale de ces molécules, mais parmi les hypothèses avancées; l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes ; la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition du métabolisme microbien.

Cushnie et Lamb, (2005) ; Daglia, (2012) ; Rezaire, (2012) signalent que l'effet antimicrobien des flavonols et des flavanones est dû à leur aptitude à inhiber la germination des spores, représentés alors comme d'excellents candidats pour lutter contre les champignons pathogènes chez l'Homme.

La capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (Cowan, 1999 ; Daglia, 2012).

### 6.3. Activité anti-inflammatoire

La figure 14 représente les pourcentages d'inhibition d'hémolyse donnés par les épices et leurs mélanges ainsi que de control positif "diclofenac" à la concentration de 2mg/ml.



**Figure 14 : Pourcentages d'inhibition de la thermo-hémolyse**

Les épices étudiées stabilisent différemment la membrane des globules rouges contre l'effet thermique (Fig. 14).

La figure 14 laisse apparaître l'effet topique des extraits du curcuma et du gingembre sans différence notable entre les deux dans la protection des érythrocytes ( $p>0.05$ ), où ils enregistrent les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse de  $82.88\pm 6.45\%$  et  $80.47\pm 2.15\%$  respectivement. Le pourcentage d'inhibition de ces épices est cependant inférieur à celui du témoin positif qui s'élève à  $95.2\%$ .

La cannelle, le poivre noir et le carvi donnent des pourcentages d'inhibition compris entre  $75.80 \pm 5.66$  à  $71.00\pm 4.02 \%$  respectivement, semblent également efficaces dans la protection des érythrocytes (Fig. 14).

Des pourcentages d'inhibition de  $41.00\pm 1.5$ ,  $39.26\pm 2.33$ , et  $35.80\pm 1.98\%$  sont observés en présence de l'extrait brut de la noix de muscade, la coriandre et le cumin indiquant leur faible effet inhibiteur de l'hémolyse (Fig. 14).

Cependant, l'extrait de l'anis vert suivie de celui du fenouil avec leurs pourcentages d'inhibition de  $28.93\pm 2.51 \%$  et  $18.78\pm 0.25 \%$  respectivement, sont les moins efficaces dans la protection des globules rouges (Fig. 14).

L'examen de la figure 14 fait ressortir que les extraits des mélanges "Ras el hanout" inhibent inégalement l'hémolyse des érythrocytes. Le deuxième mélange avec son pourcentage d'inhibition de  $69.54\pm 3.54 \%$  semble le plus efficace que le premier mélange ( $50.65\pm 7.66$ ).

## Discussion

L'étude *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire des épices par inhibition de l'hémolyse des hématies induite thermiquement, révèlent que les dix épices analysées et leurs mélanges ont un effet antihémolytique. Cette expérience mime le mécanisme *in vivo* en cas des brûlures ou d'une fièvre prolongée suite à une inflammation, provoquant ainsi la dilatation des membranes érythrocytaires et leur éclatement.

La destruction des hématies paraît être la conséquence d'une fragilité osmotique et mécanique accrue à cause d'une altération thermique de la spectrine (protéine fibreuse hétérodimérique du cytosquelette de la membrane des hématies, reliée à la membrane plasmique), témoigné par la présence de schizocytes dans le frottis sanguin (Kimber et Lander, 1964).

De nombreuses études *in vitro* ont montré, l'effet significatif de stabilisation de la membrane des hématies par des plantes médicinales telles que *Persicaria stagnina* (Ahmed *et al.*, 1997), *Scoparia dulcis* (Ahmed *et al.*, 2001), *Polygonum viscosum*

(Datta *et al.*, 2004) et *Sida cordifolia* (Sutradhar *et al.*, 2007). Ces études ont démontré que cette activité est due aux sesquiterpènes, diterpènes, glycosides, flavonoïdes et aux alcaloïdes.

Rashid *et al.*, (2011) ont trouvé que des flavonoïdes, tels que la gossypine, gnaphaline, hespéridine, hibifoline, hypolaetine, oroxindine, et la quercétine ont des activités protectrices des hématies.

Notre expérience nous conduit à estimer que le curcuma et le gingembre sont les plus efficaces dans la stabilisation membranaire des hématies par rapport aux autres épices. Cependant, aucune étude comparative n'est trouvée dans la littérature évaluant l'activité antiinflammatoire des épices par le test de thermo-déstabilisation des hématies. Le plus souvent, l'étude de cette activité est menée *in vivo* sur des souris.

En effet, le curcuma ayant de fortes teneurs en flavonoïdes et en polyphénols et une activité anti-inflammatoire remarquable, contient un composé appelé curcumine qui freine la synthèse de l'acide arachidonique (Grosogoeat et Compper, 2009). Cette Curcumine inhibe également certaines enzymes et molécules impliquées dans l'inflammation, telles que la phospholipase, la lipoxygénase, la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), les leucotriènes, la thromboxane, les prostaglandines, l'oxyde nitrique, la collagénase, l'élastase, la hyaluronidase, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), interféron protéine inductible, TNF (facteur de nécrose tumorale) et l'interleukine-12 (Deodhar *et al.*, 1980 ; Chen *et al.*, 2006 ; Rahman *et al.*, 2006).

Les molécules responsables de l'activité antiinflammatoire chez le gingembre sont le 6-shogaol et le 1-déhydro-6-gingerdione. Ces deux molécules ont été découvertes et caractérisées structurellement dans les différentes variétés de gingembre. Le 1-déhydro-6-gingerdione isolé de *Zingiber officinale* dans la conformation énolique, se caractérise par la présence d'un groupe carbonyle à effet inhibiteur à proximité du noyau aromatique, par l'intermédiaire d'une interaction hydrophobe et hydrogénique, sur l'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX-2) qui provoque l'inflammation (Aryaeian et Tavakkoli, 2015). Il a été récemment observé un effet synergique du gingembre avec un traitement anti-tuberculose plus bénéfique que le traitement anti-tuberculose seul (Kumar, 2013).

L'effet antiinflammatoire de la cannelle a été prouvé par l'étude de Pasupuleti et Siew (2014), ayant rapporté que le 2-hydroxycinnamaldehyde isolé de l'écorce de la cannelle, en inhibant l'activation du facteur nucléaire kappa-chaîne légère-activateur de

cellules B (NF-kB), arrête la production d'oxyde nitrique, indiquant ainsi que cette substance pourrait potentiellement être utilisée comme agent anti-inflammatoire.

Singh et Duggal (2009) et Tasleem (2014), ont indiqué que la pipérine isolée de *P. nigrum* (poivre noir) en inhibant le facteur de nécrose tumorale (TNF-  $\alpha$ ) responsable de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, il bloque l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium au cours des réactions inflammatoire, comme il participe considérablement à la réduction des cytokines pro-inflammatoires (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* -GMCSF-, interleukine 6 et interleukine 1).

Pour traiter une inflammation, de nombreux médicaments sont couramment prescrits. On distingue les corticoïdes et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Néanmoins, ils peuvent provoquer des effets secondaires à l'origine d'intoxications, notamment par surdosage ou par interaction avec d'autres médicaments, allant des nausées, vomissements, diarrhées, pesanteur ou douleurs d'estomac, voire d'ulcère et d'hémorragie digestive. Ces médicaments peuvent également causer des réactions allergiques (urticaire et asthme), des céphalées, fatigue, acouphènes et même l'hypertension (Capet *et al.*, 2001)

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de différentes épices montre que ces plantes possèdent un pouvoir antiinflammatoire, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires pour minimiser l'usage des médicaments antiinflammatoires à effet indésirables.

#### **6.4. Corrélation entres les métabolites dosés et les activités biologiques étudiées**

Afin de mettre en exergue les inter-liens métaboliques et physiologiques menés chez les épices étudiées, une matrice de corrélation globale permet de constater la forte dépendance entre les teneurs des épices en polyphénols et leur activité antioxydante, le coefficient de corrélation  $r$  est de 0.65 avec  $p < 0.01$ . Cette même activité est faiblement corrélée avec les flavonoïdes ( $r=0.44$ ), mais plus faiblement avec les tanins condensés ( $r=0.35$ ) et les tanins hydrolysables ( $r=0.34$ ) (tableau XI).

Maizura (2011), par une étude sur le curcuma et le gingembre ; Turgay et Esen (2015), par une étude sur le gingembre, les clous de girofle, la bruyère, la menthe pouliot, le piment de la Jamaïque et le thym de serpolet et Ereifej (2016), par une étude

sur les clous de girofle, la cannelle, le curcuma, le cumin, le gingembre et la coriandre ont signalé la forte corrélation des polyphénols avec l'activité antioxydante des espèces citées. Néanmoins, Kähkönen, (1999), par une étude sur 92 plantes, a trouvé une corrélation non significative entre les polyphénols et l'activité antioxydante.

La faible corrélation entre le contenu des épices en flavonoïdes et leur activité antioxydante a également été signalée par Phatak *et al.*, (2015). Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité anti-oxydante est un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment dans la lutte contre l'oxydation, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait (Dorman *et al.* 2003 ; Tawaha *et al.*, 2007).

Au regard des souches testées, leur inhibition semble positivement corrélée avec les teneurs en composés phénoliques, très fortement et significativement avec *C. albicans* ( $r=0.67^{**}$ ), mais plus faiblement avec *P. aeruginosa* ( $r= 0.22$ ).

La matrice révèle une faible corrélation des flavonoïdes avec l'activité antimicrobienne. Les coefficients de corrélation varient de 0.29 avec *C. albicans* à 0.099 avec *P. aeruginosa* (tableau XI).

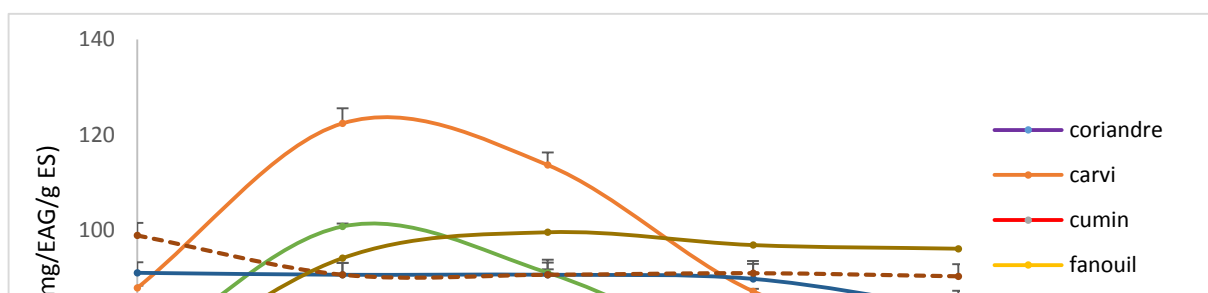
Les deux types de tanins dosés s'avèrent faiblement corrélés avec l'activité antimicrobienne. Pour les différentes souches testées, le coefficient "r" est compris entre 0.06 et 0.29 pour les tanins hydrolysables et entre 0.04 et 0.29 pour les tanins condensés (tableau XI).

Entre les activités antimicrobiennes elles-mêmes, une forte dépendance significative est observée, témoignée par leurs coefficients de corrélation allant de 0.56<sup>\*\*</sup> à 0.82<sup>\*\*</sup> (tableau XI).

La corrélation globale entre l'activité antimicrobienne et le contenu des épices en métabolites dosés est faible, ceci pourrait être expliqué par le fait qu'en plus des composés phénoliques, les extraits renferment d'autres substances dotées d'activités antimicrobiennes comme les alcaloïdes, les terpénoïdes, les lectines, les polypeptides, les glucosinolates et autres (Bobbarala, 2012).

L'activité anti-inflammatoire semble fortement corrélée avec les polyphénols mais faiblement avec les flavonoïdes. Le coefficient "r" est de 0.77<sup>\*\*</sup> et 0.39 respectivement. Avec les deux types des tanins, l'activité décrite n'est que faiblement corrélée avec ces métabolites (tableau XI).

L'effet antiinflammatoire des épices mis en évidence par leur aptitude à protéger la membrane des globules rouges de la dégradation thermique, semble être attribuer beaucoup plus aux composés phénoliques. En effet et selon la littérature, les coumarines (callophlloïde et daphnétine), les alcaloïdes (betonicine, glaucine et pépirine -chez le poivre noir), les monoterpénoides, diterpénoides et les sesquiterpénoides (artabsin, camphor, linalool-chez la coriandre-), phénylpropanoïdes (myristicine chez la noix de muscade et le carvi), des quinones (Aethiopinone), les saponine (arvenoside A) pourrait exercer des effets antiinflammatoires notables (Perez, 2001).





**Figure 15 : Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en polyphénols**

D'après la figure 15, on peut constater que les composés phénoliques des différentes épices et leurs mélanges sont influencés différemment par le traitement thermique.

Après 30 min de traitement, une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) en polyphénols est observée chez les extraits du carvi, du poivre noir, de la cannelle, du fenouil et de la noix de muscade, allant de  $87.70 \pm 0.96$  à  $122.33 \pm 6.3$ , de  $73.32 \pm 1.01$  à  $100.67 \pm 1.95$ , de  $60.38 \pm 3.03$  à  $65.62 \pm 3.69$ , de  $9.37 \pm 0.47$  à  $26.21 \pm 1.50$  et de  $68.81 \pm 1.32$  à  $94.01 \pm 1.17$  mgEAG/gES respectivement. Au-delà de ce temps, les concentrations baissent progressivement. En effet, on observe que deux heures de traitement thermique affectent négativement les concentrations phénoliques des épices citées par rapport aux témoins non traités, à l'exception du fenouil et de la noix de muscade. Cette diminution est significative ( $p > 0.05$ ) chez le poivre noir et le carvi (Fig. 15).

La température, comme témoigne la figure 14, n'affecte que négativement les teneurs du cumin, de l'anis vert et du curcuma en polyphénols. Cette diminution est significative ( $p > 0.05$ ) après 30 min de traitement chez l'anis et le curcuma passant de  $24.81 \pm 1.7$  à  $13.43 \pm 0.41$  et de  $98.79 \pm 5.28$  à  $91.01 \pm 5.03$  mgEAG/gES respectivement.

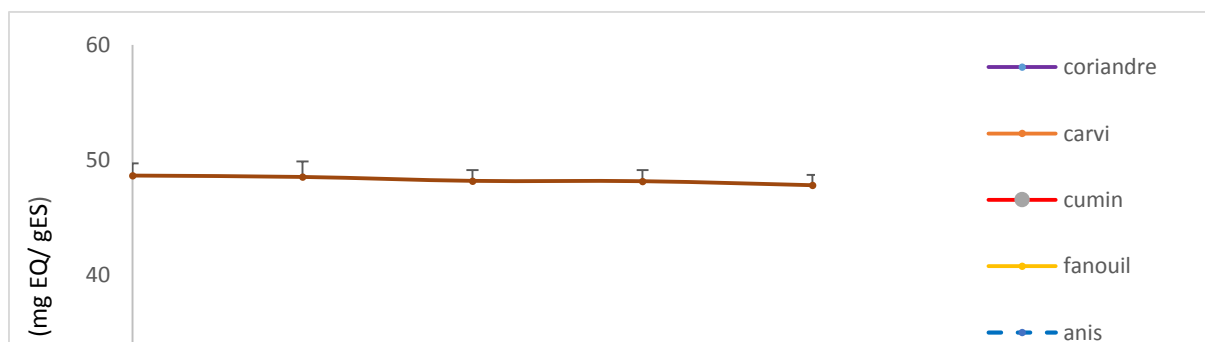
Au-delà, la réduction des teneurs en polyphénols est très faible. Ce n'est qu'après deux heures que le traitement thermique affecte négativement les teneurs du cumin en polyphénol dont la diminution est significative ( $p < 0.05$ ) (Fig. 15).

Les composés phénoliques de la coriandre et surtout du gingembre semblent thermostables, sachant que chez de la coriandre, une légère augmentation non significative est observée ( $p > 0.05$ ) (Fig.15).

Le traitement thermique pendant 30 minutes améliore les teneurs des mélanges "Ras el hanout" en composés phénoliques. On enregistre une augmentation significative allant de  $23.72 \pm 2.5$  à  $30.98 \pm 3.40$  et de  $43.04 \pm 3.56$  à  $51.93 \pm 2.10$  mgEAG/gES chez le premier et le deuxième mélange respectivement (Fig. 15). Après cette durée, les teneurs en polyphénols de deux mélanges baissent progressivement mais non significativement jusqu'à la fin du traitement (Fig. 15).

### 7.1.2. Effet du traitement thermique sur les teneurs en flavonoïdes

La mise en exergue de l'impact du traitement thermique sur le contenu de différentes épices en flavonoïdes montre que ces derniers évoluent différemment avec ce traitement (Fig. 16).



**Figure 16 : Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en flavonoïdes**

Les flavonoïdes de la majorité des épices étudiées semblent thermostables, ceci est remarqué chez le curcuma, la cannelle, le cumin, le gingembre, la coriandre et l'anis vert. Pour lesquelles aucunes modifications significative n'a été observée pendant le traitement ( $p > 0.05$ ), les valeurs enregistrées entre les témoins non traités et les extraits traités pendant deux heures évoluent respectivement de  $48.62 \pm 1.07$  à  $47.78 \pm 0.9$ , de  $13.76 \pm 1.15$  à  $14.05 \pm 0.97$ , de  $6.31 \pm 0.64$  à  $6.05 \pm 0.8$ , de  $4.89 \pm 0.95$  à  $4.27 \pm 0.6$ , de  $0.77 \pm 0.19$  à  $0.76 \pm 0.15$  et de  $3.75 \pm 0.14$  à  $4.72 \pm 0.13$  mgEQ/gES (Fig. 16).

En revanche, le traitement thermique affecte positivement le contenu en flavonoïdes du carvi et surtout celui du poivre noir. On assiste à une augmentation significative de ces métabolites chez ce dernier allant de  $6.31 \pm 0.39$  pour le témoin à  $22.14 \pm 0.1$  mg EQ/g ES après deux heures de traitement thermique (Fig. 16).

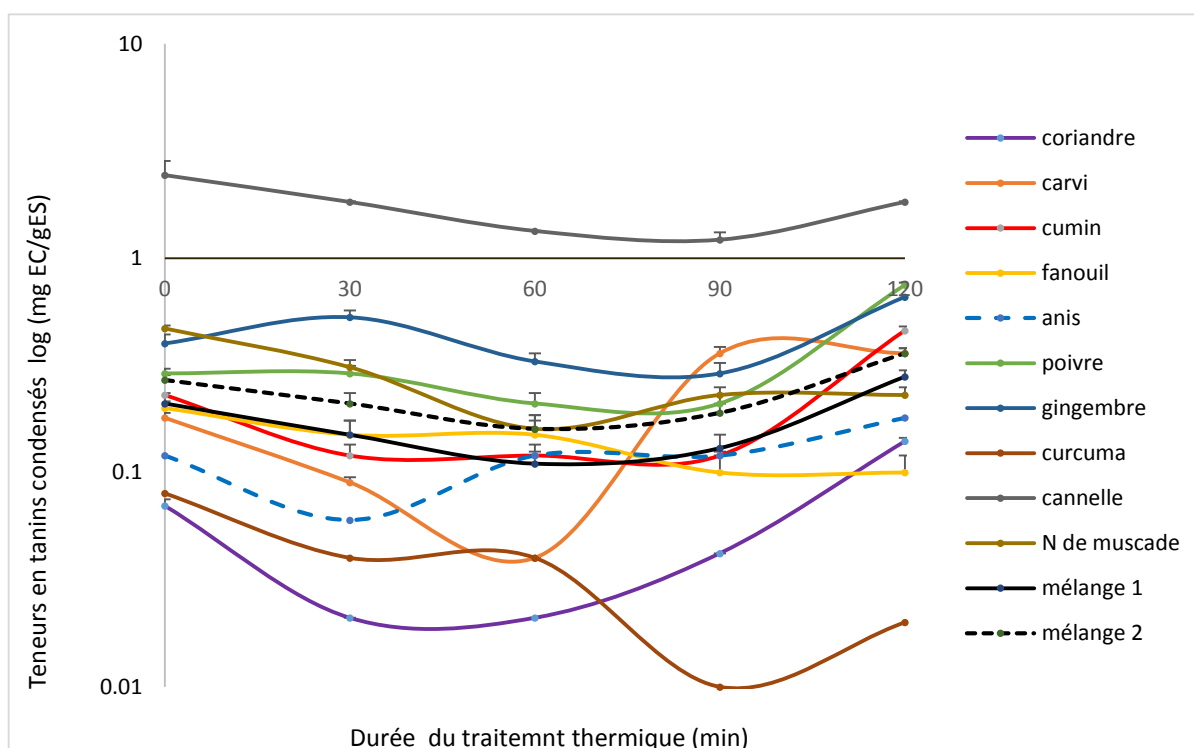
Les concentrations en flavonoïdes exhibent des fluctuations pour la noix de muscade et le fenouil sous l'action de la température. Toutefois, ces modifications sont non significatives en les comparant avec celles des témoins non traités (Fig. 16).

Les teneurs en flavonoïdes varient de la même façon chez les deux mélanges "Ras el hanout", montrant une diminution non significative après 30 min de traitement

thermique à 200°C. Les teneurs baissent de  $6.65 \pm 0.02$  à  $6.06 \pm 0.1$  mg EQ/g ES dans le mélange 1 et de  $11.32 \pm 0.1$  à  $9.41 \pm 0.33$  mg EQ /g ES dans le deuxième, ensuite, les teneurs en flavonoïdes tendent à augmenter mais non significativement jusqu'à la fin de l'expérimentation ( $p > 0.05$ ) (Fig. 16).

### 7.1.3. Effet du traitement thermique sur les teneurs en tanins hydrolysables et en tanins condensés

L'impact du traitement thermique sur le contenu des épices en tanins condensés est déterminé et présenté dans la figure 17.



**Figure 17 : Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en tanins condensés**

L'allure des courbes représentant les teneurs des épices étudiées en tanins condensés est généralement sinusoïdale. Il apparaît en début du traitement thermique de ces épices une diminution de leurs teneurs en ces métabolites, suivie d'une augmentation avant de tendre à diminuer à la fin de l'expérimentation pour certaines

épices et de continuer à augmenter pour la majorité d'entre elles. Les évolutions des contenus en tanins condensés constatées varient selon les épices (Fig. 17).

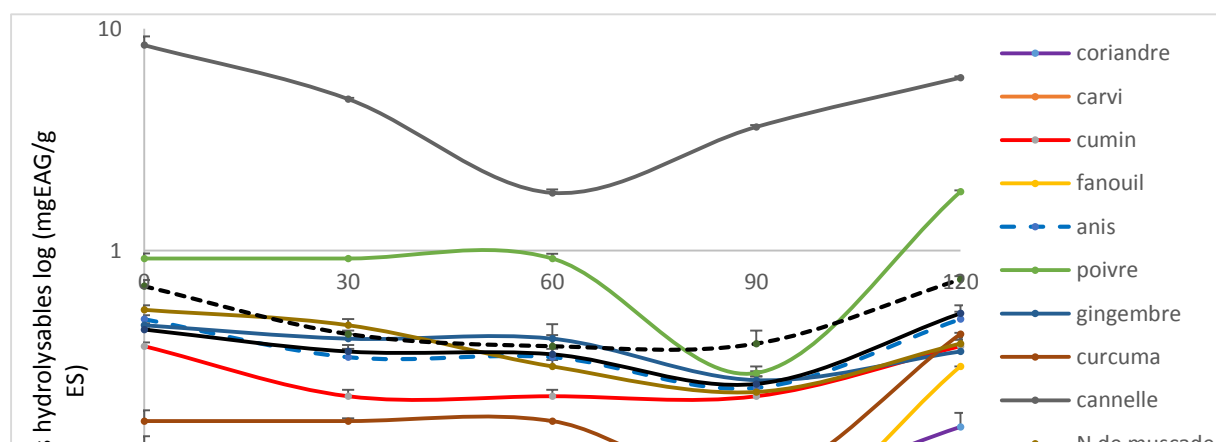
Chez la coriandre, le cumin, l'anis vert, la cannelle, la noix de muscade, le carvi et le curcuma, les teneurs en tanins condensés ont diminuées significativement après 30 min d'exposition à la température. Ces concentrations passent de  $0.07 \pm 0.01$  à  $0.027 \pm 0.0$ , de  $0.23 \pm 0.01$  à  $0.12 \pm 0.03$ , de  $0.12 \pm 0.02$  à  $0.06 \pm 0.0$ , de  $2.44 \pm 0.8$  à  $1.83 \pm 0.02$ , de  $0.47 \pm 0.03$  à  $0.16 \pm 0.05$ , de  $0.18 \pm 0.02$  à  $0.09 \pm 0.01$  et de  $0.08 \pm 0.0$  à  $0.04 \pm 0.0$  mg EC/g ES respectivement. Chez le poivre noir, cette diminution n'est observée qu'après 90 min de traitement thermique (fig. 17).

La figure 17 fait également apparaître, qu'un traitement thermique prolongé (deux heures) augmente considérablement le contenu des épices citées à l'exception de la cannelle et de la noix de muscade. Les concentrations en tanins condensés du cumin, du poivre noir et du gingembre soumis à  $200^{\circ}\text{C}$  dépassent celles des témoins non traités. Leurs valeurs sont de  $0.46 \pm 0.04$ ,  $0.72 \pm 0.06$  et  $0.66 \pm 0.02$  mg EC/g ES respectivement au lieu de  $0.23 \pm 0.01$ ,  $0.29 \pm 0.01$  et  $0.4 \pm 0.08$  mg EC/g ES dans les mêmes épices non traitées (Fig. 17).

Par ailleurs, 30 min de traitement thermique affecte positivement le contenu du gingembre en tanins condensés qui passe de  $0.4 \pm 0.08$  à  $0.53 \pm 0.07$  mg/g ES, suivi d'une diminution ( $0.26 \pm 0.07$  mg EC/g ES) après 90 min. A la fin du traitement thermique ce contenu atteint une valeur plus élevée de  $0.66 \pm 0.02$  mg EC/g ES (Fig. 17).

La teneur du fenouil en tanins condensés diminue progressivement au cours du traitement thermique sans aucune augmentation (Fig. 17).

Comme pour les tanins condensés, les teneurs en tanins hydrolysables exhibent une diminution chez toutes les épices étudiées suivie d'une augmentation à la fin du traitement (Fig. 18).



**Figure 18 : Effet du traitement thermique sur les teneurs des épices et leurs mélanges en tanins hydrolysable**

Après 30 min de traitement thermique, une diminution des teneurs en tanins hydrolysables est observée chez la cannelle, le carvi, la coriandre, le cumin, la noix de muscade, le gingembre et l'anis vert. Leurs valeurs passent de  $8.44 \pm 1.6$  à  $4.82 \pm 0.06$ , de  $0.08 \pm 0.02$  à  $0.04 \pm 0.0$ , de  $0.13 \pm 0.03$  à  $0.08 \pm 0.0$ , de  $0.37 \pm 0.03$  à  $0.22 \pm 0.03$ , de  $0.54 \pm 0.05$  à  $0.46 \pm 0.06$  de  $0.46 \pm 0.02$  à  $0.40 \pm 0.04$  et de  $0.49 \pm 0.04$  à  $0.33 \pm 0.06$  mg EAG/g ES respectivement (Fig. 18).

La diminution des teneurs en tanins hydrolysables chez le fenouil, le poivre noir et le curcuma ne se produit qu'après 90 min de traitement thermique (Fig. 18).

Après deux heures de traitement thermique, tous les extraits exhibent une re-augmentation de leurs contenus en tanins hydrolysables. Cette augmentation est significative pour le curcuma, le poivre noir et le fenouil dont les concentrations finales de leurs tanins hydrolysables sont de  $0.42 \pm 0.01$ ,  $1.84 \pm 0.05$  et  $0.3 \pm 0.0$  mg EAG/ g ES respectivement (Fig. 18).

Les teneurs des mélanges "Ras el hanout" en tanins condensés et hydrolysables varient de la même façon sous le traitement thermique.

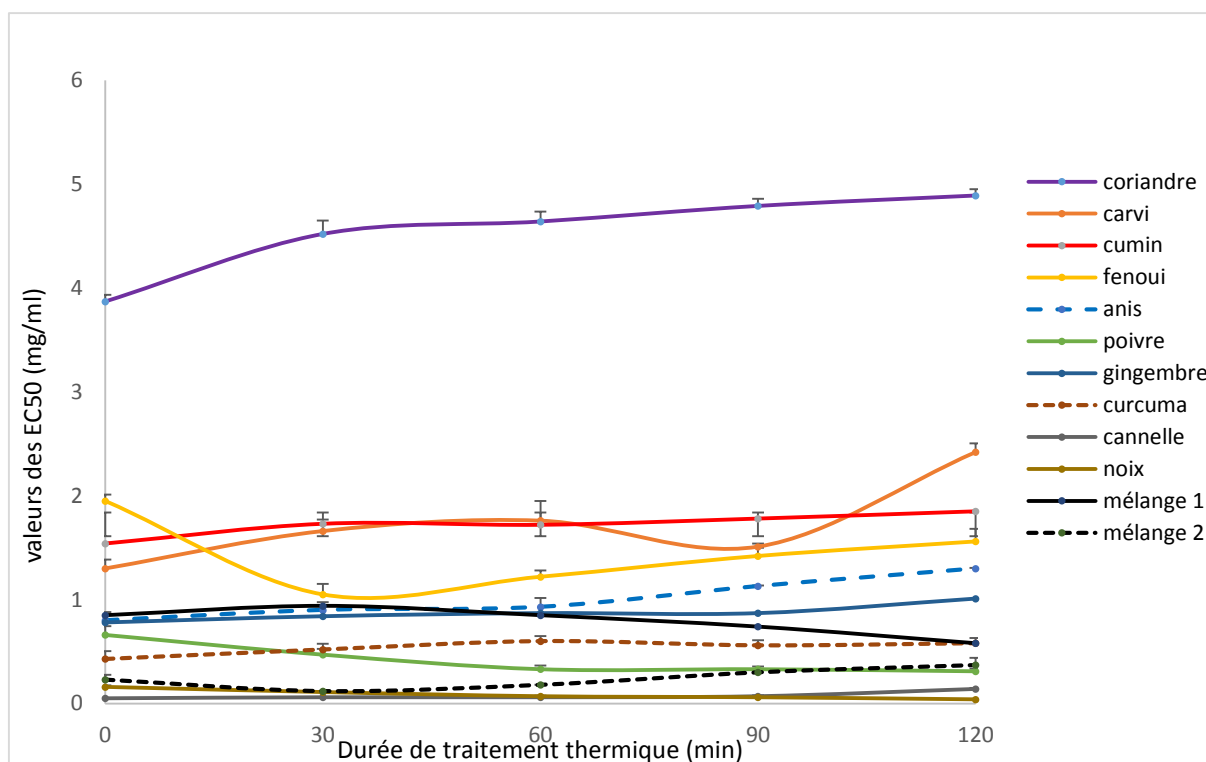
Après 30 min de traitement, les deux types de tanins témoignent d'une diminution. Pendant ce temps, les teneurs en tanins hydrolysables diminuent de  $0.44 \pm 0.01$  à  $0.35 \pm 0.05$  et de  $0.69 \pm 0.09$  à  $0.42 \pm 0.03$  mg EAG/g ES pour le mélange 1 et le mélange 2 respectivement. Celles des tanins condensés varient de  $0.21 \pm 0.05$  à  $0.15 \pm 0.01$  et de  $0.27 \pm 0.02$  à  $0.21 \pm 0.09$  mg EC/g ES chez le premier le deuxième respectivement. Cette diminution se poursuit jusqu'à 60 min de traitement pour les

tanins condensés et 90 min pour les tanins hydrolysables, où l'on note une diminution significative de leurs teneurs évaluées à  $0.25 \pm 0.0$  et  $0.38 \pm 0.11$  mg EAG/ g ES en tanins hydrolysables et  $0.11 \pm 0.0$  et  $0.16 \pm 0.0$  en tanins condensés pour le premier et le deuxième mélange respectivement (Fig. 17 et 18). Cependant, un traitement de deux heures conduit à une augmentation significative de ces métabolites chez les deux mélanges (Fig. 17 et 18).

## 7.2. Effet du traitement thermique sur les activités biologiques

### 7.2.1. Effet du traitement thermique sur l'activité antioxydante

Le traitement thermique des épices étudiées semble affecter plus ou moins différemment leurs activités antioxydantes (Fig. 19).



**Figure 19 : Effet du traitement thermique sur l'activité antioxydante des épices et leurs mélanges**

Une augmentation de l'activité antioxydante est constatée chez le poivre noir, le fenouil, la noix de muscade et la noix de muscade, après 30 min du traitement thermique. Cette augmentation est attestée par l'abaissement de leurs  $EC_{50}$  de  $0.66 \pm 0.0$  à  $0.47 \pm 0.11$ , de  $1.95 \pm 0.12$  à  $1.05 \pm 0.20$  et de  $0.16 \pm 0.03$  à  $0.11 \pm 0.02$  mg/ml

respectivement (Fig. 19). Au-delà de 60 min jusqu'à deux heures de traitement, on observe la stabilisation de l'activité antioxydante pour le poivre noir, une diminution pour le fenouil. Alors que, chez la noix de muscade cette activité est augmentée progressivement atteignant une  $EC_{50}$  de  $0.04 \pm 0.0$  mg/ml après 120 min du traitement thermique (Fig. 19).

L'activité antioxydante des autres épices représentées par la coriandre, le carvi, le cumin, le gingembre, le curcuma, l'anis vert et la cannelle a évolué négativement sous l'effet de la température (Fig. 19). Après 30 min de traitement, la diminution est non significative chez ces épices à l'exception de la coriandre, chez laquelle, la  $EC_{50}$  augmente de  $3.87 \pm 0.13$  à  $4.52 \pm 0.26$  mg/ml (Fig. 19).

L'évolution négative du pouvoir antioxydant des épices citées se poursuit jusqu'à la fin du traitement de manière significative chez la coriandre, le carvi, le curcuma et la cannelle. Les  $EC_{50}$  de ces épices traitées sont plus importantes que celles des témoins. On note le passage de  $3.87 \pm 0.13$  à  $4.89 \pm 0.12$ , de  $1.30 \pm 0.17$  à  $2.42 \pm 0.17$ , de  $0.43 \pm 0.15$  à  $1.3 \pm 0.21$  et de  $0.05 \pm 0.0$  à  $0.14 \pm 0.02$  mg/ml respectivement (Fig. 19).

Le traitement thermique des mélange "Ras el hanout" pendant 30 min conduit à l'augmentation de l'activité antioxydante du mélange 2 traduite par la diminution de sa  $EC_{50}$  de  $0.23 \pm 0.09$  à  $0.12 \pm 0.0$ , alors que cette activité connaît une diminution dans le mélange 1 où l'on assiste à l'augmentation de la  $EC_{50}$  qui passe de  $0.85 \pm 0.25$  à  $0.94 \pm 0.04$  mg/ml (Fig. 19).

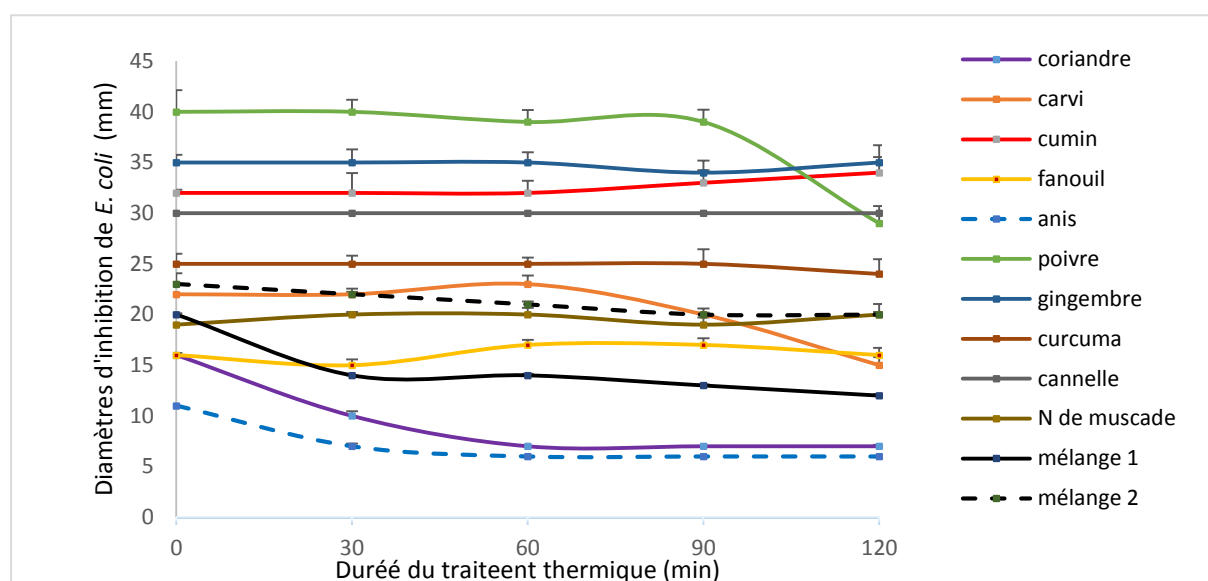
Après 30 minutes de traitement thermique, on assiste à un renversement de situation entre les deux mélanges. Le premier témoigne d'une augmentation de son pouvoir antioxydant, alors que le deuxième voit son activité diminuer progressivement jusqu'à la fin du traitement. Les  $EC_{50}$  respectives des deux mélanges évoluent de  $0.58 \pm 0.1$  à  $0.85 \pm 0.25$  mg/ml et de  $0.37 \pm 0.14$  à  $0.23 \pm 0.09$  mg/ml (Fig. 19).

### **7.2.2. Effet du traitement thermique sur l'activité antimicrobienne**

Les extraits bruts des différentes épices et de leurs mélanges portés à 200 °C pendant des temps différents et déposés ensuite au contact des souches testées



conduisent à l'apparition des zones d'inhibition de tailles variables (Fig. 20, 21, 22 et 23).



**Figure 20 : Effet du traitement thermique sur l'activité anti *E. coli* des épices étudiées et de leurs mélanges**

D'après les résultats de la figure 20, il apparaît que le traitement thermique agit différemment sur le pouvoir inhibiteur des extraits d'épices contre *E. coli*.

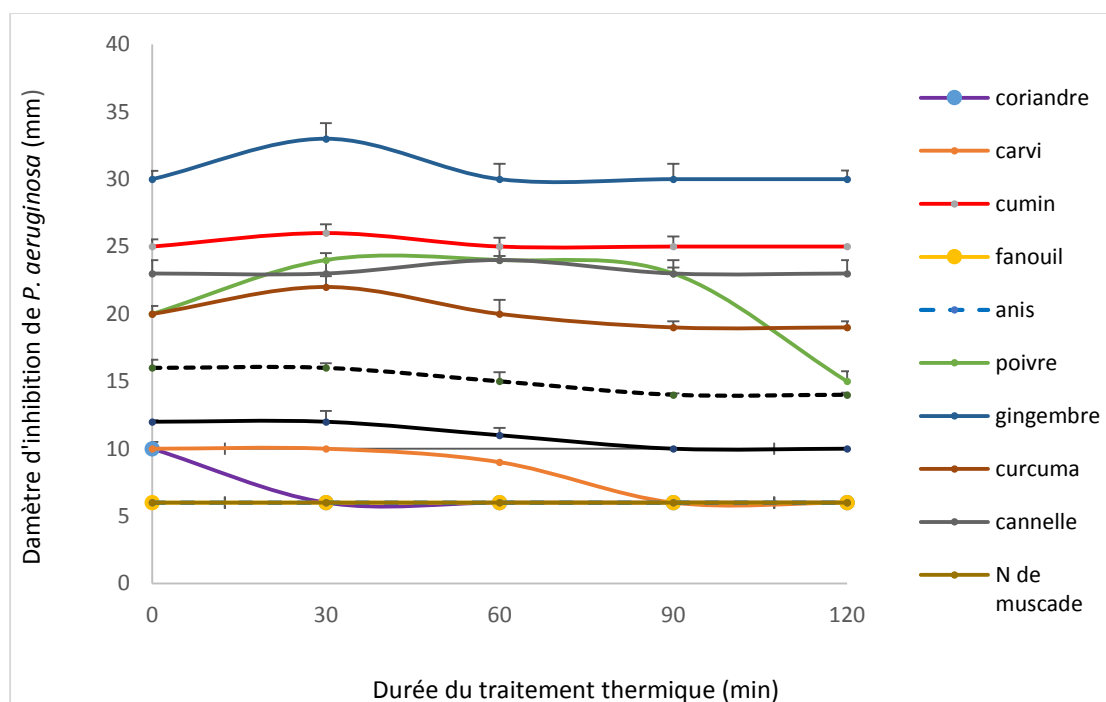
Un traitement thermique de 30 min affaiblit significativement ( $p < 0.05$ ) l'activité anti *E. coli* de la coriandre et de l'anis vert. Les diamètres des halos formés passent de  $16 \pm 0.05$  à  $10 \pm 0.9$  mm et de  $11 \pm 0.0$  à  $7 \pm 0.54$  mm respectivement. Cette activité devient nulle après 60 min de traitement thermique (Fig. 20).

Néanmoins, l'activité antimicrobienne des extraits du poivre noir et du carvi contre *E. coli* diminue après 90 min de traitement thermique. Avec lesquelles les diamètres d'inhibition baissent de  $40 \pm 4.25$  à  $29 \pm 3.4$  et de  $22 \pm 0.0$  à  $15 \pm 1.6$  mm respectivement (Fig. 20).

L'examen de la figure 20 ressort également que l'effet inhibiteur initialement fort de la cannelle, du curcuma, du gingembre et de la noix de muscade envers *E. coli* est thermostable pendant les deux heures de traitement thermique.

Cependant, l'activité contre *E. coli* de l'extrait du cumin est affectée positivement mais non pas significativement ( $P > 0.05$ ) pendant le traitement thermique, ceci est certifié par les diamètres d'inhibition variant de  $32 \pm 0.6$  à  $34 \pm 3.1$  mm (Fig. 20).

Le traitement thermique des extraits de fenouil, de la noix de muscade et de l'anis vert ne semble pas avoir modifié leur activité anti *P. aeruginosa*. Cependant, ce traitement affecte négativement l'efficacité des extraits de la coriandre après 30 minutes et du carvi après 90 minutes contre la souche testée (Fig. 21).



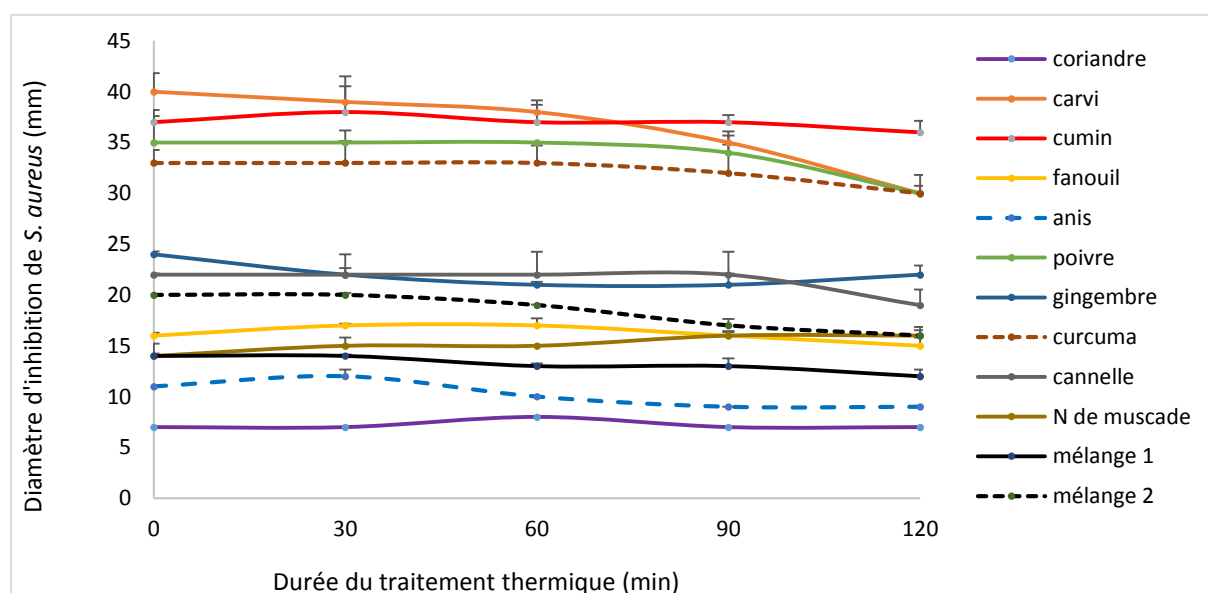
**Figure 21 : Effet du traitement thermique sur l'activité anti *P. aeruginosa* des épices étudiées et de leurs mélanges.**

L'activité antibactérienne des extraits de poivre noir, du gingembre et du curcuma contre *P. aeruginosa* augmente après 30 min de traitement thermique. Les zones d'inhibition relevées en présence de ces épices évoluent de  $20 \pm 0.0$  à  $24 \pm 1.0$ , de  $30 \pm 1.5$  à  $33 \pm 2.3$  et de  $20 \pm 1.2$  à  $22 \pm 1.6$  mm respectivement. Une diminution non significative de l'activité antibactérienne de ces extraits est constatée après les 30

premières minutes de traitement. Cette diminution est plus significative au contact du poivre noir dont le diamètre de la zone d'inhibition passe de  $20 \pm 1.5$  mm chez le témoin à  $15 \pm 1.5$  mm en présence de l'extrait traité pendant 2 heures (Fig. 21).

Le traitement thermique prolongé ne semble pas affecter significativement l'effet des extraits de la cannelle et du cumin sur la croissance de *P. aeruginosa* (Fig. 21).

Au contact de *S. aureus* une réduction progressive de l'activité antimicrobienne pendant le traitement thermique est observée chez les extraits du carvi, de l'anis vert, du poivre noir, du gingembre, du curcuma et de la cannelle pendant le traitement thermique. Cette réduction est significative seulement chez le carvi et le poivre noir avec lesquels les diamètres d'inhibition varient de  $40 \pm 3.65$  à  $30 \pm 1.5$  mm et de  $35 \pm 5.23$  à  $30 \pm 3.60$  mm respectivement (Fig. 22).

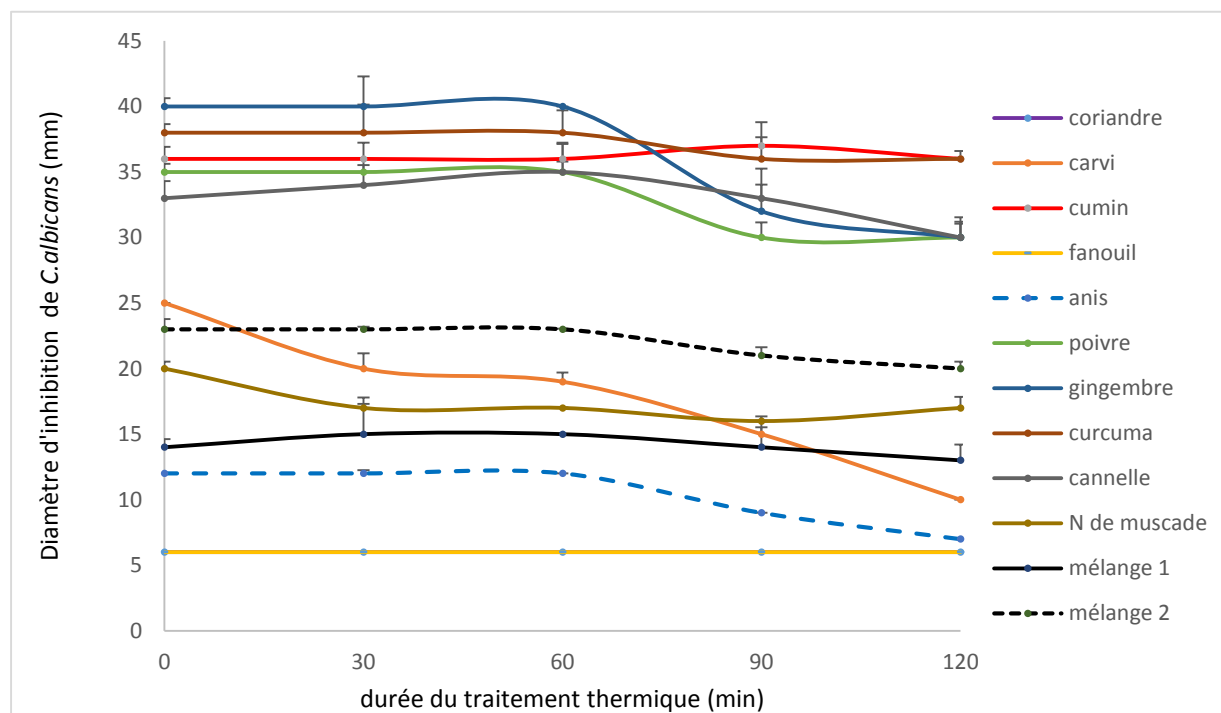


**Figure 22 : Effet du traitement thermique sur l'activité anti *S.aureus* des épices étudiées et de leurs mélanges**

L'activité inhibitrice de *S. aureus* des extraits du cumin, de la coriandre, de la noix de muscade et du fenouil est souvent stable le long du traitement thermique (Fig. 22).

D'après la figure 23, on observe que le traitement thermique n'améliore pas l'activité de la coriandre et de fenouil contre la levure *C. albicans*.

Néanmoins, l'activité antimicrobienne de l'anis vert, du carvi, de la noix de muscade, du poivre noir et du gingembre au contact de la levure *C. albicans* témoigne une diminution avec le traitement thermique. Cette diminution est apparue après 30 min de traitement chez les extraits du carvi et de la noix de muscade, avec lesquelles les diamètres d'inhibition baissent de  $25 \pm 1.89$  à  $20 \pm 2.33$  et de  $20 \pm 1.05$  à  $17 \pm 0.7$  mm et après 60 min pour les extraits de l'anis vert, du poivre noir et du gingembre dont les diamètres varient de  $12 \pm 0.0$  à  $9 \pm 0.01$ , de  $25 \pm 1.25$  à  $18 \pm 2.1$  et de  $40 \pm 1.25$  à  $30 \pm 2.4$  mm respectivement (Fig. 23).



**Figure 23 : Effet du traitement thermique sur l'activité anti *C. albicans* des épices étudiées et de leurs mélanges**

L'effet inhibiteur de la cannelle témoigne une augmentation non significative ( $p > 0.05$ ) après 60 min de traitement thermique. Chez laquelle les diamètres d'inhibition varient du  $33 \pm 2.6$  à  $35 \pm 4.5$  mm, suivie d'une réduction à  $30 \pm 3.1$  mm après deux heures (Fig. 23).

Toutefois, les extraits du curcuma et du cumin extrêmement inhibiteurs de la levure *C. albicans* avant le traitement, ce pouvoir est souvent stable pendant le traitement thermique (Fig. 23).

L'activité antimicrobienne des extraits des mélanges "Ras el hanout" est négativement affectée par le traitement thermique (Fig. 20, 21, 22 et 23).

30 min de traitement diminue significativement seulement l'effet inhibiteur du premier mélange vis-à-vis *E. coli*, dont le diamètre d'inhibition varie de  $20 \pm 0.25$  à  $16 \pm 0.01$  mm. Pendant ce temps, l'effet antimicrobien des deux mélanges est souvent stable en contact des autres souches (Fig. 20, 21, 22 et 23).

A la fin du traitement thermique, une diminution peu importante ( $p > 0.05$ ) des diamètres d'inhibition des deux mélanges en contact des différentes souches testées est observée à l'exception des effets inhibiteurs du premier mélange envers *E. coli* et de deuxième mélange vis-à-vis *C. albicans* avec lesquelles les diamètres d'inhibition baissent de  $20 \pm 0.25$  à  $13 \pm 0.3$  et de  $20 \pm 1.56$  à  $16 \pm 0.4$  mm respectivement (Fig. 20, 23).

## Discussion

Les épices sont généralement utilisées dans la cuisson, ce qui conduit à s'interroger sur le devenir de leurs phytomicronutriments ainsi que leurs activités biologiques au cours de ce traitement.

Compte tenu de la complexité et la diversité moléculaires des épices, les informations et les données littéraires ne répondent pas encore certainement aux interrogations posées sur les mécanismes biochimiques induisant les variations observées dans les teneurs en métabolites ainsi que les activités biologiques sous l'action du traitement thermique.

L'étude de Khatun (2006) sur les clous de girofle, le piment de la Jamaïque, la cannelle, la noix de muscade, la moutarde, le cumin, le gingembre, le fenouil, le fenugrec, le poivre noir, la coriandre, le curcuma et la cardamome a révélé des fluctuations dans la cinétique du contenu des épices citées en polyphénols et leur capacité à réduire le radical DPPH $\cdot$ . Les résultats de cette étude corroborent avec nos résultats dans la cinétique du contenu phénolique de la cannelle, du fenouil, du cumin, du gingembre et du poivre noir.

L'augmentation des teneurs du carvi, du poivre noir, de la cannelle, de la noix de muscade et des deux mélanges "Ras el hanout" en polyphénols au début du traitement thermique est accompagnée d'une diminution en tanins condensés. Ceci pourrait être interprété par la dégradation thermique des tanins condensés nommés

également proanthocyanidines qui sont des polymères de flavan-3-ols par clivage de liaison C-C, conduisant à la formation d'anthocyanes (sous classe des polyphénols). En milieu chaud, la liaison interflavanique des tanins condensés, relativement fragile, est rompue. Sa rupture conduit à la formation d'un carbocation réactif localisé en C(4) de l'unité flavan-3-ol supérieure (position 4, stabilisée en résonance avec sa forme méthylène quinone) et à la libération de l'unité (-)-épicatéchine ou (+)-catéchine (position 6 ou 8) correspondant à l'unité inférieure (Bate-Smith, 1954).

Les carbocations formés sont des molécules très réactives qui peuvent s'oxyder dans le milieu afin de former des anthocyanes. De plus, ces carbocations, peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines, des polysaccharides et des polyphénols puis former des liaisons exogènes avec la chaîne polypeptidique, polysaccharidique ou des liaisons polyphénol/polyphénol (Beart *et al.*, 1985 ; Renard *et al.*, 2014). Ces interactions pourraient être à l'origine de la diminution des teneurs en polyphénols lorsque le traitement thermique est prolongé. Cette diminution peut également être induite par la dégradation des anthocyanes formés, jugés très thermosensibles (Jimenez Elizondo, 2011).

Un traitement à haute température peut aussi provoquer la dégradation des polyphénols conduisant à la formation d'*o*-quinones et d'*o*-semi-quinones, molécules très réactives qui peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines et/ou des polysaccharides (O'Connel et Fox, 1999).

Les variations observées dans les teneurs phénoliques des différentes épices au cours du traitement thermique pourraient être causées également par la différence de la thermo-sensibilité des acides phénoliques (sous classe des polyphénols) contenu dans les épices. En effet, l'acide vanillique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide p-coumarique, l'acide ferulique, l'acide gentisique montrent une augmentation au cours du traitement thermique, alors que, l'acide sinapique, l'acide chlorogénique, l'acide cinnamique diminuent par ce traitement (Jeong, 2004 ; Xu *et al.*, 2007 ; Zoric *et al.*, 2014).

Pendant le traitement thermique, le contenu en flavonoïdes de la plus part de nos épices (le curcuma, la cannelle, le cumin, le gingembre, la coriandre et l'anis vert) s'est révélé thermostables. Cette stabilité est due à la glycosylation de la majorité des flavonoïdes, qui les protègent de la dégradation thermique. Exemple, la rutine est plus thermostable que sa forme non glycosylée (la quercétine) (Takahama, 1986 ; Friedman, 1997 ; Buchner, 2006).

Mohd-Zainol *et al.* (2009), par une étude sur l'influence du traitement thermique sur le contenu de l'extrait de *Centella asiatica* (le pegaga) en flavonoïdes, en utilisant l'HPLC pour l'identification et le dosage de ces molécules avant et après le traitement, ont trouvé que la quercétine, la catéchine, la lutéoline, le kaempférol et l'apigénine sont thermolabiles alors que le flavan-3-ols catéchine, l'épicathéchine, le gallocatéchine, l'épigallocatechine et la naringine sont thermostables.

L'évaluation de l'activité antioxydante après traitement thermique prolongée a révélé l'augmentation de cette activité chez le poivre noir et la noix de muscade confirmant les résultats de Paul et Ghost (2012). Cette augmentation pourrait être due à la formation des produits des réactions de Maillard (brunissement non enzymatique résultant d'une réaction chimique entre les sucres et les groupements amine d'une protéine) (Chandrasekara et Shahidi, 2011 ; Sharma et Gujral, 2011). Sachant que le méthanol extrait également des sucres et des protéines.

L'activité antioxydante des produits de Maillard peut être due à la formation de structures de type phénols et/ou aux propriétés chélatantes des mélanoidines (pigment brun à haut poids formé après traitement thermique) (Ames, 1999 ; Cheriote, 2007). Les expériences de résonance paramagnétique électronique (RPE) montrent clairement que ces produits piègent plus de 90 % des radicaux hydroperoxydes en captant directement les radicaux libres mais également peuvent chélater des ions ferreux impliqués dans la réaction de Fenton (Yoshimura *et al.*, 1997).

Néanmoins, la cannelle, le gingembre, l'anis vert, le cumin, le carvi et la coriandre ont subi une diminution de leurs activités antioxydantes durant le traitement thermique. Cette diminution de l'activité antioxydante n'est pas reliée systématiquement à la dégradation des polyphénols (Buchner *et al.*, 2006). Denre (2014), par une étude sur le cardamome, le gingembre, le curcuma, le cumin, les clous de girofle, l'ail, le chili et l'oignon a constaté que la diminution de l'activité antioxydante est accompagnée de la dégradation thermique de la vitamine C, sachant que nos épices citées (la cannelle, le gingembre, l'anis vert, le cumin, le carvi, la coriandre et le fenouil) renferment des quantités de vitamine C de 3.8, 7, 21, 7.7, 21, 21 et 21 mg/100g respectivement (Charles, 2013). Cette vitamine connue par ses puissants effets antioxydants (Sies et Stahl, 1995). Elle est capable de réagir directement avec les espèces réactives oxygénées et azotées, réduire l'anion

superoxyde sous forme acide ou basique, limiter la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux peroxy et les complexes oxoferryle, intervenir dans de nombreuses réactions enzymatiques fer dépendantes en tant que transmetteur d'électrons et elle permet aussi de régénérer la vitamine E (Sekli-Belaidi, 2011).

L'activité antimicrobienne des différentes épices contre les souches testées est également affectée par le traitement thermique. Il s'agit pour la plus part des épices, d'une diminution plus ou moins importante. Ces résultats pourraient être liés aux thermo-modifications observées dans les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et en tanins, métabolites connus par leurs effets antimicrobiens.

On estime également que la diminution des activités antimicrobiennes est due à la dégradation thermique ou à l'éventuelle évaporation des essences volatiles durant le traitement thermique. Ces essences sont représentées par des terpénoïdes tels que l' $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène, contenus dans la noix de muscade, le gingembre, le curcuma et le poivre noir),  $\beta$ -caryophyllène, trouvés dans la cannelle et le poivre noir, le géraniol, un composant du gingembre, linalool (coriandre), carvone et carvacrol (carvi), *trans*-anethole (fenouil et l'anis vert),  $\alpha$  cuminal (cumin) (Zuzarte et Salgueiro, 2015). Ces molécules et bien d'autres sont caractérisées par une grande efficacité antimicrobienne (Zengin and Baysal, 2014).

Comme pour les composés phénoliques, les terpénoïdes sont différemment thermosensibles. En effet, Romson *et al.*, (2011) ont montré que le p-cymene, le thymol sont thermolabile alors que, le  $\gamma$ -terpinene, le carvacrol, le  $\beta$ -caryophyllène sont thermostables.

L'enjeu de cette partie d'étude est de savoir l'effet de la cuisson sur le contenu des épices en métabolites secondaires (phytomicronutriments) et sur leurs effets biologiques. Mais ces intérêts sont, *in vivo*, indissociables de leur biodisponibilité (Borel , 2014).

Devant la multiplicité des facteurs potentiels qui peuvent affecter l'absorption des phytomicronutriments, West et Castenmiller, (1998) ont proposé un acronyme, « SLAMENGHI », pour se remémorer ces principaux facteurs. Chaque lettre de l'acronyme représente un facteur. **S** «*species of phytomicronutriment*», pour l'effet de la structure chimique des phytomicronutriments ; **L** «*molecular Linkage*» pour l'effet des modifications chimiques du phytomicronutriment (estérification, conjugaison...) ; **A** «*Amount consumed in a meal*» pour l'effet de la dose de phytomicronutriments



consommée au cours d'un repas; **M** «*Matrix in which the phytomicronutriment is incorporated*» pour l'effet de la matrice alimentaire ; **E** «*effectors of absorption*» pour tenir compte des autres composés de l'alimentation qui peuvent moduler l'absorption (lipides, fibres, médicaments...) ; **N** «*Nutrient status of the host*» pour l'effet du statut en phytomicronutriments de l'individu qui pourrait rétro-réguler l'absorption ; **G** «*Genetic factors* » pour les polymorphismes génétiques qui modulent la capacité des individus à absorber certains phytomicronutriments (Borel, 2012) ; **H** «*Host related factors*» pour les facteurs liés à l'hôte (âge, sexe, pathologies...) ; **I** «*Interactions* » pour les interactions entre tous ces facteurs (Renard *et al.*, 2014).

Les phytomicronutriments incluant les polyphénols sont peu biodisponibles et le sont probablement encore moins quand ils sont adsorbés sur les parois végétales. Par contre, leurs métabolites coliques sont absorbés (Crozier *et al.*, 2010).

L'amélioration de la biodisponibilité des phytomicronutriments contenus dans les épices lors des traitements culinaires (cuisson) est liée aux changements du microenvironnement de ces composés dans la matrice végétale (agit sur le facteur M). En effet, ces traitements altèrent la microstructure végétale et facilitent la libération des phytomicronutriments « prisonniers » des structures cellulaires (Parada et Aguilera, 2007).

L'amélioration de la biodisponibilité de certains phytomicronutriments contenus dans les épices par les traitements thermiques pourrait aussi être liée à l'isomérisation partielle de ces molécules (agit sur le facteur S). C'est par exemple le cas des caroténoïdes dont la biodisponibilité est améliorée par la cuisson car elle augmente la proportion d'isomères *cis* de caroténoïdes, lesquels sont plus biodisponibles que l'isomère *trans* présent initialement dans les épices (Borel, 2014)

Par ailleurs, les traitements thermiques, en déstructurant la matrice végétale, peuvent même augmenter les quantités bio accessibles dans le tractus gastro-intestinal et donc augmenter les effets bénéfiques de ces molécules (Dufour *et al.*, 2014 ; Gobert *et al.*, 2014 ; Renard *et al.*, 2014).

## **8. Effets synergiques des métabolites secondaires et des activités biologiques des mélanges binaires et équimolaires**

Les teneurs en métabolites et les activités antioxydante et antimicrobienne des mélanges binaires et équimolaires, ainsi que leurs effets synergiques (ES) sont déterminés et consignés dans les tableaux XII, XIII, XIV, XV et XVI.

**Tableau XII : Concentrations des mélanges binaires équimolaires des épices en polyphénols et leurs effets synergiques**

Epices	Coriandre	Noix de m.	Curcuma	Poivre noir	Fenouil	Cumin	Carvi	Cannelle	Gingembre	Anis vert
Coriandre	5.72									
Noix de m.	41.68±3.02 ES=1.12	68.81								

Curcuma	11.56±1.2 ES=0.22	103.51±7.58 ES=1.24	98.8							
Poivre noir	18.73±0.5 ES=0.47	21.17±0.36 ES=0.30	35.55±0.36 ES=0.41	73.32						
Fenouil	4.0±0.01 ES=0.53	44.04±0.2 ES=1.13	48.68±0.38 ES=0.90	16.04±1.021 ES=0.39	9.37					
Cumin	18.03±0.2 ES=1.16	43.95±3.14 ES=0.93	39.59±2.36 ES=0.64	18.84±0.54 ES=0.38	11.16±0.25 ES=0.64	25.27				
Carvi	8.98±0.3 ES=0.19	49.21±3.02 ES=0.63	35.33±0.69 ES=0.38	20.81±0.88 ES=0.26	61.04±4.26 ES=1.26	42.26±2.3 ES=0.75	87.77			
Cannelle	24.22±0.35 ES=0.69	127.11±11.25 ES=1.90	132.18±5.06 ES=1.62	113.73±625 ES=1.65	146.51±8.0 ES=3.96	76.58±6.4 ES=1.70	110.98±6.5 ES=1.46	64.71		
Gingembre	34.34±2.5 ES=0.71	44.90±0.2 ES=0.56	75.41±6.28 ES=0.79	23.61±3.02 ES=0.29	41.83±2.4 ES=0.83	71.08±7.2 ES=1.22	61.40±5.2 ES=0.69	124.81± ES=1.60	90.93	
Anis vert	29.11±0.32 ES=1.91	78.02±1.54 ES=1.67	88.18±5.2 ES=1.43	24.27±0.32 ES=0.49	14.64±0.1 ES=0.86	32.63±2.3 ES=1.30	26.42±0.0 ES=0.47	138.39±2.3 ES=3.09	31.54±0.21 ES=0.54	24.81

Les effets synergiques sont signalés en **bleu**, les effets antagoniques sont signalés en **rouge** et les effets d'indifférence sont signalés en **violet**

**Tableau XIII : Concentrations des mélanges binaires équimolaires des épices flavonoïdes et leurs effets synergiques**

Epices	Coriandre	Noix de muscade	Curcuma	Poivre noir	Fenouil	Cumin	Carvi	Cannelle	Gingembre	
Coriandre	0.77									
Noix de muscade	5.65± 0.2 ES=1.15	09.02								

Curcuma	20.18±0.15 ES=0.82	61.61±3.2 ES=2.14	48.62							
Poivre noir	4.5±0.6 ES=1.18	11.05 ± 0.2 ES=1.39	18.10± 0.3 ES=0.65	6.88						
Fenouil	2.21±0.03 ES=0.89	6.82±1.3 ES=1	64.20± 8.5 ES= 2.43	5.47±0.3 ES=1	4.21					
Cumin	3.11±0.9 ES=0.88	9.24± 0.5 ES=1.20	48.72 ±4.68 ES=1.77	7.29± 0.61 ES=1.10	7.27± 0.21 ES=1.38	6.32				
Carvi	12.08±1.02 ES= 1	16.85± 1.2 ES=1	73.84±5.68 ES=2.03	17.28± 1.32 ES=1.11	15.81± 0.35 ES=1.12	15.28±2.35 ES=1	24.13			
Cannelle	9.9± 0.36 ES=1.36	12.99±1.1 ES= 1.14	60.51±2.2 ES=1.94	16.25± 0.9 ES=1.57	12.74±0.2 1 ES=1.42	13.3±2.3 ES=1.32	21.11±0.21 ES=1.11	13.76		
Gingembre	9.17± 1.58 ES=3.24	7.40±0.24 ES=1.06	72.83± 6.23 ES=2.72	9.05± 1.65 ES=1.54	7.62± 0.21 ES=1.67	7.71±0.47 ES=1.38	15.61± 2.3 ES=1.08	12.07±1.2 ES=1.29	4.89±	
Anis vert	3.68±0.02 ES=1.63	7.75±1.2 ES=1.21	51.14±1.23 ES=1.95	8.82± 0.21 ES=1.66	6.60± 0.32 ES=1.66	14.78±1.32 ES=2.94	3.69±0.1 ES=0.26	16.68±1.5 ES=1.91	5.25±0.2 ES=1.22	

Les effets synergiques sont signalés en **bleu**, les effets antagoniques sont signalés en **rouge** et les effets d'indifférence sont signalés en **violet**

**Tableau XIV : Concentrations des mélanges binaires équimolaires des épices en tanins condensés et en tanins hydrolysables et leurs effets synergiques**

T e n	Teneurs des mélanges binaires et équimolaires des épices en tanins condensés
-------------	--

Epices	Coriandre	Noix de muscade	Curcuma	Poivre noir	Fenouil	Cumin	Carvi	Cannelle	Gingembre	
Coriandre	0.07 0.13	0.45± 0 ES=1.67	0.06± 0 ES=0.80	0.04± 0 ES=0.22	0.09± 0 ES=0.67	0.08± ES=0.53	0.12±0 ES=1	0.97± 0.1 ES=0.77	0.12±0 ES=0.51	
N.de muscade	0.0037±00 ES=0.01	0.47 0.54	0.26± ES=1	0.35± ES=0.92	0.56± 0 ES=1.67	0.56± 0 ES=1.60	0.52± ES=1.60	1.14± 0.2 ES=0.78	0.35±0.09 ES=0.80	
Curcuma	0.07±0 ES=0.47	0.21± 0.04 ES=0.59	0.08 0.17	0.16± ES=0.86	0.31± 0 ES=2.21	0.81± 0 ES=5.23	0.66± ES=5.08	1.43± 0.36 ES=1.13	0.22±0.02 ES=0.92	
Poivre noir	0.13±0.02 ES=0.25	0.17± 0.02 ES=0.23	0.25±0 ES=0.46	0.29 0.92	0.30± 0 ES=1.22	0.55± 0.02 ES=2.12	0.35± 0.02 ES=1.49	1.15± 0.5 ES=0.84	2.26±0 ES=6.55	
Fenouil	0.004±0 ES=0.03	0.05±0 ES=0.16	0.14±0 ES=1	0.16± 0.1 ES=0.31	0.2 0.1	0.33± 0.01 ES=1.53	0.16± 0 ES=0.84	3.35±1.2 ES=2.54	0.28± 0 ES=0.89	
Cumin	0.05±0 ES=0.20	0.25±0 ES=0.81	0.24±0 ES=0.89	0.08± 0 ES=0.12	0.05± 0 ES=0.21	0.23 0.37	0.35± 0 ES=1.71	2.36±0.22 ES=1.77	0.54±0.05 ES=1.71	
Carvi	0.015±0 ES=0.14	0.05±0 ES=0.16	0.3±0.01 ES=2.40	0.07±0 ES=0.14	0.1± 0 ES=1.11	0.18±0 ES=0.8	0.18 0.08	3.92± 1.02 ES=2.99	0.34± 0.01 ES=1.17	
Cannelle	2.15±0.21 ES=0.50	1.44± 0.09 ES=0.32	1.7± 0.09 ES=0.39	1.8±0.2 ES=0.38	7.06±0.1 ES=1.65	1.21± 0.5 ES=0.27	5.321.3 ES=1.25	2.44 8.44	1.07± 0.02 ES=0.84	
Gingembre	0.04±0 ES=0.14	0.29± 0 ES=0.58	0.25±0 ES=0.79	0.20± 0.0 ES=0.29	0.01±0 ES=0.04	0.17± 0 ES=0.41	0.17± 0.01 ES=0.63	1.89± 0.05 ES=0.42	0.4 0.46	
Anis vert	0.08±0 ES=0.26	0.05±0 ES=0.10	0.12±0 ES=0.36	0.14± 0 ES=0.20	0.07±0 ES=0.24	0.12± 0 ES=0.26	0.18±0 ES=0.63	0.87±0.01 ES=0.19	0.066± 0 ES=0.14	

Les effets synergiques sont signalés en **bleu**, les effets antagoniques sont signalés en **rouge** et les effets d'indifférence sont signalés en **violet**

**Tableau XV : Concentrations inhibitrices efficaces (EC50) des mélanges binaires et équimolaires des épices et leurs effets synergiques**

Epices	Coriandre	Noix de muscade	Curcuma	Poivre noir	Fenouil	Cumin	Carvi	Cannelle	Gingembre
Coriandre	3.87								
Noix de muscade	2.06± 0.01 (ES) <sup>-1</sup> =1	0.16							
Curcuma	2.3± 0 (ES) <sup>-1</sup> =1	1.99±0.0 (ES) <sup>-1</sup> =0.15	0.43						
Poivre noir	5.56±0.21 (ES) <sup>-1</sup> =0.41	1.52± 0.01 (ES) <sup>-1</sup> =0.27	0.29± 0 (ES) <sup>-1</sup> =1.88	0.66					
Fenouil	3.11± 0.32 (ES) <sup>-1</sup> =1	2.21±0.03 (ES) <sup>-1</sup> =0.48	1.04± 0.21 (ES) <sup>-1</sup> =1.14	1.41±0.3 (ES) <sup>-1</sup> =1	1.95				
Cumin	0.97±0.21 (ES) <sup>-1</sup> =2.79	0.66±0.02 (ES) <sup>-1</sup> =1.29	1.43± 0.0 (ES) <sup>-1</sup> =0.69	1.36± (ES) <sup>-1</sup> =0.81	2.25±0.06 (ES) <sup>-1</sup> =0.78	1.54			
Carvi	0.73±0.1 (ES) <sup>-1</sup> =3.54	0.41± 0.01 (ES) <sup>-1</sup> =1.78	0.88± 0.06 (ES) <sup>-1</sup> =1	0.65± 0.01 (ES) <sup>-1</sup> =1.51	0.65±0.02 (ES) <sup>-1</sup> =2.5	2.25±0.05 (ES) <sup>-1</sup> =0.63	1.30±		
Cannelle	3.97± 0.3 (ES) <sup>-1</sup> =0.49	0.28± 0 (ES) <sup>-1</sup> =0.38	0.18± 0 (ES) <sup>-1</sup> =1.33	0.32±0.021 (ES) <sup>-1</sup> =1.11	0.9± 0.01 (ES) <sup>-1</sup> =1.11	0.25± 0.01 (ES) <sup>-1</sup> =3.18	0.18±0.0 (ES) <sup>-1</sup> =3.75	0.05	
Gingembre	0.57±0.1 (ES) <sup>-1</sup> =4.08	0.62±0.02 (ES) <sup>-1</sup> =0.75	0.38± 0 (ES) <sup>-1</sup> =1.59	0.78±0.05 (ES) <sup>-1</sup> =0.92	0.7± 0.05 (ES) <sup>-1</sup> =1.95	1.78± 0.03 (ES) <sup>-1</sup> =0.65	1.78±0.02 (ES) <sup>-1</sup> =0.58	1± 0 (ES) <sup>-1</sup> =0.42	0.78
Anis vert	1.27± 0.02 (ES) <sup>-1</sup> =1.84	0.44±0.09 (ES) <sup>-1</sup> =1.09	0.6±0.01 (ES) <sup>-1</sup> =1	0.56±0 (ES) <sup>-1</sup> =1.85	0.35±0.03 (ES) <sup>-1</sup> =3.93	1.3±0.1 (ES) <sup>-1</sup> =0.90	1.3± 0.21 (ES) <sup>-1</sup> =1.85	0.27±0.02 (ES) <sup>-1</sup> =1.85	0.79±0.05 (ES) <sup>-1</sup> =1.57

Les effets synergiques sont signalés en **bleu**, les effets antagoniques sont signalés en **rouge** et les effets d'indifférence sont signalés en **violet**

**Tableau XVI : Diamètres des zones d'inhibition des souches testées par les mélanges binaires et équimolaires et leurs effets synergiques**

Diamètres des zones d'inhibition	Diamètres des zones d'inhibition de <i>E. coli</i> par les mélanges binaires et équimolaires et leurs effets synergiques									
	Epices	Coriandre	Noix de muscade	Curcuma	Poivre noir	Fenouil	Cumin	Carvi	Cannelle	Gingembre

	Coriandre	16 10	20± 0.22 ES=1.14	17± 0.36 ES=0.83	26± 0.21 ES=1	15± 0.33 ES=1	28±0.36 ES=1.17	15± ES=0.79	21± ES=0.91	24±0 ES=1	16±0 ES=1
	N.de muscade	15±1.02 ES=1.25	19 14	25± 0.5 ES=1.14	25±0.27 ES=0.85	20± 0.25 ES=1.14	23± 0.25 ES=0.90	18±0 ES=0.85	29± 0.02 ES=1.18	25± 0.32 ES=1	22±0 ES=1
	Curcuma	12± 0.2 ES=0.80	21± 0.58 ES=1.24	25 20	35±2.5 ES=1.08	19±3.2 ES=1	26± 0.2 ES=0.91	20± 0 ES=0.85	32± 3.02 ES=1.16	28± 1.2 ES=1	21±0 ES=1
	Poivre noir	13± 0.75 ES=0.87	15±0.34 ES=0.88	23± 1.3 ES=2.30	40 20	26±0 ES=1	32± 2.34 ES=0.89	29±2.3 ES=1	41±3.4 ES=1.17	41±3.65 ES=1.09	24±0 ES=1
	Fenouil	8± 0.0 ES=1	12± 0.41 ES=1.20	14±0.8 ES=1.08	15± 0.22 ES=1.50	16 6	24± 0 ES=1	23± 0.21 ES=1.21	30±0.35 ES=1.30	25± 0.25 ES=1	16±0 ES=1
	Cumin	20±1.6 ES=1.14	18± 0.0 ES=0.92	19±1.6 ES=0.84	19± 1.4 ES=0.84	12±0.21 ES=0.77	32 25	26± 2.3 ES=1	35± 0.24 ES=1.13	26± 3.2 ES=0.78	24±0 ES=1
	Carvi	12± 0.2 ES=1.20	11± 0.0 ES=0.92	17± 0.4 ES=1.13	14± 0.0 ES=1	11± 0.34 ES=1.38	16± 0.6 ES=0.67	22 10	30± 2.1 ES=1.15	24± 1.2 ES=0.84	24±0 ES=1
	Cannelle	17± 0.54 ES=1	23±0.14 ES=1.24	26±0.25 ES=1.21	25± 0.1 ES=1.16	14±0.3 ES=1	28±2.5 ES=1.17	20± 0.47 ES=1.21	30 23	34± 0.54 ES=1	32±0 ES=1
	Gingembre	22±0.58 ES=1.10	23± 0.2 ES=1	27±0.54 ES=1.08	27± 0.3 ES=1.08	17±0.0 ES=1	24±1.3 ES=0.87	22± 1.23 ES=1.10	30 ± 0.21 ES= 1.13	35 30	22±0 ES=1
	Anis vert	12±0.24 ES=1.50	13± 0.1 ES=1.30	17± 0.8 ES=1.31	15± 0.6 ES=1.15	8±0.0 ES=1.33	14±1.01 ES=0.90	12±0.26 ES=1.50	17±0.2 ES=1.17	14±0.0 ES=0.78	16±0 ES=1

Diamètres des zones d'inhibition de <i>C. albicans</i> par les mélanges binaires et équimolaires et leurs effets synergiques	Diamètres des zones d'inhibition de <i>S. aureus</i> par les mélanges binaires et équimolaires et leurs effets synergiques										
	Epices	Coriandre	Noix de muscade	Curcuma	Poivre noir	Fenouil	Cumin	Carvi	Cannelle	Gingembre	Anis vert
	Coriandre	7 6	13±0 ES=1.24	19± 0 ES=1	24± 0.2 ES=1.14	11± 0 ES=1	17±1.3 ES=0.77	23±0.25 ES=1	16± 0 ES=1.10	25±0.25 ES=1.61	28±2.36 ES=3.11
	N.de muscade	15±0.15 ES=1.15	14 20	28±0.14 ES=1.19	27±0.25 ES=1.10	15± 0.1 ES=1	25± 1.26 ES=1	27± 0 ES=1	21± 0.0 ES=1.17	20±0.25 ES=1	15± 0 ES=1.20
	Curcuma	17±0.2 ES=0.77	33± 2.36 ES= 1.14	33 38	32±2.35 ES=1	28±2.3 ES=1.14	38± 3.2 ES=1.09	37± 5.3 ES=1	31±0.27 ES=1.13	33±0.33 ES=1.16	26±0.21 ES=1.18
	Poivre noir	18±1.2 ES=0.88	27± ES=1	32±0.25 ES=0.88	35 35	27±0.25 ES=1.06	39± 3.54 ES=1.08	38±1.6 ES=1	31±2.58 ES=1.63	32± 0.2 ES=1.08	27±0.36 ES=1.17
	Fenouil	6± 0 ES=1	16±0.1 ES=1.23	21±0.2 ES=1	20±0 ES=1	16 6	27	29± 0.2 ES=1	21±2.3 ES=1.11	23±0.32 ES=1.15	28± 0.25 ES=2.07
	Cumin	30±0.89 ES=1.36	28± 0.33 ES=1	35± 0.75 ES=0.92	35±0.5 ES=1	21± 0.2 ES=1	37 38	38±0.18 ES=1	32±1.26 ES=1	32±3.2 ES=1	28± 0.3 ES=1.17
	Carvi	14± 0.1 ES=0.90	22± 0.33 ES=1	30±0.2 ES=1	29±1.5 ES=1	17±0.5 ES=1.10	29± 0.3 ES=0.92	40 25	30±1.35 ES=1	32±3.5 ES=1	21± 1.36 ES=0.70
	Cannelle	18±0.26 ES=0.92	31± 0.75 ES=1.17	38± 0.5 ES=1.07	42± 0.1 ES=1.24	29± 0.25 ES=1.49	38± 0.75 ES=1.07	32± 0.5 ES=1	22 33	27±0.2 ES=1.17	25± 2.36 ES=1.52

Gingembre	22± 0.21 ES=1	29± 0.21 ES=1	37±1.25 ES=1	35±2.32 ES=1	20±0.25 ES=0.87	41±1.25 ES=1	32±0.33 ES=1	38±0.25 ES=1	24 40	20± 2.3 ES=1.14
Anis vert	13± 0.0 ES=1.44	25±0.21 ES=1.56	28±0.12 ES=1.12	23±0.2 ES=1	8± 0 ES=0.89	27± 0.2 ES=1.46	18± 1.2 ES=1	30±2.3 ES=1	39± 0.3 ES=1.33	11 12

Les effets synergiques sont signalés en **bleu**, les effets antagoniques sont signalés en **rouge** et les effets d'indifférence sont signalés en **violet**

## 8.1. Effet synergique des mélanges en métabolites

### 8.1.1. Effet synergique des polyphénols

Les teneurs des mélanges binaires et équimolaires des différentes épices en polyphénols et leurs effets synergiques sont calculés et consignés dans le tableau XII.

Les concentrations en polyphénols des extraits bruts séparés oscillent entre 5.72 mg EQ/g ES pour la coriandre et 98.8 mg EQ/gES pour le curcuma. En mélange équimolaire, ces valeurs sont comprise entre 4 et 146.51 mg EAG/g ES (Tableau XII).

Parmi les 45 mélanges binaires et équimolaires dosés, 18 mélanges ont montré une amélioration de leurs teneurs phénoliques, indiquant ainsi des effets synergiques supérieurs à 1.

Le tableau XII fait ressortir un important effet synergique dans le mélange binaire cannelle-fenouil. Le ES de ces deux épices est 3.96.

Des améliorations importantes des concentrations en polyphénols sont également constatées par les combinaisons anis vert – coriandre, anis vert - noix de muscade, cannelle - noix de muscade, cannelle - cumin, cannelle - curcuma, cannelle - poivre noir et cannelle – gingembre. Les ES de ces mélanges varient de 1.91 à 1.60 (Tableau XII).

Les effets synergiques obtenus avec les combinaisons : noix de muscade-coriandre, fenouil-curcuma, curcuma-anis, fenouil-carvi, gingembre-cumin, anis-cumin et carvi-cannelle sont moins importants. Leurs ES sont compris entre 1.12 et 1.46 (Tableau XII).

Parmi nos mélanges équimolaires, on constate, pour certains une diminution des teneurs en polyphénols par rapport à celles de leurs extraits constitutifs. Leurs ES



inférieurs à 1 et varient de 0.90 pour le mélange coriandre-cannelle à 0.22 pour le mélange coriandre-curcuma (Tableau XII).

### **7.1.2. Effet synergique des flavonoïdes**

L'ensemble des résultats obtenus sur les teneurs en flavonoïdes et les effets synergiques des mélanges binaires et équimolaires des différents extraits sont enregistrés dans le tableau XIII.

Parmi les 45 mélanges, la majorité, soit 35 affectent positivement les teneurs en flavonoïdes, témoigné par leurs ES supérieurs à 1. Cette augmentation est très fortement observée chez le mélange de la coriandre avec le gingembre dont le ES est de 3.24.

Les combinaisons du cumin avec l'anis vert, du curcuma avec le fenouil, ou le gingembre ou la noix de muscade ou le carvi ont également montré une forte augmentation des teneurs en flavonoïdes. Leurs ES respectifs varient entre 2.94 à 2.03 (tableau XIII). Cet effet synergique s'est révélé moins important chez d'autres mélanges, chez lesquels les ES sont compris entre 1.95 (curcuma-anis vert) et 1.11 (carvi-cannelle et carvi-poivre noir) (tableau XIII).

Peu de mélanges ont montré un ES inférieur à 1. En effet, les mélanges coriandre- curcuma et cumin – fenouil présentent des teneurs en flavonoïdes inférieures à la somme de celles des deux épices constitutives. Les ES respectifs de ces mélanges sont de 0.82, 0.88 et 0.89. Cet effet d'antagonisme est plus prononcé dans le mélange carvi- anis vert dont l'ES n'est que de 0.26 (tableau XIII).

Des effets d'indifférence (ES=1) sont constatés dans les mélanges coriandre-carvi, noix de muscade-carvi, poivre noir-fenouil, cumin-carvi et carvi-gingembre (Tableau XIII)

### **8.1.3. Effet synergique des tanins condensés et des tanins hydrolysables**

Les teneurs des mélanges binaires et équimolaires en tanins condensés et en tanins hydrolysables ainsi que leurs effets synergiques sont calculés et consignés dans le tableau XIV.

Le tableau XIV fait ressortir que parmi les quarante-cinq (45) mélanges dosés, vingt-deux (22) présentent des teneurs en tanins condensées supérieures à celles de leurs épices constitutives.

Les effets synergiques les plus importants sont observés dans les mélanges du poivre noir-gingembre, curcuma-cumin et curcuma-carvi, dont les ES sont de 6.55, 5.23 et 5.08 respectivement (tableau XIV). Viennent par la suite les mélange dont les ES oscillent entre 2.99 pour le mélange cannelle-carvi et 2.12 pour le mélange poivre noir-cumin indiquant aussi des effets synergiques intéressants (Tableau XIV). Les autres mélanges binaires et équimolaires ont révélé des ES compris entre 1.13 pour le mélange curcuma-cannelle et 1.77 pour les combinaisons du cumin avec la cannelle ou avec l'anis vert (tableau XIV).

La majorité des mélanges dont les ES sont inférieurs à 1 présentent des teneurs en tanins condensées légèrement plus faibles que ceux des épices qui les constituent. Leurs effets synergiques varient entre 0.67 et 0.92 (Tableau XIV). Seul le mélange du poivre noir avec la coriandre, ayant des teneurs faibles en tanins condensés et un ES de 0.22 révèle un important antagonisme.

Les teneurs en tanins hydrolysables de cinq mélanges exhibent un effet synergique exprimé par des ES comprises entre 1.11 et 2.40 pour les mélanges fenouil-carvi et curcuma-carvi. Cependant, ces métabolites sont affectés négativement dans la majorité des autres mélanges. Leurs ES varient entre 0.01 et 0.89. Les valeurs les plus faibles étant celles des mélanges coriandre-cannelle (0.5) et coriandre-noix de muscade (0.01) (Tableau XIV).

## **8.2. Effets synergiques des activités biologiques des mélanges binaires équimolaires**

### **8.2.1. Effet synergique de l'activité antioxydante des mélanges**

Les éventuels synergismes ou antagonismes entre les épices en mélange sur leurs activités antioxydantes sont déterminés en inversant les valeurs des ES obtenues, vue que les  $EC_{50}$  sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante. Les  $EC_{50}$  obtenues ainsi que les valeurs inversées de leurs ES sont calculés et consignés dans le tableau XV.

L'assemblage des extraits du gingembre et de la coriandre a révélé un important effet synergique ( $ES^{-1}$ ) de l'activité antioxydante (4.08), en la comparant avec celles des

épices séparées (tableau XV). Les mélanges fenouil-anis vert, carvi-cannelle, carvi-coriandre, cannelle-cumin, coriandre-cumin, fenouil-carvi ont également vu leurs activités antioxydantes s'améliorer par rapport à celles de leurs constituants. En effet, les  $ES^{-1}$  de ces mélanges sont de 3.93, 3.75, 3.54, 3.18, 2.79 et 2.50 respectivement (tableau XV).

Un nombre important des mélanges a cependant montré des activités antioxydantes plus faibles que celles des épices seules, traduites par des  $ES^{-1}$  inférieures à 1. Leurs valeurs sont comprises entre 0.15 du mélange de la noix de muscade avec le curcuma et 0.92 du mélange du poivre noir avec le gingembre (tableau XV).

Le tableau XV fait ressortir également des effets d'indifférence entre les épices en mélanges binaires et équimolaires sur l'activité antioxydante, ceci est constaté chez les mélanges coriandre-noix de muscade, coriandre-curcuma, coriandre-fenouil et poivre noir-fenouil.

### **8.2.2. Effet synergique de l'activité antimicrobiennes des mélanges binaires et équimolaires**

Les effets synergiques des différents mélanges binaires et équimolaires, mis en évidence par la modification ou non des diamètres d'inhibition des souches sont consignés dans les tableaux XVI.

La majorité des mélanges testés ont donné des effets synergiques sur l'inhibition de *P. aeruginosa*. Le meilleur est observé en présence du mélange curcuma-poivre noir dont l'ES est de 2.30. Les effets synergiques des autres mélanges ont conduit à l'apparition de zones d'inhibition dont les ES sont compris entre 1.08 au contact du mélange poivre noir - curcuma et 1.33 pour le mélange du fenouil avec l'anis vert (Tableau XVI).

Parmi les 45 mélanges testés, 13 ont révélé des effets antagoniques entre leurs constituants vis-à-vis de *P. aeruginosa*. Leurs ES sont compris entre 0.67 pour le cumin-carvi et 0.92 obtenus avec les mélanges de la noix de muscade avec le cumin ou le carvi (Tableau XVI).

Des effets d'indifférence ( $ES=1$ ) sont constatés dans cinq mélanges, il s'agit de fenouil-coriandre, cannelle-coriandre, noix de muscade-gingembre, fenouil-cannelle et fenouil- gingembre (tableau XVI).

L'activité inhibitrice de la souche *E. coli* est plus importante en présence de 19 mélanges, pour lesquels l'effet synergique le plus élevé ne dépasse pas 1.56 obtenu avec le mélange de la cannelle avec de l'anis vert, alors que le plus faible est de 1.08 donné par la combinaison du curcuma avec le poivre noir (Tableau XVI).

Le tableau XVI fait ressortir que 11 mélanges ont des effets synergiques inférieurs à 1, témoignant d'éventuels antagonismes entre les épices constitutives vis-à-vis de l'activité anti *E. coli*. Ces effets synergiques sont compris entre 0.78 et 0.91 obtenus avec les mélanges cumin-gingembre et curcuma-carvi respectivement (Tableau XIV).

Des effets d'indifférence sont relevés dans 15 mélanges dont le ES=1 signifie que les zones d'inhibition de *E. coli* au contact de ces mélanges sont les mêmes que celles au contact de leurs épices constitutives (tableau XVI).

La combinaison binaire et équimolaire des épices ne modifie pas considérablement l'activité des épices constitutives contre *S. aureus* (tableau XVI).

Les meilleurs effets synergiques obtenus sont de 2.07, 1.63, 1.61 et 1.52 donnés par les mélanges du fenouil-anis vert, du poivre noir-cannelle, de la coriandre-gingembre et de la cannelle-anis vert respectivement. Ces valeurs sont moins importantes dans 19 autres mélanges. Elles sont comprises entre 1.08 donnée par la combinaison du cumin avec le poivre noir ou avec le gingembre et 1.24 donnée par le mélange de la coriandre avec la noix de muscade (tableau XVI).

Les mélanges du cumin avec la coriandre et du carvi avec l'anis vert représentent les seuls mélanges dont l'activité inhibitrice de la souche *S. aureus* est inférieure à celles des épices testées séparément. Leurs ES sont de 0.77 et 0.70 respectivement (Tableau XVI).

Parmi les 45 mélanges binaires et équimolaires, 17 ont révélés des effets d'indifférence (ES=1) sur l'activité de leurs épices contre *S. aureus* (Tableau XVI).

L'activité anti *C. albicans* de 15 mélanges s'est révélée meilleure que celles de leurs épices seules, indiquant ainsi un synergisme entre ces épices. Cet effet est plus important dans les mélanges anis vert-noix de muscade, anis vert-gingembre, fenouil-cannelle, anis vert-cumin, anis vert-coriandre, dont les ES sont compris entre 1.6 et 1.44 (Tableau XVI).

D'autres mélanges dont les ES sont compris entre 0.77 pour coriandre- cannelle et 0.92 pour coriandre-gingembre présentent des activités anti *C. albicans* légèrement plus faibles que celles des épices qui les constituent (Tableau XVI).

Le tableau XVI fait apparaître un effet d'indifférence (ES=1) de 17 mélanges vis-à-vis de la levure testée.

## Discussion

Depuis la découverte des divers effets synergiques et d'antagonismes et leur importance dans le domaine thérapeutique, les interactions entre les agents biologiquement actifs sont devenues un sujet important pour la recherche scientifique.

Les études sur la combinaison des épices, sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature. Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications cliniques et culinaires, permettant de réduire les éventuels effets secondaires en diminuant la dose utilisée (Otunola et Afolayan, 2013 ; Baljeet *et al.*, 2015).

Les épices sont des mélanges complexes par leur nature, représentant un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes.

Les effets synergiques des teneurs en flavonoïdes et en polyphénols sous l'effet combinatoire de certaines épices peuvent être expliqués par les interactions positives entre les constituants de ces métabolites. En effet, Hajimehdipoor *et al.*, (2014) ont mis en évidence des effets synergiques entre l'acide gallique avec l'acide rosmarinique, l'acide rosmarinique avec la quercétine, l'acide gallique avec la rutine et la quercétine avec la rutine. Ces interactions augmentent considérablement la teneur des mélanges en polyphénols, mais les mécanismes mis en jeu sont mal élucidés.

Néanmoins, d'autres interactions ont conduit des teneurs des mélanges en polyphénols, en flavonoïdes ou en tanins plus faibles. L'effet d'antagonisme provoqué par certaines associations d'épices pourrait être bénéfique. En effet, une surdose en certaines molécules est toxique. De nombreuses études mettent en évidence que les flavonoïdes ont des activités biologiques doubles. Ils peuvent agir en tant qu'antimutagène/pro-mutagènes, antioxydant/pro-oxydant, tout dépend des quantités

consommées et des conditions physiologiques de l'organisme. Un surdosage peut entraîner des dommages allant jusqu'à des mutations de l'ADN (Tabart, 2000).

Les épices peuvent différer entre elles notamment par la nature des composés bioactifs qu'elles contiennent et par les propriétés antioxydantes de ces composés. Souvent, lorsque ces épices sont consommées en même temps, la capacité antioxydante totale du mélange peut être différente de celles des épices séparées. Ceci peut être due aux interactions synergiques ou antagonistes entre leurs composants, ce qui peut en modifier l'action physiologique (Brewer, 2011).

Les effets d'antagonisme observés dans les teneurs en polyphénols totaux et de ceux de l'activité antioxydante chez certains mélanges pourraient être provoqués par des endo-interactions hydrogènes et électroniques entre les fonctions hydroxyles. Ce caractère complexant, diminue la mobilité et l'effet biologique des composés actifs présents dans les extraits (Ngakegni-Limbili, 2012).

Par ailleurs, Liao et Yin (2000) ont démontré que les combinaisons d'acide alpha-tocophérol et/ou ascorbique avec l'acide caféique, la catéchine, l'épicatéchine, la myricétine, l'acide gallique, la quercétine et la rutine ont une activité antioxydante plus élevée que chacun de ces composés pris isolément pour l'oxydation des lipides. Parker *et al.* (2010) ont montré des interactions synergiques entre certains mélanges de rutine, d'acide p coumarique, d'acide abscissique, d'acide ascorbique et un mélange de sucre en utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE) et la technique ORAC. Le synergisme des antioxydants semble se produire entre une grande variété de composés ou d'extraits ; d'où la nécessité d'une recherche supplémentaire pour explorer les endo-interactions au sein d'un mélange spécifique

L'effet synergique observé par la combinaison du cumin avec le gingembre sur l'activité inhibitrice de *C. albicans* corrobore avec les résultats de Baljeet *et al.* (2015). Ces auteurs ont signalés également l'effet synergique du cumin mélangé au gingembre sur l'inhibition des souches *B. subtilis* et *S. typhi* mais sur *P. fluorescens*, le mélange a révélé un antagonisme.

La bio activité des métabolites secondaires contre les germes microbiens est étroitement liée à l'activité des principaux composants (Bajpai, 2012). Par ailleurs, Burt (2004) ; Bassolé et Juliani (2012) signalent que l'activité antimicrobienne résulte des

interactions synergiques entre les différents groupements chimiques tels que les phénols, les aldéhydes, les cétones, les hydroxyles, les esters...etc. existants dans les différentes classes de métabolites secondaires. Cependant, les composés à structure chimiques similaires présentent le plus souvent un effet d'indifférence plutôt que synergique (Baljeet, 2015).

Des études sur la combinaison des molécules dotées d'activité antimicrobienne ont signalé que le thymol combiné à la carvacrol donne un effet d'indifférence contre les bactéries *S. aureus* et *P. aeruginosa*, mais synergique contre *E. coli* et d'antagonisme contre *B. cerus*. Les mélanges du thymol avec l'eugenol et du carvacrol avec l'eugenol ont des effets synergiques contre *E. coli* (Pei *et al.*, 2009). Le carvacrol mélangé à la myrcène donne un effet d'antagonisme contre *S. aureus*, *B. cerus* et *E. coli* (Gallucci, 2009). L'effet synergique du Cinnamaldhyde avec le thymol contre la bactérie *E. coli* est signalé par Zhou, (2007). Le Cinnamaldhyde mélangé avec l'eugenol révèle une indifférence contre *S. aureus* (Moleyar et Narasimham, 1992).

Les mécanismes impliqués dans la stratégie de la combinaison des composés bioactifs sur les bactéries n'ont pas bien été élucidés, mais plusieurs hypothèses ont été posées:

- La synergie observée par la combinaison de l'eugenol avec le carvacrol et de l'eugenol avec le thymol, est due à la capacité du thymol et du carvacrol à désintégrer la membrane bactérienne, facilitant la pénétration de l'eugenol et sa combinaison avec les protéines cytoplasmiques.

- L'eugénol avec le cinnamaldhyde forment un complexe très inhibiteur des enzymes bactériennes. Ainsi, la concentration inhibitrice minimale de ce mélange est 50 fois inférieure à celle de ses composés séparés (Bassolé et Juliani, 2012).

Des effets antagonistes, conduisant à une réduction de l'activité antibactérienne ont également été signalés. Ils se produisent généralement entre les molécules actives et les composés non oxygénés, qui réduisent leur solubilité et donc leur efficacité. Par exemple, la solubilité du terpinène-4-ol est réduite par le  $\gamma$ -terpinène (Cox *et al.*, 2001).

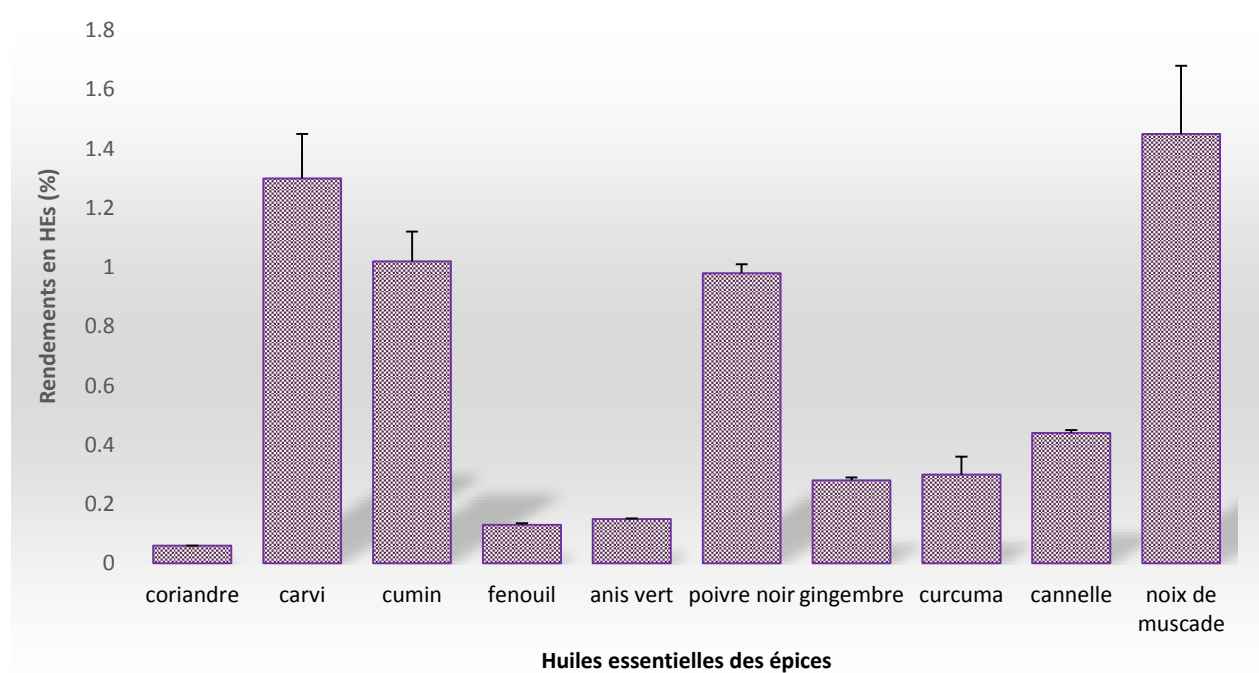
Les résultats de cette partie laissent supposer qu'il est important de faire un choix stratégique en sélectionnant des épices ou en privilégiant un mélange d'épice favorisant les synergies et en défavorisant les antagonismes au point de vue de l'activité antioxydante et antimicrobienne.

Les études déjà réalisées ont été menées sur la combinaison des molécules antioxydantes ou antimicrobiennes individuelles, ce qui laisse la compréhension des mécanismes biochimiques impliquées entre les épices en mélanges y compris le mélange "Ras el hanout" encore mal compris.

## 9. Etude des huiles essentielles des épices de "Ras el hanout"

### 9.1. Rendement et caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des épices

Les rendements en huiles extraites par hydrodistillation des différentes épices sont présentés dans la figure 24.



**Figure 24 : Rendements d'extraction des huiles essentielles des différentes épices**



Le rendement d'extraction des huiles essentielles (HE) varie selon l'épice étudiée. Le plus important est celui de la noix de muscade évalué à  $1.45 \pm 0.23\%$ . Il est moins important mais non significativement chez le carvi ( $1.30 \pm 0.15\%$ ), le cumin ( $1.02 \pm 0.1\%$ ) et le poivre noir ( $0.98\%$ ) ( $p > 0.05$ ). Les plus faibles rendements d'extraction sont ceux de la cannelle, du curcuma, du gingembre, de l'anis vert, du fenouil et de la coriandre chez lesquelles les taux d'extraction des HE varient de  $0.44 \pm 0.01$  à  $0.06 \pm 0.0$  (Fig. 24).

Les huiles extraites ont des odeurs très fortes et caractéristiques de chaque épice. Celles du poivre noir et de la noix de muscade sont incolores, celles du cumin, de la cannelle, du carvi, du gingembre, de la coriandre, de l'anis vert, du fenouil sont jaune pâle alors que l'huile du curcuma est de couleur jaune foncée. Toutes les huiles extraites sont liquides à la température ambiante et à basse température à l'exception de celles de l'anis verts et du fenouil qui figent à basse température.

## Discussion

Les rendements en huiles essentielles extraites des différentes épices étudiées sont relativement faibles par rapport à ceux cités par la littérature. En effet, les graines du cumin n'ont permis l'extraction que  $1.02\%$  d'huile essentielle, alors que Bellakhdar (1997), Chaudhry (2012) et Dossou *et al.* (2012) ont signalé des taux allant de 2.5 à 10%. Cependant, des rendements comparables ont été signalés par Sultan (2005) sur le gingembre ( $0.85$  à  $2\%$ ), par Bahl *et al.* (2014) sur le rhizome de curcuma ( $0.5$  à  $1\%$ ), par Zheljazkov (2014) sur la coriandre ( $0.25\%$ ), par Kasim *et al.* (2014) sur la cannelle ( $2.8\%$ ) et par patela (2012) sur le fenouil ( $0.88\%$ ).

Le mode d'extraction des huiles essentielles n'assure pas toujours de très bons rendements (Bruneton, 1999). De plus, la qualité des essences obtenues dépend dans une large mesure de l'état de fraîcheur du végétal et du temps écoulé entre la récolte et la transformation. Un stockage de la plante pendant 24 heures suffit pour induire des changements sensibles de sa composition pouvant d'ailleurs être souhaités. Ainsi, au cours du stockage, la perte des composés les plus volatils peut être importante. La disparition de 15% de produits volatils du végétal après 3 mois de stockage et de 80% après neuf ans a aussi été signalée (Bruneton, 1999).

Seu-Saberno et Blakeway (1984), Bruneton (1999), Olle et Bender (2010), Aprotosoie *et al.* (2010) et Zuzarte et Salgueiro, (2015), ajoutent que la composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions à savoir, l'environnement climatique, la localisation, le génotype, l'origine géographique, la période de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, l'irrigation ainsi que les techniques de récolte, le lieu, la durée et température de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes.

D'autres facteurs intrinsèques influencent également la composition et le rendement des huiles essentielles. Notamment, les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (Garnéro, 1991 ; Aprotosoie *et al.*, 2010 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015) et le polymorphisme chimique «chimiotypes» (Garnéro, 1991; Anton et Lobstein, 2005).

Il faut mentionner que les traitements survenus avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (El-Kalamouni, 2010).

## 9.2. Indices physico-chimiques des huiles essentielles étudiées

### 9.2.1. Indices physiques

Des constantes physiques définissant une huile essentielle ont été mesurées, à savoir la densité et l'indice de réfraction. Les résultats obtenus sont cosignés dans le tableau (XVII).

**Tableau XVII :** Indices physiques des huiles essentielles des épices étudiés

Epices	Densité	Densité selon AFNOR (2000)	Indice de réfraction	Indice de réfraction selon AFNOR (2000)
<b>Cannelle</b>	1,035±0.02	1.020-1.030	1,592±0.0	1.568-1.593
<b>Carvi</b>	0.92±0.01	0.907-0.919	1,484±0.0	1.484-1.488
<b>Coriandre</b>	0,89 ±0.0	0.870-0.885	1,474±0.01	1.463-1.471
<b>Cumin</b>	0,9±0.01	0.905-0.930	1,501±0.0	1.490-1.506
<b>Gingembre</b>	0,93±0.0	0.877-0.886	1,490±0.03	1.489-1.494
<b>Noix de muscade</b>	0,85±0.0	0.859-0.868	1,479±0.0	1.469-1.472

<b>Curcuma</b>	0,92±0.03	/	1,511±0.01	/
<b>Anis vert</b>	0,97±0.01	/	1,555±0.02	/
<b>Poivre noir</b>	0,91±0.0	0.873-0.916	1,481±0.03	1.480-1.499
<b>Fenouil</b>	0,98±0.01	0.965-0.977	1,504±0.0	1.528-1.539

L'examen du tableau XVII révèle que l'HE de la cannelle se distingue par sa densité supérieure à 1, alors que toutes les autres huiles ont des densités comprises entre  $0.98 \pm 0.01$  et  $0.85 \pm 0.0$ . Parmi celles-ci, les huiles essentielles du fenouil et de l'anis vert ont les densités les plus élevées évaluées à  $0.98 \pm 0.01$  et  $0.97 \pm 0.01$  respectivement (tableau XVII).

L'huile essentielle de gingembre a une densité de  $0.93 \pm 0.0$  mais reste cependant plus importante que celles du curcuma ( $0.92 \pm 0.03$ ), du carvi ( $0.92 \pm 0.01$ ), du cumin ( $0.9 \pm 0.01$ ), de la coriandre ( $0.89 \pm 0.0$ ) et de la noix de muscade ( $0.85 \pm 0.0$ ) (tableau XVII).

Les indices de réfraction des huiles essentielles, calculés à 20°C sont compris entre  $1.592 \pm 0.0$  et  $1.479 \pm 0.0$  correspondant à l'HE de la cannelle et celle de la noix de muscade (tableau XVII).

Entre ces deux valeurs se situent les indices de l'anis vert ( $1.555 \pm 0.02$ ), du curcuma ( $1.511 \pm 0.01$ ), du cumin ( $1.503 \pm 0.0$ ) et du fenouil ( $1.504 \pm 0.0$ ) qui semblent plus importants que ceux du gingembre ( $1.490 \pm 0.03$ ), du carvi ( $1.484 \pm 0.0$ ), du poivre noir ( $1.481 \pm 0.03$ ) et de la coriandre ( $1.474 \pm 0.01$ ) (tableau XVII).

## Discussion

La densité d'une huile essentielle constitue un critère très important pour évaluer sa qualité. Elle est en fonction de la composition chimique des huiles et de la température. Elle peut facilement donner un aperçu sur la nature du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'adultération (karleskind, 1992).

Les densités de nos huiles concordent avec les critères décrites par AFNOR, (2000), ayant signalé que les densités des huiles essentielles sont comprises entre 0.87 et 0.98 (inférieur à celle de l'eau) avec certaines exceptions, telles que les huiles de la cannelle, des clous de girofle et de saffran qui ont des densités supérieurs à 1.

Les valeurs des indices de réfraction de nos huiles sont en concordance avec les normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 2000), ayant fixé les valeurs normales des indices de réfractions des huiles essentielles entre 1.45 et 1.59 à 20°C.

L'indice de réfraction représente un critère de pureté de l'huile comme il est utilisé pour vérifier la qualité de la distillation, car une distillation lente à température trop élevée abaisse l'indice de réfraction (AFNOR, 2000).

Cet indice dépend également de la composition chimique des huiles. Généralement, l'indice augmente avec l'instauration ou la présence de produits secondaires (karleskind, 1992). Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (Boukhatem, 2010).

Kanko *et al.* (2004) ont montré qu'un faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques.

### 9.2.2. Indices chimiques des huiles essentielles des épices

Les indices d'acide, d'iode et de saponification des huiles essentielles de nos épices sont calculés et présentés dans le tableau XVIII.

**Tableau XVIII :** Indices chimiques des huiles essentielles des épices étudiées.

Epices	Indice d'acide	Indice de saponification	Indice d'iode
<b>Cannelle</b>	13,46±0.2	13.6±0.75	20.78±1.25
<b>Carvi</b>	4,49±0.3	20.2±0.54	49.79 ±1.34
<b>coriandre</b>	2,69±0.35	21.4±0.32	35.20±1.52
<b>Cumin</b>	2,43±0.21	23.6 ±0.21	55.50±1.45
<b>gingembre</b>	3,37±0.03	9.2±1.32	28.85±1.62
<b>Noix de muscade</b>	1,12±0.33	28±0.31	32.02±0.5
<b>curcuma</b>	8,98±1.24	12.4±0.4	23.78±1.84
<b>Anis vert</b>	4,49±0.69	14.8±0.25	33.29 ±0.36
<b>Poivre Noir</b>	1,12±0.09	13.6±1.25	25.20±2.25
<b>Fenouil</b>	2,24±0.34	15±1.3	48.52±3.02

Les huiles essentielles de nos épices ont des indices d'acides différents. Le tableau XVIII laisse apparaître que l'indice de l'HE de la cannelle, évalué à  $13.46 \pm 0.2$  est le plus élevé suivie de celui de l'HE du curcuma qui est de  $8.98 \pm 1.24$ . Cet indice s'est révélé moins important et similaire chez le carvi et l'anis vert.

Cependant, les huiles essentielles du gingembre, de la coriandre, du cumin, du fenouil, de la noix de muscade et du poivre noir ont les indices les plus faibles. Leurs valeurs respectives sont de  $3.37 \pm 0.03$ ,  $2.69 \pm$ ,  $2.43 \pm 0.35$ ,  $2.24 \pm 0.21$ ,  $1.12 \pm 0.34$  et  $1.12 \pm 0.33$  (tableau XVIII).

L'examen du tableau XVIII fait ressortir que les indices de saponification les plus importants sont ceux de la noix de muscade suivie du cumin, de la coriandre et du carvi dont les valeurs sont de  $28 \pm 0.31$ ,  $23.6 \pm 0.21$ ,  $21.4 \pm 0.32$  et  $20.2 \pm 0.54$  respectivement.

Pour les autres HE, cet indice se situe entre  $15.00 \pm 1.3$  et  $9.20 \pm 1.32$  correspondant à l'huile du fenouil et celle du gingembre (tableau XVIII).

Concernant l'indice d'iode, il apparaît que les HEs du cumin, du carvi et du fenouil ont les valeurs les plus élevées qui sont comprises entre  $55.50 \pm 1.45$  et  $48.52 \pm 3.02$  (Tableau XVIII).

Les huiles essentielles de l'anis vert, de la noix de muscade ont également des indices d'iode importants évalués à  $33.29 \pm 0.36$  et  $32.02 \pm 0.5$  respectivement. Cet indice est compris entre  $28.85 \pm 1.62$  pour l'huile du gingembre et  $20.78 \pm 1.25$  pour celle de la cannelle (tableau XVIII).

## **Discussion**

Les caractéristiques chimiques de nos huiles essentielle concordent avec ceux cités par AFNOR (1998) indiquant que les valeurs des indices d'acide, d'iode et de saponification d'une huiles essentielle ne dépassent pas en générale 6.5, 101 et 28 respectivement .

L'indice d'acide est un critère de qualité indiquant la quantité d'acides gras libres présents dans notre huile essentielle et la susceptibilité de l'HE à subir des altérations notamment l'oxydation (Seddik, 2009 et Ouis, 2015).

L'indice d'acide augmente avec la durée de la conservation au cours de laquelle les huiles essentielles pourraient être oxydées et dégradées rapidement (Boukhatem *et al.*, 2010).

L'indice de saponification indique la quantité d'acides gras pourront être entraînée avec les essences pendant l'extraction. Il dépend du taux des acides gras existants dans la matière végétale.

L'indice d'iode est un critère de pureté qui nous informe sur le degré d'insaturation des chaînes carbonées des acides gras présents dans l'huile essentielle et qui facilite leur rancissement.

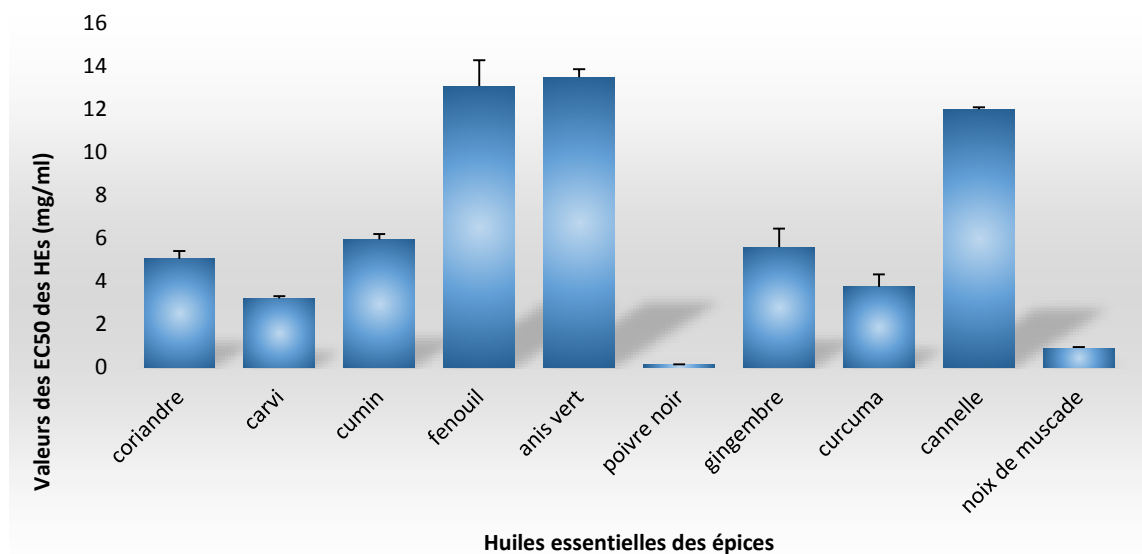
Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux possédant un pH compris entre 4 et 7 (résultant de l'immersion du matériel végétal). Les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des conversions chimiques. L'huile essentielle récupérée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

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

L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit durant le chauffage du végétal. Elle conduit à la formation d'acides organiques qui à leur tour catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation (Chouitah, 2012).

### **9.3. Activité antioxydante des huiles essentielles des épices étudiées**

Les EC<sub>50</sub> des huiles essentielles des différentes épices et de l'acide ascorbique utilisé comme témoin positif sont calculées et consignées dans la figure 25.



**Figure 25 : EC<sub>50</sub> des huiles essentielles des épices**

L'activité antioxydante des HE est inversement proportionnelle à la valeur de EC<sub>50</sub>.

L'examen de la figure 25 laisse apparaître que l'HE du poivre noir présente une forte capacité à piéger le radical DPPH • avec une EC<sub>50</sub> de  $0.12 \pm 0.01$  mg/ml, cette huile semble plus efficace que le témoin positif dont l'EC<sub>50</sub> est de 0.19. Vient par la suite l'HE de la noix de muscade dont la concentration efficace à piéger 50% du radical DPPH • (EC<sub>50</sub>) est de  $0.89 \pm 0.05$  mg/ml.

Les HEs du carvi, du curcuma, de la coriandre, du gingembre et du cumin présentent des activités antioxydantes plus faibles. Leurs EC<sub>50</sub> sont de  $3.2 \pm 0.1$ ,  $3.74 \pm 0.58$ ,  $5.05 \pm 0.35$ ,  $5.58 \pm 0.87$  et  $5.94 \pm 0.25$  mg/ml respectivement (Fig. 25).

La capacité des HEs des autres épices (l'anis vert, fenouil et cannelle) à piéger le radical DPPH est de loin la plus faible. Leurs EC<sub>50</sub> respectives sont de  $13.5 \pm 0.36$ ,  $13.08 \pm 1.2$  et  $12 \pm 0.1$  mg/ml (Fig. 25).

## Discussion

L'effet antiradicalaire des huiles essentielles, selon le test DPPH• est dû à leur capacité donatrice d'un atome d'hydrogène (Conforti *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2010).

D'après Kulisic *et al.* (2004), la méthode DPPH• est indépendante de la polarité du substrat. Ce test peut être appliqué aussi bien avec les composés lipophiles (huiles essentielles) et hydrophiles.

Les résultats de Politeo *et al.*, (2006) sur l'activité antioxydante des huiles essentielles d'une gamme d'épices corroborent avec nos résultats sur l'efficacité réductrice des huiles essentielles de la noix de muscade et du poivre noir.

Notre résultat sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de la cannelle est en accord avec celui de El-Baroty (2010) ayant trouvé une EC<sub>50</sub> de 11mg/ml, en revanche, Antunes *et al.* (2012) ont signalé une valeur de 3.19±0.15mg/ml.

Des EC<sub>50</sub> de l'huile essentielle du fenouil variant entre 0.032 et 45.89 mg/ml ont été données par Anwar (2009), Shahat (2011), Roby *et al.* (2012), Barkat (2012), El Ouariachi *et al.* (2014) et Marín (2016). Pour l'huile essentielle du gingembre, Khalaf (2008) et El-Baroty (2010) ont trouvé des EC<sub>50</sub> variant entre 0.065 et 65 mg/ml. Les EC<sub>50</sub> signalées par Khalaf (2008) et Zhang et Xu (2015) sur l'huile essentielle du poivre noir varient entre 0.14 et 1335.8 mg/ml respectivement. Ces grands écarts des EC<sub>50</sub> peuvent être expliqués par la diversité chimiotypique des huiles essentielles d'une même espèce due aux facteurs intrinsèques et extrinsèques décrits précédemment (Sadgrove et Jones, 2015 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015).

Compte tenu de la composition chimique des huiles essentielles, ces dernières représentent des mélanges complexes de composés organiques, possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (Lahlou, 2004). Ces constituants appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (essentiellement les monoterpènes et les sesquiterpènes) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1993 ; Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010).

Il est donc difficile d'attribuer cette activité antioxydante à un composé ou aux composés totaux de l'huile essentielle. Hussain (2009) a signalé que les effets antioxydants des huiles essentielles et des extraits des plantes sont principalement dus à la présence des groupes d'hydroxyle caractéristiques des composés phénoliques qui peuvent donner un atome d'hydrogène aux radicaux libres, arrêtant ainsi la réaction en



chaîne de propagation pendant le processus d'oxydation des lipides (Sanchez-Mareno *et al.*, 1998).

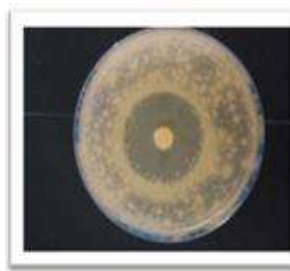
L'activité antioxydante est également attribuée aux composés terpéniques oxygénés. Cependant, l'absence de l'activité antioxydante chez les composés terpéniques hydrocarbonés est due à leur faible capacité donatrice d'atome d'hydrogène. En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénés présentent une activité anti radicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés (Benov, 1994).

L'activité antioxydante de nos huiles est due au contenu de leurs épices en métabolites cités tels que le  $\beta$ -carophyllène (un monoterpène bicyclique), le limonène (monoterpène cyclique à cétone),  $\alpha$ -pinène (monoterpène bicyclique), p-cymène (terpène monocyclique) et Cubenol (sesquiterpènes bicyclique oxygéné) pour le poivre noir. Le sabinène, le 4-terpinéol, le myristicine, le  $\alpha$ -pinène, le limonène pour la noix de muscade (Archer, 1988), le myristicine est un composé phénolique à haute activité antioxydante (Urquiza et Leighton, 2000). Des molécules comme le carvone, le limonène, l' $\alpha$ -pinène, le cis-carvéol et autres sont responsables de l'activité antioxydante de l'huile essentielle du carvi. Kintzios *et al.*, (2010), ont rapportés que l'activité antioxydante de l'huile essentielle du gingembre est due à la présence des molécules comme le zingibérène, le géraniol, le sesquiphellandène. Les principaux composants actifs existant dans l'huile essentielle du curcuma sont le turmérone, le linalool, le  $\beta$ -ocimène, le cadinol, l'elimicine et la curcumine connus par leurs activités antioxydantes (Miquel *et al.*, 2002).

Notre étude a révélé que l'huile essentielle du poivre noir présente une bonne activité antioxydante, mais en examinant les molécules constitutives citées précédemment de cette huile essentielle, on constate que la majorité de celles-ci sont des terpènes hydrocarbonés connus par leur faible pouvoir antioxydant. Cette contradiction pourrait être interprétée par le fait que l'activité antioxydante des huiles essentielles est due parfois à l'effet combinatoire de deux composés mineurs ou plus. Les composés antioxydants fonctionnent synergiquement les uns avec les autres pour produire une puissante activité (Muckenstrum *et al.*, 1997 ; Freire *et al.*, 2005 ; Bourgois *et al.*, 2008 ; Marín 2016).

### 9.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles des épices

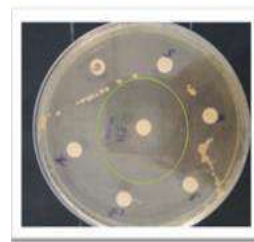
L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des différents épices étudiées est réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, traduite en diamètres des halos d'inhibition. La figure 26 illustre quelques aromatoigrammes obtenus.



1. *E. coli*



2. *P. aeruginosa*



3. *S. aureus*



4. *C. albicans*



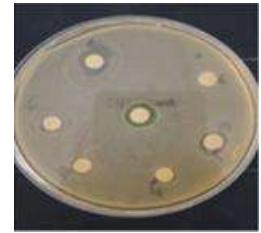
5. *E. coli*



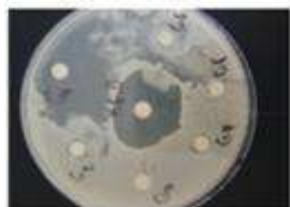
6. *P. aeruginosa*



7. *S. aureus*



8. *C. albicans*



9. *E. coli*



10. *P. aeruginosa*



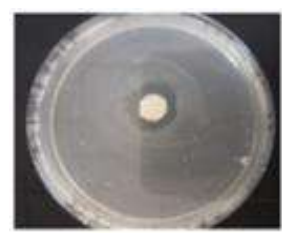
11. *S. aureus*



12. *C. albicans*



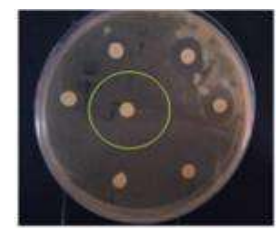
13. *E. coli*



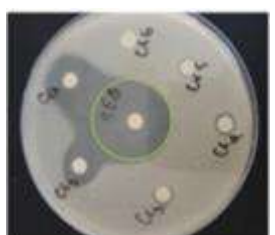
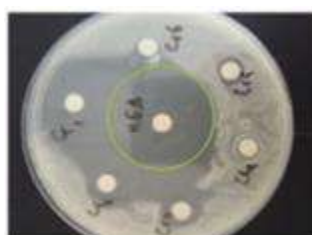
14. *P. aeruginosa*

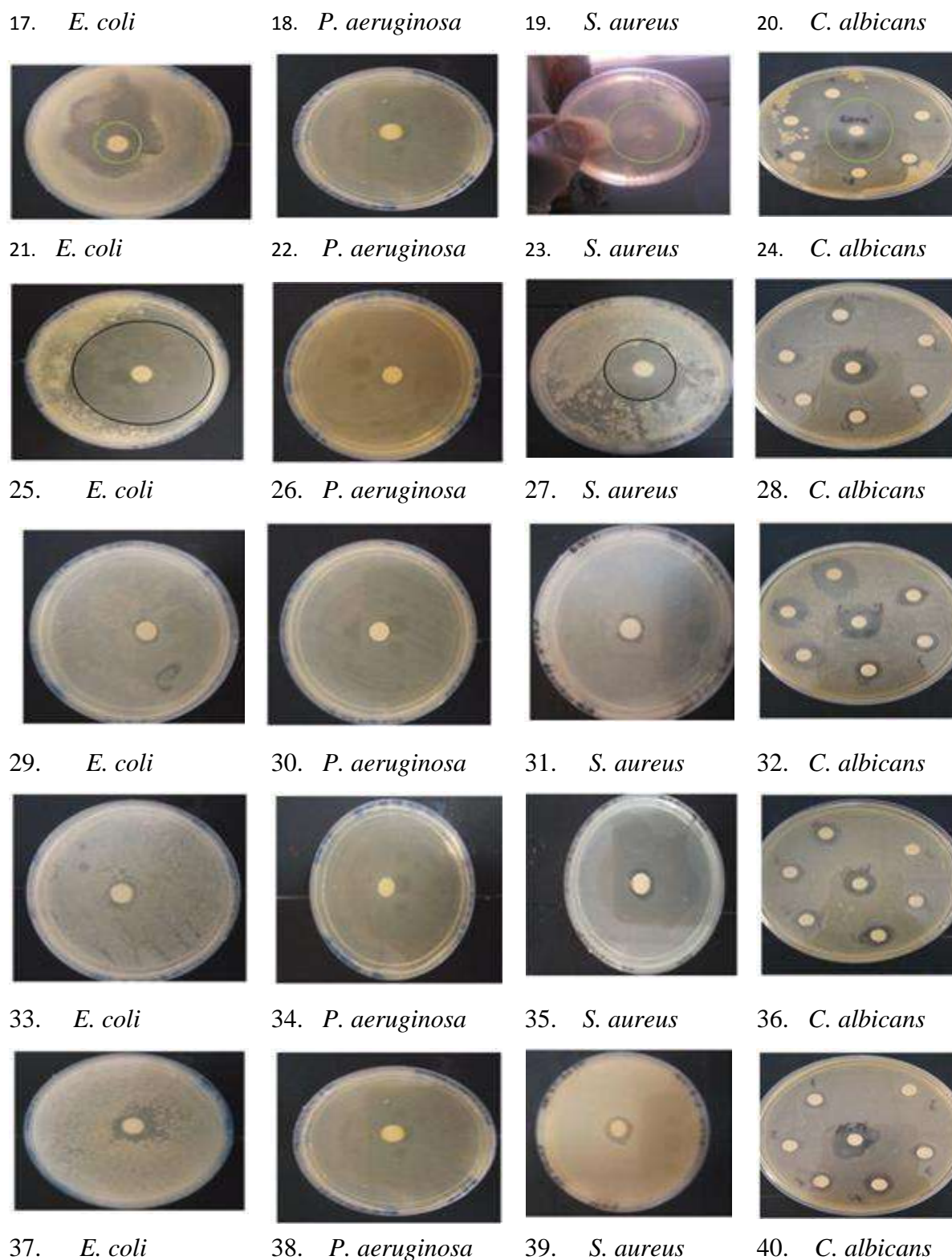


15. *S. aureus*



16. *C. albicans*





**Figure 25 :** Photographie de quelques aromagrammes obtenus avec les différentes souches testées. 1, 2, 3 et 4 pour l'HE de cumin, 5, 6, 7 et 8 pour l'HE du curcuma, 9, 10, 11 et 12 pour l'HE du gingembre, 13, 14, 15, 16 pour l'HE de la cannelle, 17, 18, 19 et 20 pour l'HE de la coriandre, 21, 22, 23, 24 pour l'HE du carvi 25, 26, 27, 28 pour l'HE du poivre noir, 29, 30, 31, 32 pour l'HE du fenouil, 33, 34, 35 et 36 pour l'HE de l'anis vert, et 37, 38, 39 et 40 pour l'HE de la noix de muscade.

La détermination de la concentration inhibitrice minimale (CMI) est effectuée à partir des huiles essentielles brutes et leurs différentes dilutions : 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 mg/ml. Le tableau XIX englobe les valeurs des diamètres d'inhibition obtenus avec les huiles brutes et les valeurs des CMI.

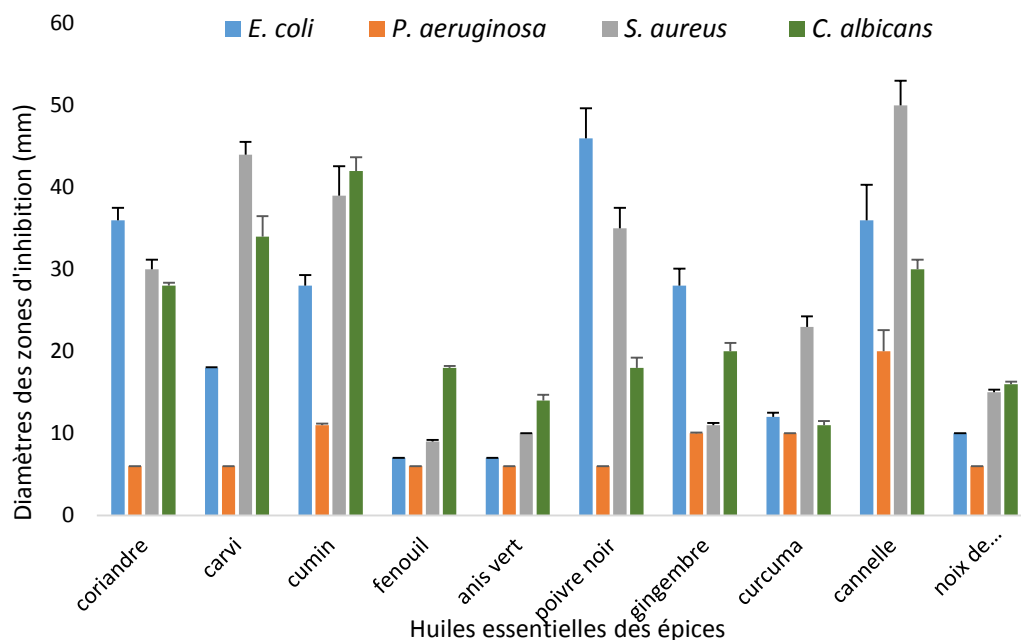
**Tableau XIX :** Diamètres des zones d'inhibition des souches testées et CMI des HEs des épices

Souche Epice	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	DZI (mm) avec l'HE B	CMI (C) (mg/ml)	Diamètre (mm) avec l'HE B	CMI (mg/ml)	Diamètre (mm) avec l'HE B	CMI (mg/ml)	Diamètre (mm) avec l'HE B	CMI (mg/ml)
Coriandre	36±1.5	25<C<50	6±0.0	-	30±1.2	25<C<50	28±0.36	12.5<C<25
Carvi	18±0.05	50<C<100	6±0.0	-	44±1.54	12.5<C<50	34±2.5	12.5<C<50
Cumin	28±1.3	12.5<C<25	11±0.2	12.5<C<50	39±3.6	25<C<50	42±1.66	12.5<C<50
Fenouil	7±0.0	100<C<200	6±0.0	-	9±0.2	50<C<100	18±0.2	25<C<50
Anis vert	7±0.01	50<C<100	6±0.0	-	10±0.01	50<C<100	14±0.69	12.5<C<25
Poivre noir	46±3.65	25<C<50	6±0.0	-	35±2.5	12.5<C<25	18±1.23	12.5<C<25
Gingembre	28±2.1	200<C<400	10±0.09	100<C<200	11±0.25	50<C<100	20±1.04	12.5<C<25
Curcuma	12±0.5	50<C<100	10±0.0	200<C<400	23±1.26	12.5<C<50	11±0.5	50<C<100
Cannelle	36±4.33	25<C<50	20±2.6	25<C<50	50±3.0	50<C<100	30±1.2	12.5<C<10
Noix de muscade	10±0.02	200<C<400	6±0.0	-	15±0.32	25<C<50	16±0.31	25<C<50

C : CMI (concentration minimale inhibitrice) / HEB : huile essentielle brute

Un diamètre égale à 6mm (correspond au diamètre du disque), indique une activité nulle.

Pour comparer le pouvoir antimicrobien de nos huiles contre les différentes souches testées, des histogrammes récapitulatifs des diamètres d'inhibition sont tracés et illustrés dans la figure 27.



**Figure 27 : Diamètres des zones d'inhibition des souches testées par les huiles essentielles des épices**

Le tableau XIX et la figure 27 montrent que *E. coli* se distingue par une extrême sensibilité vis-à-vis des HEs du poivre noir, de la coriandre et de la cannelle. Les diamètres des zones d'inhibition atteignent  $46 \pm 3.65$ ,  $36 \pm 1.5$ ,  $36 \pm 4.33$  mm respectivement. Les CMI de ces HEs contre cette souche sont comprises entre 25 et 50 mg/ml. Cette souche semble très sensible aux HEs du cumin et du gingembre, en présence desquelles les diamètres d'inhibition sont évalués à  $28 \pm 1.3$  et  $28 \pm 2.1$ . Elle est sensible à l'HE du carvi ( $12 \pm 0.5$ ) et résistante aux HEs du fenouil et de l'anis vert (tableau XIX et Fig. 27).

Concernant l'effet des HEs sur *P. aeruginosa*, il apparaît que l'HE de la cannelle est la plus inhibitrice de cette souche, conduisant à la formation d'une zone d'inhibition dont le diamètre est de  $20 \pm 2.6$  mm avec une CMI située entre 25 et 50 mg/ml (tableau XIX et Fig. 27).

Les HEs du cumin, du gingembre et du curcuma sont très faiblement actives contre cette souche, au contact de laquelle elles forment des halos à diamètres de  $11 \pm 0.2$ ,  $10 \pm 0.09$  et  $10 \pm 0.0$  mm respectivement (Tableau XIX et Fig. 27).

Le tableau XIX et la figure 26 font ressortir que la souche *P. aeruginosa* est résistante aux HEs de la coriandre, du carvi, du fenouil, de l'anis vert, du poivre noir et de la noix de muscade.

La bactérie *S. aureus* est extrêmement sensible aux HEs de la cannelle, du carvi, du poivre noir, du cumin et de la coriandre qui conduisent à la formation des halos de

diamètres de  $50\pm3.0$ ,  $44\pm4.54$ ,  $39\pm3.6$ ,  $35\pm2.5$  et  $30\pm1.2$  mm respectivement avec des CMI comprises entre 12.5 et 50 mg/ml (Tableau XIX et Fig. 27).

L'huile essentielle du curcuma au contact de cette souche est très active ( $23\pm1.26$ ), celle de la noix de muscade est active ( $15\pm0.32$ ), celles du gingembre, de l'anis vert et du fenouil sont faiblement inhibitrices de la souche *S. aureus*. Les diamètres respectifs des halos d'inhibition sont de  $11\pm0.25$ ,  $10\pm0.01$  et  $9\pm0.2$  mm (Tableau XIX et Fig. 27).

Les huiles essentielles extrêmement actives contre la levure *C. albicans* sont celles du cumin, du carvi et de la cannelle, ayant conduit au contact de cette levure à l'apparition de larges zones d'inhibition dont les diamètres sont respectivement de  $42\pm1.66$ ,  $34\pm2.5$  et  $30\pm1.2$  mm. Les CMI de ces HEs sont comprises entre 12.5 et 50 mg/ml. L'HE de la coriandre est également très active contre la levure étudiée ( $28\pm0.36$ mm) (Tableau XIX et Fig. 27).

Les HEs du gingembre, du poivre noir, du fenouil et de la noix de muscade sont actives vis-à-vis *C. albicans*. Elles conduisent à la formation des halos dont les diamètres varient de  $20\pm1.04$  à  $14\pm0.69$  mm.

Néanmoins, l'huile essentielle du curcuma n'inhibe que très faiblement la levure *C. albicans* ( $11\pm0.5$ mm) (Tableau XIX et Fig. 27).

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les huiles essentielles de la cannelle, du carvi, du gingembre, du cumin et de la coriandre présentent une activité antimicrobienne plus importante que les autres huiles essentielles. Cependant, l'efficacité de ces HEs diffère d'une souche à l'autre. En effet, les huiles essentielles du poivre noir suivi de celles de la cannelle et de la coriandre sont plus actives contre *E. coli*, l'huile essentielle de la cannelle est la meilleure inhibitrice de *P. aeruginosa*. Ce sont les huiles essentielles de la cannelle, du carvi, du cumin, du poivre noir et de la coriandre qui se sont avérées les plus actives sur *S. aureus*. Les huiles essentielles du cumin, du carvi et de la cannelle sont particulièrement efficaces sur la levure *C. albicans* (tableau XIX et Fig. 27).

## Discussion

Le résultat obtenu sur l'efficacité inhibitrice de l'HE de la cannelle est en accord avec ceux de Naveed *et al* (2013), Al-Marri (2014) et Bardají (2015), qui ont attribué

l'activité de cette huile essentielle à sa teneur en trans-cinnamaldéhyde, eugénol,  $\gamma$ -terpinène et autres composés.

Le cinnamaldéhyde est très actif contre de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*...etc.). Il inhibe l'ATP synthétase bactérienne et provoque une diminution de la production de l'ATP intracellulaire (Gill et Holley, 2006). Le cinnamaldéhyde se fixe aux protéines intra-cytoplasmiques de *P. aerogenasa* et bloque la synthèse des toxines par inactivation des aminoacides décarboxylases. Chez *S. aureus*, il empêche la formation complète des septa de division et entraîne une modification de la morphologie cellulaire (Wendakoon et Sakaguchi, 1995).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la coriandre, du carvi, du cumin et du poivre noir est également confirmée par la littérature (Silva, 2011 ; Seidler-Łożykowska, 2013 ; Patil, 2016 ; Martinelli *et al.*, 2017). Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent à ces huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Il est trouvé que l'activité antimicrobienne de ces groupements est classée selon l'ordre décroissant suivant : Phénol>alcool>aldéhyde>cétone>oxyde>hydrocarbures>esters (Tantaoui-Elaraki, 1993).

Selon Wang et ses collaborateurs (2012), l'impact des composés mineurs n'est pas à négliger. Ils ont démontré que les HEs entières ont une activité antimicrobienne supérieure à un mélange de composants majeures des mêmes huiles essentielles, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent avoir un effet synergique.

Les composés carbonylés, appartenant aux familles chimiques des aldéhydes et des cétones sont également décrits comme très actifs. Le cinnamaldéhyde de l'huile essentielle de la cannelle et le caravone de l'huile essentielle du carvi font partie de ce groupe (Fang *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2014).

De nombreuses huiles essentielles présentent une forte teneur en alcools telles que l'huile essentielle de la coriandre riche en linalool, géraniol,  $\alpha$ -terpinéol et en terpinène-4-ol, celle du carvi et de la cannelle en eugenol, ou encore celle de curcuma en t-cadinol. Ces alcools sont légèrement moins actifs que les composés phénoliques et carbonylés. Leur activité antibactérienne est toutefois plus élevée que celle générée par

les éthers, comme le 1,8 cinéole ou l'anéthole constitutifs du fenouil et de l'anis vert (Moghtader, 2013).

Le rôle fondamental du groupement hydroxyle dans l'action des phénols a également été confirmé et sa position relative sur le noyau benzénique influence peu le degré d'activité (Dorman, 2000 ; Ultee *et al.*, 2002). Ainsi, le thymol (présent dans l'HE du curcuma) et le carvacrol (présent dans l'HE du carvi), qui ne diffèrent que par la position ortho/méta du substituant hydroxyle, présentent une activité comparable sur des souches de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001 ; Ultee *et al.*, 2002).

D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. Ainsi, l'acétate de géranyle est plus actif que le géraniol (existant dans la coriandre) contre un grand nombre de bactéries à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> (Dorman, 2000 ; Toure, 2015).

Les HEs ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des levures. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, ces huiles agissent sur la biomasse et la production des pseudo-mycéliums, alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Rhayour, 2003; Faleiro, 2011).

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

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de cette dernière, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions K<sup>+</sup> (Sikkema, 1994 ; Cox *et al.*, 2000).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par



action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Helander ; Faleiro, 2011).

Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides (Mezzoug, 2007 ; Faleiro, 2011). Rhayour (2003), pense que l'activité inhibitrice de ces composés est due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion

Le présent travail vise à rechercher les activités biologiques du mélange "Ras-el-Hanout" et de ses principales épices. Il nous sera ainsi possible de valoriser ce mélange à travers ses composants et les interactions pouvant exister entre eux. L'effet du traitement thermique sur les qualités et les activités de ces épices est également rechercher.

L'enquête ethnobotanique réalisée auprès de la population de Ouargla a révélé l'importance de "Ras el hanout" dans la gastronomie de la région, traduite par sa connaissance et son utilisation par la quasi-totalité des personnes questionnées.

Les épices constitutives de ce mélange les plus citées sont : la coriandre, le carvi, le cumin, le fenouil, l'anis vert, le poivre noir, le gingembre, le curcuma, la cannelle et la noix de muscade. Cependant, une diversité quantitative et qualitative a été relevée dans la composition de "Ras el hanout" selon les résultats de l'investigation effectuée chez les herboristes. Sur cette base, le choix s'est porté sur deux mélanges composés des dix épices les plus citées mais à des proportions différentes.

Le criblage phytochimique des extraits fractionnés effectué par CCM révèle la présence de certains métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les coumarines, les tanins et les terpénoïdes dans toutes les épices, alors que les stéroïdes ne sont identifiés que dans le cumin et le gingembre, les stérols dans la cannelle, le poivre noir, la noix de muscade et le curcuma et les saponines n'ont été révélées que dans la cannelle, le curcuma, le poivre noir et la coriandre. Les alcaloïdes ont, eux été détectés dans le gingembre, le curcuma, le poivre noir, la noix de muscade et la cannelle. Cette diversité des métabolites secondaires contribuerait à la constitution d'un mélange regroupant les qualités organoleptiques et même thérapeutiques des différentes épices.

Le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins a révélé la richesse du curcuma en polyphénols et en flavonoïdes et les fortes teneurs en tanins condensés et en tanins hydrolysables dans la cannelle. Les épices les moins dotées en ces métabolites étant la coriandre pour les polyphénols et les flavonoïdes et le curcuma, la coriandre et le carvi pour les tanins.

La détermination des propriétés physicochimiques des huiles essentielles à savoir la densité, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'iode et l'indice de saponification révèlent en générale des valeurs conformes avec les normes de commercialisation des huiles essentielles établies par AFNOR.

Les deux tests DPPH • et FRAP ont révélé la forte activité antioxydante de la cannelle et de la noix de muscade. Cependant, le classement des autres épices selon l'importance de leurs activités antioxydantes diffère d'un test à l'autre. En effet, le test DPPH • a permis de mettre en évidence la faible activité antioxydante de la coriandre, alors que le test FRAP révèle que c'est le gingembre qui présente l'activité la plus faible. Ces différences peuvent être attribuées à la nature des composants et à leurs concentrations dans chaque épice. Elles peuvent également être en relation avec la spécificité des tests.

Les huiles essentielles de certaines épices répondent différemment que les extraits bruts au test DPPH. C'est le cas de celles du poivre noir dont l'activité antioxydante est forte alors que l'extrait de cette épice n'a présenté qu'une moyenne capacité à piéger le radical DPPH •. Par ailleurs, les huiles essentielles de la cannelle ont révélé une faible activité antioxydante, contrairement à son extrait brut.

L'inhibition de la croissance des différentes souches microbiennes testées peut être assurée différemment selon l'épice considérée, soit par aussi bien les extraits bruts que les HES de certaines épices constituant « Ras el hanout », comme dans le cas du cumin, de la cannelle et du carvi dont les spectres d'action de leurs extraits et de leurs HES sont relativement larges. Les extraits bruts d'autres épices montrent une meilleure activité inhibitrice que celle des HES, c'est le cas du gingembre et du curcuma, dont les extraits sont extrêmement actifs contre toutes les souches testées alors que leurs huiles essentielles sont nettement moins efficaces. A l'opposé, l'HE de la coriandre est nettement plus efficace que son extrait brut n'ayant affecté sensiblement que *E. coli* alors que son HE a montré un effet inhibiteur sur *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*.

L'activité antiinflammatoire évaluée suivant le test de thermo-déstabilisation des érythrocytes a révélé un effet topique des extraits du curcuma, du gingembre, de la cannelle, du poivre noir et du carvi dans la protection des érythrocytes. Cependant, l'extrait de l'anis vert et du fenouil sont les moins efficaces.

Les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes, en tanins condensés et en tanins hydrolysables du mélange 2 de "Ras el hanout" ainsi que ses activités antioxydante, antimicrobienne et antiinflammatoire sont plus importantes que celles du mélange 1.

Cette différence est acquise grâce à la plus forte proportion des épices riches en métabolites décrites pouvant être à l'origine de leurs bonnes activités biologiques dans le mélange 2.

L'hypothèse initialement proposée sur l'effet du traitement thermique des extraits, est leur effet négatif sur les teneurs de ces extraits en métabolites et sur leurs activités biologiques. Or, les résultats trouvés montrent l'inverse dans plusieurs situations, parmi lesquelles, on rappelle l'augmentation des teneurs en polyphénols du carvi, du poivre noir, de la cannelle, du fenouil, de la noix de muscade et des deux mélanges "Ras el hanout", l'augmentation des teneurs en flavonoïdes du carvi, du poivre noir et des deux mélanges "Ras el hanout", ainsi que l'augmentation de l'activité antioxydante du poivre noir, du fenouil, de la noix de muscade et du mélange 2 de "Ras el hanout, lorsque ces derniers subissent un traitement thermique de 200°C de courte durée (30 min). C'est aussi le cas de l'activité antimicrobienne de l'extrait du cumin et du fenouil contre *E. coli*, des extraits du gingembre, du poivre noir et du curcuma traités contre *P. aeruginosa* et de l'extrait de la cannelle traité pendant 60 min contre *C. albicans*.

Des situations de thermostabilité ont également été observées dans les teneurs des extraits de la coriandre et du gingembre en polyphénols, les teneurs du curcuma, de la cannelle, du cumin, du gingembre, de la coriandre et de l'anis vert en flavonoïdes, de l'activité antimicrobienne des extraits du gingembre, de la noix de muscade, du curcuma et de la cannelle contre *E. coli*, de l'activité de la cannelle et du carvi vis-à-vis de *P. aeruginosa*, de l'activité anti *S. aureus* du cumin, de la noix de muscade et du fenouil et l'activité du curcuma et du cumin contre *C. albicans*, et ce, pendant les 120 minutes de traitement.

Cependant, il est important de rappeler que ces expériences ont été menées dans un système de traitement thermique semi-hermétique qui minimise autant que possible l'évaporation des composés volatiles. Par conséquent, ces résultats ne peuvent pas être généralisés au système de la cuisson ordinaire qui est plus ouvert et conduit ainsi à une évaporation intense des essences dotés d'activités biologiques importantes.

D'après nos résultats et les constats de la littérature, on suggère que le temps adéquat de la cuisson de "Ras el hanout" ne doit pas dépasser 30 min. Ce temps permet de garder la saveur des épices en minimisant la perte des essences, comme il permet la dépolymérisation des tanins à effet anti-nutritif en anthocyanes, et la dégradation des saponines à effet hémolytique. Par ailleurs, les traitements thermiques, en déstructurant

la matrice végétale des épices, peuvent augmenter les quantités bio-accessibles dans le tractus gastro-intestinal et donc augmenter les effets bénéfiques des molécules contenues dans les épices.

La synergie des métabolites et des activités antioxydante et antimicrobienne des mélanges binaires et équimolaires des extraits est étudiée afin d'initier à un choix stratégique dans la préparation du mélange "Ras el hanout" caractérisé par une richesse en métabolites et d'activités biologiques importantes.

Les résultats montrent des effets synergiques chez 17 mélanges pour les polyphénols particulièrement dans le mélange cannelle-fenouil, 35 mélanges pour les flavonoïdes surtout dans les mélanges gingembre-coriandre et les mélanges du curcuma avec le carvi, le fenouil ou le gingembre. 4 mélanges pour les tanins hydrolysables et 21 mélanges pour les tanins condensés. Cette synergie est également observée chez 22 mélanges pour l'activité antioxydante, 19 mélanges pour l'activité anti *E. coli*, 26 mélanges pour les activités anti *P. aeruginosa* et anti *S. aureus* et 14 mélanges pour l'activité anti *C. albicans*.

L'association des extraits montre également des effets antagonistes. On compte 28 pour les polyphénols, 5 pour les flavonoïdes, 39 pour les tanins hydrolysables, 18 pour les tanins condensés, 17 pour l'activité antioxydante et 2, 10, 11, 12 respectives aux activités anti *S. aureus*, anti *C. albicans*, anti *E. coli* et anti *P. aeruginosa*.

Néanmoins, les interrelations métaboliques conduisant à ces effets, pouvant être liées à la diversité structurale et fonctionnelle des métabolites dosés sont encore méconnues.

On pense à partir des résultats trouvés sur la richesse du mélange 2 en métabolites et son efficacité antioxydante et antimicrobienne que les teneurs d'un mélange d'épices en métabolites et ses activités biologiques pourraient être le résultat d'un équilibre entre les synergies et les antagonismes produits entre les paramètres décrits. De ce fait, on privilégie le deuxième mélange "Ras el hanout" et pour améliorer sa qualité, on suggère d'augmenter sa teneur en curcuma "amie de la santé" et de minimiser sa teneur en noix de muscade connue par sa toxicité.

## Perspectives

Bien que les épices aient présenté de bonnes propriétés antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire, il serait judicieux pour améliorer ces activités de:

Faire une étude plus approfondie sur l'identification des composés phénoliques des épices constitutives de "Ras el hanout" avant et après le traitement thermique afin de mettre en exergue les modifications biochimiques provoquées par la cuisson des épices et de décrire une stratégie conduisant à la stabilité des activités biologique du mélange au cours de la cuisson.

Elaborer des mélanges équimolaires de plus de deux épices afin de rechercher les éventuels synergies ou antagonismes pouvant survenir entre un grand nombre d'épices.

Identifier le profil moléculaire des huiles essentielles des épices constitutives de "Ras el hanout" vu leur efficacité antioxydante et antimicrobienne.

Evaluer d'autres activités biologiques, surtout l'activité immuno-modulatrice et anticancéreuse.

Développer des formulations différentes de "Ras el hanout" en incluant d'autres épices afin d'innover un mélange "Ras el hanout" de haute qualité biologique et physiologique (plus biodisponible et moins toxique).

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

- Abdallah E. M.**, 2011. Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (06) : 16-20.
- Abderrazak M. et Joël R.**, 2007. La botanique de A à Z. *Ed. Dunod. Paris*. 177p.
- Achat S.**, Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. *Thèse de Doctorat en Sciences Alimentaires, Univ. De Bejaia et Univ. d'Avignon et des pays de Vaucluse*, pp: 19-21.
- AFNOR, (1998)**. Association française de normalisation, les huiles essentielles-vocabulaire-1<sup>ière</sup> liste. *NF T 75-006. Paris, France*.
- AFNOR. (2000)**. Association française de normalisation, Normes des Huiles essentielles. *NF T-75 111, 112. Paris, France*.
- Agrahari P., Singh D.K.**, 2014. A review on the pharmacological aspects of *Carum carvi*. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 4: 1-13
- Ahamefula I., Onwuka G. I. and Chibuzo N.**, 2014. Nutritional Composition of Tumeric (*Curcuma longa*) and its Antimicrobial Properties. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 5 (10): 1085.
- Ahmada S. I., Capoorb M. and Khatoona F.**, 2013. Phytochemical analysis and growth inhibiting effects of *Cinnamomum cassia* bark on some pathogenic fungal isolates. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(3) :25-32.
- Akroum S.**, 2011. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. *Doctorat en physio-toxicologie- Université Mentouri de Constantine*, 100p.
- Alavi L., Barzegar M., Jabbari A., Naghdi Badi H.**, 2010. Effect of Heat Treatment on Chemical Composition and Antioxidant Property of *Thymus daenensis* Essential Oil. *Summer*, 9: (35) 129-138.
- Alkurd A., Hamed T. R., AlSayed H.**, 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4: 265 - 274.
- Alejandro M. R., Lui M. C. Y., Lajolo F. M., Genovese M. I.**, 2011. Commercial spices and industrial ingredients: evaluation of antioxidant capacity and flavonoids content for functional foods development. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31(2): 527-533.
- Al-Gabbiesh A., Kleinwächter M. and Selmar D.**, 2015. Influencing the Contents of Secondary Metabolites in Spice and Medicinal Plants by Deliberately Applying Drought Stress during their Cultivation. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8 (1) : 1 – 10
- Alix L. D.**, 2012. Les épices c'est malin, cannelle, clou de girofle, poivre. Leurs bienfaits et toutes leurs utilisations méconnues pour la santé, la beauté et la maison. *Ed. Leduc. Paris.*, p 37.
- Al-Mariri A., Safi M.**, 2014. In vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *Iran J. Med. Sci.*, 39: 36-43.
- Amarowicz R.**, 2007. Tannins: the new natural antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 109 : 549–551.
- Ames J. M., Bailey R. G., Mann J.**, 1999. Analysis of furanone, pyranone, and new heterocyclic colored compounds from sugar-glycine model Maillard systems. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 438- 443.
- Amini E., Nabiuni M., Baharara J., Parivar K., Asili J.**, 2014. Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like compounds isolated from Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*). *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(10): 762-768.
- Anton R. et Lobstein A.**, 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Ed. Tec. & Doc., Paris*, 522p.
- Antunes, Robazza W. d. S., Schittler L., Gomes G. D. A.**, 2012. Synergistic and antimicrobial properties of commercial turmeric (*Curcuma longa*) essential oil against pathogenic bacteria

Propriedades antimicrobianas e sinérgicas de óleo essencial comercial de cúrcuma (*Curcuma longa*) contra bactérias patogênicas Sara Albino. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 32 : 525-530,

**Anwara F., Alia M., Hussaina A. I. and Shahida M.**, 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel. *Flavour Fragr. J.*, 24: 170–176

**Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U.**, 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia*, 58 (1):46-54

Archer A. W., 1988. *Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography*, 447: 272-276.

**Archer A.W.**, 1988. Determination of safrole and myristicin in nutmeg and mace by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 438: 117-121.

**Araujo C., Leon L.**, 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mern. Inst. Oswaldo. Cruz.*, pp 723-728.

**Arora D. S. and Kaur J.** 1999. Antimicrobial activity of spices. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12: 257-262

**Arrell K.T.**, 1990. Spices, Condiments, and Seasonings. 2nd ed .*Van Nostrand Reinhold*.

**Asimi O., A., Sahu N. P., Pal A.K.**, 2013. Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. *International Journal of Scientific and Research Publications* ; Vol. 3, (3) : 2250-3153

**Azzi R.**, 2013. Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. *Thèse Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen*. P48.

**Badiaga M.**, 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat, université de Bamako, p 10.

**Bahl L. J. R., Bansal R. P., S. N. Garg, Gupta M. M., Ikram V., Singh, Goel R., and Kumar S.**, 2014. Variation in Yield of Curcumin and Yield and Quality of Leaf and Rhizome Essential Oils among Indian Land Races of Turmeric *Curcuma longa*. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad.*, 80 (1) 143-156.

**Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M.**, 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim. Forsch*; 46:1086-1089.

**Bajpai V.K., Baek K.-H., Baek S.C.**, 2012. Control of Salmonella in foods by using essential oils. *Food Res. Int.*, 45: 722-734.

**Baljeet S.Y., Simmy G., Ritika Y., and Roshanlal Y.**, 2015. Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. *International Food Research Journal*, 22(6): 2594-2600.

**Bardaji D.K., Reis E.B., Medeiros T.C., Lucarini R., Crotti A.E., Martins C.H.**, 2015. Antibacterial activity of commercially available plant-derived essential oils against oral pathogenic bacteria. *Nat. Prod. Res.*

**Barkat M. and Bouguerra A.,** 2012. Study of the antifungal activity of essential oil extracted from seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. for its use as food conservative. *African Journal of Food Science*, 6(9): 239-244.

**Barton G.M.,** 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.*, 118(2) : 413-420.

**Baser K.H.C. and Buchbauer G.,** 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America., 994p.

**Basnet P. and Skalko-Basnet N.,** 2011. Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules*, 16, 4567-4598.

**Bassolé I. H. N., and Juliani H. R.,** 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17: 3989-4006

**Bate-Smith E.C.,** 1954. Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed leuco-anthocyanins in plant tissues. *The Biochemical Journal* 58, 122-125.

**Beart J.E., Lilley T.H., Haslam E.,** 1985. Polyphenol interactions. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition, observation on some polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 2: 1439-1443.

**Bellakhdar J.,** 1997. contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc : la situation actuelle, les produits, les sources du savoir *Thèse de doctorat en Science de la vie, Univ. De Metz*, 1102p.

**Benov L. and Georgeiv N.,** 1994. The antioxidant activity of Flavonoids Isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*. 8(2): 92-94.

**Bernonville T. D.,** 2009. Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus x domestica*). *Thèse de doctorat en Biologie cellulaire et végétale Université d'Angers*, 171p.

**Bertin-Maghit M., Mosnier F., Magnin C., Gueugniaud P. Y., Petit P.,** 2001. Réanimation du brûlé à la phase aiguë. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Conférences d'actualisation. *Paris : Elsevier*.

**Bisht, K., Wagner, K.H., Bulmer, A.C.** 2010. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, 278 : 88–100.

**Bobbarala V.,** 2012. Antimicrobial Agents, *Published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia*, 407p.

**Borel P.,** 2014. Biodisponibilité des phytomicronutriments : Mécanismes impliqués et stratégies d'amélioration. *Innovations Agronomiques*, 42: 27-37

**Borel P.,** 2012. Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 228-240.

**Borris R. P.,** 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol*, 51:29-38.

**Borris R. P.,** 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol*, 51:29-38.

**Boukhatem, M.N., Hamaidi, M.S., Saidi, F., Hakim, Y.** 2010. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue Nature et Technologie*, 03: 37-45

- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., and Marzouk B.,** 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1): 48-55.
- Brewer M.S.,** 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Food Science and Food Safety*, 10 : 221-247.
- Bousbia N.,** 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. *Thèse de doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique Alger*, 127p.
- Bremness L.,** 2002. Plantes aromatiques et médicinales. *Bordas. Paris*, 303p.
- Bruneton J.,** 1993. Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. *Lavoisier, Paris*, 278 - 279p.
- Bruneton J.,** 1999. Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales, *Paris, Lavoisier*, 1120 p.
- Bruneton J.,** 1999. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec & Doc, pp 101 -120.
- Buchner N., Krumbein A., Rhon S. and Kroh, L. W.,** 2006. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 3229-3235
- Bulduk S.,** 2004. Food Technology. 2nd edition, *Detay Publishing, Ankara, Turkey*,
- Burt S.,** 2004. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.
- Capet C, Bentot C, Druesne L, Chassagne PH, Doucet J.,** 2001. Non-steroid anti-inflammatory (NSAI) in the aged patient and adverse reactions. *Gériatrie*, 26, (5): 379-384.
- Carole G.,** 2011. Mes petites recettes magiques au super épices, cannelle, curcuma, muscade. Anticancer, protection cardiaque, mineur. *Ed. Leduc. Paris*, p17, 18.
- Castellani R. J., Li B.X., Farshori A., and Perry G.,** 2013. Oxidative Stress and Alzheimer's disease. *Springer Science Business Media*, pp: 9-13
- Casley-Smith J.R., Morgan R.G., Piller N.B., **1993.** *Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6-benzo-[alpha]-pyrone. The New England journal of medicine*, 329 (16).
- Chandrasekara N. and Shahidi F.,** 2011. Effect of Roasting on Phenolic Content and Antioxidant Activities of Whole Cashew Nuts, Kernels, and Testa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 : 5006-5014
- Charpentier B., Hamon-Lorleach F., Harlay A., Huard A., Ridoux L. et Chanselle S.,** 2008. Guide de préparateur en pharmacie. 3ème éd. *Elsevier Masson*, 1358p.
- Cheriot S.,** 2007. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. *Thèse de Doctorat de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)*,
- Charles D.J.,** 2013. Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. *Springer Science*, 255p.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I. and Florou-Paneri P.,** 2012. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*, 2: 228-243.

**Chikhi I., 2013.** Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. *Thèse de doctorat en chimie bio-organique et thérapeutique. Univ. Abou Baher Belkaid. Tlemcen*, 120 p.

**Chouitah O., 2012.** Composition chimique et Activités antibactérienne des huiles essentielles de *Glycyrrhiza glabra*. *Thèse de doctorat en biochimie, Univ. De Oran*, p30.

**Christova-Bagdassarian V. L., Bagdassarian K. S., Atanassova M. S., and Ahmad M. A., 2014.** Comparative Analysis of Total Phenolic and Total Flavonoid Contents, Rutin, Tannins and Antioxidant Capacity in Apiaceae and Lamiaceae families, *Indian Horticulture Journal*, 4: 131-140.

**Clark G. S., 1995.** Coumarin. *Perfumer and Flavorist*, 20 : 23-34

**Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D. and Menichini, F. 2006.** Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (10): 2056-2064.

**Conrad J., Vogler B., Klaiber I., Roos G., Walter U., Kraus W., 1998.** Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry*, 48: 647- 650.

**Cox S.D., Man C.M., Markham J.L., 2001.** Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 492-497.

**Cowan M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12 : 564-582.

**Crozier A., Clifford M.N. et Ashihara H., 2006.** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. *Blackwell Publishing Ltd*,

**Crozier A., Del Rio D., Clifford M.N., 2010.** Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* 31(6), 446-467.

**Cuendet M., 1999.** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraeablumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsiaalpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, *Thèse de doctorat, Université de Genève*, p 24.

**Dadi P.K., Ahmad M., Ahmad Z., 2009.** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol*, 45 (1): 72-9

**Daglia M., 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Biotechnology*, 23:174-181.

**Dai J. and Mumper R.J., 2010.** Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.

**Dangles O., 2012.** Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*, 16: 692-714.

**Das T K., Wati M.R., Shad K F., 2015.** Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease. *Arch Neurosci.*, 2:1-8.

**Dias M.I., Barros L., Sousa M.J., Ferreira I.C., 2011.** Comparative study of lipophilic and hydrophilic antioxidants from in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum*. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 66 (2) :181–186

**Diebolt M., 2003.** Effets pharmacologiques des polyphénols végétaux sur la vasomotricité et études des mécanismes dans un modèle de vaisseaux humains reconstitués par ingénierie tissulaire, TUniversité Laval,

**Dekker M., 2002.** Coumarins: analysis by TLC. *Encyclopedia of chromatography*, 1-3.

**Denre M., 2014.** The determination of vitamin C, total phenol and antioxidant activity of some commonly cooking spices crops used in West Bengal. *International journal of plant physiology and biochemistry*, 6 : 66-77.

**Deodhar S.D., Sethi R., Srimal R.C., 1980.** Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J. Med. Res.*, 71: 632–634.

**Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97: 654-66.

**Dohou K., Yamni S., Tahrouch L-M., Idrissi H., Badoc., N. Gmira., 2003.** *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142:61-78.

**Dong Y., Lu N., and Cole R. B., 2013.** Analysis of the volatile organic compounds in Cinnamomum cassia bark by direct sample introduction thermal desorption gas chromatographymass spectrometry. *Journal of Essential Oil Research*, 25(6): 458–463.

**Dorman H.J. and Deans S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatils oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.

**Dossu M.E., Houessou G.L., Loughbégnon O.T, Tenté A.H.B. et Codjia J.T.C. 2012.** Etude ethnobotanique des ressources forestières ligneuses de la forêt marécageuse d'Agonvé et terroirs au Bénin, p2.

**Droniou-Cassaró, 2012.** Les épices. *Les symposiarques*, pp : 1-6.

**Dua A., Garg G. and Mahajan R., 2013.** Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *European Journal of Experimental Biology*, 3(4):203-208

**Dufour C., Page D., Gobert M., Rémond D., Loonis M., Buffière C., Santé-Lhoutellier V., 2014.** Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif. *Innovations Agronomiques*, 36: 69-82.

**Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C. 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. Examens de laboratoires galéniques. Eléments thérapeutiques synergiques. 2<sup>ème</sup> éd. Masson, Paris.

**Duvoix, Blasius R., Delhalle S., Schnekenburger M., Morceau F., Henry E., Dicato M., Diederich M., 2005.** Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin Annelyse. *Cancer Letters*, 223: 181–190

**Edenharder R., Grünhage D., 2003.** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumenehydroperoxide in Salmonella typhimuriumTA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.

**El-Baroty G. S., Abd El-Baky H. H., Farag R. S. and Saleh M. A., 2010.** Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6):167-174

**El-Kalamouni C., 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. *Thèse de doctorat, Sciences des Agroressources*, 227p.

**El Ouariachi E., Lahhit N., Bouyanzer A., Hammouti B., Paolini J., Majidi L., Desjobert J-M. and Costa J., 2014,** Chemical composition and antioxidant

activity of essential oils and solvent extracts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Morocco. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4):743-748.

**Ereifej K.I., Feng H., Rababah T.M., Tashtoush S.H., Al-U'datt M.H., Gammoh S. and Al-Rabadi, G.J., 2016.** Effect of Extractant and Temperature on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Spices. *Food and Nutrition Sciences*, Food and Nutrition Sciences, 7, 362-370.

**Essawi T. and Srour M., 2000.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, 70: 343–349.

**Evans J., Doyle J., Dolores, Evans G., 2007.** *Escherichia Coli, Medical Microbiology, the University of Texas Medical Branch at Galveston, 4th Ed.*

**Faleiro M. L., 2011.** The mode of antibacterial action of essential oils. *Communicating current research and technological advances*. 1143-1149.

**Falleh h., ksouri r., chaieb k., karray-bouraoui n.,trabelsi n., boulaaba m., Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*, 331: 372-379.

**Fang R, Jiang CH, Wang XY, Zhang HM, Liu ZL, Zhou L, Du SS, Deng ZW. 2010.** Insecticidal activity of essential oil of *Carum Carvi* fruits from China and its main components against two grain storage insects. *Molecules*. 15:9391–9402.

**Farag R.S., Daw F.M., Hewed and El- Baroty A., 1989.** Antimicrobial activity of some Egypton spice essential oils. *J. Food Prot.*, 52: 665-667.

**Fatemi F., Allameh A., Khalafi H., Rezaei M.B., 2011.** Biochemical properties of irradiation caraways essential oils. *Journal of Food Biochemistry*, 35: 650-662.

**Favier A.,** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques*. pp: 109-115.

**Fernandez X., Cabrol-bass D.,** Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept. 2007, pp. 3233-5, 10.

**Ford R. A, Hawkins D. R, Mayo B. C et Api A. M., 2001.** The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, 39 : 153-162.

**Figueredo G. (2012).** Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, pour obtenir le grade de docteur d'université (Spécialité : Chimie organique). p 56.

**Fitsiou E., Mitropoulou G., Spyridopoulou K., Tiptiri-Kourpeti A., Vamvakias M., Bardouki H., Panayiotidis M.I., Galanis A., Kourkoutas Y. , Chlichlia K. and Pappa A., 2016.** Phytochemical Profile and Evaluation of the Biological Activities of Essential Oils Derived from the Greek Aromatic Plant Species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. *Molecules*, 21: 1069-

**Formica J.V., Regelson W., 1995.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33 : 1061–1080.

**Fossat C. et Roméo M., 2006.** Schizocytes : recherche et interprétation. *Spectr. Biol.*, 150: 41-5.

**Freire R.S., Morais S.M., Catunda-Junior F.E.A., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2005.** Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 4353-4358.

**Friedman M., 1997.** Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (5) :1523-1540.



**Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygodlo J., Demo M., 2009.** Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr. J.*, 24: 38–354.

**Garnero J., 1991.** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. *Encyclopédie des médecines naturelles, phytothérapie, Aromathérapie. Paris.* pp. 2-20.

**Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E., and Rahmat A., 2010.** Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15: 4324-4333

**Gill A.O., and Holley R.A., 2006.** Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol*, 111: 170-174.

**Gobert M., Rémond D., Loonis M., Buffière C., Santé-Lhoutellier V., Dufour C., 2014.** Fruits, vegetables and their polyphenols protect dietary lipids from oxidation during gastric digestion, *Food and Function*, 5: 2166-2174.

**Grieve M., 1971.** *A Modern Herbal: The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folk-Lore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs & Trees with their Modern Scientific Uses.* New York, Dover Publications,

**Groff J., and Gropper S., 2000.** Advanced Nutrition and human Metabolism, 3<sup>rd</sup> Ed. Belmont: Wadsworth.

**Grosogeat H., Compper H., 2009.** Ma promesse anti-âge. *Odile Jacob éd., Paris*, pp : 154- 155.

**Guerin-fauble V. and CARRET G., 1999.** L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées Nationales GTV- INRA*, 5-12.

**Guignard J. L., 1974.** Abrégé de Biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie : *Masson. Paris.* pp: 146-155.

**Guignard J. L., Cosson L., et Henry M., 1985.** Abrégé de phytochimie, *Masson. Paris*, Pp 138.

**Guilloton M., 2005.** Hypersensibilité aux épices, incluant les condiments et aromates. *Faculté de médecine, Université de Limoges*,

**Guinoiseau E., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. *Thèse de doctorat, Univ. de Corse-Pasquale Paoli.* 143p.

**Gupta D., 2013.** Comparative analysis of spices for their phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, 4(1): 38-42.

**Gupta A. D., and Rajpurohit D., 2011.** Antioxidant and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans*). *Chapter*, pp : 832-839.

**Guzun-Cojocar T., Cayot P., Loupiac C., Cases E., 2010.** Iron chelates and oil-water interfacial stabilized by milk proteins: role of phosphate groups and pH. Prediction of iron transfer from aqueous phase toward fat globule surface by changes of interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 24: 364-373.

**Häfliger K., 1999.** Epices Herbes Graines. Pp: 4-14.

**Hajji S., Beliveau J., Simon D.Z., Salvador R., Aube C., Conti A., 1984.** A rapid method for the perfractionation of essential oils: application to essential oil of black spruce. *Journal of Liquid Chromatography*, 7(13): 2671-2677.



**Hajimehdipoor H., Shahrestani R., Shekarchi M.,** 2014. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3): 35-40.

**Helander I.M., Alakomi H.-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M.,** 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 3590-3595.

**Haleng J., Pincemail J.O., Defraigne C., Charlier, Chapelle J.P.,** 2007. Le stress oxidant. *Rev Med. Liege*, 62: 628-638.

**Harborne J.B.,** 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. *Third Edition*. pp : 203-214.

**Haslam E.,** 1994. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.*, 11: 41-66.

**He Y., Yuan Yue Y., Zheng X., Zhang K., Chen S., and Du Z.,** Molecules 2015, Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? 20 : 9183-9213.

**Heers.,** 2008. Rôle historique des spices et des aromates. *Terre et vie*, p96.

**Hemingway R.W. et Laks P.E.,** 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In plant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. (New York), p34.

**Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F.,** 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6

**Hertog M., Feskens E., Hollman P., Katan M., Kromhout D.,** 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The zupthen elderly study. *The Lancet*, 342: 1007-1014.

**Ho C.L., Wang E.I.C., Yu H.T., Yu H.M. and Su Y.C.,** 2010. Compositions and antioxidant activities of essential oils of different tissues from *Cryptomeria japonica* D. Don. *林業研究季刊* 32 (1): pp.63-76.

**Hopkins W.,** 2003. Physiologie végétale. *Ed De Boeck. Paris*. P280.

**Hossain M.A., Ismail Z., Rahman A. and Kang S.C.,** 2008. Chemical composition and antifungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops And. Products* 2, 7: pp. 328–334.

**Hostettmann K.,** 1992. Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. *Ed. Zyma SA, Nyon. Switzerland*, 25 : 76-

**Hoult J. R. S., Paya M.,** 1996. Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine: Natural Products with Therapeutic potential. *Gen. Pharmacol. Vol.*, (27): 711-722.

**Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Capasso F., Senatore F.,** 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 53(1): 57-61.

**Ikpeama A., Onwuka G. I. and Nwankwo C.,** 2014. Nutritional Composition of Tumeric (*Curcuma longa*) and its Antimicrobial Properties. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 5 (10): 1085-1088

**Ioannou I, Ghoul M.,** 2012. Biological activities and effects of food processing on flavonoids as phenolic antioxidants. *Advances in Applied Biotechnology, Prof. Marian Petre (Ed.), In Tech*, 5:101– 125.

**Irchhaiya R., Kumar A., yadav A., Gupta N., Kumar S., N. Gupta , S. Kumar , Vinay Yadav , Prakash A. and Gurjar H., 2015,** Metabolites in plants and its classification *world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4 (1): 287-305.

**Iserin P., 2001.** Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins. *Larousse*, pp : 15-16.

**ISO, 1999.** Organisation Internationale de Normalisation, indices physicochimiques des huiles essentielles. (NF ISO 280).

**Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K. C., Ahn D.U., and Lee S.C., 2004.** Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3389–3393.

**Jigar B. patela , Bhavna Patelb , Rajendra K. Patela , Bhavesh H., Patela, 2012.** Comparative Evaluation of Extraction Methods for Extraction of Essential Oil from *Foeniculum Vulgare*. *Journal Of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, 2 (4) : 176-178.

**Jimenez Elizondo N., 2011.** Impact des opérations thermiques agroalimentaires à hautes températures sur la dégradation des anthocyanes : caractérisation et modélisation des cinétiques réactionnelles. *Thèse de doctorat en Génie de procédés. Montpellier SupAgro*, 194 p.

**Jurenka JS., 2009.** Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa* preclinical and clinical research. 14(2):141-153.

**Kabera J.N., Semana E., Ally R., Mussa and He X., 2014.** Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 377-392

**Kähkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J.-P., Pihlaja, K., and Kujala T. S., 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47:3954–3962.

**Kanko C., Sawaliho B.E., Kone S., Koukoua G., N’guessan Y.T., 2004.** Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie*, 7 : 1039-1042.

**Kamaliroostaa Z., Kamaliroosta L., Elhamiradc A. H., 2013.** Isolation and Identification of Ginger Essential Oil. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 3: 73-80,

**Karleskind A., (1992).** Manuel des corps gras. *Tome2. Ed tec et doc, Lavoisier : Paris*, PP : 1571-1578.

**Kasim N. N., Syed Ismail S., Masdar N.D., Ab Hamid F., Nawawi W.I., 2014.** Extraction and Potential of Cinnamon Essential Oil towards Repellency and Insecticidal Activity. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4: 1-6.

**Kaushal P., Kaur M. and Sharma H. K., Bhat S., 2014.** Coriander (*Coriandrum sativum L.*): Processing, nutritional and functional aspects. *African Journal of Plant Science*, 8 (1) : 25-33.

**Kebieche M., 2009.** Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L.* : effet sur le diabète expérimental et l’hépatotoxicité induite par l’Epirubicine. *Thèse de doctorat en biochimie- Université Mentouri Constantine*, 122p.

**Khalaf N. A., Shakya A. K., Al-Othman A., El-Agbar Z., Farah H., 2008.** Antioxidant Activity of Some Common Plants. *Turk. J. Biol.*, 32: 51-55.

**Khan R. Y.**, 2012. Fruit Yield and Quality of Anise (*Pimpinella anisum* L.) in Relation to Agronomic and Environmental Factors. A thesis submitted for the requirement of doctoral degree in agriculture from Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, and Environmental Management Justus Liebig University Giessen, Germany p5.

**Khatun M., Eguchi S., Yamaguchi T., Takamura H. and Matoba T.** 2006. Effect of Thermal Treatment on Radical-scavenging Activity of Some Spices. *Food Sci. Technol.*, 12(3): 178- 185.

**Kimber R. J., Lander H.**, 1964. The effect of heat on human red cell morphology, fragility and subsequent survival *in vivo*. *J. Lab. Clin. Med.*, 64 : 922-33.

**Kinsella J.E., Frankel E., German B., Kanner J.**, 1993 Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47 (4) :85-89.

**Koedam A.**, 1982. The influence of some distillation conditions on essential oil composition in Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects. *Publishers Netherlands*, 40:229-236.

**Konig M., Scholz E., Hartmann R., Lehmann W., Rimpler H.**, 1994. Ellagitannins and complex tannins from *Quercus patrae* bark. *J. Nat. Product.*, 57: 1411 -15.

**Koroch A., Ranarivelo L., Behra O., Rodolfo Juliani H., and Simon J. E.** 2007, Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar. *Botanicals and Medicinals*, pp : 338-341.

**Kueny-Stotz M.**, 2008. Contribution à la chimie des flavonoïdes : (i) Elaboration de squelettes flavylium sophistiqués ; (ii) Nouvelles voies d'accès aux flavan-3-ols et procyanidines. *PhD thesis, University Strasbourg I*,

**Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M.**, 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.*, 85:633-640.

**Kurkin V.A.**, 2003. Phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity. *Chem. Nat. Compd.*, 39:123-153.

**Ladyguina E.Y., Safronitch L.N., Otriachenkova V. E., Balandina I. A., Grinkevitch N. I.**, 1983. Analyse chimique des plantes médicinales. *Ed. Moskva, Vischaya Chkola*, 196p.

**Lagnika L.**, 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. *Thèse de Doctorat, Université Louis pasteur, Strasbourg*,

**Lahlou M.**, 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18: pp. 435-448

**Lambert R.J., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas.** 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-462.

**Langcake P., Cornford C. A., Pryce R. J.**, 1979. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, 18: 1025-1027.

**Laribi B., Kouki K., Mougou A., Marzouk B.**, 2010. Fatty acid and essential oil composition of three Tunisian caraway (*Carum carvi* L.) seed ecotypes. *J. Sci. Food Agric.*, 90:391–396.

**Laverdiere D., Hoban C., Restieri F., Habel, 2002.** *In vitro* activity of three new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50 (1): 119-123.

**Lawrence, B.M., 1995.** Essential oils, *Allured Publishing Corporation*, 20 (1) : 47.

**Leclerc I.L., Gaillard J.P., Simonet M., 1995.** Microbiologie générale. Doin Éditeur. Paris

**Lehucher-Michel M.P., Lesgards J. F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, 30: 1076-1081.

**Leong L. P. and Shui G., 2002.** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76: 69-75.

**Leopoldini M., Russo N., Toscano M., 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, 125: 288-306.

**Lhuillier A., Fabre N., Moyans F., Malins N., Claparols C., Fouraste I., Moulines C. 2007.** Comparaison of flavonoid profiles of *Agauria Salcifilia* (Ericaceae) by liquid chromatography UV diode array detection. Electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography*, pp: 191-198.

**Liao K., Yin M., 2000.** Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2266-70.

**Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Tian Y. 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102: 771-776.

**Lin C. C., Wu S. J., Chang C. H., and Ng L. T., 2003.** Antioxidant activity of *Cinnamum cassia*,” *Phytotherapy Research*, vol. 17 (7): 726–730.

**Liu X.C., Hu J. F., Zhou L. and Liu Z. L., 2014.** Evaluation of fumigant toxicity of essential oils of Chinese medicinal herbs against *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2 (3): 164-169.

**Lü J.M., Lin P. H., Yao Q., and Chen C., 2010.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* 14(4): 840–860.

**Lugasi A., Hovari J., Sagik., and Biro L., 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta. biologica. Szegediensis*, 47 (1 4):119-125.

**Macheix J. J., Fleuriet A. and Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne*, p. 4-5.

**Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N., 2013.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*, 09: 35- 40.

**Maizura M., Aminah A. and Wan Aida W. M., 2011.** Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*, 18: 529-534.

**Makkar H.P.S., 2003.** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49: 241-256.

- Malecky M.**, 2007. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat, INRA, Physiologie de la Nutrition et Alimentation, Paris*, pp. 30-35.
- Malešev and Kunti V.**, 2007. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72 (10): 921-939.
- Mamyrbekova-Bekro J. A. , Boua Boua B., Kouassi K. Ch., Békro Y.A.**, 2013. Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature and Technologie*, 08: 2-12
- Mann C.M., and Markham J.L.**, 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538–544
- Marín I., Sayas-Barberá E., Viuda-Martos M., Navarro C., and Sendra E.**, 2016. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain, *Foods*, p 5, 18.
- Marongiu B., Piras A., Porcedda S.**, 2007. Supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24):10022–10027.
- Marston A. and Hostettmann K.**, 2006. Developments in the application of counter current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography*, 1112 (1-2), 181-194.
- Martinelli L., Rosa J. M., Ferreira C.B., Nascimento G. M.L., Freitas M. S., Pizato L. C., Santos W. O., Pires R. F., Okura M. H., Malpass G.P., Granato A.C.**, 2017 Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species Atividade antimicrobiana e constituintes químicos dos óleos essenciais e oleoresinas extraídas. *Ciência Rural*, 47: 05,
- Marzuki I., Bintoro J., Aziz S.A. , Augusta H., Memen S.**, 2014. Physico-Chemical Characterization Of Maluku Nutmeg Oil. *International Journal of Science and Engineering*, 7(1):61-64.
- Mazimba O., Wale K., Kwape T.E., Mihigo S. O., Kokengo B. M.**, 2015. Cinnamomum verum: Ethylacetate and methanol extracts antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3(3): 28-32.
- Meghwal M. and Goswami T. K.**, 2012, Chemical Composition, Nutritional, Medicinal And Functional Properties of Black Pepper. *Open Access Scientific Reports*, 1 (2):5p.
- Mehdi R.A., Masoomch S.G., Mohammad B.R., et al.** 2009. Chemical composition and antiaflatoxicogenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Contr.*, 20(11): 1018-1024.
- Merck E**, 1980. Révélateurs pour la chromatographie en couche mince et sur papier. *Darmstadt*, 153 p.
- Meyer K.C., Zimmerman J.**, 1993. Neutrophil mediators, *J. Lab. Clin. Med.*, 121, 654p.
- Mezzoug N., Elhadri A., Dalllouh A., Amkiss S., Skali N.S., Abrini J., Zhiri A., Baudoux D., Diallo B., Jaziri M.E., Idaomar M.**, 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research*, 2007; 629: 100-110.
- Middleton E., Kandaswami C., AND Theoharides T. C.** 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological reviews*, 52:673–751.

**Milane H.**, 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur*, pp : 13-36.

**Miquel J., Bernd A., Sempere J. M. and Diaz -Alperi R. A.** (2002), The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects future clinical use. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 34, 37-46.

**Mitjavila S., Lacombe G., Carrera G. and Derache R.**, 1997. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. *J. Nutr.*, pp: 2113-2121.

**Moghtader F. M.**, 2013. Comparative survey on the essential oil composition from the seeds and flowers of *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Horticulture*, 5(3): 37-40.

**Mohd Zainol, M.K., Abdul-Hamid A., Abu Bakar, F. and Pak Dek, S.**, 2009. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal* ; 16: 531-537.

**Mole S., Waterman P.G.**, 1987. Tannic acid proteolytic enzymes: enzyme inhibition substrate derivation. *Phytochemistry*, 26: 99-102.

**Mole S., Waterman P.G.**, 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia*, 72:137-147

**Moleyar V., Narasimham P.**, 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 337-342.

**Montenegro de Matta S.S., Delle Monache F., Ferrari F., Marini-Bettolo GB.**, 1976. Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria* sp. from Peru. *Farmaco. Sci.*, 31: 5227-35.

**Moon J. K., Shibamoto T.**, 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1655-1666.

**Morin P., Gunther C., Peyron L., Richard H.**, 1985. Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy experimental and theoretical study. *Éd. Bull. Soc. Chim.* p921.

**Motamed S.M., Naghibi F.**, 2010. Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chem*, 119(4):1637-1642.

**Mountagud F.**, 2014. Epices, cosmétiques et allergies. *American College of Allergy, Asthma and Immunology*. P02.

**Muanda F.N.**, 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine, Metz*, pp.77.

**Muckenstrum B., Foechterlen D., Reduron JP, Danton P, Hildenbrand M** (1997). Phytochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*, *Biochem. Syst. Ecol.* 25: 353-358.

**Murcia M.A., Egea I., Romojaro F., Parras P., Jiménez A.M., Martínez-Tomé M.**, 2004. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7):1872-1881.

**Nakatani N.**, 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors*, 3:141-146.

**Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R., 2011.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.

**Nathan C., 2002.** Points of control in inflammation. *Nature*, 420 (6917):846-852.

**Naveed R., Hussain I., Tawab A., Tariq M., Rahman M., Hameed S., Mahmood M.S., Siddique B., Iqbal M., 2013.** Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against Salmonella and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complement. Altern. Med*, 13: 265-275.

**N'gaman K.C.C., Bekro Y-A., Mamyrbekova-Bekro J. A., Benie A., Goore S., 2009.** Sur la Composition en Metabolites Secondaires et L'activite Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Cote d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *Eur. J. Sci. Res.*, 36 (2): 161-171.

**Ngakegni-Limbili A. C., 2012.** Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. *Thèse doctorat, Univ. De Toulouse, Sciences des agroressources*, p140.

**O'Connell J.E., Fox P.F., 1999.** Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. *International Dairy Journal*, 9 (8): 523-536.

**Olle M., and Bender I., 2010.** The effect of non-woven fleece on the yield and production characteristics of vegetables. *Journal of Agricultural Science. Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi väljaanne*, 1: 24-29.

**Otunola G.A., Afolayan A.J., 2013.** Evaluation of the polyphenolic contents and some antioxidant properties of aqueous extracts of Garlic, Ginger, Cayenne Pepper and their mixture. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86: 66-70.

**Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah y., amrani M. et Bellabas M.A., 2005.** Etude de l'activité des plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapies*. 4:147-157.

**Ouattara L.H., Kabran G. R. M., Kadja A.B., Tano M. B., Mamyrbekova-Bekro J. A., and BEKRO Y. A. 2016.** Phytochemical survey and antioxidant activity of plant extracts from cote d'ivoire used in traditional treatment of hemorrhoids. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 15 (4): 881-893

**Oyaizu M., 1986.** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

**Oyedapo O.O., Akinpelu B. A., Akinwunmi K. F., Adeyinka M. O. and Sipeolu F. O., 2010.** Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of Lantana camara and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4): 46-51.

**Parada J., Aguilera J.M., 2007.** Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72: 21-32.

**Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E., Boll P.M., 1997.** Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*, 46:597-673

**Parker T.L., Miller S.A., Myers L.E., Miguez F.E., Engeseth N.J., 2010.** Evaluation of synergistic antioxidant potential of complex mixtures using oxygen

radical absorbance capacity (ORAC) and electron paramagnetic resonance (EPR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 209-17.

**Parthasarathy V. A., Chempakam B. and John Zachariah T.,** 2008. Chemistry of Spices. Typeset by Spi, Pondicherry, India. ISBN-13: 978 1 84593 405 7

**Pasupuleti V. R. and Siew H. G.,** 2014. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. Hindawi Publishing Corporation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 12 p.

**Patil S.D., Maknikar P.P., Wankhade S.J., Ukesh C. S., Rai M. K.,** 2016. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oils from cumin and ajowan, *Nusantara Bioscience*, 8 (1): 60-65.

**Pei R.S., Zhou F., Ji B.P., Xu J.,** 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.*, 74: 379-383.

**Penchev P.I.,** 2010, Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, Institut National Polytechnique de Toulouse, doctocat.p51 -52.

**Perchellet E.M., Moutaseb H.U., Makkar H.P.S. and Perchellet P.,** 1996. Ability of tannins extracted from various tree leaves to inhibit the biomarkers of tumor promotion in mouse skin in vivo. *Int. J. Oncol.*, 9 : 80-809.

**Poisson J. E.,** article *Alcaloïdes*, *Encyclopædia Universalis*, 2011.

**Perez G. R.M.,** 2001. Anti-Inflammatory Activity of Compounds Isolated from Plants. *The Scientific World*, 1: 713-784.

**Peronny S.,** 2005. La perception gustative et la consommation des tannins chez le Maki (Lemure Catta). *Thèse de doctorat en éco-éthologie, Muséum national d'histoire naturelle, France*, 22 p.

**Peter Y., Wong Y., David D., Kitts,** 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97: 505-515.

**Petrovska,** 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognoy*, 6:1-5.

**Phatak R. S., Pratinidhi A. K., Hendre A. S.,** 2015. Screening of some indian household spices for comparative studies of antioxidant and antiradical activities by using in-vitro models, *Asian J Pharm Clin Res*, 8 : (2) 431-438.

**Pichersky E., and Gang D.R.,** 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5: 439-445.

**Pietta P.G.,** 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*, 63: 1035- 1042.

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O.,** 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4 (5).

**Politeo O., Jukic M., and Milos M.,** 2006. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of Twelve Spice Plants. *Croatica Chemica ACTA*, 79 (4): 545-552 .

**Prakash B., Singh P., Kedia A., Dubey N.K.,** 2012. Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and in vivo efficacy in food system. *Food Research International*, 49: 201-2

**Prakash D., Upadhyay G., Gupta C., Pushpangadan P., and Singh K.K,** 2012. Antioxidant and free radical scavenging activities of some promising wild edible fruits. *International Food Research Journal*, 19 (3): 1109-1116.



- Prasad K.N., Yang B., Dong X., Jiang G., Zhang H., Xie H., Jiang Y., 2009.** Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 627-632.
- Priyadarsini K. I., 2014.** The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, 19: 20091-20112.
- Przygodzka M., Zielin H., Zuzana S., Kukurová K. C and Lamparski G., 2014.** Effect of selected spices on chemical and sensory markers in fortified rye-buckwheat cakes. *Food Science & Nutrition*, 4(4): 651–660
- Raghavan S., 2007.** Handbook of spices, seasonings, and flavorings. *2nd Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.*
- Raja R., Sreenivasulu R. M., 2015** Medicinal plants secondary metabolites used in pharmaceutical importance-an overview *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(4) : 436-447.
- Rahman N.A.A., Fazilah A and Effarizah M.E., 2015.** Toxicity of Nutmeg (Myristicin). *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 5 (3): 61-64.
- Raven P., Evert R, et Eichhorn S., 2000.** Biologie végétale. *Ed. De Boeck. Paris*, p32, 33.
- Redhead J., 1990.** Utilisation des aliments tropicaux : sucres, épices et stimulants. *Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture*, pp : 19- 46.
- Renard C.M.G.C., Caris-Veyrat C., Dufour C., Le Bourvellec C. 2014.** Le devenir des polyphénols et caroténoïdes dans les fruits et légumes traités thermiquement. *Innovations Agronomiques*, 42:125-137.
- Rezaire A., 2012.** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). *Thèse pour le doctorat en Phytochimie-Université des Antilles et de la Guyane*, 192p.
- Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Sendice K., Remmal A., 2003.** The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 356-362.
- Richard H., 1987.** Épices et herbes aromatiques. *Cedex*, pp 6-9.
- Robya M.H. H., Sarhana M.A., Selima K. A.-H., Khalel K. I., 2013.** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) *Industrial Crops and Products*, 44 : 437-445
- Robert H. P. and Don W. G., 2007.** Perry's chemical engineers 'handbook, 8<sup>th</sup> edition McGraw-Hill,
- Romson S., Sunisa S. and Worapong U., 2011.** Stability of antioxidant and antibacterial properties in heated turmeric-chili paste and its ingredients. *International Food Research Journal*, 18: 397-404.
- Sadgrove N., and Jones G., 2015.** A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*, 5: 48-102.
- Sadique J., Al-Rqobah N.A., Bughaith M.F., El-Gindy A.R., 1989.** The bioactivity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*, pp: 525-532.

**Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., et Fujisawa S., 2005.** Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, 66: 2108 - 2120.

**Saleem M., Bhatti, H.N.; Jilani, M.I., Hanif, M.A., 2015.** Bioanalytical evaluation of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Nat. Prod. Res.* 29:1857-1859

**Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F., 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (2): 270–276.

**Sarma A.D., Mallick A. R. and Ghosh A. K., 2010.** Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3) :185-192

**Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, *Ed. Lavoisier (Tec et Doc), Paris*, pp : 300-398.

**Sasidharan I., Menon A. N., 2010.** Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2 (4)

**Scalbert, 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12) :3875-3883.

**Seddik M., Dib S., Fortas Z., El-Abed D., 2009.** Étude de pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région d'Adrar. *Congrès international sur la santé et l'agroalimentaire (CISA), 2 et 3 décembre, Sidi Fredj –Alger.*

**Seidler-Łożykowska K., Kędzia B., Karpińska E. and Bocianowski J. 2013.** Microbiological activity of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil obtained from different origin. *Agronomy Maringá*, 35 (4): 495-500.

**Sekli-Belaidi F., 2011.** Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly (3,4- éthylènedioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum sanguin. *Thèse de Doctorat Génie des Procédés et de l'Environnement, Univ. De Toulouse*, p10.

**Senanayake U. M., Lee T. H., and Wills R. B. H., 1978.** Volatile Constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; vol. 26 (4) : 822-824.

**Seu-Saberno M. et Blakeway J., 1987.** La mousse des chênes, une base de la parfumerie pour la science. *Edition Française de scientifique American*, 83p.

**Shahat A. A., Ibrahim A. Y., Hendawy S. F., Omer E. A., Hammouda F.M., Abdel-Rahman F. H., and M.A. Saleh, 2011.** Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules*, 16, 1366-1377.

**Shamkant B., Badgujar, Patel V. V. and Atmaram H., Bandivdekar, 2014.** Foeniculum vulgare Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *Bio. Med. Research International*, 32 p.

**Shannugapriya K., 2012.** Antioxidant potential of pepper (*Piper nigrum* Linn.) leaves and its antimicrobial potential against some pathogenic microbes. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(4), 570-577.

**Sharma P. and Gujral H.S., 2011.** Effect of sand roasting and microwave cooking on antioxidant activity of barley. *Food Research International*, Vol. 44 : 235-240

**Shi Y., Chen Q. X., Wang Q., Song K. K., Qiu L., 2005.** Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chemistry*, 92(4):707–712.

**Shinde U. A., Phadke A.S., Nair A.M., Mugantiwar A.A., Dikshit V.J. and Saraf V.O.,** 1999. Membrane stabilizing activity –a possible mechanism of action for the anti- inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70 (3): 251-257.

**Shiney ramya B. and Ganesh P.,** 2012. Phytochemical Analysis and Comparative Effect of *Cinnamomum zeylanicum*, *Piper nigrum* and *Pimpinella anisum* with Selected Antibiotics and Its Antibacterial Activity against Enterobacteriaceae Family. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(4): 914-917.

**Shirazi O.U., Muzaffar M., Khattak A.K., Azwani N., Shukri M., Nasyriq M. N.,** 2014. Determination of total phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3 (3): 104-108.

**Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P.S.,** 1998. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers, *Planta. Med.*, 64(4):353-6.

**Sibi G., Apsara V, Dhananjaya K., Ravikumar K.R., and Mallesha H.,** 2013. Phytochemical and antibacterial properties of spices against food borne bacteria with special reference to *parmelia perlata*. *Global Journal Of Biosciences and biotechnology*, 2 (2): 145-149.

**Sies H., Stahl W.,** 1995. Vitamin E and C, beta carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*; vol. 62:13115S-21S.

**Sikkema J., De-Bont J.A.M., Poolman B.,** 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem*, 269, 8022–8028.

**Silva F., Ferreira S., Queiroz J.A. and Domingues F. C.,** 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*, 60:1479-1486

**Singh A.K., Pandey M.B., Singh U.P.** 2007. Antifungal activity of an alkaloid allosecurinine against some fungi. *Mycobiol*, 35: 62–64.

**Singleton V.L. and Rossi J.A.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and viticulture* 16: 144-158.

**Skene C. D., Sutton P.,** 2006. *Saponin-adjuvanted particulate vaccines for clinical use*. *Methods*, 40:53-9.

**Slavich G. M. and Irwin M. R.,** 2014, From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression Psychological. *Bulletin American Psychological Association*, 140 (3) : 774-815.

**Sophie J.,** 2006. La culture des plantes aromatiques, *Ed. artémis*, p 91,92.

**Souto E.,** 2015. Les bienfaits insoupçonnés du gingembre. *Phytochemistry*, 26: 99-102.

**Sultan M., Bhatti H.N., Iqbal Z.,** 2005. Chemical analysis of essential oil of ginger (*Zingiber officinale*). *Pakistan Journal Of Biological Sciences*, 8(11):1576-1578.

**Sun T., Powers J.R., Tang J.,** 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus broccoli and their juices. *Food Chem.*, 105: 101-106.

**Surwase V.S., Laddha K.S., Kale R.V., Hashmi S. I. and Lokhande S.M.,** 2011. Extraction and isolation of turmerone from turmeric. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 10 (5): 2173-2179.

**Swain T., Hillis W.E.**, 1956. The phenolics constituents of prunus domestica - 1- the quantitative analysis of phenolics constituents. *J. of the Sei. of Food and Agric.*, pp:10- 13.

**Tabart J., Optimisation** et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et Etude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. *Thèse de Doctorat en Sciences (Biochimie, Biochimie moléculaire et cellulaire, Bioinformatique et modélisation) Univ. De Liège*, p 37.

**Takahama U.**, 1986. Spectrophotometric study on the oxidation of rutin by horseradish peroxidase and characteristics of the oxidized products. *BBA -General Subjects*, Vol.882(3) : 445-451

**Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H. and Errifi A.**, 1993. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Thymus Broussonettii, T.zygis and T.satureioides. *J. Essent. Oil. Res.*, 5: 45-53.

**Tasleem F. Azhar I., Zafar S. A.,. Mahmood A.**, 2014. Analgesic and anti-inflammatory activities of Piper nigrum L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 71(1): 61-8.

**Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-elimat, T.** 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, 104: 1372-1378.

**Teixeira-Duarte M. C., Mara Figueira C. et Sartoratto A.**, 2005. Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 305-311.

**Toure D.**, 2015. Études chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. *Thèse de Doctirat en Biologie Humaine Tropicale, UNIV. Felix Houphouët-Boigny*, p14.

**Turgay O. and Esèen Y.**, 2015. Antioxidant, total phenolic and antimicrobial characteristics of some spices. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21 (3) 498-503.

**Tylkowski B., Trusheva B., Bankova V., Giamberini M., Peev G., and Nikolova A.**, 2010. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 348 : 124-130.

**Ultee A., Bennik M.H. and Moezelaar R.**, 2002.- The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and. Environmental Microbiology*, 68: 1561-1568.

**Urquhaga I., Leighton F.**, 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. 33(2) : 55-64.

**Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Mark T., Cronin D., Mazur M., Telser J.**, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.

**Vangalapati M., Sree Satya N, Surya Prakash D. V., Avanigadda S.**, 2012. Pharmacological Activities and Clinical effects of Cinnamon Species. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3: 653-663

**Vermerris W.**, 2006. Phenolic compound biochemistry, *Springer*, 276 p.  
**Vetvicka V. and Vetvickova J.**, 2016. Strong Anti-Inflammatory Effects of Curcumin. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 3 (2): 1-8

**Vican P., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. *Larousse (Ed). Paris*, p 355.

**Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., GarciaParilla M.C., 2007.** Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.

**Viuda-Martos M., Ruíz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A., 2007.** Chemical Composition of the Essential Oils Obtained From Some Spices Widely Widely Used in Mediterranean Region. *Acta. Chim. Slov*, 54: 921-926

**Wang J., Yue Y.D., Tang F. and Sun J., 2012,;** TLC Screening for Antioxidant Activity of Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification of Antioxidant Flavone Glycosides from Leaves of *Bambusa. textilis McClure molecules*, 17: 12297-12311

**Wendakoon C. N. and Sakaguchi M., 1995.** Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of Enterobacter aerogenes by Active Components in Spices. *Journal of Food Protection*, 58 (3):280-283.

**West C.E., Castenmiller J.J.J.M., 1998.** Quantification of the "SLAMENGHI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 68, 371-377.

**Williams C. A., Grayer R. J., 2004,** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 539-573.

**Wink M., 2015** Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Biochemistry of plant secondary metabolism*, 40: 1-19.

**Xu G., YE X., Chen J., and Liu D., 2007.** Effect of Heat Treatment on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract, *J. Agric. Food Chem.*, 55:330-335.

**Yano Y., Satomi M., Oikawa H., 2006.** The antimicrobial effects of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J Food Microbiology*, 111: 6-11.

**Yao L. H., Jiang Y. M., SHI J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R. et Chen S. S., 2004.** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59: 113-122.

**Yordi E. G., Pérez E. M., Matos M. J. and Villares E. U., 2012.** Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. *Nutrition, Well-Being and Health*, pp: 2-48.

**Yoshimura Y., Iijima T., Watanabe T., Nakazawa H., 1997.** Antioxidative effect of Maillard Reaction products using glucose-glycine model system. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4106-4109.

**Zengin H., and Baysal A. H., 2014.** Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*, 19: 17773-17798.

**Zenk M. H. et Juenger M., 2007.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68: 2757-2772

**Zheljazkov V. D., Astatkie T. and Schlegel V., 2014.** Hydrodistillation Extraction Time Effect on Essential Oil Yield, Composition, and Bioactivity of Coriander Oil. *Journal of Oleo Science* 63, (9) 857-865.

**Zhiri A., 2006.** Aromathérapie. *Nutranews*, pp: 2-16.

**Zhou F., Ji B., Zhang H. Jiang H., Yang Z., Li J., Li J., Yan W., 2007.** The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the food-borne pathogen *Salmonella typhimurium*. *J. Food Saf.*, 27: 124-133.

**Zoric Z., Uzelac D. V., Pedisi S., Kurtanjek Z. and GarofuliC I.E.,** 2014. Kinetics of the Degradation of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols During Heat Treatments of Freeze-Dried Sour Cherry Marasca Paste. *Food Technol. Biotechnol.*, 52 (1) :101–108.

**Zuzarte M. and Salgueiro L.,** 2015 Bioactive Essential Oils and Cancer. *Springer International Publishing Switzerland*, 292p.

# RÉSUMÉS

## Biological activities of the constituent spice mixture "Ras el Hanout" used by the inhabitants of Ouargla

### Abstract

This work focuses on the study of biological activities of the constituent mixture of spices "Ras el Hanout" used by the habitants of Ouargla. This mixture is well known and widely used in the study area. Two mixtures "Ras el Hanout" Constituted by coriander, Caraway, cumin, fennel, green anise, black pepper, ginger, turmeric, cinnamon and nutmeg, at different proportions are studied. Phytochemical screening of spices by TLC revealed the presence of flavonoids, Coumarins, tannins and terpenoids in all our spices. While the saponins, sterols, steroids and alkaloids are distributed differently among the different spices. The colorimetric assays have revealed the richness of turmeric in polyphenols and flavonoids, which the respective contents are  $98.8 \pm 5.29$  mgEAG/gDE and  $48.62 \pm 1.07$  mg EQ/gDS. While the contents of coriander in these metabolites do not exceed  $5.72 \pm 0.51$  mgEAG/gDS and  $0.77 \pm 0.19$  mg EQ/gDS respectively. Cinnamon is the spice the most provided with hydrolyzable tannins and condensed tannins. Their contents are  $8.44 \pm 1.6$  mg EAG/ES and  $2.44 \pm 0.8$  mgEC/DS. The essential oils extracted from the spices studied were found to comply with the standards established by AFNOR (1998 et 2000). Both DPPH · and FRAP tests are revealed the strong antioxidant activity of the extracts of cinnamon and nutmeg, Their  $EC_{50}$  according to the DPPH test are  $0.05 \pm 0.0$  and  $0.16 \pm 0.02$  mg/ml. Coriander has the lowest antioxidant activity according to the DPPH test, Its  $EC_{50}$  is  $3.87 \pm 0.15$  mg/ml. Ginger was also found to be weakly active but by the FRAP test. The essential oils of the majority of spices respond differently than the crude extracts to the DPPH test which reveals the strong antioxidant activity of the essential oil of black pepper, their  $EC_{50}$  is  $0.12 \pm 0.01$  mg/ml And the low activity of green anise, fennel and cinnamon, the respective  $EC_{50}$  are  $12 \pm 0.1$ ,  $13.08 \pm 1.2$  et  $13.5 \pm 0.36$  mg/ml. The antimicrobial activity of cumin, cinnamon, black pepper and caraway is ensured by their extracts as well as EOs. The diameters of the inhibition zones of the tested strains reach  $40 \pm 3.65$  and  $50 \pm 3.0$  mm. In the presence of the crude extracts and the EOs of these spices. The extracts from other spices, such as ginger and turmeric, show better inhibitory activity than EOs. Indeed, in the presence of these extracts, the diameters of the zones of inhibition are  $25 \pm 1.99$  and  $35 \pm 1.5$  mm for *E. coli*,  $20 \pm 1.2$  and  $30 \pm 1.25$  for *P. aeruginosa*,  $24 \pm 0.5$  and  $33 \pm 2.56$  mm for *S. aureus*,  $38 \pm 1.29$  and  $40 \pm 1.25$  mm for *C. albicans*. In contrast, EO of coriander is more effective than its crude extract, it has indeed led to the formation of halos around *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*, with which diameters are between  $28 \pm 0.36$  and  $36 \pm 1.5$  mm. The anti-inflammatory activity evaluated by the efficacy of the extracts in the protection of the erythrocytes was strong for the extract of the turmeric and low for the extract of the fennel. Their percentages of inhibition of hemolysis are  $82.88 \pm 6.45$  and  $18.78 \pm 0.25\%$  respectively. The contents of the mixture 2 of "Ras el hanout" on polyphenols, flavonoids, condensed tannins and hydrolyzable tannins and its antioxidant, antimicrobial and antiinflammatory activities are greater than those of the mixture 1. The heat treatment of the extracts at  $200^{\circ}\text{C}$  affect the contents of the extracts in metabolites and their biological activities differently. We are observed the thermo-stable, the thermo-labile situations and sometimes an increase in the parameters described. The results obtained show that in order to preserve the phenolic compounds and to reduce the content of tannins, described as anti-nutrients, the mixture "Ras el hanout" must be added at the end of cooking of the foods for a period not exceeding 30 min. The dosage of metabolites and evaluation of the activities of the binary and equimolar mixtures, Reveal synergistic effects, antagonism and indifference. Synergistic effects are found in 17, 35, 4 and 21 mixtures for polyphenols, flavonoids, hydrolyzable tannins and condensed tannins respectively, whereas, for these same metabolites, antagonistic effects are observed in 28, 5, 39 and 18 mixtures. Among the elaborated mixtures, synergistic effects of the antioxidant activity are noted in 22 Mixtures and antagonistic effects in 17 mixtures. For anti *E. coli*, anti *P. aeruginosa*, anti *S. aureus* and anti *C. albicans* activities, synergy is noted in 19, 26, 26 and 14 mixtures, While antagonism is revealed in 11, 12, 2 and 10 mixtures respectively. These different effects suggest that the contents of a mixture of spices in metabolites and its biological activities is the result of a balance between the synergies and the antagonisms produced.

### Keywords

Ras el hanout, secondary metabolites, biological activities, heat treatment, synergy, essential oils.



## النشاطات البيولوجية للتوابل المكونة للخليط "راس الحانوت" المستعمل لدى سكان ورقلة

### الملخص

يتركز هذا العمل على دراسة النشاطات البيولوجية للتوابل المكونة للخليط "راس الحانوت" المستعمل لدى سكان ورقلة. هذا الخليط جد معروف وواسع الاستعمال لدى سكان المنطقة. تمت دراسة خليطين مختلفين كمياً من "راس الحانوت" والمكونان نوعياً من: الكسير، البسباس، اليانسون، الفلفل الأسود، الزنجبيل، الكركم، القرفة وجوزة الطيب. أثبت التحليل الكيميائي النباتي باستعمال CCM وجود الفلافونيدات، الكومارينات، العفصيات والترينويدات في كل التوابل أما وجود الصابونين، الستيرول، الستيريديات والألكلويدات فيختلف من تابل إلى آخر. أثبت القياس الكمي أن الكركم هو الأكثر غنا بمتعددات الفينول والفلافونويدات بتركيز تقدر على التوالي ب  $5.19 \pm 98.8$  و  $1.07 \pm 48.62$  مغ/مل. أما الكسير فمحتواه لا يتعدى  $0.51 \pm 5.72$  و  $0.19 \pm 0.77$  مغ/مل. بالنسبة للعفصيات بنوعيتها المكثفة والقابلة للتميه فهي أكثر تواجدا في القرفة وذلك بتركيز تقدر ب  $1.16 \pm 8.44$  و  $0.8 \pm 2.44$  مغ/مل. الزيوت الأساسية المستخلصة تتوافق مع المعايير المرسومة من طرف AFNOR. النشاط المضاد للأكسدة للقرفة وجوزة الطيب هو الأقوى من خلال اختباري DPPH و FRAP حيث سجلا من خلال اختبار DPPH قيما للتراكيز  $EC_{50}$  تقدر ب  $0.15 \pm 3.87$  مغ/مل. أما اختبار FRAP فقد أثبت أن الزنجبيل هو الأقل نشاطاً ضد الأكسدة. أثبت اختبار DPPH اختلاف النشاط المضاد للأكسدة للزيوت الأساسية للتوابل عن نشاط مستخلصاتها الخام. حيث يعد زيت الفلفل الأسود هو الأقوى ضد الأكسدة، تركيزه  $EC_{50}$  يقدر ب  $0.01 \pm 0.12$  مغ/مل. أما نشاط الزيوت الأساسية لليانسون، البسباس والقرفة فهو الأضعف، تراكيزها  $EC_{50}$  هي  $0.1 \pm 12$ ،  $1.2 \pm 13.08$  و  $0.36 \pm 13.5$  مغ/مل على التوالي. تتميز كلا من المستخلصات الخام والزيوت الأساسية للكمون القرفة الفلفل الأسود والكروية بنشاط ضد الميكروبات. أقطار مناطق التثبيط للميكروبات تصل إلى  $3.65 \pm 40$  و  $3.0 \pm 50$  ملم. أما بالنسبة للزنجبيل و الكركم، فيعد نشاط مستخلصاتها الخام أقوى من نشاط زيوتها الأساسية ضد الميكروبات، حيث تقدر مناطق تثبيطها ب  $1.44 \pm 25$  و  $1.5 \pm 35$  ملم ضد *E. coli*،  $1.2 \pm 20$  و  $1.25 \pm 30$  ملم ضد *P. aeruginosa*،  $0.5 \pm 24$  و  $2.56 \pm 33$  ملم ضد *S. aureus* و  $1.29 \pm 38$  و  $1.25 \pm 40$  ملم ضد *C. albicans*. أما الكسير، فنشاط زيوتها الأساسية هو الأكثر فعالية من مستخلصها الخام. حيث تتراوح مناطق التثبيط بالنسبة للزيوت الأساسية بين  $0.36 \pm 28$  و  $1.5 \pm 36$  ملم. أثبت النشاط المضاد للالتهاب قوة الكركم وضعف البسباس وذلك باستعمال اختبار حماية الكريات الحمراء. حيث تقدر نسب تثبيط انحلال الدم ب  $6.45 \pm 82.88$  و  $0.25 \pm 18.78$  % على التوالي. تعد تراكيز متعددة الفينول والفلافونويدات والعفصيات بنوعيتها وكذا النشاطات البيولوجية أقوى عند خليط "راس الحانوت" 2. تتأثر المركبات الأيضية الثانوية والنشاطات البيولوجية للمستخلصات الخام بالعلاج الحراري سلبياً أو إيجابياً أو تبقى ثابتة. كما أثبتت النتائج أن المدة المثلى لطهو "راس الحانوت" هي 30 دقيقة. هذه المدة تسمح بالحفاظ على المركبات الفينولية كما أنها تنقص من العفصيات ذات التأثير السلبى على التغذية. القياس الكمي للأيضيات الثانوية وتقييم النشاطات البيولوجية للخلائط الثنائية والمتجانسة التراكيز و المقدرة ب 45 خليط وجود تأثيرات التآزر في 17، 35، 4 و 21 خليط وذلك في متعددة الفينول والفلافونويدات والعفصيات المكثفة والقابلة للتميه على التوالي، أما التأثيرات المعادية لهذه الأيضيات فقدرت في 28، 5، 39 و 18 خليط. أما تأثيري التآزر والتعادي فوجد في 22 و 17 خليط بالنسبة للنشاط المضاد للأكسدة. أدرك النشاط المضاد ل *E. coli*، *P. aeruginosa*، *S. aureus* و *C. albicans* وجود التآزر في 19، 26، 26 و 14 خليط، أما التعادي فوجد في 11، 21، 2 و 10 خليط. هذه التأثيرات تسمح بالقول أن تراكيز المركبات الأيضية الثانوية و النشاطات البيولوجية لخليط ما من التوابل هو ناتج التوازن بين تأثيرات التآزر و التعادي المنتجة.

### الكلمات الدالة

"راس الحانوت"، المركبات الأيضية الثانوية، النشاطات البيولوجية، العلاج الحراري، التآزر، الزيوت الأساسية.

