

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Mémoire

En vue d'obtention du diplôme de

Magister en BIOLOGIE

Spécialité : Biologie

Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

Thème

Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*).

Présenté par : M^{me} HELLAL ZOHRA

Devant le jury:

MESBAHI MAHMOUD	Maître de conférences A à l'UMMTO	Président
DJENANE DJAMAL	Maître de conférences A à l'UMMTO	Rapporteur
RIBA AMAR	Maître de conférences A à l'UMBB	Examineur
AMROUCHE TAHAR	Maître de conférences B à l'UMMTO	Examineur
OUELHADJ AKLI	Maître de conférences B à l'UMMTO	Examineur

ANNÉE UNIVERSITAIRE :2010-2011

Remerciements

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont particulièrement à :

-Mr Djenane Djamal Maître de conférences à la faculté des Sciences Agro-biologie de l'Université de Tizi-Ouzou d'avoir bien voulu diriger ce travail et pour tous ses conseils fructueux et ses encouragements. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et déférence.

-Mr Mesbahi Mahmoud, Maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour l'honneur qu'il nous a fait pour assurer la présidence du jury.

-Mr Riba Amar, Maître de conférences à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes d'avoir bien voulu accepté de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.

-Mr Amrouche Tahar, Maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir bien voulu juger ce travail.

-Mr Ouelhadj Akli, Maître de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour participer au jury et d'évaluer ce travail.

- A toute l'équipe de Microbiologie du laboratoire pédagogique Hasnaoua (Djamila, Nadia, Malika, Hamid, et Nadia du labo de chimie), de m'avoir soutenu et encouragé tout le long de mon travail.

- Un très grand merci à mes parents pour leurs innombrables sacrifices, à mes frères et sœurs, à mon fils Samy que j'adore pour tout ce qui m'apporte.

Abstract

The natural extracts resulting from plants contain a variety of phenolic compounds and essential oils, to which are allotted antibacterial and antioxidant activities.

The essential oils extracted by hydrodistillation starting from the Citrus fruits peel had presented poor yields going from 0.5% to 0.7%.

The chemical composition of these essential oils is determined by gas chromatography coupled with the mass spectrometry (GC-MS). The results of this analysis showed that studied oils are made up mainly of limonene (77.37%) for the oil extracted from *C. sinensis*; and linalyl acetate (37.28%), linalool (23.36%), citral (10.45%) for *C. aurantium*; finally limonene (51.39%), β -pinene (17.04%), γ -terpinene (13.46%) and α -pinene (3.37%) for *C. limonum*. The antibacterial activity of the oils extracted from *C. limonum* and *C. aurantium* was studied; this last, had been shown sensible for *S. aureus*; where inhibition diameters of 38 mm and 24 mm were measured for the two oils respectively. While *Ps. aeruginosa*, *S. Enteritidis* and *E. coli* have exhibited a resistance towards these oils.

The study of the inhibiting activity “in vitro” showed that the oil extracted from *C. sinensis* is by far the most effective, followed by the oil of *C. limonum* with MIC of 4% and finally *C. aurantium* with 2%. At the end of our study, we have evaluated the antibacterial and antioxidant activities of the oils studied on foodborne “*sardina pilchardus*”.

For the antibacterial activity, the values of MIC x1 and MIC x 4 had been applied, as well as a follow up of bacterial growth kinetic during 7 days of conservation at $6 \pm 1^\circ\text{C}$. The results obtained revealed that the MIC x 4 of the oil of *C. aurantium* reduced completely the growth of *S. aureus* in the less than 24 h of incubation.

Concerning the antioxidant activity, it has been tested with concentrations going from 500 to 3000 ppm during 7 days of conservation at $6 \pm 1^\circ\text{C}$. The results showed that, without ambiguity, the oil of *C. aurantium* compared to oil of *C. limonum* reduce significantly the oxidation sardina's lipids.

These data given show that essential oils would constitute an alternative solution to the synthetic conservatives in the agro alimentary field.

Key words:

Essential oils, citrus, *sardina pilchardis*, GC-MS, antibacterial activity, antioxidant activity, the MIC.

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques ainsi que des huiles essentielles (H.Es) auxquels on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes.

Les H.Es extraites par hydrodistillation à partir des zestes d'agrumes de *C. limonum*, *C. sinensis* et *C. aurantium* ont présenté un faible rendement allant de 0,5 à 0,7%.

La composition chimique de ces H.Es est déterminée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Les résultats de l'analyse ont montré que les huiles étudiées sont constituées principalement de limonène (77,37%) pour l'H.E de *C. sinensis*; d'acétate de linalyle (37,28%), de linalol (23,36%) et de citral (10,45%) pour l'H.E de *C. aurantium* ; et que l'H.E de *C. limonum* est composée du limonène (51,39%), β -pinène (17,04%), γ -terpinène (13,46%) et α -pinène (3,07%).

L'activité antibactérienne des huiles de *C. limonum* et de *C. aurantium* a été étudiée sur *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis et, *Escherichia coli*. *S. aureus* est le seul germe à présenter une sensibilité aux huiles de *C. limonum* et *C. aurantium* avec des diamètres d'inhibition de 38 mm et 24 mm respectivement.

L'étude de l'activité inhibitrice « *in vitro* », a montré, que les H.Es de *C. limonum* et de *C. aurantium* ont présenté des CMI de l'ordre de 4% et de 2%.

Au terme de notre étude nous avons évalué les activités antibactérienne et antioxydante des H.Es de *C. limonum* et de *C. aurantium* sur une matrice alimentaire (Sardine: *Sardina pilchardus*). Pour l'activité antibactérienne contre *S. aureus* des valeurs de CMI x 1 et CMI x 4 ont été appliquées ainsi qu'un suivi de la cinétique de la croissance bactérienne pendant 7 jours de conservation à $6 \pm 1^\circ\text{C}$. Les résultats obtenus ont révélé que la CMI x 4 de l'H.E de *C. aurantium* a réduit complètement la croissance de *S. aureus* en moins de 24 heures d'incubation.

Concernant l'activité antioxydante, elle a été testée à des concentrations d'H.Es allant de 500 ppm à 3000 ppm. Les résultats ont montré que sans équivoque, l'H.E de *C. aurantium* comparativement à l'H.E de *C. limonum* a réduit de manière significative l'oxydation des lipides de la sardine.

Ces données montrent que les H.Es constitueraient une solution alternative aux conservateurs synthétiques dans le domaine agro alimentaire.

Mots clés: H.Es de *Citrus*, CG-SM, activité antibactérienne, activité antioxydante, CMI, *Sardina pilchardus*.

Sommaire

Sommaire

	Pages
Introduction.....	1
 Première partie: Etude bibliographique	
CHAPITRE I: Les Huiles essentielles	
1. Historique.....	3
2. Définition.....	4
3. Localisation et lieu de synthèse.....	4
4. Propriétés physiques	4
5. Rôle physiologique	5
6. Composition chimique.....	5
6.1. Les terpènes.....	5
6.2. Les composés aromatiques.....	6
6.3. Les composés d'origine diverses.....	6
6.4. Notion de chemotype.....	6
7. Facteurs influençant la composition chimique.....	8
8. Méthodes d'extraction.....	8
8.1. Distillation.....	8
8.2. Extraction à froid.....	10
8.3. Extraction assistée par micro ondes.....	10
8.4. Extraction par les solvants et les graisses.....	11
8.5. Extraction par fluide supercritique.....	11
9. Toxicité des H.Es.....	12
10. Méthodes de caractérisation chimique des H.Es.....	12
10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	12
10.2. La spectrométrie de masse (SM).....	13
10.3. Couplage CPG/SM.....	14
11. Activités biologiques.....	14
11.1. Activité antimicrobienne.....	14
11.1.1. Activité liée à la composition chimique.....	15
11.1.2. Mécanismes d'action antibactérienne.....	16
11.1.3 Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne.....	16
11.1.4. Détermination de l'effet bactériostatique et bactéricide.....	17
11.1.5. Facteurs influençant l'activité antibactérienne.....	17
11.2. Activité antioxydante.....	18
11.2.1. Définition.....	18
11.2.2. Mécanisme d'action.....	18
11.2.3. Différents types d'antioxydant.....	19
11.2.4. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	20
12. Application des H.Es dans les produits alimentaires.....	23

CHAPITRE II : Agrumes

1. Définition.....	24
2. Classification.....	24
3. Description de quelques espèces de <i>Citrus</i>	25
3.1. <i>Citrus limonum</i> (citron).....	25
3.2. <i>Citrus aurantium</i> (orange amère : bigarade).....	25
3.3. <i>Citrus sinensis</i> (orange douce Var : Thompson).....	26
4. Domaines d'application.....	27
5. Production mondiale.....	27

CHAPITRE III : Sardine commune (*Sardina pilchardus*)

1. Généralités.....	28
2. Principaux composants.....	28
3. Flore bactérienne.....	29
3.1. Flore pathogène.....	29
3.2. Flore d'altération.....	35
3.3. Intoxication à la scombrottoxine.....	35
4. Altération de la sardine.....	36
4.1. Lipolyse.....	36
4.2. Oxydation lipidique.....	37

Deuxième partie : Etude expérimentale

1. Matériel.....	39
1.1. Matériel végétal.....	39
1.2. Microorganismes utilisés.....	39
1.3. Milieux de culture.....	39
1.4. Sardine.....	40
2. Méthodes.....	40
2.1. Procédés d'extraction.....	40
2.1.1. Calcul de rendement.....	40
2.1.2. Caractéristiques des H.Es.....	41
2.1.2.1. Indices physico-chimiques.....	41
2.1.2.2. Analyse de la composition chimique.....	41
2.2. Tests microbiologiques.....	42
2.2.1. Tests de confirmation de souches bactériennes.....	42
2.2.2. Tests biochimiques.....	43
2.3. Conservation des souches.....	44
2.4. Préparation de l'inoculum.....	44
2.5. Etude de l'activité antibactérienne.....	45
2.5.1. Test « <i>in vitro</i> ».....	45
2.5.1.1. Protocole expérimental.....	45
2.5.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	46
2.5.2. Effet inhibiteur des HEs de <i>Citrus</i> sur les bactéries pathogènes inoculées sur la sardine.....	48

2.5.2.1. Protocole expérimentale.....	48
2.5.2.2. Analyse microbiologique.....	48
2.6. Evaluation de l'activité antioxydante des HEs.....	50
2.6.1. Méthode sr-TBA.....	50
2.6.2. Courbe d'étalonnage.....	52
2.7. Analyse statistique.....	52

Résultats et discussion

1. Huiles essentielles.....	53
1.1. Rendement.....	53
1.2. Caractéristiques physicochimiques.....	54
1.2.1. Densité.....	54
1.2.2. Indice de réfraction.....	55
2. Analyse de la composition chimique.....	55
3. Activité antibactérienne <i>in vitro</i>	60
3.1. Test de l'aromatogramme.....	60
3.1.1. Essai avec de HE de <i>C. limonum</i>	61
3.1.2. Essai avec de HE de <i>C. aurantium</i>	62
3.1.3. Essai avec de HE de <i>C. sinensis</i>	63
3.2. Concentration minimale inhibitrice.....	67
3.3. Activité antibactérienne des HEs de <i>C. limonum</i> et de <i>.aurantium</i> appliquées sur la sardine.....	69
4. Activité antioxydante des HEs de <i>C. limonum</i> et de <i>C. aurantium</i>	74
Conclusion et perspectives.....	78

Références bibliographiques

Annexes

Tableau I: Caractères morphologiques étudiés pour identifier les bactéries.....	43
Tableau II: Caractères biochimiques recherchés.....	44
Tableau III: Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.....	47
Tableau IV: Détermination des différentes concentrations du TEP.....	52
Tableau V: Rendements en H.Es de <i>Citrus</i> (moyenne \pmécart type).....	53
Tableau VI: Valeurs de densités de trois H.Es étudiées (moyenne \pmécart type)...	55
Tableau VII: Valeurs des indices de réfraction à 20°C (moyenne \pmécart type) des H.Es de <i>Citrus</i>.....	55
Tableau VIII: Principaux composés chimiques (%) de l'H.E de <i>C. sinensis</i> Analysée par la CG/SM.....	56
Tableau IX: Principaux composés chimiques (%) de l'H.E de <i>C. aurantium</i> Analysée par la CG/SM.....	57
Tableau X: Principaux composés chimiques (%) de l'H.E de <i>C. limonum</i> Analysée par la CG/SM.....	58
Tableau XI: Halos d'inhibition en (mm) (moyenne \pmécart type) provoquée par l'H.E de <i>C. limonum</i>.....	61
Tableau XII: Halos d'inhibition en (mm) (moyenne \pmécart type) provoquée par l'H.E de <i>C. aurantium</i>.....	62
Tableau XIII: Halos d'inhibition en (mm) (moyenne \pmécart type) provoquée par l'H.E de <i>C. sinensis</i>.....	63
Tableau XIV: Diamètres des zones d'inhibition (mm) (moyenne \pmécart type) des trois H.Es.....	63
Tableau XV: Valeurs des CMI des H.Es testées sur <i>S. aureus</i> en (μl/ml).....	67
Tableau XVI: Effet du pourcentage d'inhibition de deux H.Es sur la formation du MDA.....	76

Liste des figures	Pages
Figure 1: Structures chimiques des composés prépondérants des H.Es.....	7
Figure 2: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.....	9
Figure 3: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur.....	10
Figure 4: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique.....	11
Figure 5: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	13
Figure 6: Formation du complexe chromogène par réaction de TBA et MDA.....	22
Figure 7: Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique.....	36
Figure 8: Schéma général de l'oxydation des lipides.....	38
Figure 9: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.....	45
Figure10 : Schéma du test de l'activité antibactérienne des H.Es de <i>C. limonum</i> et de <i>C. aurantium</i> sur la Sardine inoculées avec <i>S. aureus</i>	49
Figure 11: Schéma de procédure de la mise en œuvre du test de rs-TBA.....	51
Figure 12: Courbe d'étalonnage du MDA.....	52
Figure 13: Pourcentage en H.Es obtenus pour <i>C. limonum</i> , <i>C. sinensis</i> et <i>C. aurantium</i> par la technique d'hydrodistillation.....	53
Figure 14: Représente le profil chromatographique de l'H.E de <i>C. sinensis</i>	56
Figure 15: Représente le profil chromatographique de l'H.E de <i>C. aurantium</i>	57
Figure 16: Représente le profil chromatographique de l'H.E de <i>C. limonum</i>	58
Figure 17: Photos des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose.....	61
Figure 18: Photos montrant l'effet de l'H.E de <i>C. limonum</i> sur <i>E. coli</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> et <i>S. Enteritidis</i>	61
Figure 19: Photos montrant l'effet de l'H.E de <i>C. aurantium</i> sur <i>E. coli</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> et <i>S. Enteritidis</i>	62
Figure 20: Photos montrant l'effet de l'H.E de <i>C. sinensis</i> sur <i>E. coli</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> et <i>S. Enteritidis</i>	63
Figure 21: Effet inhibiteur de L'H.E de <i>C. limonum</i> à différentes concentrations vis-à-vis de <i>S. aureus</i> inoculé sur la sardine pendant le stockage à 6±1°C.....	70
Figure22: Effet inhibiteur de l'H.E de <i>C. aurantium</i> à différentes concentrations vis-à-vis de <i>S. aureus</i> inoculé sur la sardine pendant le stockage à 6±1°C.....	70
Figure 23 : Effet antioxydant de l'HE de <i>C. aurantium</i> sur la formation du MDA à Différentes concentrations appliquées sur la sardine pendant le stockage à 6±1°C....	75
Figure 24: Effet antioxydant l'HE de <i>C. limonum</i> sur la formation du MDA à Différentes concentrations appliquées sur la sardine pendant le stockage à 6±1°C.....	75

Liste des abréviations

ABTS: Acide 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-sulphonique)

AGPI: Acides gras polyinsaturés

AG: Acides Gras

ANP: Azote non protéique

BHA: Butyl-hydroxyanisole

BHT: Butyl-hydroxytoluène

CRD : Centre de recherche développement

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

DG: Diglycérides

DMSO: Dimethylsulfoxyde

DPPH: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FDA : Food Drug Administration

FID: Flamme Ionisation Detector

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

GRAS: Generally recognised as safe (Généralement considéré sain)

H.Es : Huiles essentielles

IC: Ionisation chimique

IE: Ionisation électronique

IP: Indice de Peroxydes

MDA: Malondialdéhyde

MAP: Modified Atmospheres Packaging (Conditionnement et emballage sous atmosphères modifiées)

MG: Monoglycérides

MH: Mueller Hinton

mM : millimole

PG: Gallate de propyle

RH: Acide gras libre

ROOH: Hydroperoxyde

ROH: radical alcooxyle

ROS ou **RLO:** Radicaux libres oxygénés

RPE: Résonance paramagnétique électronique

TBA: Acide thiobarbiturique

TBA-rs: Thiobarbituric acid reactive species (les espèces réactives avec le TBA)

TBHQ: Tertio butyl-hydroxyquinone

TCA: Acide trichloroacétique

TEAC: Activité Antioxydante Équivalente de Trolox

TIA: Toxi-infection alimentaire

TR: Temps de rétention

Introduction

Les produits de la mer sont des denrées très vulnérables à l'action d'oxydation lipidique et à l'altération autolytique (enzymatique et microbienne).

La microflore responsable de la dégradation du poisson frais change avec les variations de température de conservation. Ainsi aux basses températures (0-5°C), on retrouve les espèces telles que : *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas spp*, *Pseudomonas spp* etc., et aux températures élevées (15-30°C), ce sont les Entérobactéries, Vibrionaceae et, les bactéries à Gram positif. Parfois même avec des risques de développement de toxines de *Clostridium botulinum* ou formation d'histamines.

On doit noter que la rapidité de la prolifération bactérienne est favorisée par les mauvaises manutentions infligées au poisson notamment par le non respect des bonnes pratiques d'hygiène (hygiène du personnel, conditions de manipulations des poissons lors de l'éviscération, de la qualité microbiologique des eaux de lavage, et de la glace utilisée et le non respect des températures de conservation au cours du stockage et du transport).

De part sa richesse en acides gras polyinsaturés, le poisson est sensible aux réactions d'oxydation lipidique. Ces dernières sont accélérées par plusieurs paramètres comme la présence de radicaux libres oxygénés (RLO), la température élevée, la lumière solaire et les métaux de transition. Ces réactions d'oxydation conduisent à des produits de dégradation qui sont responsables des modifications de goût, d'odeur et de couleur au cours du processus de fabrication et de stockage.

Afin de limiter ces altérations, on a recours à la conservation par le froid ou à l'utilisation de divers conservateurs de synthèse tels que: BHA (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), BHT (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) et le PG (gallate de propyle). L'usage extensif d'agents antioxydants et d'agents antimicrobiens dans les produits alimentaires et dans la médication humaine et animale conduit à la sélection des souches bactériennes multi résistantes, et ils sont suspectés d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur.

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits « naturels » sans conservateurs a conduit l'industrie alimentaire à envisager l'incorporation de substances considérées «non chimiques».

Ainsi, de nombreux composés phytochimiques y compris les H.Es commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoire et anticancéreux.

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs principaux se résument dans les volets suivants :

- Valoriser les sous produits d'agrumes par extraction des huiles essentielles à partir des zestes de trois espèces de *Citrus* : *C. limonum* (citron), *C. sinensis* (orange douce) et *C. aurantium* (orange amère) ;

- Caractérisation de la composition chimique quantitativement et qualitativement des H.Es extraites par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) ;
- Des tests de sensibilité pour évaluer « *in vitro* » l'activité antibactérienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles extraites sur un ensemble de bactéries pathogènes qui sont à l'origine d'intoxication alimentaire comme (*Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* et, *Pseudomonas aeruginosa*) ;
- Evaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des H.Es efficaces contre les bactéries testées sur une matrice alimentaire d'origine animale (la sardine: *Sardina pichardus*).

Etude bibliographique

1. Historique

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation, à son hygiène et sa santé.

Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques.

Déjà, En Chine, l'Empereur Chen Nong (2800 av. J.-C.), médecin érudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao, qui recense plus de 1000 plantes médicinales utiles (LARDY & HABERKORN, 2007).

Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. L'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient déjà obtenus sous forme d'huile distillée

Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'Art de distillation.

C'est Gerber (721-815) qui mentionna le premier de façon écrite la description de la distillation.

L'alambic est incontestablement associé à Avicenne (930-1037), tout comme le GiovanniI- Baptista Della Porta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage « De destillatione » parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des Arabes dans le domaine de la distillation.

Hermann Boerhave (1668-1738) fut l'un des premiers à décrire les H.Es d'un point de vue chimique (LUCCHESI, 2005).

L'aromathérapie tomba ensuite dans l'oubli, toutefois il a fallu attendre le XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En 1928 René-Maurice Gatte Fossé chimiste Français publia un ouvrage « aromathérapie » décrivant la relation entre la structure biochimique de l'H.E et son activité antimicrobienne.

En 1929, Sevelinge un pharmacien en France, étudia les H.Es en médecine vétérinaire et confirma le potentiel antimicrobien élevé de ces substances aromatiques.

En 1975, Franchomme en France, aromatologue mis en évidence l'importance du chémotype (ou race chimique de l'espèce) (FOUCHE *et al.*, 2000).

L'ère industrielle a pris peu le pas sur un empirisme et développa ainsi de nouvelles techniques de distillation.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des H.Es dans différents domaines (ZHIRI, 2006).

2. Définition

Les H.Es sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les H.Es ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie BRUNETON, (1999).

3. Localisation et lieu de synthèse

Les H.Es n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèces qu'elles regroupent en particulier dans les familles : *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apeaceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*. (MOHAMMEDI, 2006).

La synthèse et l'accumulation des H.Es sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les *Labiaceae*, *Geraniaceae*, et *Rutaceae*, ils produisent les essences dites superficielles. Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant les cellules et les poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtaceae*, *Auranthiaceae*, ainsi que les canaux sécréteurs chez les *Ombelliferaceae* *Apiaceae* ou *Asteraceae*.

Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, *Eucalyptus*), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore, gingembre), sève (encens, myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graines (carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe (BRUNETON, 1999).

Quantitativement, les teneurs en H.Es sont extrêmement faibles. Pour produire 200g d'essence de Thym, il faut 100kg de plantes fraîches, et à titre d'exemple selon PADRINI & LUCHRONI, (2003), pour obtenir 1kg d'H.E il faut :

- ✓ 1 tonne de fleur d'oranger.
- ✓ 4 tonnes de pétales de Rose.
- ✓ 6 à 7 kg de boutons floraux de clous de Girofle.
- ✓ 100 kg de sommités fleuries de Lavande.
- ✓ 7 tonnes de Mélisse.
- ✓ 1tonne de Verveine.

4. Propriétés physiques

Les H.Es sont en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeur très forte, incolores, jaunes pâles ou quelques fois bleues. Leur densité est <1 sauf pour les H.Es de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et Sassafras (*Sassafras albidum*). Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants, les huiles et la vaseline; très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (CHARPENTIER *et al.*, 2008).

Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (TEUSHER *et al.*, 2005).

5. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les H.Es en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Selon BAKKALI (2008), les H.Es peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables.

6. Composition chimique

Sur le plan chimique, les H.Es sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène etc.) (CROTEAU *et al.*, 2000).

6.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpènes** formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), les **sesquiterpènes**, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), les **diterpènes**, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). Les **tétraterpènes** huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les **polyterpènes** (C_5H_8)_n ou n peut-être de 9 à 30 (HERNANDEZ-OCHOA, 2005).

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

Les **monoterpènes** sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.Es, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone, β -vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate α -terpinyle) (figure : 1).

Les **sesquiterpènes** il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol (BRUNETON, 1999 ; HERNANDEZ-OCHOA, 2005).

6.2. Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les H.Es d'*Apiaceae* (anis, fenouil, cannelle, basilic).

6.3. Les composés d'origine diverses

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléique et α -linoléique en (3-cis hexanol, decanal, β -ionone) (PIOCHON, 2008).

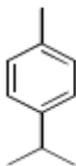
6.4. Notion de chémotype

Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer des H.Es extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les H.Es pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les H.Es à chemotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (PIBIRI, 2005).

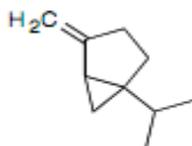
1. Terpenes

-Monoterpenes

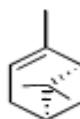
Carbure monocyclic
Cymene ("y") or p.cymene



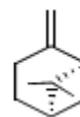
Sabinene



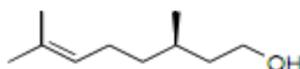
Carbure bicyclic
Alpha-pinene



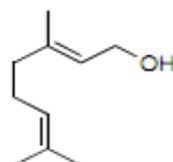
Betapinene



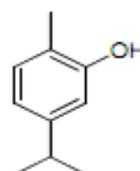
Alcohol acyclic
Citronellol



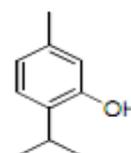
Geraniol



Phenol
Carvacrol

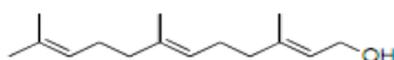


Thymol

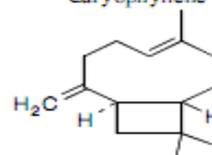


-Sesquiterpenes

Carbure
Farnesol

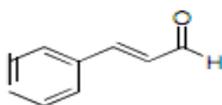


Alcohol
Caryophyllene

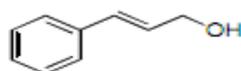


2. Aromatic compounds

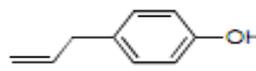
Aldehyde
Cinnamaldehyde



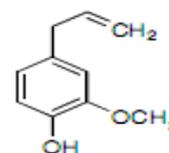
Alcohol
Cinnamyl alcohol



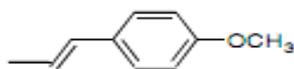
Phenol
Chavicol



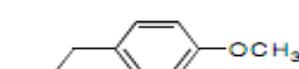
Phenol
Eugenol



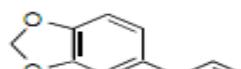
Methoxy derivative
Anethole



Methoxy derivative
Estragole

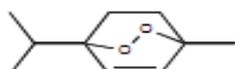


Methylene dioxy compound
Safrole



3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

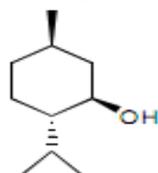


Figure 1: Structures chimiques des composants prépondérants des H.Es (BAKKALI *et al.*, 2008).

7. Facteurs influençant la composition chimique

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'H.E : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction ; sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les *citrus* ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée. Les fleurs de *Chrysanthemum caronarium* sont riches en H.E sous l'effet de fertilisants (BRUNETON, 1999).

8. Méthodes d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.Es, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

8.1. Distillation

Selon PIOCHON (2008), il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

- **Hydrodistillation**

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'H.E se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité. L'H.E étant plus légère que l'eau, elle surnage au dessus de l'hydrolysate (figure: 2). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (LUCCHESI, 2005).

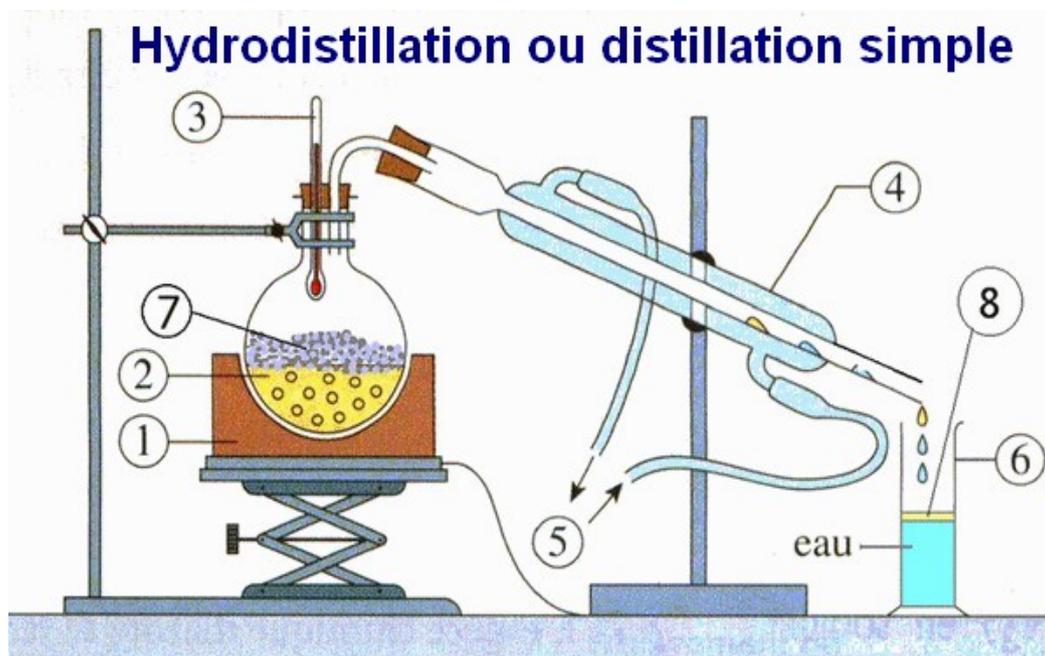
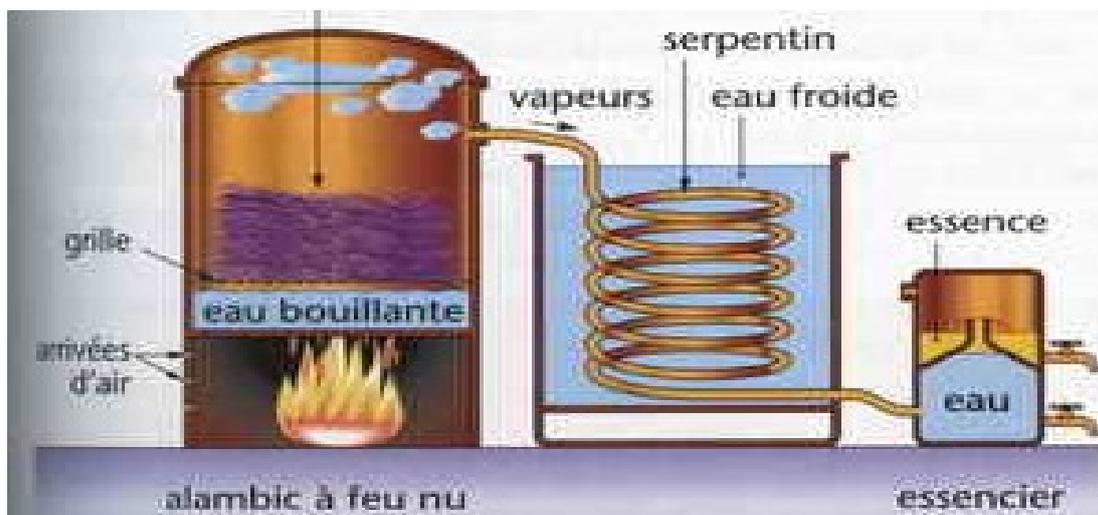


Figure 2: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005).

- | | |
|-------------------|----------------------------------|
| 1- Chauffe ballon | 5 - Entrée et sortie d'eau |
| 2- Ballon | 6 - Erlenmeyer |
| 3- Thermomètre | 7 - Matière à extraire l'essence |
| 4- Réfrigérant | 8 - La couche d'H.E |

- ***Distillation par entraînement à la vapeur d'eau***

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (figure: 3). La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.



Alambic pour Lavande.

Figure 3: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (LUCCHESI, 2005).

- **Hydrodiffusion**

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils.

8.2. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (ROUX, 2008).

8.3. Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (HEMWIMON *et al.*, 2007).

8.4. Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvants résiduels (HERNANDEZ-OCHOA, 2005).

8.5. Extraction par fluides supercritiques

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (figure: 4). En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit. Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars, $T^{\circ}= 31,1^{\circ}\text{C}$), le CO_2 possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (PIOCHON, 2008).

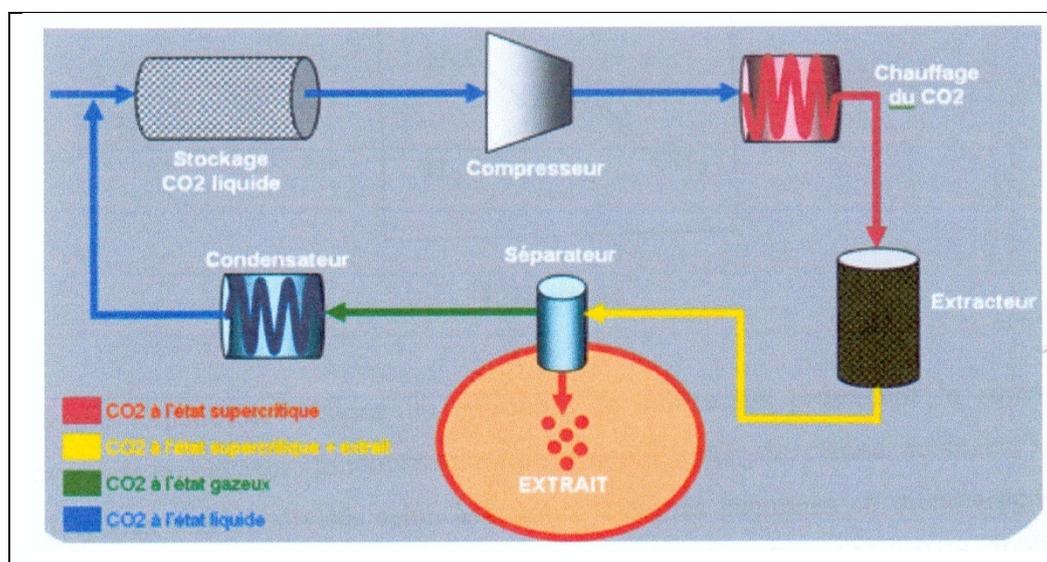


Figure 4: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO_2 supercritique (POURMORTAZAVI, 2007).

9. Toxicité des H.Es

Les H.Es ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Certaines H.Es sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de *citrus* contenant des furacoumarines), d'autres H.Es ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux). La toxicité des H.Es est assez mal connue. Il manque de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes et cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques H.Es dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène ou de propenylbenzène comme le saffrole, l'estragole, la β -ararone, et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs. Le saffrole et l'estragole, sont métabolisés au niveau du foie des rats en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines. Ces résultats sont controversés, car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le saffrole par exemple est métabolisé en dihydroxysaffrole et trihydroxysaffrole non cancérigène (GUBA, 2001).

10. Méthodes de caractérisation des H.Es

La détermination de la composition chimique des H.Es est une étape importante malgré le développement des méthodes de séparation et d'identification. Elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des H.Es.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans le four et un détecteur (figure: 5). Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en "*split*" ou injection avec "*division de flux*", il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur (hélium, azote, argon, ou hydrogène). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire (BOUCHONNET & LIBONG, 2002).

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique la colonne analytique. Cette colonne peut être de deux types : colonne remplie ou colonne capillaire. Dans le cas des H.Es, les colonnes capillaires semblent plus adaptées ; elles sont en métal, en verre ou plus souvent en silice fondue. Les substances de l'échantillon traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire (BESOMBES, 2008).

Le développement des phases stationnaires et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les H.Es. Ainsi, la CPG bidimensionnelles (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec les composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans la première colonne, puis les composés qui coéluent sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés (PAOLINI, 2005).

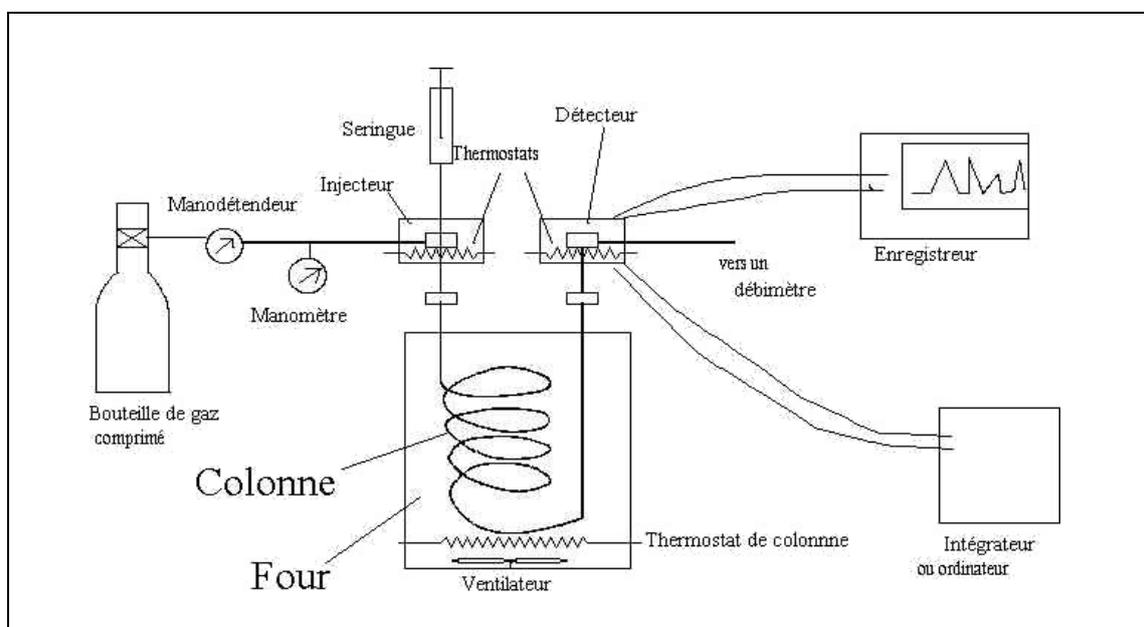


Figure 5: Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse (BESOMBES, 2008).

10.2. La spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse, où les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" (IE) ou à "ionisation chimique" (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (BOUCHENNET & LIBONG, 2002). Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Dans le

spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur ration « masse/Charge », à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (BESOMBES, 2008). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

10.3. Couplage CPG/SM

Le couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé. Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM – IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des H.Es (CAVALLI, 2002). Le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (BOUCHENNET & LIBONG, 2002).

11. Activités biologiques

11. 1. Activité antimicrobienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (DORANTES *et al.*, 2000 ; DJENANE *et al.*, 2002 et 2006 ; KUDA *et al.*, 2004, BOUSBIA, 2004). Les constituants des H.Es sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

✓ **Activité antibactérienne :** Les H.Es les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à H.Es riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (PAULI, 2001).

BELLETTI *et al.* (2004) et FISHER *et al.* (2007), ont démontré que les H.Es de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157:H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Thyphimurium*, et *Acrobacter butzleri*.

✓ **Activité antifongique** : Le pouvoir antifongique des H.Es des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (DE BILLERBECK *et al.*, 2002 ; KOKA *et al.*, 2004 ; OUSSOU *et al.*, 2004 ; OURAINI *et al.*, 2005) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (TEIXEIRA-DUARTE, 2005). Des travaux similaires ont été réalisés par MOMAMMEDI, (2006) sur l'H.E de *Cistus ladaniferus* contre sept moisissures : *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus* ; OMIDBEYGI *et al.* (2007) ont démontré que les H.Es de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus*. Les H.Es d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camaldulensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (JASET-DONGMO *et al.*, 2008).

PIACENTINI a noté pour la première fois les propriétés antimicrobiennes des H.Es de *Citrus* en 1949 in (FISHER & PHILLIPS, 2008) que les essences de *Citrus* en solution étaient plus puissantes que les phénols comme désinfectants.

Selon les travaux de PRUDENT *et al.* (1995) ; SHARMA-TRIPATHI, (2006) ; et VIUDA-MARTOS *et al.* (2008), les H.Es de *Citrus* : d'orange douce, de citron, de mandarine et, pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*.

Il a été établi d'après COX *et al.* (2000) que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

✓ **Activité antivirale** : Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des H.Es telles que les monoterpénols et les monoterpénols. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des H.Es ont montrées des améliorations importantes. L'effet antiviral de l'H.E de *Mentha piperita* a été étudié « *in vitro* » contre le virus de Herpes Simplex (HSV-1 et HSV-2), une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations entre 0,002% et 0,008% (SCHUHMACHER & REICHLING, 2003).

11.1.1. Activité liée à la composition chimique

L'efficacité d'une H.E dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l'H.E est riche en substances actives, plus son activité est importante. L'activité biologique d'une H.E est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques et cétoniques). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des H.Es et semblent agir en synergie avec les composés principaux (ZHIRI, 2006).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α - terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes (DORMAN & DEANS, 2000).

11.1.2. Mécanismes d'action antibactérienne

Les mécanismes par lesquels les H.Es exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des H.Es. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (DORMAN & DEANS, 2000).

BURT (2004a) a avancé que la caractéristique importante des H.Es est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules.

OUSSALAH *et al.* (2006), suggère que, l'action des H.Es sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des H.Es dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (CRISTIANI *et al.*, 2007).

11.1.3. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des H.Es. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des H.Es dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

- **Aromatogramme:** L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'H.E sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (GUERIN & CARRET, 1999).

- **Méthode de diffusion en puits :** Méthode proposée par COOPER & WOODMAN en 1946 et, reprise par SHROEDER et MESSING en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'H.E à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'H.E de concentration connue. L'H.E diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition

circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (EYMARD, 2003).

- **Méthode de dilution:** Les H.Es à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (ROBERT-DEMUET, 1995).

- **Méthode de micro-atmosphère:** Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boites de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'H.E qui est déposé au centre du couvercle de la boite de Pétri, renversée après fixation de l'H.E sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boite, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (PIBIRI, 2005)

11.1.4. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une H.E est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- S'il y a croissance bactérienne, l'H.E a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- S'il au contraire il y a absence de croissance bactérienne, l'H.E présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche.

La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (MANN & MARKHAM, 1998).

La CMB est la petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'H.E (HADDOUCHI *et al.*, 2009).

11.1.5. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des H.Es ou leurs composants actifs tels que : la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type des microorganismes ciblés (MALECKY, 2007).

Plusieurs études ont noté l'effet des matrices alimentaires sur la résistance microbienne aux H.Es, mais aucune ne semble avoir expliqué le mécanisme, bien que les suggestions aient été proposées quant aux causes possibles. La disponibilité de substances nutritives dans les produits alimentaires permet aux bactéries de réparer les cellules endommagées plus rapidement. Les propriétés intrinsèques de l'aliment (lipide/protéine/eau, le pH, le sel, la présence d'antioxydants, de conservateurs, d'autres additifs) ainsi que, les propriétés

extrinsèques (la température, l'emballage sous vide/gaz/air, les caractéristiques des microorganismes) peuvent influencer la sensibilité bactérienne (TASSOU *et al.*, 1995).

Généralement, la sensibilité des bactéries à l'action des H.Es semble augmenter avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage et de la concentration en oxygène dans le milieu. A pH bas l'hydrophobicité d'une H.E augmente, lui permettant de se dissoudre plus facilement dans les lipides membranaires de bactéries cibles (MEJLHOLM & DALGAARD, 2002). Par ailleurs, la présence de graisse et/ou les protéines dans les aliments réduit la disponibilité des molécules actives. L'H.E se dissout dans la phase lipidique de l'aliment, il y aura relativement moins d'H.E disponible pour agir sur les bactéries. Par contre, les glucides dans les produits alimentaires ne semblent pas protéger les bactéries de l'action des H.Es autant que les lipides et les protéines (BURT, 2004b).

11.2. Activité antioxydante

11.2.1. Définition

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini (POKNORY *et al.*, 2001).

11.2.2. Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (BERSET & CERVELIER, 1996).

11.2.3. Différents types d'antioxydants

• **Antioxydants de type I:** Il s'agit de substances capables d'interrompre la chaîne radicalaire en cédant un radical d'hydrogène (H°) à un radical libre lipidique présent.



AH : antioxydant et A° : radical de l'antioxydant.

Les radicaux A° qui se forment sont relativement stables et ne possèdent pas d'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides. Ils subissent une réaction d'arrêt aboutissant à la formation de produits non radicalaires (PINCEMAIL *et al.*, 1998).

• **Antioxydants de type II :** Les antioxydants de cette catégorie sont les composés qui agissent en empêchant ou en diminuant la formation de radicaux libres. Les plus utilisés sont des agents complexant les ions métalliques réduisant l'effet prooxydant des ions, c'est le cas des acides phosphorique, citrique et les ascorbates. Ils agissent en stabilisant la forme bivalente du métal dont l'action catalysante est plus faible que celle de la forme trivalent.

• **Antioxydants de type III :** Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante, en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière. L'emballage des produits permet ainsi de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière. La mise sous vide permet de limiter les réactions de l'oxydation et de prolonger la durée de vie des produits. L'emballage peut également être réalisé sous atmosphère modifiée (N₂, O₂, CO₂).

• **Antioxydants synthétiques:** Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur. Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. Le TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) a l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée. Le nitrite présente des propriétés antioxydantes, il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes. Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique (PIBIRI, 2005).

11.2.4. Méthode de détermination de l'activité antioxydante

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation comme par exemple la mesure : a) affaiblissement du substrat, et /ou la consommation de l'oxygène au cours de l'oxydation ; b) la formation des produits d'oxydation ; c) la capacité à piéger les Radicaux libres en différentes phases.

- **Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)**

Cette méthode a été décrite pour la première fois par MILLER & RICE-EVANS (1993) puis améliorée en 1999. En fait, elle consiste en la réduction du radical-cation coloré (2,2'-azobis 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) plus connu sous le nom de ABTS⁺. On suit le développement de sa concentration à 734 nm au cours de sa réaction avec les antioxydants. La capacité antioxydante est mesurée comme la concentration (mM) de Trolox (un analogue soluble de la vitamine E) produisant le même effet que l'échantillon d'essai sur la réduction d'ABTS⁺ (MIQUEL-BECKER *et al.*, 2004). La littérature fournit TEAC de certains antioxydants (Vitamine C = 0,99 mM, β- carotène = 1,9 mM).

- **Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrozyl)**

La capacité antioxydante peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale. L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 516 nm.



Plus un composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration du composé phénolique nécessaire pour atteindre une disparition de 50 % du DPPH à l'équilibre est connue comme la C50. SANCHEZ -MORENO *et al.* (1998) ont proposé un autre paramètre pour mesurer l'efficacité antiradicalaire (EA) où le TC50 est le temps nécessaire pour arriver à l'état d'équilibre en utilisant la C50. La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et de sa reproductibilité.

- **Test de crocine**

Les crocines sont des caroténoïdes localisées dans les stigmates du *Crocus salivus* (safran) solubles dans l'eau. Le dosage de la crocine est basé sur l'oxydation d'une solution de crocine par entraînement de la perte de couleur par la présence d'un Radical libre comme ABAP (azodiisobutyramidine dichlorohydrate). Le suivi de la décoloration de la crocine se fait par les mesures de l'absorbance à 450 nm (FASSEAS *et al.*, 2007).

- **Méthode par résonance paramagnétique électronique (RPE)**

La RPE est une autre technique qui spécifiquement détecte les Radicaux libres impliqués dans l'auto-oxydation. Elle permet d'étudier l'effet des antioxydants sur ces radicaux (ANTOLOVICH, 2002). Cependant, la RPE ne permet pas de détecter les radicaux de courte vie mis en cause dans le processus d'oxydation. D'autres techniques ont été utilisées afin d'améliorer la détection de ces radicaux ; par exemple la radiolyse pulsée, la photolyse UV. La RPE est une technique relativement nouvelle pour l'étude des antioxydants et l'oxydation lipidique. Malgré ses limitations, elle est considérée comme prometteuse par le fait qu'elle permet la mesure des concentrations des Radicaux libres formés durant le processus d'oxydation.

- **Détermination de l'indice de peroxyde (IP)**

Cette méthode permet de mesurer les produits primaires d'oxydation tels que les peroxydes formés lors de l'oxydation lipidique en jouant un rôle essentiel dans l'auto-oxydation des lipides. L'inhibition de leur formation et/ou l'action des antioxydants peut être employée comme indicateur afin d'évaluer l'activité antioxydante. Il s'agit d'une analyse volumétrique de l'iode libéré à partir de l'iodure de potassium par l'oxydation avec des peroxydes à température ambiante et dans un milieu chloroforme/acide acétique.

- **Détermination des diènes conjugués**

Méthode très employée qui utilise des produits intermédiaires d'oxydation (diènes conjugués). La quantification des diènes conjugués se réalise en calculant l'augmentation de l'absorbance à 234-235 nm et les triènes conjugués à 268 nm par rapport à la masse de l'échantillon dans le temps fixe. La mesure de la formation des diènes conjugués présente l'avantage de permettre l'évaluation dans une étape initiale du processus d'oxydation.

Cependant, la méthode des diènes conjugués par spectroscopie UV fournissant peu d'information concernant la nature des composés impliqués. La sélectivité de cette technique peut être améliorée par la séparation des différents diènes conjugués en utilisant la chromatographie à haute performance (HPLC), (ANTOLOVIGH, 2002).

- **Méthode de sr- TBA (Substances Reactive Acid Thiobarbuturic)**

Méthode aussi communément utilisée pour évaluer l'activité antioxydante. Le test sr-TBA mesure la quantité de dialdéhyde malonique (MDA) qui se forme comme produit d'un endoperoxyde des AGI au cours de l'oxydation lipidique (Figure: 6). Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique pour donner des pigments de coloration rouge. La quantité de pigments peut être mesurée par spectroscopie à 532-535 nm. L'oxydation est inhibée par

l'action des antioxydants et par conséquent on peut observer une diminution de l'absorbance. L'activité antioxydante est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la formation du MDA. La décomposition des produits primaires de l'oxydation lipidique produit des mélanges complexes comprenant des époxydes, des cétones, des hydrocarbures et des aldéhydes saturés et insaturés tels que l'héxanal. C'est ainsi que plusieurs mesures de ces produits finaux ont été utilisées dans le but d'évaluer la capacité antioxydante. Par exemple l'indice d'anisidine a été couramment employé pour mesurer la formation de 2-alcène au cours de l'oxydation des lipides. Les composés comportant dans leurs structures des groupements carbonyles en incluant le pentanal, et l'octa 3,5-dien-2-one semblent être les principaux responsables du mauvais goût associé à la rancidité dans plusieurs produits alimentaires (CORBO *et al.* 2000). L'hexanal est le produit final le plus abondant, et par conséquent le plus employé comme marqueur de la propagation du processus d'oxydation lipidique.

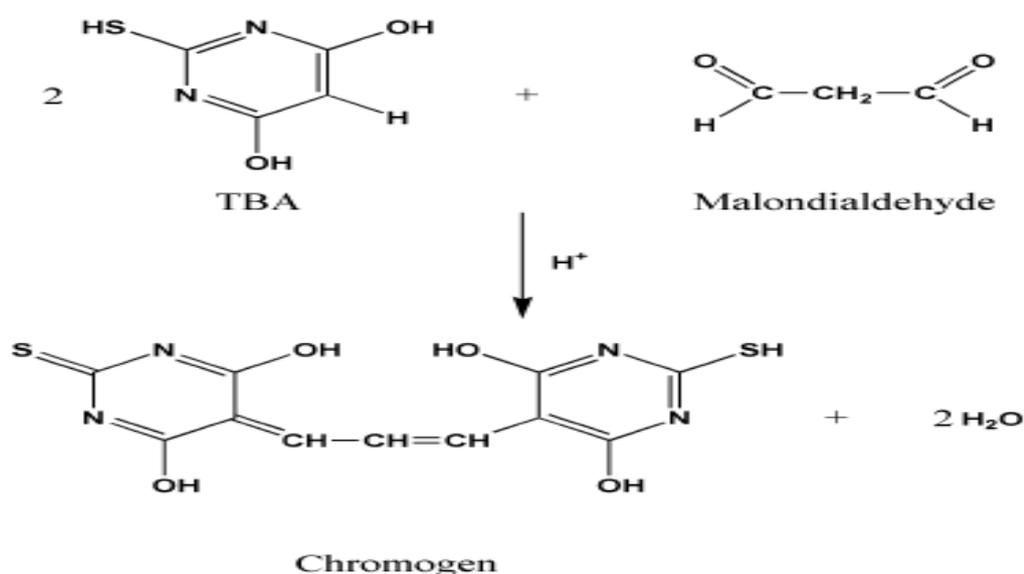


Figure 6: Formation du complexe chromogène par réaction de TBA et MDA

(ANTOLOVICH, 2002).

• Evaluation sensorielle

Les mauvaises odeurs traduisent les altérations biochimiques d'un produit et sont souvent de très bons indicateurs d'altération. L'évaluation sensorielle est souvent considérée comme une bonne méthode d'évaluation d'oxydation des produits. En général, une élévation du niveau d'oxydation se traduit par une modification de l'odeur ou de l'arôme du produit. De nouvelles notes odorantes apparaissent parmi lesquelles les odeurs qualifiées de rance. L'analyse sensorielle permet de détecter et d'identifier les odeurs résultantes de la dégradation lipidiques difficilement mesurables par les méthodes chimiques. Cependant, ce type d'analyse nécessite de constituer un jury d'évaluateurs sensoriels entraînés capables de qualifier et de quantifier les odeurs et goûts perçues (HSIEH & KINSELLA, 1989).

12. Application des H.Es dans les produits alimentaires

En raison des préoccupations quant à l'innocuité des composés synthétiques, d'importants travaux sont effectués pendant ces dernières décennies pour trouver de composés d'origine organique provenant de sources naturelles comme solution de rechange à ces substances chimiques. En conséquence il y a une forte tendance à isoler ces composés organiques naturels pour la protection de la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs.

Actuellement, les H.Es et leurs composants, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles sont riches en composés antimicrobiens et antioxydants. Elles pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « généralement reconnus comme GRAS » ou approuvés comme additifs alimentaires par l'administration Américaine des aliments et des médicaments, FDA (Food Drug Administration). Ils n'ont pas par conséquent pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité sans pour autant être toxique pour l'homme (CAILLET & LACROIX, 2007).

Pour choisir les H.Es comme conservateurs alimentaires, il convient de connaître le seuil d'efficacité (la concentration la plus faible en H.E capable d'inhiber toute croissance microbienne), car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même. Chaque H.E possède une activité spécifique variable selon les microorganismes, les conditions de stockage de l'aliment (le pH, la température, pression d'oxygène etc.) ou la nature des aliments peuvent avoir une influence sur l'action des H.Es. Ainsi, la généralisation de l'utilisation des H.Es n'est pas facilement envisageable à tous les aliments (CUTTER, 2000). Mais le recours aux H.Es s'avère être un choix pertinent à la nécessité de réduire ou de remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques.

Dans le but d'augmenter la durée de conservation des différents types d'aliments, par exemple l'usage simultané de plusieurs facteurs de conservation sous forme de systèmes combinés pourrait être très utile pour potentialiser l'efficacité de chaque facteur individuel. La notion de synergie entre les systèmes antioxydants et antimicrobiens est aussi une alternative intéressante. Voire même un procédé incontournable pour mieux sécuriser les produits vis-à-vis des germes pathogènes et, contre les phénomènes d'oxydation lipidique (AZEREDO *et al.*, 2004).

De nombreux auteurs (KIM *et al.* 1995a et 1995b ; SMITH-PALMER *et al.* 2001 ; PINTORE *et al.* 2002 ; LIN *et al.* 2004 ; FISHER & PHILLIPS, 2006 ; OUSSALAH, 2006 ; CAILLET & LACROIX, 2007), ont rapporté que les H.Es peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. Les H.Es d'origan, de thym, de cannelle, ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, et la charcuterie, l'H.E de menthe pour les produits frais, les H.Es à base de carvacrol ou le citral pour les poissons L'incorporation d'H.E dans la viande hachée a contribué au maintien de la qualité microbiologique et à la réduction de l'oxydation lipidique au-delà de sa durée normale d'entreposage.

Dès la plus haute antiquité, l'homme s'est intéressé aux agrumes. CONFUCIUS parlait des qualités organoleptiques des agrumes 500 ans avant l'ère chrétienne. L'oranger est assurément l'agrume le plus répandu dans le monde, et aussi le plus populaire.

1. Définition :

D'après LOUSSERT (1989), le mot « agrumes » d'origine italienne, est un mot collectif masculin pluriel qui désigne les fruits comestibles par extension aux arbres qui les portent appartenant au genre « *Citrus* ».

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

Le terme général orangeries désigne non seulement les plantations d'orangers mais, par extension toute plantation d'agrumes constituant le verger agrumicole (MEDJEDOUB, 1996).

2. Classification :

D'après GUIGNARD (2001), la position systématique des agrumes est comme suite :

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

Les principaux genres sont :

- Le genre *Fortunella* :
 - Fortunella japonica* (T) Kumquat rond.
 - Fortunella margarita* (L) Kumquat ovale
 - Poncirus trifolia* (L).

- Le genre *Citrus* Linné :
 - Citrus aurantium* (L), bigarade.
 - Citrus sinensis* (L), oranger doux.
 - *Citrus reticulata* (L), mandarine
 - Citrus clementina* (L), clémentine.
 - Citrus medica* (L), cédratier.
 - Citrus paradisis* (racf), pamplemousse.
 - *Citrus limonum* (L), citronnier.

Le genre *Citrus* comprend 16 espèces et chaque espèce contient plusieurs variétés ou cultivars importants.

3. Description de quelques espèces de Citrus utilisées :

3.1. *Citrus limonum* (Citron) :

Nom commun : citron.

Nom scientifique : *Citrus limon*

Le citron s'est d'abord appelé « limon », terme emprunté à l'italien limone, qui venait lui-même de l'arabo-persan limûn. Le mot est apparu dans la langue française en 1351. De là vient le mot « limonade ». Le terme « citron », né en 1398, est dérivé du latin *Citrus*, il a graduellement remplacé « limon » dans la langue populaire.

C'est dans les écrits chinois qu'on fait tout d'abord référence au citron, une première description date de 1175. Le citron a probablement été introduit en Chine entre X^e siècle et le milieu du XII^e siècle, à l'est de la région Himalaya, au sud de la Chine, plus précisément de la Haute Birmanie. Le citron est cultivé par les Grecs et les Romains, voire par les Egyptiens. Ce sont les arabes qui diffuseront le citron, l'introduisant en Afrique du Nord, en Afrique et en Espagne, de même que dans tout le bassin méditerranéen. Lors des croisades au Proche-Orient, les Européens de l'ouest, de l'est et du nord découvriront les agrumes qu'ils rapporteront dans leur pays respectif. De là naîtront les premières serres, dites orangeries. Les premiers agrumes : Citrons, limes, oranges sont introduits dans le Nouveau Monde par Christophe Colomb en 1493. A la même époque, les portugais plantaient les premiers arbres à agrumes au Brésil. Vers la fin du XVI^e leur culture se répand graduellement dans tout le sud-est des Etats-Unis et, plus tard, en Californie, à Hawaï et à Porto-Rico. Aujourd'hui, les agrumes sont cultivés dans toutes les régions tropicales et subtropicales de la planète.

Le citronnier est un petit arbre épineux à feuilles persistantes, atteignant 3 à 6 m de hauteur, à cime étalée et peu dense, au feuillage vert clair. Les feuilles composées, unifoliolées, alternées, de forme variables, lancéolées et elliptiques, à bord denticulé, de taille très variable de 5 à 10cm. Les fleurs blanches et odorantes. Fruit ovoïde, de 5 à 10cm de diamètre, à peau épaisse, adhérente, jaune clair à maturité odorante. Le citron a plusieurs variétés dont les connues sont : Verno, Eurica, Femminello, Intedonoto etc. (CLEMENT, 1981).

3.2. *Citrus aurantium* (Orange amère) :

Noms communs : Bigarade, orange amère, orange de Séville.

Nom scientifique : *Citrus aurantium*.

Le bigaradier est originaire du sud-est de l'Asie. Les arabes l'auraient introduit au IX^e ou X^e siècle en Perse, en Irak, en Syrie, en Palestine, en Egypte, en Afrique du Nord, puis en Sicile, en Sardaigne et en Espagne (DIDIER, 1984). Ce sont les croisés qui répandront dans toute l'Europe où, près de 500 ans, c'est le seul type d'oranger que l'on cultivait. A cette époque, on l'apprécie essentiellement pour ses propriétés médicinales, pour l'écorce confite de ses fruits et pour le parfum que l'on tire de ses fleurs. Au XII^e siècle, il est bien installé à Séville (d'où un de ces noms de son fruit « orange de Séville »). Christophe Colomb

l'introduira dans les Antilles lors de son deuxième voyage vers 1518. Le bigaradier est aujourd'hui cultivé dans de nombreuses parties du monde. En Chine et au Japon, on l'apprécie ses fleurs qui sont séchées et ajoutées aux feuilles de thé.

On tire également des fleurs l'essence de néroli, qui est employée en parfumerie (beaucoup plus aromatique que celle que l'on tire des fleurs de l'orange douce) ainsi, que dans les liqueurs, boissons gazeuses, glaces, pâtisseries et gomme à mâcher. Le résidu de la distillation de l'essence constitue ce que l'on appelle l'« eau de fleur d'oranger », très employée dans la cuisine orientale. De l'écorce du fruit immature, on tire une autre essence qui sert à aromatiser les liqueurs (dont le Grand Marnier, le Cointreau). A partir des feuilles et des rameaux éliminés durant la taille des arbres, on produit l'essence de petit grain qui sert en pharmacie, en parfumerie et dans l'industrie agroalimentaire. Le terme « bigarade » vient de bigarrer, un mot provençal apparu au XV^e siècle et dont l'origine peut être germanique. Le mot est apparu en 1600, remplaçant l'expression plus ancienne d'« orenger bigarrat ».

Le bigaradier est un arbre de 5 à 10 m, à floraison continue, il porte un fruit, la bigarade nommée orange amère, avec la peau rugueuse, teinté de vert ou jaune, sa chair est acide et peu juteuse, très amère et contient beaucoup de pépins. Les fleurs d'oranger sont blanches ou roses très odorantes, elles fleurissent tout le long de l'année.

Le bigaradier est utilisé comme porte greffe pour ses nombreuses qualités :

- résistance à la gommose (*Phytophthora* qui provoque le dépérissement rapide des racines).
- La compatibilité satisfaisante avec les autres grandes variétés (*Citrus sinensis*, et le citronnier).
- La production abondante de fruits de bonne qualité (MEDJDOUB, 1996).

3.3. *Citrus sinensis* (Orange douce) :

Nom commun : Orange douce.

Nom scientifique : *Citrus sinensis*.

Le terme « Orange » est apparu au XIII^e siècle. Il vient de l'arabe *narangi*. L'oranger est originaire du sud-est de l'Asie, foyer du genre *Citrus*, il était déjà connu en Chine. Comme bien d'autres plantes qui servaient également en médecine, il suivra la route de la soie vers l'Europe traversant le Moyen-Orient et le Proche-Orient où il trouvera un climat adapté. De là il gagnera le sud de l'Europe, probablement dans les premiers siècles de notre ère. L'expansion dans le sud de l'Europe au XV^e siècle est le fait des Portugais, qui le ramenèrent d'Asie. Grâce à la sélection et à la mise au point de nouvelles méthodes de culture, l'orange du Portugal devient la norme de qualité et de référence dans toute l'Europe. Sa popularité était telle que, dans les pays arabes, on a cessé de l'appeler *narangi* pour l'appeler *bortugal*. Au moment de la conquête, l'orange traversera l'Atlantique avec la bigarade, la lime et le cédrat. Ils sont cultivés dans les Antilles, au Mexique, en Amérique du sud. Aujourd'hui, l'oranger est l'arbre fruitier cultivé dans le monde. Jusque dans les années 1920, son fruit était consommé à l'état frais. Puis, on commercialise son jus, riche en vitamine C. Aux Etats-Unis, 40% de la production des orangeries est destiné à la

préparation de concentré de jus. Les sous-produits de cette transformation : H.E, pectine, écorce confite, pulpe ont trouvé de nombreux usages dans l'industrie agroalimentaire.

On a longtemps cru que le bigaradier et l'oranger appartenaient à la même espèce botanique, le second étant censé descendre du premier. Mais les recherches modernes indiquent qu'il s'agit de deux espèces différentes, non seulement par la saveur de leur fruit, mais par diverses caractéristiques botaniques.

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé, la floraison blanche très parfumée. Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés les plus connues la Songuilli, Thomson Navel, Valencia Laté, Washington Navel Powell, Florida Pineapple, Maltaise Orange Portugaise etc. (LOUSSERT, 1989).

4. Domaines d'application et intérêt phytothérapie :

Les H.Es de Citrus sont utilisées pour la préparation des parfums, les savons, désodorisant, les bougies parfumées, en industries alimentaires comme aromatisants, en confiseries, pâtisseries, les glaces. En aromathérapie avec les essences d'H.Es de *Citrus*, il est recommandé pour traiter : insomnies, anxiété, calme les palpitations, antirides, vasodilatatrice.

L'H.E de Citron est employée comme désaltérant, possédant des propriétés antimicrobiennes, tonique, stimulante, stomachique, carminative, diurétique, entretien de la peau et soins, obésités, antispasmodique, fébrifuge, coliques, états févieux, spasmes (BARDEAU, 2009).

5. Production mondiale :

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

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

Le bassin Méditerranéen produit des agrumes pour alimenter le marché international du fruit frais avec des exportations de l'ordre de 5.424100 tonnes pour la campagne de 1997 et 1998. Les agrumicoles du bassin Méditerranéen sont : L'Espagne, l'Italie, l'Egypte, le Maroc, La Grèce, l'Algérie, et la Tunisie. L'Espagne étant le premier pays producteur avec 5578000 tonnes en 1999. Parmi les producteurs d'agrumes, l'Algérie occupe la 7^{ème} place (MEDJDOUB, 1996).

1. Généralités

La sardine commune (*Sardina pilchardus*) appartient à la classe des Actinophéryngiens, à l'ordre des Cluéoformes et à la famille des Clupéidés. La sardine commune évolue en Atlantique Nord-est de la Norvège à l'Écorce jusqu'au Sénégal, et en Méditerranée. C'est un poisson pélagique qui vit entre la surface et le fond dans les eaux côtières jusqu'à 120 m de profondeur. La sardine vit en bancs parfois importants, près de la surface la nuit et plus en profondeur le jour. Sa taille moyenne est de 10 – 20 cm, avec une taille maximale de 25 cm. Les périodes de pontes varient selon la répartition géographique ; les sardines adultes se nourrissent de crustacées planctoniques, des larves de crabes. Elle est consommée fraîche, salée, parfois fumée, mais principalement en conserves (EYMARD, 2003).

2. Principaux composants

La composition chimique de la sardine varie considérablement d'une espèce et d'un individu à l'autre selon l'âge, la maturité sexuelle, les changements de saison, les cycles alimentaires, le comportement migratoire (CORRAZE & KANSHIK, 1999).

La teneur en hydrates de carbone du muscle de poisson est très faible, habituellement inférieure à 0,5% et se présente sous forme de glycogène.

Les lipides présents dans les espèces de poisson peuvent être divisés en deux groupes principaux : les phospholipides (65%) et les triglycérides (35%).

Les phospholipides constituent la structure intégrale des membranes des unités cellulaires et, sont de ce fait appelés souvent lipides structuraux. Les phospholipides sont constitués de fraction la plus importante en phosphatidyl-éthanolamine (69%), de la phosphatidyl-choline (19%) et de la phosphatidyl-sérine (5%).

Les triglycérides sont des lipides utilisés pour entreposer l'énergie dans les dépôts de graisse, habituellement à l'intérieur de cellules spéciales entourées d'une membrane de phospholipide. On appelle souvent les triglycérides des graisses de dépôt (AUBOURG *et al.*, 1998). Les poissons peuvent être classés en espèces maigres ou grasses suivant la façon dont ils stockent les lipides pour l'énergie. Les poissons maigres utilisent le foie comme réservoir d'énergie tandis que, les poissons gras répartissent leurs lipides dans les cellules grasses à travers tout leur corps. Les cellules grasses constituent les dépôts de lipides, elles sont typiquement situées dans les tissus sous-cutanés, dans les muscles de la paroi abdominale et dans les muscles animant les nageoires et la queue. Les lipides du poisson diffèrent des lipides des mammifères, la différence principale tient au fait que les lipides du poisson incluent jusqu'à 40% d'acide gras à longue chaîne (14 à 22 atomes de carbone) qui sont hautement insaturés tels que les acides linoléique, linoléique, arachidonique, l'acide eicosapénique et ténoïque (BANDARRA *et al.*, 1997).

Les Protéines des tissus musculaires du poisson peuvent être divisées en trois groupes :

- Les protéines structurelles (actine, myosine, tropomyosine, et actinomyosine) qui constituent de 70 à 80% de la teneur totale en protéines.
- Les protéines sarcoplasmiques (myoalbumine, globuline, et enzymes) cette fraction représente de 25 à 30% des protéines.

- Les protéines du tissu conjonctif (collagène) qui constituent environ 3% à 10%.

Extraits azotés

Les extraits azotés peuvent être définis comme étant des composants de nature non protéique, solubles dans l'eau, de poids moléculaire faible et renfermant de l'azote. Cette fraction ANP (Azote non protéique) constitue 9 à 18% de l'azote total. Les composants principaux de cette fraction sont des bases volatiles telles que l'ammoniaque, l'oxyde triméthylamine (OTMA), la créatine, les acides aminés libres (taurine, l'alanine, la glycine, et l'histidine), les bases nucléotides et l'urée.

Vitamines et sels minéraux

En général la chair de poisson est une bonne source de vitamines A, B, et D. Les éléments minéraux sont représentés entre 0,8 et 2 %, la chair de poisson est considérée comme une source appréciable de calcium et de phosphore, iode ; mais également de fer, de cuivre et sélénium.

3. Flore bactérienne

3.1. Flore pathogène

Ces dernières années les problèmes liés aux bactéries responsables de toxi-infections alimentaires (TIA) se sont considérablement amplifiés par l'apparition de germes résistants à une série d'antimicrobiens et menacent d'entraîner un grave problème de santé publique. Il a été estimé qu'environ 30% de personnes dans les pays industrialisés souffrent de maladies transmises par les aliments. Chaque année, des millions des cas sont signalés partout dans le monde (NEDOROSTOVA *et al.*, 2009).

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'homme via les denrées alimentaires. Ces bactéries sont regroupées en bactéries d'intoxication alimentaire et celles qui peuvent entraîner une infection alimentaire.

Intoxication alimentaire : les bactéries pathogènes se multiplient dans l'aliment et produisent des toxines. Une intoxication alimentaire est caractérisée par l'apparition rapide de la maladie (généralement les symptômes sont les nausées et les vomissements), et que les toxines sont déjà préformées dans les aliments avant ingestion.

Infection alimentaire : l'aliment agit comme support pour les microorganismes pathogènes. L'agent infectieux peut ou non se multiplier dans l'aliment, mais les bactéries ingérées viables continuent à croître dans l'hôte et provoque les symptômes de la maladie (fièvre, diarrhée). La dose infectante minimale (MDI) varie considérablement entre les espèces bactériennes. MID est élevée pour *Vibrio spp* (10^6 cellules), et très faible pour *Salmonella spp* et *Shigella* (BOURGEOIS, 1990).

Le poisson est capable de causer la plupart des intoxications et infections alimentaires connues. En outre, il existe des maladies qui sont typiquement associées à la consommation de ces produits et à l'environnement aquatique.

Le niveau de contamination des poissons au moment de la capture dépend de l'environnement et de la qualité bactériologique de l'eau dans laquelle ils ont été pêchés. Beaucoup de facteurs influent sur la microflore des poissons ; les plus importants sont la température, la teneur en sel, la proximité des régions de pêche avec les habitations humaines, la quantité et l'origine de la nourriture consommée par les poissons, ainsi que les méthodes de pêche.

Le tissu du muscle comestible de poisson est normalement stérile lors de la capture et les bactéries sont habituellement présentes sur la peau, les branchies et dans le tube digestif. Il y a deux groupes de bactéries qui peuvent contaminer les produits de la pêche:

✓ Ceux qui sont normalement présents dans l'environnement aquatique (microflore indigène), par exemple : *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Plesimonas spp*, *Listeria monocytogenes* (HUSS & PETERSON, 1980).

✓ Ceux qui sont introduits par la contamination de l'environnement par les déchets souvent domestiques ou industriels, par exemple : Les Enterobacteriaceae telles que *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, et *Yersinia enterocolitica*.

Les bactéries pathogènes de l'environnement, quand elles sont présentes dans le poisson frais, sont trouvées en nombre assez faible, et quand les produits sont cuits suffisamment avant consommation, les dangers pour la sécurité des aliments sont insignifiants. Pendant le stockage, les bactéries d'altérations se développent plus rapidement que les bactéries pathogènes. Les poissons sont habituellement altérés avant de devenir toxiques et sont rejetés par les consommateurs. Le personnel peut servir de vecteur ou apportant des risques hygiéniques (germes fécaux, *Staphylococcus*, *Clostridium*) (DELARRAS, 2007).

- ***Salmonella spp***

Les Salmonelles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae et, l'on connaît plus de 2000 sérovars. *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium sont deux sérotypes responsables de salmonelloses transmises de l'animal à l'homme, provoquant des gastro-entérites, et de toxi-infections alimentaires (59% des foyers de TIA à *Salmonella*) (WEILL, 2009). Les infections à *Salmonella* demeurent un véritable problème de santé publique. Qui dans la plupart des cas ne s'accompagnent d'aucune complication et ne nécessitent pas de traitement, mais peuvent être invasives et peut avoir un pronostic mortel chez les jeunes, les personnes âgées et, les malades dont l'immunité est affaiblie. La dose infectante varie selon les sérovars, les aliments incriminés, et la sensibilité des individus, généralement la dose infectante minimale est $> 10^8$ cellules.

La plupart des études publiées indiquent que, les produits de la mer véhiculent beaucoup moins les salmonelles que d'autres aliments, et que les poissons ne sont responsables que d'une faible proportion de l'ensemble des cas de salmonelloses enregistrées. Dans la plupart des cas ces produits sont cuits avant la consommation et, par conséquent ces produits ne font courir que des risques extrêmement réduits au consommateur, sauf lors de contamination par manipulation (KORSAN *et al.*, 2004).

- ***Escherichia coli***

E. coli est une bactérie qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud. Le plus souvent les souches d'*E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commensaux inoffensifs. Toutefois à l'intérieur de l'espèce on trouve au moins quatre types de souches pathogènes :

- *E. coli* entérotoxigène (EPEC).

- *E. coli* entérotoxigène (ETEC).
- *E. coli* entéroinvasif (EIEC), *E. coli* de type de dysenterie à bacille de Shiga la dose infective est faible (100 bactéries vivantes).
- *E. coli* entérohémorragique (EHEC).
- *E. coli* producteur de vérocytoxine (VTEC) ou *E. coli* O157 H:7 (JOLY & REYNAUD, 2002).

Les études épidémiologiques font appel à la sérotypie, la lysotypie, et aux méthodes génétiques pour distinguer les différents types d'*E. coli*. Mais il n'existe pas de marqueurs phénotypiques spécifiques permettant de séparer les souches pathogènes des souches non pathogènes. Toutefois certaines propriétés atypiques telles que, le fait d'être lactose négatif ou de ne pas produire d'indole à 44°C, sont plus répandues parmi les souches pathogènes. VTEC ne se développe pas du tout sur les milieux sélectifs à 44°C (MANIL, 2004). Les souches pathogènes d'*E. coli* sont responsables de maladies intestinales qui varient en gravité, des formes bénignes jusqu'à des formes graves même être mortelle (le syndrome est mortel dans 20 à 30% des cas).

Les Enterobacteriaceae (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*) se manifestent toutes sur les produits de la pêche par suite de contamination à partir du réservoir animal/humain. Cette contamination est associée à la contamination fécale ou à la pollution des eaux, ou à la contamination directe des produits au cours de la préparation. Il en résulte que la lutte contre les maladies provoquées par les Enterobacteriaceae passe nécessairement par une bonne hygiène personnelle et de l'éducation sanitaire du personnel chargé de manipulation des aliments.

- ***Shigella sp***

Le genre *Shigella* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae. Sa présence dans le milieu naturel étant liée à une contamination fécale. Les shigelles sont responsables de la shigellose qui est une infection de l'intestin. Les symptômes sont variables, depuis l'infection asymptomatique ou la diarrhée légère jusqu'à la dysenterie caractérisée par des selles sanglantes, la sécrétion de la glaire, la déshydratation, fièvre et crampes abdominales sévères. La période d'incubation de la shigellose est de 1–7 jours. La mort chez les adultes est rare, mais chez les enfants la maladie peut être grave. Dans les pays où sévit la malnutrition, la diarrhée de *Shigella* est responsable de la mort d'au moins de 500 000 enfants/an (COHEN & KARIB, 2006). Les shigelloses sont provoquées par la transmission directe des bactéries d'individu à individu par voie orale-fécale. La transmission est importante là où hygiène laisse à désirer. L'alimentation, y compris les produits de la mer, est la cause d'un certain nombre de poussées épidémiques de shigelloses. Dans la majorité des cas il s'agit de contamination d'aliments crus ou précédemment cuits au cours de leur préparation par un porteur asymptomatique infecté ne respectant pas les règles d'hygiène (SUTRA *et al.*, 1998).

- ***Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques fait partie de la famille des *Micrococcaceae*, sont des germes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau, l'air, la poussière, le lait, les sols, les eaux usées etc. Le principal réservoir et habitat est constitué par le nez, la gorge et la peau des animaux/ humain. 60% de porteurs en bonne santé sont des porteurs avec une moyenne de 25–30% de la population positive à l'égard des souches productrices d'entérotoxines (DEVRIESE *et al.*, 2005). Les TIA causées par *S. aureus* sont très fréquentes, se manifestent surtout en faveur d'une hygiène défectueuse. Les symptômes qui peuvent survenir dans les 2 à 4 heures qui suivent la consommation d'aliments contaminés sont les nausées, les vomissements et, parfois des diarrhées. Dans les cas graves la déshydratation peut conduire au choc et au collapsus. La mortalité liées aux complications de *S. aureus* peuvent être considérables et atteindre 3-20%.

Les produits de la mer peuvent être contaminés par les staphylocoques soit par l'intermédiaire de manipulateurs infectés, soit par l'environnement. Lorsqu'il se multiplie dans les aliments, *S. aureus* produit un certain nombre d'entérotoxines. Ces toxines sont très résistantes aux enzymes protéolytiques et à la chaleur (la chaleur appliquée à domicile ne suffit pas à détruire la toxine) (VINCENOT *et al.*, 2008). De bonnes pratiques sanitaires, ainsi le contrôle de la température sont nécessaires pour éviter la contamination, la prolifération et la production de toxines, notamment dans le cas des produits de la mer précuits.

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Ce germe appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Bacille à Gram négatif, aérobie, asporulé très mobile par un ou plusieurs flagelles polaires. Il s'agit de bactéries d'altération ou pathogènes (parfois même redoutable est mortelle). *Ps. aeruginosa* est l'espèce qui revêt d'importance dans la pollution microbienne du milieu marin. Sa présence dans l'eau est associée aux activités humaines. On le trouve dans environ 10% des matières fécales normales et fréquemment dans les eaux usées. Il possède une grande tolérance dans les gammes de température environnante bien qu'ayant une température optimale de croissance située entre 30 – 35°C (mésophile). Il est capable de pousser à des températures entre 4 – 42°C. Les souches psychrophiles contaminent les denrées alimentaires conservées au réfrigérateur. On peut les isoler de la flore intestinale de l'homme et des animaux, mais leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier. Ils se comportent comme des opportunistes souvent à l'origine d'infection nosocomiales (MANN *et al.*, 2000).

- ***Clostridium botulinum***

C. botulinum est extrêmement répandu dans le sol (végétaux, épices, sel marin), présence normale l'environnement aquatique et les poissons. Le botulisme humain est une maladie grave relativement rare, il est de loin d'être le plus dangereux. Il s'agit d'un empoisonnement provoqué par une toxine préformée dans l'aliment. Parmi les symptômes figurent les nausées et vomissement, suivi d'un certains nombre de symptômes neurologiques : oculaires (diplopie, accommodation difficile), digestifs (difficulté à déglutir), puis dans les cas graves, paralysie respiratoire et mort. Pas de fièvre, ni de diarrhée.

Tous les produits frais de la pêche constituent un milieu très favorable à la croissance de *C. botulinum* et à la production de toxine par les souches non protéolytiques et psychrotrophes (type E, D, F). La vitesse de la synthèse des toxines augmente en fonction de la température quand celle-ci dépasse + 3,3°C, atteignant une production maximale à 25-30°C (BOURGEOIS, 1990).

Cependant, il y'a pas de cas de botulisme humain dû à du poisson frais, cela s'explique probablement par le fait que, le poisson se décompose avant de devenir toxique car les toxines préformées sont de faible thermostabilité. La cuisson du poisson est suffisante pour inactiver toute toxine préformée. Un procédé thermique par voie humide de 82°C pendant 30 mn détruit environ 10^7 spores. Par contre, à pH faible ou milieu salé, cette toxine devient extrêmement stable (HUSS & RYE PETERSON, 1980).

- **Vibrio**

Le genre vibrio fait partie de la famille des *Vibrionaceae* et comprend 34 espèces dont 13 espèces sont pathogènes pour l'homme. D'origine marine et se multiplient qu'en présence 2 à 3% de sel (halotolérant). Ces espèces pathogènes sont mésophiles ubiquistes, des eaux tropicales, ainsi que dans des eaux tempérées. Les plus importantes sont : *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*.

Vibrio parahaemolyticus

Ce germe a été identifié pour la première fois en 1951 au Japon, chez les victimes d'une TIA due à l'ingestion de sardine contaminée par ce germe. *V. parahaemolyticus* est le deuxième microorganisme pathogène qui se rencontre naturellement dans le poisson notamment ceux capturés dans les eaux chaudes. C'est une bactérie marine à Gram négatif, mobile, halophile la température de croissance est > 8°C. Les conditions optimales sont le milieu alcalin contenant 2 à 4% de NaCl et à 37°C (BEUCHAT, 1976). Dès lors, Une charge faible de *V. parahaemolyticus* qui est inoffensive peut se multiplier rapidement pour atteindre un taux capable de provoquer des intoxications alimentaires. La dose infectante est de 10^6 à 10^9 bactéries/g. La virulence des souches pathogènes est due à la production de deux hémolysines : hémolysine thermostable directe (TDH) et une hémolysine (TRH). Les incidents aux *V. parahaemolyticus*, sont isolés dans les coquillages, notamment les mollusques bivalves, crustacées, mais moins dans les poissons. Il est responsable de foyers gastro-entérites (Diarrhée hydrique, fièvre, coliques, nausées).

Vibrio cholerae

La bactérie peut contaminer les fruits de mer et l'intestin des poissons, des eaux d'estuaire dans les zones chaudes, eau de mer. *V. cholerae* est considéré comme témoin de contamination récente. Elle survit pendant 50 jours dans l'eau de mer à 5-10°C, et 10 à 12 jours à 30°C, expliquant son existence saprophytique. La dose infectante est élevée chez les personnes sans facteur de risque (> 10^8 bactéries). Les symptômes se résument à une diarrhée aqueuse, vomissements, déshydratation. La cuisson des aliments est une protection simple et efficace de propagation de la maladie

Vibrio vulnificus

C'est un *Vibrio* halophile qui ressemble à *V. parahaemolyticus*. Il a été isolé à partir des cultures de sang malades souffrant de maladies hépatiques. Les infections à *V. vulnificus* sont fréquemment associées à la consommation des produits de la mer (huîtres). *V. vulnificus* affecte surtout les personnes à risque aux pathologies sous-jacentes telles que cirrhose, hépatite, et dont le système est affaibli. La mortalité dans les groupes à risque est de 60%. *V. vulnificus* produit une cytotoxine extracellulaire et des enzymes hydrolytiques qui sont responsables de la dégradation des tissus musculaires, et la présence d'une capsule polysaccharidique. *V. vulnificus* prolifère rapidement pendant les mois chauds. Il peut s'accumuler jusqu'à 10^4 UFC/g dans les huîtres et peut-être trouvé avec une concentration allant jusqu'à 10^6 UFC/g dans les intestins du poisson se nourrissant de mollusques. La présence de cette bactérie dans les eaux et les huîtres est saisonnier, un grand nombre d'infection est détecté pendant la période d'été. Une température de 8°C limite la croissance de ce germe. Il est nécessaire de cuire les mollusques avant la consommation (DELARRAS, 2007).

- ***Aeromonas hydrophila***

Le genre *Aeromonas* fait partie de la famille des *Vibrionaceae*. Il contient des espèces pathogènes pour le poisson et l'homme. L'espèce *A. hydrophila* agent des maladies diarrhéiques transmises par les aliments, ubiquiste des eaux douces, saumâtres, marines. Agent principal d'altération de la viande, saumon, poisson. Pathogène et opportuniste infectant les plaies souillées, septicémies chez les immunodéprimés. Le germe produit une large gamme de toxines telles que l'entérotoxine, cytotoxine, des hémolysines et des inhibiteurs de canaux de sodium de type tétrodotoxine. Les toxines sont préformées dans les aliments.

- ***Plesiomonas shigelloides***

Le genre *Plesiomonas* appartient à la famille des *Vibrionaceae*. *Plesiomonas* est très répandu dans la nature, mais surtout associé à l'eau (douce ou l'eau de mer). Les poissons et les fruits de mer sont les principaux réservoirs de *Plesiomonas* et peuvent être responsables de gastro-entérites avec les symptômes allant de la maladie bénigne de brève durée à la diarrhée sévère (type *Shigella* ou cholérique).

- ***Listeria monocytogenes***

La bactérie est très répandue dans la nature. On peut l'isoler du sol, de la végétation, des aliments, y compris le poisson et les produits de la mer. La listériose est une infection dont le point d'entrée est l'intestin, mais la dose infectante n'est pas connue, la période d'incubation peut varier d'un jour à plusieurs semaines. *L. monocytogenes* est capable de se multiplier dans les macrophages et d'entraîner une septicémie suivie d'infection d'autres organes tels que le système nerveux, le cœur, les yeux, ainsi que le fœtus des femmes enceintes. Chez les adultes en bonne santé, la listériose ne dépasse pas généralement le stade entérique primaire, lequel peut-être asymptomatique où ne présente que des symptômes bénins de type grippal.

La listériose présente un risque particulier voire mortel pour les fœtus, les femmes enceintes, les nouveaux nés et les personnes dont le système immunitaire est déprimé (CRESSY *et al.*, 2003).

3.2. Flore d'altération

Les espèces bactériennes peuplant les poissons sont bien adaptées aux facteurs de sélection qui, sont la teneur de l'eau en NaCl (espèces halophiles) et à la température ambiante (espèces psychrophiles et psychrotrophes).

Les bactéries d'altération sont des bactéries en général naturellement présentes et qui vont, suite à leur développement favoriser l'altération des poissons. Ce sont surtout les bacilles à Gram négatifs appartenant aux genres : *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Shewanella putrefaciens*, des *Vibrionaceae*, des *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Photobacterium phosphoreum*. La mise en glace rapide permet de limiter la prolifération de flore d'altération. Pour les poissons sous glace, les principales bactéries d'altération sont :

-*Shewanella putrefaciens*, typiques de l'altération aérobie sont des germes halophiles contaminants fréquents des produits de la mer. Ils produisent de la triméthylamine (TMA), de l'hydrogène sulfuré (H₂S) et autres sulfures volatils qui donnent lieu aux odeurs et aux saveurs sulfureuses (d'œuf pourri). Des métabolites similaires sont formés par les *Vibrionaceae* et les *Enterobacteriaceae* au cours de l'altération à des températures élevées.

-*Photobacterium phosphoreum* et *Halobacterium*, sont typiques de l'altération des poissons entreposés en atmosphère modifiée sous CO₂. Germes psychrotrophes produisant de grandes quantités de TMA (MEJLHOLM & DALGAARD, 2002).

-*Pseudomonas spp*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* sont des germes de la flore d'altération se développe sur la peau, ils sont responsables des odeurs anormales sulfureuses qui sont perceptibles avec une charge microbienne > 10⁷ UFC/cm² et l'apparition de la couche poisseuse caractéristique du développement microbien excessif (charge microbienne > 10⁸ UFC/cm²). Les pseudomonas produisent des sulfures volatils (par exemple methylmercaptan (CH₃SH) et dimethylsulfure ((CH₂)₂S), H₂S, des cétones, esters, et aldéhydes (HUSS et RYE PETERSON, 1980).

3.3. Intoxication à la scombrottoxine :

Un type d'intoxication particulière est l'intoxication scombririque causée par l'ingestion de poisson appartenant à la famille des *scombridaeae*. Les poissons qui sont responsables sont le thon rouge, les maquereaux et la sardine. La scombrottoxine est attribuée à des *Enterobacteriaceae* qui produisent de grandes quantités d'histamines, en présence d'une décarboxylase qui dégrade l'acide aminé histidine présent dans le muscle du poisson, lorsque les produits ne sont pas refroidis immédiatement après avoir été capturés. Les cas d'intoxication à la scombrottoxine est du à des teneurs en histamine dépassant les 20 mg/100g dans le poisson.

Elle est rarement fatale, mais les symptômes peuvent être spectaculaires (phénomènes d'allergie aigu). Les poissons peuvent présenter des niveaux toxiques d'histamine sans présence des aspects d'altération (BOURGEOIS, 1990).

4. Altération

La chair de poisson ne présente pas d'odeur rapidement quand le poisson est très frais. Dès la mort du poisson la contraction *post-mortem* et la chute de pH reste modérées. Le pH du muscle du poisson est généralement insuffisant pour inhiber ou ralentir le développement bactérien. En plus d'une activité protéolytique susceptible d'amollir rapidement les tissus, des enzymes telles que les lipases et les phospholipases restent remarquablement actives au froid et dégradent les lipides. Les modifications *post-mortem* des muscles se traduisent par une baisse de solubilité des protéines, une fragilisation des cellules, et la libération d'acides gras.

4.1. Lipolyse

L'hydrolyse des lipides est principalement le fait d'enzymes lipolytiques tissulaires. Il s'agit des lipases et des phospholipases A₂ et B. Les lipases hydrolysent les liaisons esters des glycérides et libèrent à partir des triglycérides (TG) des acides gras libres (AGL), des diglycérides (DG), et des monoglycérides (MG). La phospholipase A₂ hydrolyse la liaison ester en position 2 du glycérol dans les phospholipides. La phospholipase B attaque la liaison ester en position 1 ou 2 du glycérol (HSIEH & KINSELLA, 1989). Ces réactions de lipolyse induisent une dégradation de la qualité du produit, de plus les AGL provenant de l'activité de ces enzymes interagissent avec les protéines favorisant leur dénaturation et conduisent à l'altération du produit (REFSGAARD *et al.*, 2000).

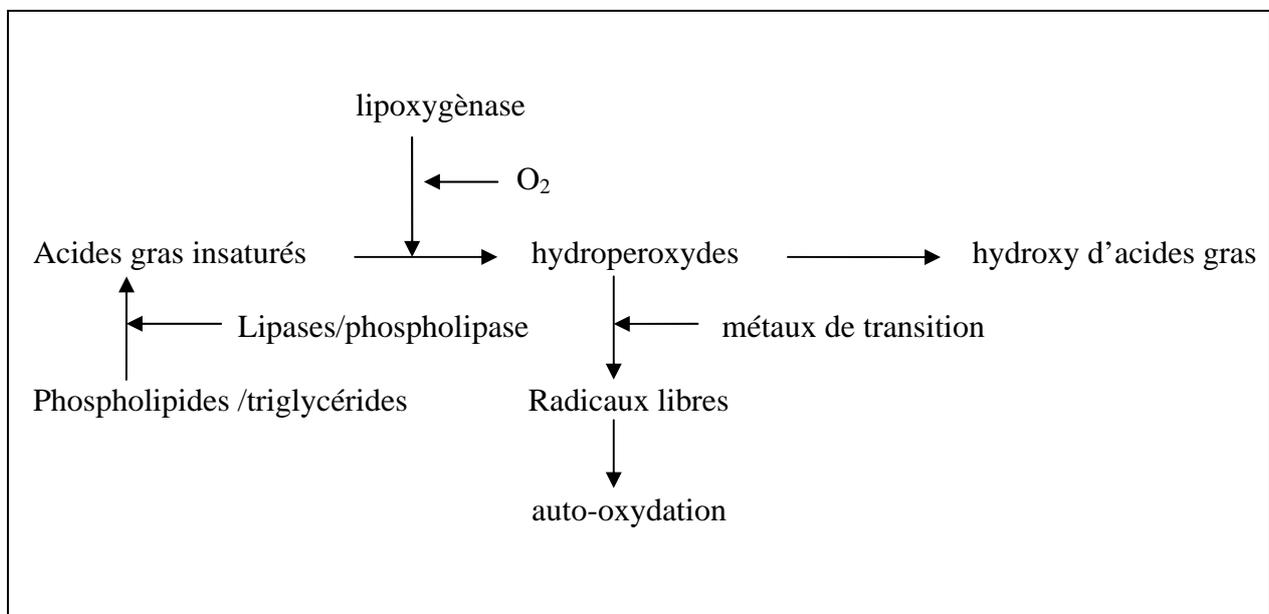


Figure 7: Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique (GERMAN & KINSELLA, 1985).

4.2. Oxydation lipidique

Au niveau des tissus vivants l'auto-oxydation des lipides et la production de radicaux libres sont des processus naturels. Mais il existe des mécanismes de contrôle de l'oxydation afin de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires, des protéines, et des acides nucléiques. Ainsi il existe une régulation des systèmes prooxydants et antioxydants qui permettent de maintenir la balance entre les facteurs impliqués dans la réaction d'oxydation. La régulation des facteurs pro et antioxydants est perturbée à la mort de l'animal et durant le stockage du poisson. Ce dérèglement induit les changements des propriétés biochimiques du muscle. Ces modifications sont caractérisées notamment par une augmentation de la teneur en fer libre, une activation des protéines héminiques, la dégradation des membranes. Ces facteurs favorisent le développement des réactions d'oxydation qui induisent des conséquences négatives sur des propriétés biochimiques, organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment et sur la santé du consommateur (POKORNY *et al.*, 2001). Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit de facteurs intrinsèques tels que la composition en AG des lipides (nombre et position des insaturations), la présence des prooxydants (hème, ions métalliques, enzymes), ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes...) et des facteurs extrinsèques tels que la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité d'eau, les conditions de stockage (HUANG *et al.*, 1993). Les phospholipides sont les plus sensibles à l'oxydation que les triglycérides et les esters de cholestérol en raison de leur teneur élevée en acide gras polyinsaturés. Les produits de la peroxydation lipidique ont des effets cytotoxique, mutagène, cancérigène, athérogène...

L'oxydation lipidique est initiée dans la fraction des AG des phospholipides membranaires conduisant à la production des composés primaires (hydroperoxydes, peroxydes, les radicaux libres, des diènes conjugués) sont des produits intermédiaires sans odeur spécifique, très instables, sensibles à la décomposition en produits de réaction secondaire (HULTIN, 1992). La scission des produits primaires de l'oxydation conduit à la formation des composés secondaires souvent volatils. Ces composés sont responsables des odeurs propres aux poissons (aldéhydes, cétones, alcools, esters d'acide gras, OTMA, TMA, NH₃) caractérisent les odeurs des lipides oxydés (Figure: 8).

Les composés primaires et secondaires issus de l'oxydation des lipides interagissent avec les composés aminés (acides aminés, peptides, protéines) induisant la formation de composés d'interaction qui ont un impact important sur la dégradation des propriétés fonctionnelles, sensorielles, et nutritionnelles des aliments. Les modifications chimiques induites par les interactions entre les hydroperoxydes des lipides et les protéines se traduisent par des polymères protéine-protéine, des produits d'addition lipide-protéine, et des dégradations d'acides aminés plus particulièrement lysine, cystéine, méthionine, tryptophane. Par exemple les aldéhydes issus de l'oxydation des lipides réagissent préférentiellement avec les groupements thiols des cystéines et les groupements aminés de lysine pour former les substances telles que : le sulfure d'hydrogène et ses dérivés méthylés : méthyl mercaptan (CH₃SH), sulfure de diméthyl-d'hydrogène sulfuré ((CH₃)₂S), à l'origine d'odeur putride.

Les réactions du maonaldéhyde, produit secondaire de l'oxydation des lipides avec les protéines conduit à la formation de groupements carbonyles au niveau des chaînes d'acides aminés (EYMARD, 2003).

Les antioxydants naturels (les oligo-éléments, enzymes, et vitamines) protègent les phospholipides membranaires contre les dommages oxydatifs. Toutefois, les antioxydants sont souvent éliminés pendant la manutention, la transformation, ou lors de l'entreposage de l'aliment. Ce qui nécessite en outre, la supplémentation en antioxydant (GENOT *et al.*, 2003).

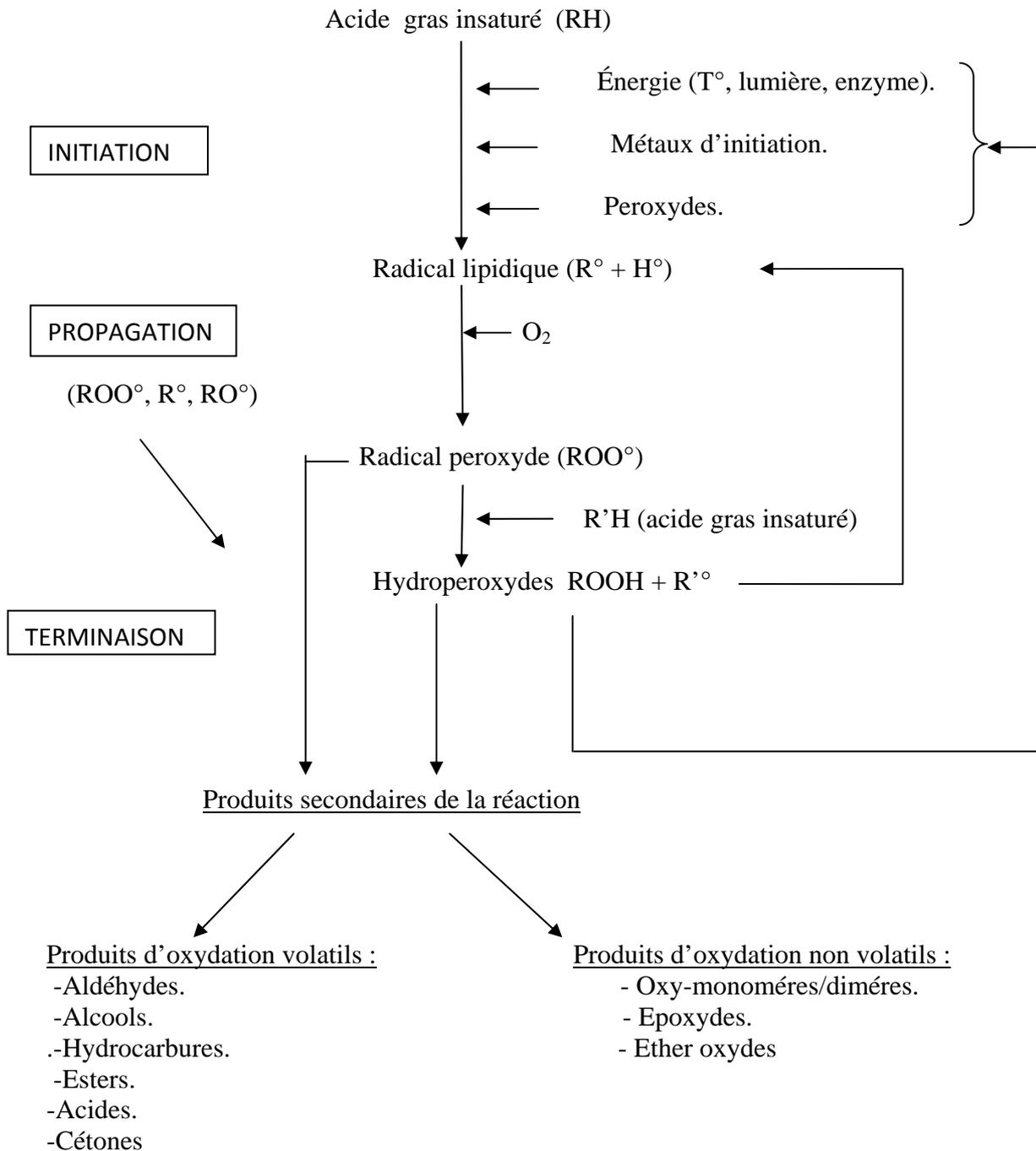


Figure 8 : Schéma général de l'oxydation des lipides (EYMARD, 2003).

Partie expérimentale

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pendant la période allant de septembre 2008 à Juin 2009. La détermination de la composition chimique des H.Es de *Citrus* a été effectuée au Centre de Recherche et Développement (CRD) de Boumerdes.

1. Matériel

1.1 Matériel végétal

Les fruits d'agrumes des espèces : *Citrus limonum* (citron), *Citrus aurantium* (l'orange amère) et *Citrus sinensis* (l'orange douce, var: Thomson) proviennent d'une exploitation agricole privée, située dans la région d'Irdjen dans la wilaya de Tizi-Ouzou. La récolte a été réalisée durant la période allant du mois de novembre 2008 jusqu'au mois de mars 2009. Les fruits fraîchement récoltés au hasard, sont nettoyés, lavés, séchés avec une serviette en coton propre. Le zeste (épicarpe d'agrumes) est récupéré à l'aide d'un économe.

1.2. Microorganismes utilisés

Le choix des bactéries a été porté sur quatre souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de (TIA) constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens. Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

- ❖ Des bactéries à Gram négatif : *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❖ Des bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

Les souches bactériennes d'*E. coli*, de *Ps. aeruginosa* et de *S. Enteritidis* sont des souches hospitalières et celle de *S.aureus* est d'origine alimentaire. Ces souches nous ont été fournies aimablement par les responsables de laboratoire de Microbiologie des centres hospitaliers Universitaires (CHU) de Tizi-Ouzou et de Mustapha Bacha d'Alger et, par le service de Microbiologie Alimentaire de l'Institut Vétérinaire de Draâ Ben Khedda (Tizi-Ouzou),. Ces souches ont été procurées dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose de conservation.

1.3. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées, et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants :

- Gélose nutritive, gélose de Mueller Hinton et gélose de conservation.
- Milieux sélectifs : gélose Chapman, gélose Hecktoen, gélose SS.
- Milieu King A et King B.
- Milieu liquide BHIB, et l'eau physiologique, eau peptonée.

Les milieux proviennent du commerce (Biomérieux[®] SA-France). La composition de ces milieux est décrite dans l'annexe 1.

1.4. La sardine

Afin de valider l'effet antibactérien et antioxydant de nos H.Es, nous avons utilisé la sardine commune (*Sardina pilchardus*). Le choix de la sardine comme matrice alimentaire, est un poisson qui est beaucoup consommé, et très vulnérable aux altérations microbiennes et au processus d'oxydation lipidique. La qualité nutritionnelle de la sardine est liée en grande partie à la composition de ses dépôts lipidiques surtout les acides gras à longue chaîne polyinsaturée (AGPI). Or ces acides gras, sont très sensibles aux phénomènes d'oxydation lipidique qui a pour conséquence une diminution des qualités nutritionnelle et organoleptique (altération de la flaveur et de la couleur du poisson). De plus, les composés d'oxydation formés peuvent avoir des effets délétères pour la santé du poisson et celle du consommateur (HUSS & PETERSON, 1980).

2. Méthodes

2.1. Procédé d'extraction

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation. 500 g de zeste d'agrumes frais sont introduits dans un ballon de 2 litres imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant se condensent puis elles sont récupérées dans une ampoule à décanter, l'eau et l'H.E se séparent par différence de densité.

Les H.Es extraites sont conservées à une température voisine de $6 \pm 1^\circ\text{C}$, dans des flacons en verre opaque, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont des principaux agents de dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique.

2.1.1. Calcul du rendement :

Le rendement en H.E est le rapport entre le poids de H.E extraite et le poids de la biomasse végétale à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R = (P_h / P_v) \times 100$$

R = rendement en huile essentielle en %.

P_h = poids de l'huile essentielle en gramme.

P_v = poids de la biomasse végétale en gramme.

2.1.2. Caractéristiques des H.Es

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur).
- Déterminer ses indices physiques (densité et indice de réfraction).
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

2.1.2.1. Indices physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico- chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

➤ **Mesure de la densité relative à 20°C (Norme NF T 75 - 111)**

La densité relative de l'H.E est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d_{20}^{20} . La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de volume : 5 ml à la température de 20°C.

➤ **Mesure de l'indice de réfraction (norme NF T 75 – 112)**

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé Prisma- CETI convexe. Quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^{\circ}\text{C})$$

I_{20} = Indice à 20°C

I_t = Indice à la température ambiante ou de mesure.

T = Température ambiante.

Les produits étalons de qualité pour réfractométrie servant à ajuster le réfractomètre sont les suivants :

-Eau distillée	(1,333)
-P- cymène	(1,4906)
-Benzoate	(1,5685)
-Bromo-1- naphtalène	(1,6585).

2.1.2.2. Analyse de la composition chimique des H.Es par CG/SM

Nos échantillons d'H.E ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), Cette technique est très utilisée dans l'analyse qualitative et quantitative des H.Es. L'analyse de la composition chimique des H.Es a été faite au niveau du Centre de Recherche et de Développement (C.R.D.) de SONATRACH (Boumerdes).

La chromatographie phase gazeuse (C.P.G.) est un appareil du type GC 6890 N (HP Agilent Technologies) ; équipé d'une colonne capillaire HP 5-MS (5% de phényle ; 95% diméthyle polysiloxane), de longueur : 30 m, et de diamètre interne de 0,25 mm ; l'épaisseur du film de la phase : 0,25µm. Couplé à un spectromètre de masse (SM) de type : MS-5973 N (HP Agilent Technologies) avec un détecteur Scan à impact d'électron. Les conditions analytiques sont les suivantes :

Le gaz vecteur qui constitue la phase mobile est l'Hélium réglé à un débit de 1ml/mn. Programmation de la température : La température de l'injecteur est de 250°C, et d'injection se fait en mode « Split ». Initialement la température du four est maintenue à 35°C en isotherme pendant 5mn, puis augmentation de la température se fait graduellement à raison de 5°C/mn jusqu'à 250°C. Pour le spectromètre de masse la température de détection est de 250°C. La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV, et une pression = 6,75 Psi; volume injecté est de : 0,2 µl. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse.

L'identification des constituants des huiles essentielles extraites est basée sur :

- La comparaison des spectres de masses des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature.
- En tenant compte de l'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée.
- En tenant compte de la proposition et du pourcentage de probabilité de présence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

2.2. Tests microbiologiques

2.2.1. Tests de confirmation des souches

Les souches que nous avons utilisées ont été déjà au préalable confirmées par le service maladies infectieuses de CHU de Tizi-Ouzou. Nous avons tenu de vérifier leur pureté par les caractéristiques cellulaires, par quelques tests biochimiques et cultureux.

Après ensemencement des bactéries sur leurs milieux sélectifs, la coloration de Gram est réalisée après incubation à 37°C pendant 24 heures.

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

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

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

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif. Le tableau (I) montre les observations notées.

Tableau I: Caractères morphologiques étudiés pour l'identification bactérienne.

Espèces bactériennes	Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>E. coli</i>	Gélose Hecktoen	Négatif	Coccobacille
<i>S. Enteritidis</i>	Gélose SS	Négatif	Coccobacille
<i>Ps. aeruginosa</i>	Milieu gélosé King A et King B	Négatif	Bacilles
<i>S. aureus</i>	Gélose Chapman	Positif	Coccus en grappe de raisin

2.2.2. Tests biochimiques

Des tests biochimiques complémentaires ont été réalisés pour la confirmation des souches étudiées (tableau II).

- **Test de la catalase**

Ce test permet de différencier les bactéries à Gram positif de la famille des *Micrococcaceae* qui sont catalase positive, des familles *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae* qui sont catalase négative. La catalase agit en dégradant H₂O₂ (eau oxygénée) en H₂O et oxygène qui se manifeste par un dégagement gazeux.

- **Test de la coagulase**

Le test est réalisé pour différencier les coccus à Gram positif et catalase positive. L'espèce *S. aureus* possède une coagulase libre, l'enzyme capable de coaguler le plasma oxalaté de lapin en 24h ; des autres espèces et sous espèces de staphylocoques d'origine humaine qui ne possèdent pas de coagulase libre, sauf *S. schleiferi subsp.coagulan*

- **Test de L'oxydase**

Le test de l'oxydase permet de distinguer les bactéries à Gram négatif, de la famille des *Entérobactériaceae* à oxydase négative, des *pseudomonodaceae* à oxydase positive. L'enzyme oxydase ou phényl diamine oxydase intervient dans la phosphorylation oxydative. Présence de cette enzyme chez la bactérie indique la présence de cytochrome C dans la chaîne respiratoire. Sur le disque d'oxydase imprégné de N-diméthyl paraphenylène diamine (incolore). Les bactéries qui produisent l'enzyme d'oxydase oxyde le réactif en formant l'indophénol un composé violet.

L'espèce de *Ps.aeruginosa* est la seule espèce à produire deux pigments : la pyocyanine et la pyoverdine, les autres espèces ne produisent que la pyoverdine. La production de la pyocyanine est favorisée sur le milieu King A, en donnant une couleur bleu - verte, et la pyoverdine est de couleur jaune - verte fluorescente se manifeste sur le milieu de culture king B.

Tableau II: Caractères biochimiques recherchés.

Espèces bactériennes	Catalase	Coagulase	Oxydase	Pigments
<i>E. coli</i>	NR	NR	Negative	NR
S. Enteritidis	NR	NR	Negative	NR
<i>Ps. aeruginosa</i>	NR	NR	Positive	Pyocyanine et pyoverdine
<i>S. aureus</i>	Positive	Positive	NR	NR

NR : non recherché

2.3. Conservation des souches :

A partir des souches identifiées, faire des repiquages dans des tubes de gélose de conservation en piqûre centrale et incubation à 37°C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite conservés dans le réfrigérateur à $6 \pm 1^\circ\text{C}$. Les repiquages sont réalisés tous les 15 jours.

2.4. Préparation de l'inoculum

✓ Préparation de pré-culture

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (BHIB). Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37°C pendant 18 heures.

✓ Préparation de la suspension bactérienne

A partir des cultures jeunes sur (GN). On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques

secondes. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm.

Selon Mac Farland, on admet que une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml ; la suspension d'inoculum est diluée à 1:10 dans de l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de 10^6 germes/ml.

2.5. Etude de l'activité antibactérienne

2.5.1. Test « *in vitro* »

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.Es, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatoگرامme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (BENJELALI *et al.*, 1986).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Figure: 9).

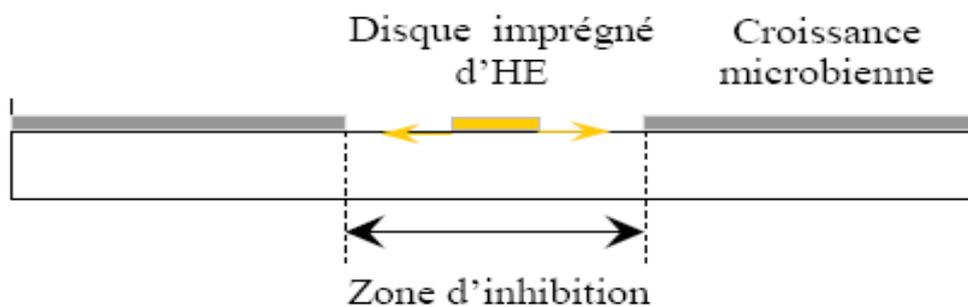


Figure 9: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatoگرامme.

2.5.1.1. Protocole expérimental

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (M.H) en surfusion dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse, 1ml de chaque suspension de culture bactérienne de concentration d'environ (10^6 UFC/ml) est préparé à partir d'une culture de 18 heures, et ensuite étalé à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'un râteau.

➤ Dépôt de disques

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose stérile cellulose (disque de référence : papier filtre MN 640w, MACHEREY-NAGEL GmbH & co. KG Germany. Diamètre : 6mm) et l'imbiber avec l'H.E à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'H.E jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5 μ l), puis déposer sur la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24

heures. Dans les boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans de l'eau distillée stérile. L'expérience est répétée trois fois pour chaque H.E et pour chaque espèce bactérienne.

➤ **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es, (PONCE *et al.*, 2003).

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

2.5.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

✓ **Méthode de dilutions en milieu solide**

L'utilisation des H.Es dans les produits alimentaires est souvent limitée par effets indésirables (odeur forte, changement de goût) qu'elles peuvent engendrer dans l'aliment. Pour cette raison, il est nécessaire de déterminer la CMI (la concentration minimale inhibitrice) de l'H.E capable d'inhiber la croissance de bactéries sans altérer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment. Selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même (CAILLET & LACROIX, 2007).

SKANDAMIS & NYCHAS (2001), la CMI est définie comme étant la plus faible concentration en H.E capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90% ; donc ne laisse survivre que 10% de la population.

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des H.Es dans des milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Plusieurs substances ont été utilisées pour cette fin. : éthanol (BEUCHAT, 1976 ; MARINO *et al.*, 2001) ; méthanol (ONAWUNMI, 1989), acétone en combinaison avec Tween-80 (PRUDENT *et al.*, 1995), Tween-20 (KIM *et al.*, 1995b ; HAMMER *et al.*, 1999 ; MANN & MARKHAM, 1998), DMSO (FIROUZI *et al.* 1998) ; propylène-glycol (NEGI *et al.* 1999), *n*-hexane (SENATORE *et al.*, 2000), le poly éthylène glycol (PINTORE *et al.*, 2002), Tween-80 (BASSOLE *et al.*, 2003), et l'agar (MANN & MARKHAM, 1998 ; DELAQUIS *et al.*, 2002 ; GILL *et al.*, 2002 et BURT & REINDERS, 2003).

Nous avons effectué des tests préliminaires sur le choix de l'émulsifiant : le tween 80 et le DMSO. Les résultats que nous avons obtenus ont révélé que le DMSO permet une très bonne dispersion des HEs dans le bouillon MH d'une part, et l'homogénéité du mélange.

CRESSY *et al.* (2003) ont indiqué que l'usage de Tween 80 dans les milieux aqueux présente l'inconvénient d'entraver les observations visuelles dues à la turbidité qu'il provoque et, il pourrait interférer dans l'activité antimicrobienne des H.Es et protégeant ainsi, les cellules cibles de son effet.

➤ **Préparation de la gamme de dilutions**

La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé. Des dilutions de demi en demi ont été effectuées dans une gamme de concentration de 500µl/ml à 0,97µl/ml de l'HE à tester (Tableau III). L'H.E est d'abord diluée dans du DMSO selon les proportions 1/9 (Emulsifiant/H.E) méthode décrite par OUSSOU *et al.*(2004).

Nous avons déterminé la CMI uniquement pour les H.Es de *C. limonum* et *C. aurantium* qui ont présenté une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *S. aureus*. Nous avons éliminé celle de *C. sinensis* en raison de sa faible activité antibactérienne. Ainsi, que les bactéries (*E. coli*, *Ps. aeruginosa* et *S. Enteritidis*) qui n'ont pas été sensibles aux H.Es de Citrus.

Tableau III : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI.

Rapport de dilution (H.E/H ₂ O)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
%	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4	0,2	0,1
µl H.E/ml	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97

➤ **Ensemencement en milieu solide**

Liquéfier le milieu MH à 95°C dans un bain marie, couler aseptiquement à raison de 15 ml de gélose par boîte de Pétri et laisser solidifier sur la paillasse. Mélanger 1ml de chaque dilution d'H.E à tester avec 3ml de gélose MH en surfusion, puis agiter manuellement les tubes. Transvaser chaque contenu des tubes dans les boîtes contenant la première couche de gélose. Après solidification du milieu, réaliser un ensemencement en surface de 1 ml de suspension bactérienne (cellules jeunes de 18 à 20 heures, en phase exponentielle) de concentration de 10⁶ UFC/ml. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en H.E où on n'observe aucune croissance bactérienne.

2.5.2. Effet inhibiteur des H.Es de Citrus sur des bactéries pathogènes inoculées sur la sardine

La concentration en H.E qui est nécessaire pour qu'elle exerce son pouvoir antibactérien dans une matrice alimentaire doit être supérieure à celle appliquée « *in vitro* ».

Burt (2004a) a suggéré que les valeurs des CMI des H.Es obtenues « *in vitro* » doivent être affectées d'un coefficient correcteur allant de 2 à 100, pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire.

Le choix du coefficient correcteur a été établi après avoir procédé à des tests préalables de dégustation avec les H.Es les plus actives (*C. limonum* et *C. aurantium*). Nous avons jugé utile de multiplier les valeurs des CMI, par un coefficient de 4.

2.5.2.1. Protocole expérimental

➤ Préparation des échantillons

La sardine est achetée fraîchement au marché local de Tizi-Ouzou. Elle est acheminée au laboratoire dans une enceinte isothermique de type glacière, puis étêtée, éviscérée, nettoyée, rincée à l'eau du robinet, laisser égouttée, conservée au réfrigérateur à ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), jusqu'au moment de l'emploi.

18 échantillons de sardine fraîche sont préparés dans des boîtes de Pétri en verre, puis ils ont été inoculés en surface à l'aide d'un écouvillon avec charge de 10^6 UFC/g de *S. aureus*. Les différents échantillons sont répartis comme suit :

Première série :

- 50 g de sardine fraîche + *S. aureus* + H.E de *C. limonum* de concentration (1 x CMI).
- 50g de sardine fraîche + *S. aureus* + H.E de *C. limonum* de concentration (4 x CMI).
- 50g de sardine fraîche + *S. aureus* (Témoin).

Deuxième série :

- 50g de sardine fraîche + *S. aureus* + H.E de *C. aurantium* de concentration (1 x CMI).
- 50g de sardine fraîche + *S. aureus* + H.E de *C. aurantium* de concentration (4 x CMI).
- 50g de sardine fraîche + *S. aureus* (témoin).

Les échantillons témoins ont été traités avec de l'eau distillée stérile. L'opération est répétée trois fois, et conservés à une température de réfrigération de $6 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 7 jours.

2.5.2.2. Analyse microbiologique

Afin de déterminer l'effet des H.Es appliquées à la sardine inoculée par la bactérie test, des analyses microbiologiques sont effectuées pour suivre la cinétique de la croissance bactérienne en présence et/ou en absence d'H.E.

Les dénombrements des bactéries sont réalisés à partir des prélèvements de deux jours (J_1 ; J_3 ; J_5 ; J_7). Pour cela, 10g de sardine sont prélevés de chaque échantillon, et introduits dans 90 ml d'eau peptonée stérile (0,1%) puis, Broyés à l'aide d'un Stomacher pendant 1min. Des dilutions décimales sont préparées à partir de la solution mère (dilution de 1ml dans 9ml d'eau physiologique). L'ensemencement de 1ml de la solution mère et ses dilutions est effectué dans des boîtes de Pétri contenant environ 15 ml de gélose sélective (Chapman). Incubation à 37°C pendant 24 heures. La lecture est réalisée par comptage direct des colonies caractéristiques pour l'espèce. Le dénombrement est exprimé en log UFC/g comme étant la moyenne de deux déterminations (Figure:10).

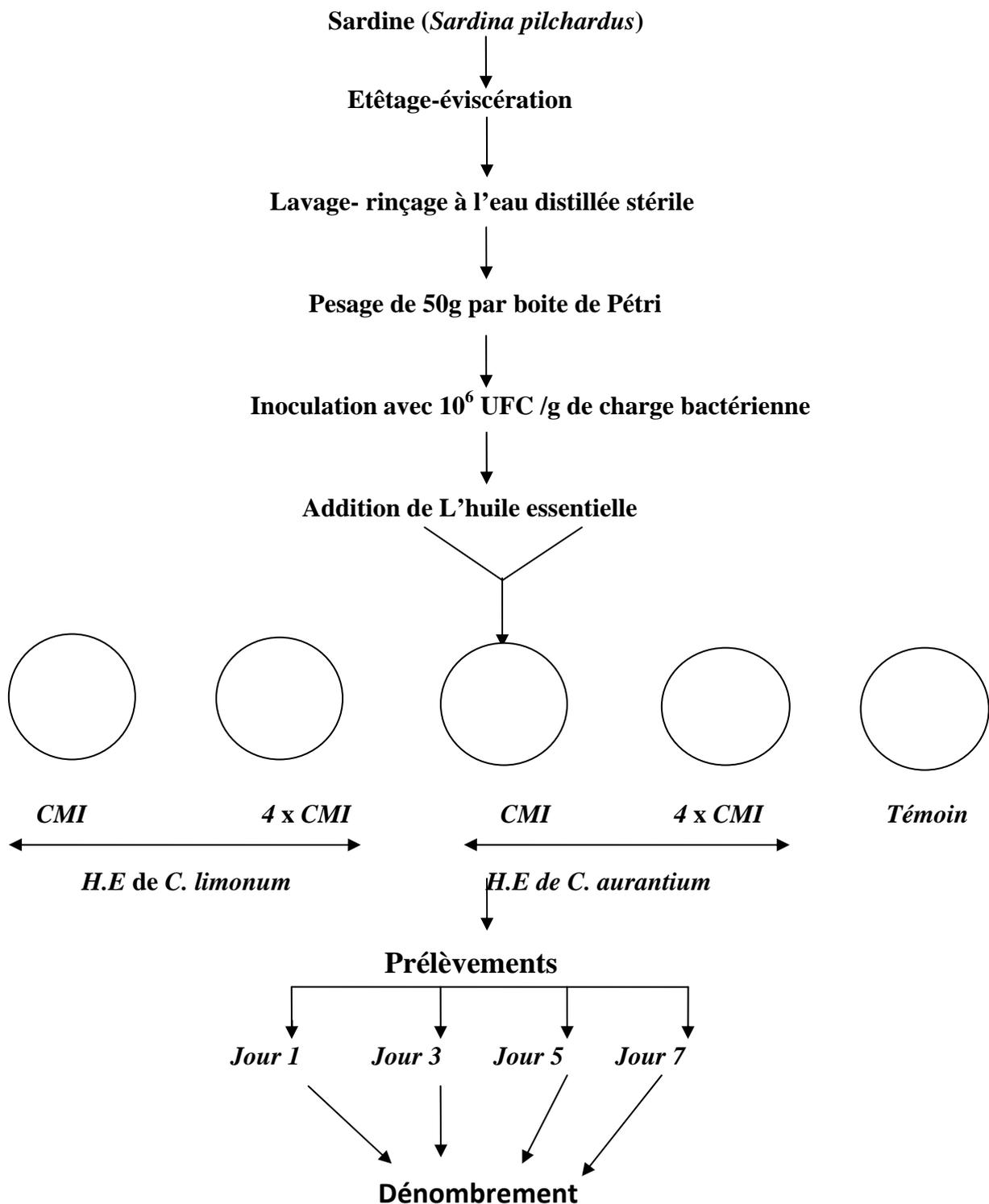


Figure 10: Schéma du test de l'activité antibactérienne des H.Es de *C. limonum* et de *C. aurantium* sur la Sardine inoculées avec *S. aureus*.

2.6. Evaluation de l'activité antioxydante

2.6.1. Méthode de sr- TBA

La méthode à l'acide thiobarbiturique est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage des composés secondaires de l'oxydation des lipides dans les produits d'origine animale. La méthode utilisée pour notre étude est celle mise au point et modifiée par (DJENANE *et al.*, 2011d).

- **Principe**

Les Produits secondaires de l'oxydation des lipides les plus couramment dosés sont les aldéhydes. L'acide thiobarbiturique (TBA) réagit avec le malonaldéhyde (MDA) pour former un complexe de couleur rose possédant un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 532 nm. Il réagit également avec d'autres aldéhydes résultant de l'oxydation des AGPI à longue chaîne. La concentration en substances réactives au TBA (sr-TBA) exprimée en équivalent MDA, est évaluée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre visible des sr-TBA extraites des échantillons par l'acide trichloracétique (TCA). Les résultats sont exprimés en valeur de TBA calculée à partir des valeurs de l'absorbance relative de chaque échantillon contre celle de l'échantillon de contrôle sur un jour. L'eau distillée est utilisée comme un blanc dans le spectromètre. Les valeurs supérieures de TBA indiquent une plus grande accumulation de sr-TBA à la suite de l'augmentation de l'oxydation des lipides dans le produit analysé.

- **Mode opératoire**

Les HE retenues (*C. aurantium* et *C. limonum*) comme étant efficaces vis-à-vis de *S. aureus* sont appliquées à des concentrations de 500, 1000, 2000 et 3000 ppm. Le suivi de taux d'oxydation se fait chaque deux jours durant 7 jours (1^{ère} jour, 3^{ème} jour, 5^{ème} jour et 7^{ème} jour).

8 échantillons de 20g de sardine ont été préparés (deux pour chaque concentration d'HE, + 4 échantillons pour le contrôle). Les différentes étapes de la mise en œuvre du test de sr- TBA sont résumées dans la (Figure:11) ci-dessous.

Les valeurs sr -TBA sont exprimées en tant qu'équivalent MDA par gramme de sardine (μ mole d' MDA/g) selon la formule suivante :

$$\text{L'équivalent de MDA } (\mu\text{mole d'MDA/g}) = (12,67 \times \text{DO}_{532} \times 5) / 2 \times 1000$$

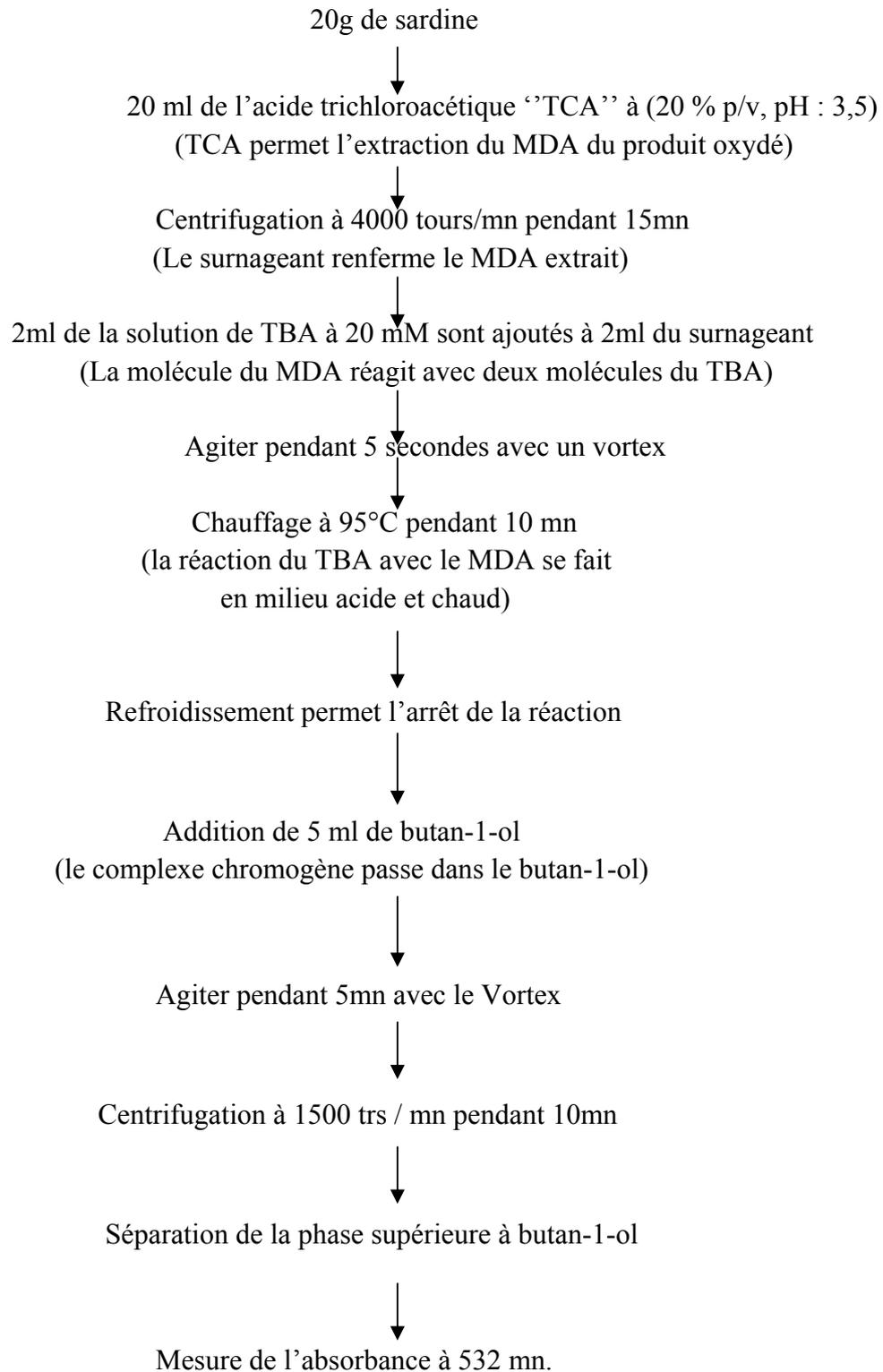


Figure 11 : Schéma de Procédure de la mise en œuvre du test de sr-TBA.

2.6.2. Courbe d'étalonnage de MDA

Pour la courbe d'étalonnage du MDA, nous avons préparé une concentration de 0,625 μM de la solution du 1, 1, 3,3-tétraéthoxy-propane (TEP, $\text{PM}=220$). Puis des dilutions $\frac{1}{2}$ sont préparées à partir de cette concentration.

Tableau IV : Détermination des différentes concentrations du TEP

Tube	Concentration du TEP (μM)	Absorbance à 532 nm
A	0,000	0,000
B	0,078	0,950
C	0,040	0,496
D	0,0195	0,193
E	0,010	0,111

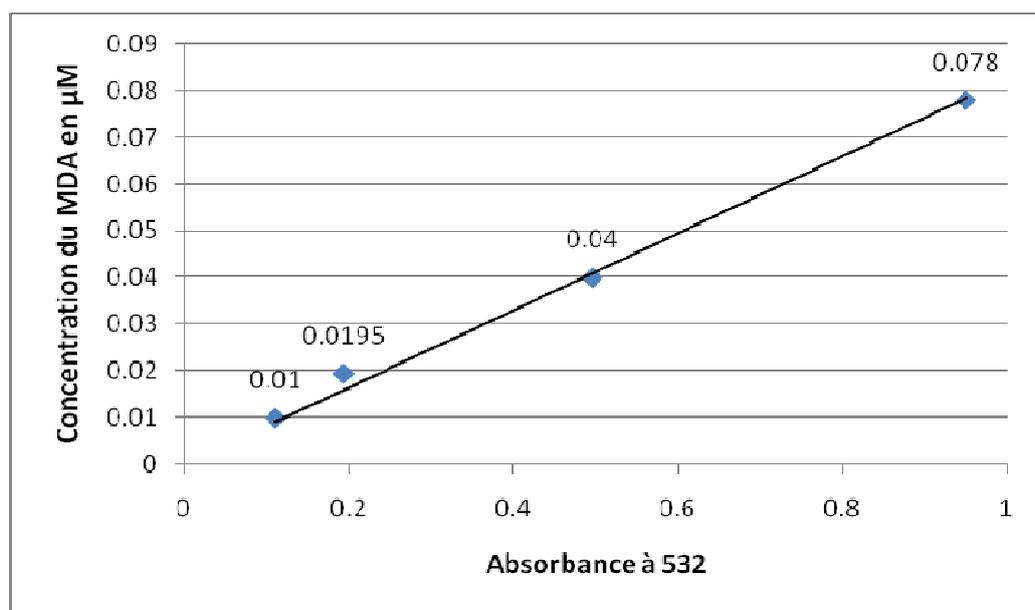


Figure 12: La courbe d'étalonnage du MDA

2.7. Analyse Statistique

L'étude de la variance a été utilisée pour déterminer les différences significatives entre les différents traitements. Les différences entre les moyennes ont été testées à travers LSD. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées significativement différentes.

Résultats et discussion

1. Huiles essentielles

1.1. Rendement

L'hydrodistillation est réalisée sur les zestes d'agrumes de trois espèces de *Citrus*: *C. limonum*, *C. sinensis* et *C. aurantium* placées dans un hydrodistillateur avec le rapport eau/matière végétale. Le (Tableau V) résume les rendements moyens en H.E extraite (moyenne±écart type).

Tableau V: Rendements en H.Es (moyenne±écart type) de *Citrus*.

Huile essentielle	<i>C. limonum</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. sinensis</i>
Rendement (%)	0,70±0,03	0,60±0,03	0,58±0,05

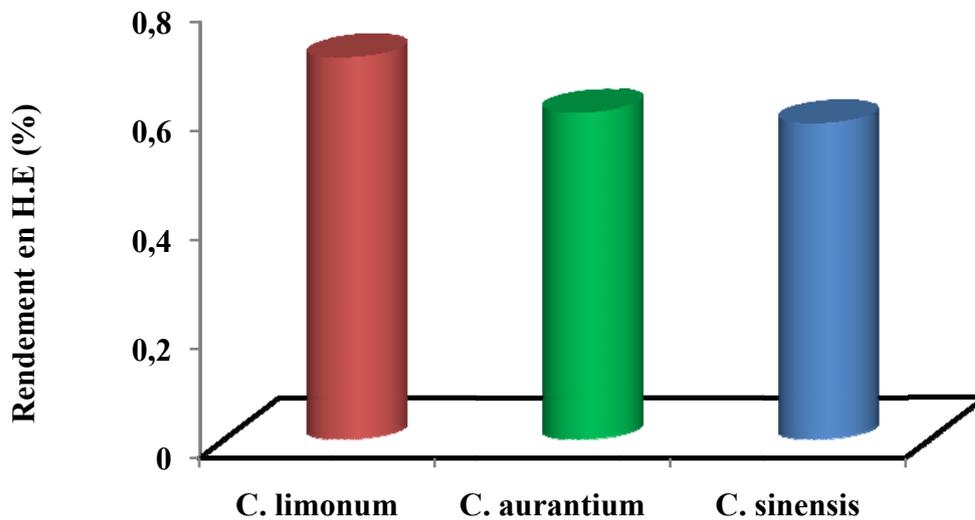


Figure 13: Pourcentage en H.Es obtenus pour: (●) *C. limonum*, (●) *C. aurantium* et (●) *C. sinensis* par la technique d'hydrodistillation.

Les résultats représentés sur la (Figure: 13), montrent que les rendements moyens en H.Es de *C. sinensis*, *C. aurantium* et *C. limonum* obtenus à l'aide d'une extraction par hydrodistillation à l'échelle du laboratoire sont de l'ordre de 0,58, 0,60 et 0,70 %, respectivement. De nos jours l'hydrodistillation reste la méthode d'extraction des H.Es la plus convoitée par l'industrie. Cependant, l'extraction par le gaz carbonique (CO₂) supercritique sous haute pression engendre des rendements supérieurs et des H.Es caractérisées par un profil organoleptique naturel, néanmoins l'utilisation de cette méthode reste limitée dans la pratique industrielle pour des raisons de rentabilité économique (GLIŠIĆ *et al.*, 2007; DJENANE *et al.*, 2011a,b).

Pour optimiser le rendement en H.E, plusieurs études ont été réalisées sur des parties végétales fraîches et, la concentration en eau du matériel végétal a été prise comme facteur de variation. Les résultats obtenus ont démontré que les rendements obtenus sont très inférieurs chez les parties végétales fraîches. Ceci pourrait être expliqué par la grande proportion d'eau présente dans le végétal. Néanmoins, les rendements ont été optimisés pour les parties végétales qui ont été préalablement séchées pendant 8 jours. Toutes les extractions qui ont été réalisées pour les parties végétales séchées au-delà de cette période de 8 jours ont engendré des rendements significativement inférieurs. Ce déclin est probablement lié à l'évaporation des composés volatils lors d'un séchage prolongé (BENDIMERAD *et al.*, 2005).

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'H.Es. Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités. En effet, JEANNOT *et al.* (2005) et FUSELLI *et al.* (2008) ont observé des rendements allant de 0,25 à 0,57% pour l'H.E de *C. aurantium*; 0,6 à 0,8% pour l'H.E de *C. sinensis* et 0,7 à 0,9% pour l'H.E de *C. limonum*. Cependant, REGA *et al.* (2003) ont rapporté que les rendements en H.Es chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%. Cette différence pourrait être expliquée selon KELEN & TEPE (2008) par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'H.E. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en H.Es (VEKIARI *et al.*, 2002),.

Pour expliquer l'impact de la technique d'extraction utilisée sur le rendement en H.E obtenu DJENANE *et al.* (2011a) ont observé des rendements nuls en H.Es de myrte et de l'*Eucalyptus*, utilisant un dispositif d'hydrodistillation à l'échelle du laboratoire, cependant les rendements en H.Es de ces deux plantes ont été améliorés de 0,056% et 0,048%, respectivement quand l'extraction a été réalisée à l'aide d'un hydrodistillateur semi-industriel chez SAIDAL, Filiale Biotic, Alger.

On peut dire que les quantités obtenues en H.Es pour les 3 espèces de *Citrus* utilisées; dans la pratique restent satisfaisantes pour mener à bien une telle étude car les quantités en H.Es nécessaires sont généralement de l'ordre des microlitres (μ l). En termes de valeurs, les trois espèces de *Citrus* utilisées ont donné des rendements presque similaires.

1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les H.Es des espèces de *Citrus* présentent un aspect liquide, limpide et jaune pâle pour le citron et jaune-orangé pour les deux espèces d'orange. Elles sont caractérisées par une odeur du zeste d'orange et du citron.

1.2.1. Densité

La densité d'une H.E constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une H.E dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, chimique, etc.). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'adultération.

Tableau VI: Valeurs des densités des H.Es de *Citrus* (moyenne±écart type).

Huile essentielle	Densité à 20°C
<i>C. limonum</i>	0,855±0,005
<i>C. aurantium</i>	0,857±0,010
<i>C. sinensis</i>	0,852±0,004

D'après les résultats (**Tableau VI**) des densités obtenues, on peut dire que les trois huiles sont conformes aux normes internationales. Selon l'Association Française de Normalisation, les H.Es appartenant aux espèces *Citrus* doivent avoir une densité maximale de 0,876 (AFNOR NF T. 75-202).

1.2.2. Indice de réfraction

Les indices de réfraction ont été calculés et ramenés à 20°C à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé Prisma-CETI convexe. Ils sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII: Valeurs des indices de réfraction à 20°C (moyenne±écart type)
des trois H.Es de *Citrus*.

Huile essentielle	Indice de réfraction
<i>C. limonum</i>	1,472±0,005
<i>C. aurantium</i>	1,476±0,007
<i>C. sinensis</i>	1,473±0,003

L'indice de réfraction c'est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Ce rapport indique la capacité des H.Es à réfléchir la lumière. Les valeurs de l'indice de réfraction de nos échantillons correspondent aux normes d'AFNOR (1,4700 - 1,4780). Elles indiquent leur faible réfraction à la lumière.

2. Analyse de la composition chimique

Dans la recherche de méthodes alternatives de lutte antibactérienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont une activité antibactérienne, antioxydante, antifongique et insecticide (DJENANE *et al.*, 2002 ; BOUSBIA, 2004 ; BOUZOUITA *et al.*, 2008; DJENANE *et al.*, 2011b). Les résultats de l'analyse de la composition des huiles testées sont obtenus par comparaison des données de la masse des spectres et des temps de rétention sont résumés dans les Tableaux VIII, IX et X.

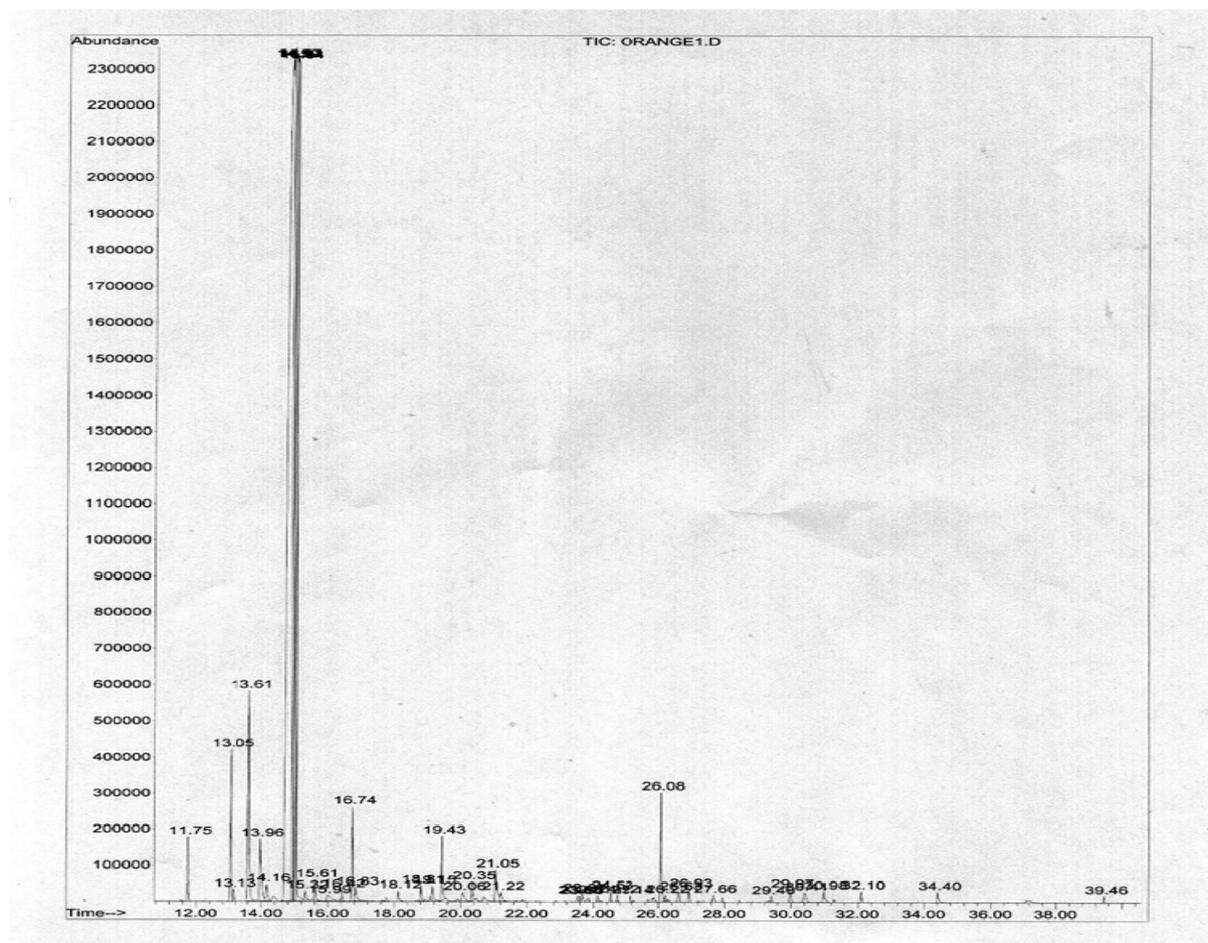


Figure 14: Profil chromatographique de L’H.E de *C. sinensis* analysée par CG/SM.

Tableau VIII: Principaux composés chimiques (%) de l’H.E de *C. sinensis* analysée par CG-SM.

Composants	Temps de rétention	%
α -pinène	11,749	0,769
β -phellandrène	13,048	1,916
β-pinène	13,612	3,454
Octanal	13,964	1,245
Limonène	14,922	77,370
β -linalol	16,738	1,216
Décanal	19,435	0,827
Naphtalène	26,074	1,417
Total		88,214

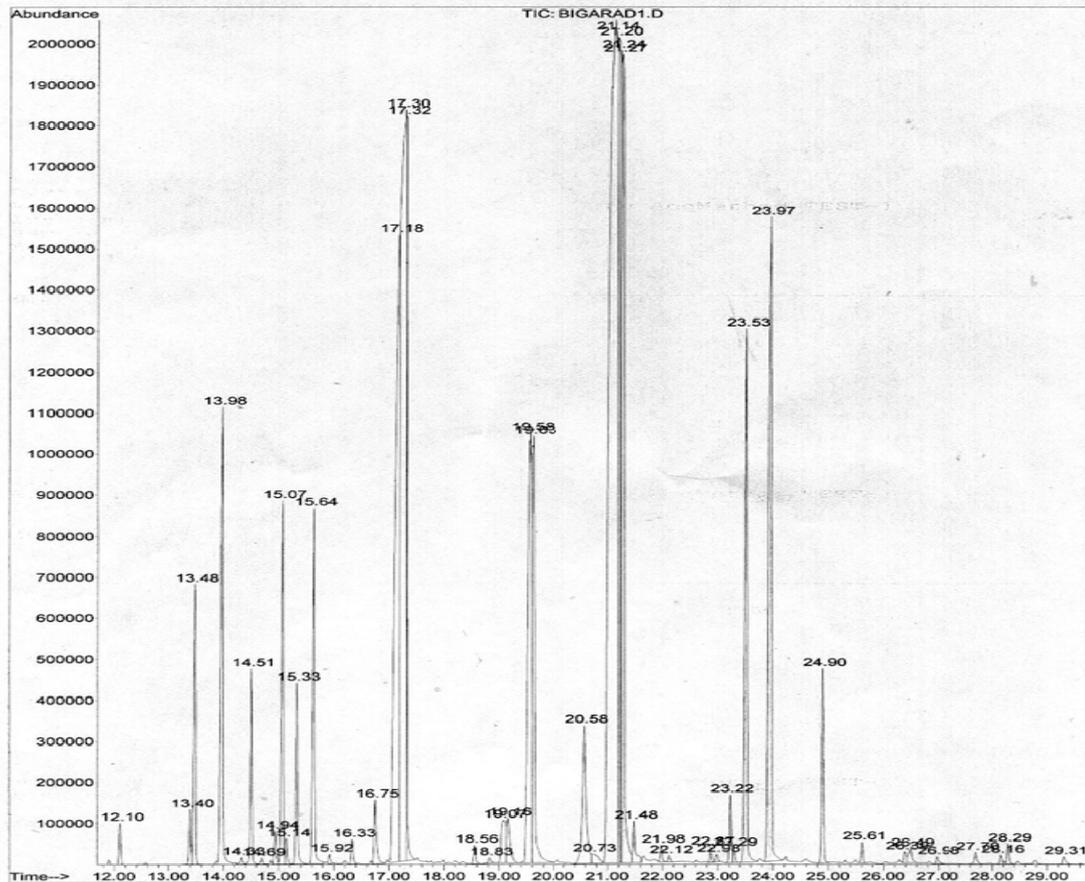


Figure 15: Profil chromatographique de L’H.E de *C. aurantium* analysée par CG/SM.

Tableau IX: Principaux composés chimiques (%) de l’H.E de *C. aurantium* analysée par CG/SM.

Composants	Temps de rétention	%
α -pinène	12,101	0,224
β -pinène	13,476	1,622
β -myrcène	13,964	3,197
Carène	14,505	1,089
Limonène	15,075	2,200
Ocimène	15,639	2,237
Linalol	17,272	23,369
Acétate de linalyle	21,250	37,288
Citral	21,485	0,339
Acétate de neryl	23,524	4,104
Acétate de géranyl	23,964	6,352
Caryophyllène	24,898	1,117
Total		83,138

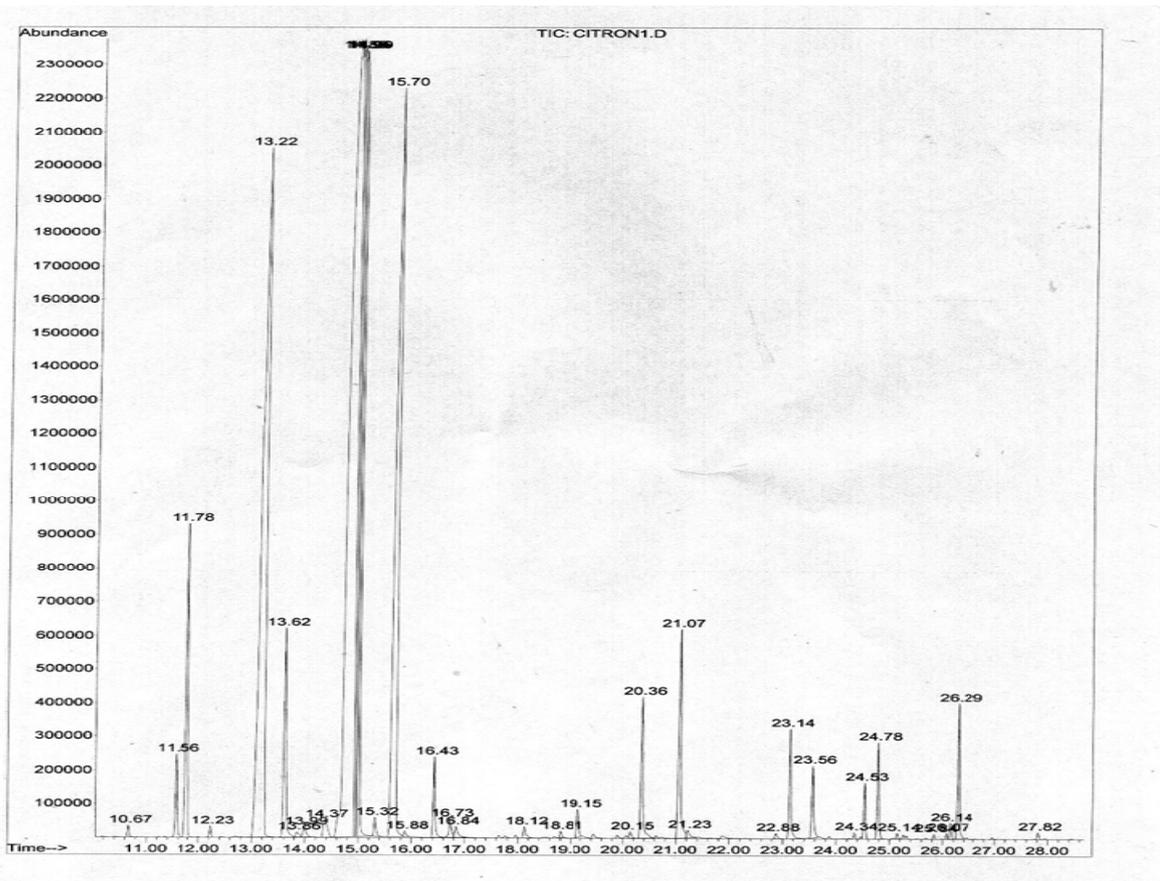


Figure 16: Profil chromatographique de L’H.E de *C. Limonum* analysée par CG/SM.

Tableau X: Principaux composés chimiques (%) de L’H.E de *C. limonum* analysée par la CG/SM.

Composants	Temps de rétention	%
α -pinène	11,767	3,070
β -pinène	13,207	17,041
β -Myrcène	13,618	2,366
Limonène	14,928	51,395
γ -terpinène	15,698	13,462
Nérol	20,367	1,496
Géraniol	21,074	2,429
Acétate de neryl	23,131	1,054
Isocaryophyllène	26,286	1,233
Total		93,546

Les résultats de l'identification qualitative et quantitative des composés chimiques par CG/SM des H.Es des 3 espèces de *Citrus* sont présentés dans les tableaux VIII, IX, et X.

L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour les trois HEs représentant 93,546%, 83,138% et 88,214% respectivement pour *C. limonum*, *C. aurantium* et *C. sinensis*. Cette analyse montre d'une part que, la plupart des substances identifiées sont des hydrocarbures monoterpéniques, et d'autre part le limonène est incontestablement le composé majoritaire des H.Es de *C. sinensis* (77,37%) et *C. limonum* (51,4%). A l'inverse l'H.E de *C. aurantium* est dominée par la présence de deux composés majoritaires: l'acétate de linanyle (37,30%) et le linalol (23,4%). Ces deux composants constituent à eux seuls 60,65% du total identifié (tableau: IX). En revanche le limonène n'est représenté qu'à une teneur de 2,20%. Les autres composés monoterpéniques identifiés pour cette même H.E ont des teneurs appréciables comme l'acétate de géranyl (6,352%), l'acétate de néryl (4,104%), β -myrcène (3,19%), ocimène (2,23%), et en quantités moins importantes on retrouve β -pinène (1,62%), caryophyllène (1,11%), carène (1,08%), α -pinène (0,22%) et le citral (0,33%).

En plus du limonène qui est le composé majoritaire de l'huile de *C. sinensis*, d'autres composés mineurs sont représentés par β -pinène (3,45%), β - phellandrène (1,9%), naphthalène (1,41%), d'octanal (1,24%), linalol (1,21%), ainsi que sous forme de traces le décanal (0,82%) et α - pinène (0,76%).

Nos résultats sont relativement différents de ceux obtenus par SOVOBODA *et* GREENAWAY (2003), sur l'orange *C. sinensis Osbeck* variété *Hongiiian* provenant de chine. La composition chimique de cette H.E est constituée principalement de limonène (93,6%) et de β - myrcène (2,0%), et de composés minoritaires tels que le décanal (0,82%), sabinène (0,7%), α -pinène (0,4%) et β - phellandrène (0,3%), et totalisant 88,21%.

En étudiant la composition chimique des H.Es de *C. sinensis* et *C. limonum* MOUFIDA & MARZOUK, (2003) ont confirmé que ces H.Es sont constituées majoritairement de limonène. Ce composé varie entre 68 à 98% pour *C. sinensis* et de 45 à 76% pour *C.limonum*, et que le linanol n'est représenté qu'à des taux faibles (0,2 et 10,23%) respectivement, ainsi que les composés néral/géranial, ensemble dénommés souvent le citral sont présents dans les H.Es de *C. limonum*, *C. sinensis*, et *C. auarntium* avec des concentrations qui varient de 0,1%, 0,7% et 3% respectivement.

L'analyse chimique de l'H.E de *C. limonum* a permis de recenser une dizaine de composés dont le limonène, β -pinène et γ -terpinène sont des composés majoritaires représentés avec des pourcentages de 51,4%, 17,04%, et 13,46% respectivement, suivis par d'autres molécules à faibles teneurs comme α - pinène (3,07%), géraniol (2,42%), β -myrcène (2,36 %), nérol (1,49%) d'isocaryophyllène (1,23%) et l'acétate de néryl (1,05%). L'ensemble de ces constituants contribuent au mélange à concurrence de 93,54%.

Nos résultats concernant le profil chimique de l'huile de *C. limonum* concordent avec ceux de VEKIARI *et al.* (2002) qui ont montré que les essences de citron sont caractérisées par des concentrations élevées en β -pinène, γ -terpinène et α -pinène (21,2%, 17,4%, et 9,8%) respectivement.

Il est à noter d'après cette analyse que les composés acycliques comme le nérol et le géraniol sont identifiés uniquement dans l'H.E de *C. limonum*. En accord avec nos résultats GANCEL *et al.* (2005) ont constaté l'absence de ces deux composés dans les essences de *C. sinensis* et *C. aurantium*.

Plusieurs investigations de MOUFIDA & MARZOUK (2003); BELLETI *et al.*, (2004); REHMAN *et al.*, (2004) ont démontré que, généralement les H.Es de *Citrus* sont constituées principalement de composés monoterpéniques (97%). Alors que les autres composés comme les alcools, les aldéhydes et, les esters ne sont représentés qu'avec des teneurs faibles allant de 1,8 à 2,2%.

En étudiant la composition chimique des HEs de *Citrus*, NOGATA *et al.* (2006) ont conclu qu'en plus des monoterpènes, ces H.Es renferment des acides gras en quantités assez faibles (0,8%). L'acide linoléique est l'acide gras principal de *C. sinensis*; l'acide linoléique est retrouvé dans *C. limonum* et l'acide oléique dans *C. aurantium*. Les flavonoïdes se retrouvent dans des huiles de *Citrus* et composent la partie non volatile des huiles et ils sont utiles dans la différenciation entre les espèces d'agrumes.

Selon SENATORE *et al.* (2000), les variations rencontrées dans la composition chimique des H.Es, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs: le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et, la présence de chemotypes. En effet, (WOLFORD *et al.*, 1971; SHAW, 1979; BOELENS, 1991; SMITH *et al.*, 2001) ont distingué que les H.Es de *C. limonum* pourrait être de chimiotypes β -pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, et citronellal; *C. aurantium* de chimiotypes limonène, linalol, decanal, et *C. sinensis* de chimiotypes D-limonène, géraniol, linalol, citral, citronellal, terpinéol et decanal.

Il faut noter aussi que selon MINH *et al.* (2002), la maturité du fruit a un impact important sur la composition chimique de l'huile essentielle. Ainsi, les terpènes sont exclusivement présents dans l'H.E du fruit non mûr, à mesure que le fruit mûrisse les concentrations en aldéhydes, les terpènes oxygénés et sesquiterpènes aliphatiques augmentent.

3. Activité antibactérienne « *in vitro* »

3.1. Aromatogramme

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es de *Citrus* sur la croissance des souches bactériennes testées: *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* et, *S. Enteritidis*, sont représentées dans le tableau XIV et les Figures: 17, 18, 19 et 20.

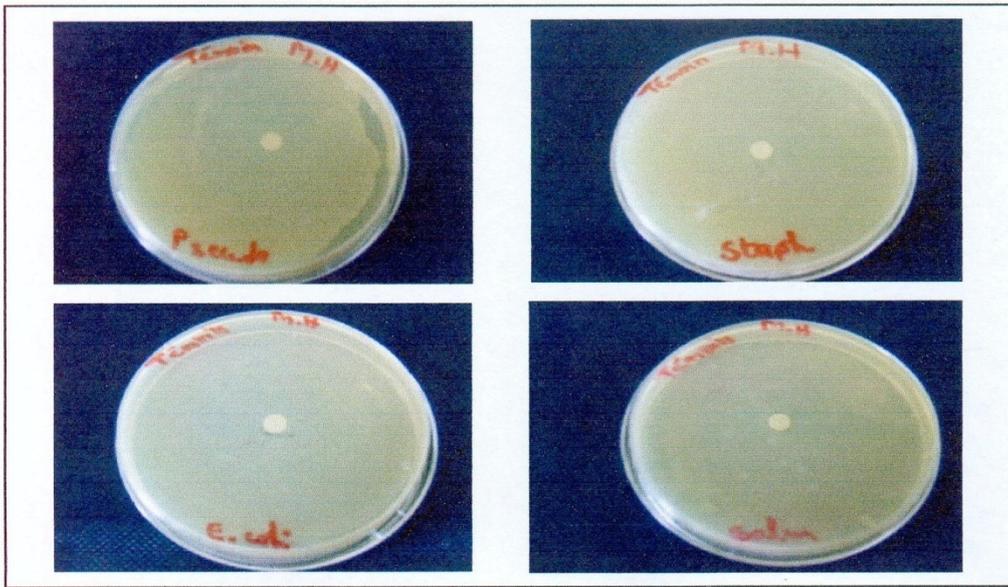


Figure 17: Photos des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose.

3.1.1. Essai avec l'H.E de *C. limonum*



Figure 18: Photos montrant l'effet de l'H.E de *C. limonum* sur: *E. coli*, *S. aureus* et *Ps. aeruginosa* (\varnothing =halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose).

Tableau XI: Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne \pm écart type) provoqués par l'H.E de *C. limonum*.

	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
\varnothing d'inhibition (mm)	6,0 \pm 0,0	30,33 \pm 1,53	6,0 \pm 0,0	8,33 \pm 0,6
Sensibilité	Résistante	Extrêmement sensible	Résistante	Résistante

*Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

3.1.2. Essai avec l'H.E de *C. aurantium*

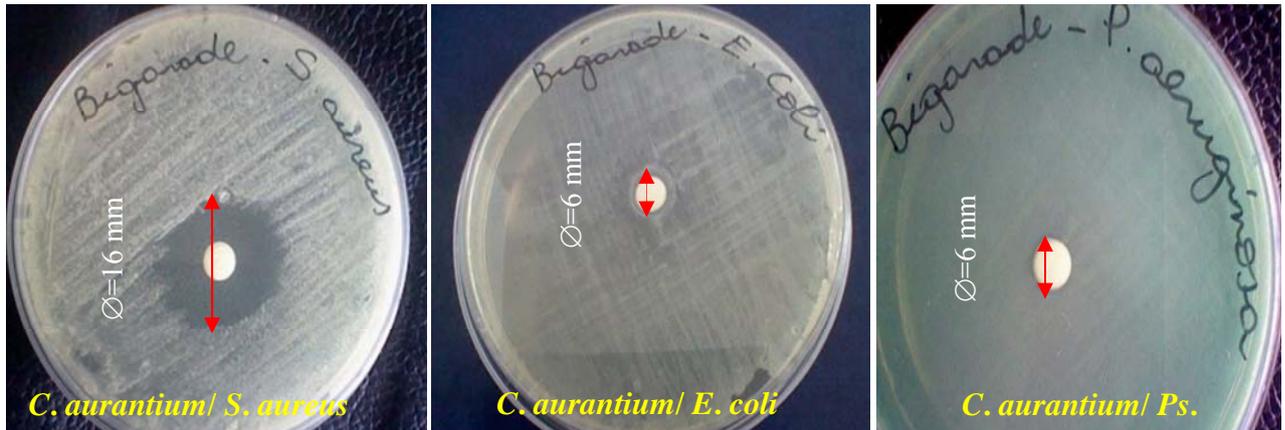


Figure 19: Photos montrant l'effet de l'H.E de *C. aurantium* sur: *E. coli*, *S. aureus* et *Ps. aeruginosa* (\varnothing =halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose)

Tableau XII: Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne±écart type) provoqués par l'H.E de *C. aurantium*.

	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Ø d'inhibition (mm)	6,0±0,0	16,0±1,0	6,0±0,0	6,0±0,0
Sensibilité	Résistante	Très sensible	Résistante	Résistante

*Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

3.1.3. Essai avec l'H.E de *C. sinensis*



Figure 20: Photos montrant l'effet de l'H.E de *C. sinensis* sur: *E. coli*, *S. aureus* et *Ps. aeruginosa* (\emptyset =halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose).

Tableau XIII: Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne±écart type) provoqués par l'H.E de *Citrus sinensis*.

	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Ø d'inhibition (mm)	6,0±0,0	11,66±1,53	6,0±0,0	8,0±0,0
Sensibilité	Résistante	sensible	Résistante	Résistante

*Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition

Tableau XIV: Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne ± écart type) des H.Es de *Citrus*.

	<i>C. limonum</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. sinensis</i>
<i>S. aureus</i>	30,33±1,53	16,0±1,0	11,66±1,53
<i>Ps. aeruginosa</i>	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00
<i>E. coli</i>	8,33± 0,6	6,0±0,00	8,0±0,00
<i>S. Enteritidis</i>	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00

La sensibilité des bactéries aux H.Es est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (Figures: 18, 19 et 20).

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antimicrobienne « *in vitro* » obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne des H.Es testées est en fonction de la bactérie cible. Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Ps. aeruginosa*, et, *S. Enteritidis*. Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.Es de *Citrus*. En revanche la souche d'*E. coli* a manifesté une résistance relative vis-à-vis de *C. limonum* et *C. sinensis* malgré les faibles zones d'inhibitions observées (8,33 et 8 mm respectives).

Un fait saillant pourrait être dégagé de ces résultats et qui concernent *S. aureus*. En effet, cette bactérie a manifesté une certaine sensibilité variable à ces H.Es. L'H.E de *C. sinensis* a montré l'activité antibactérienne la plus faible par rapport aux H.Es de *C. limonum* et *C. aurantium*, avec un diamètre d'inhibition moyen de 11,66 mm. Quant à l'H.E de *C. aurantium* a présenté une activité antibactérienne modérée dont le diamètre de la zone d'inhibition est situé à 16 mm. Il est à noter que l'activité antimicrobienne la plus élevée a été enregistrée avec l'H.E de *C. limonum* avec une valeur moyenne de l'auréole d'inhibition de 30,33 mm. Ces résultats concordent avec les travaux de LAMBERT *et al.* (2001) qui ont testé l'effet antibactérien des polyphénols de plusieurs plantes contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les résultats ont indiqué que *S. aureus* était plus sensible que *S. Enteritidis* et *E. coli*. Pour sa part, DE BILLERBECK (2007) a rapporté que *S. aureus* a présenté une sensibilité variable envers les H.Es de quelques espèces de *Citrus* testées, en effet, les H.Es de bergamote, de citron et du petit grain de bigarade ont montré des zones d'inhibition de 30 mm, 12 mm et de 20 mm, respectivement. Des résultats similaires ont été enregistrés avec d'autres types d'H.Es par AKIN *et* AKTUMSEK (2009), en testant l'H.E d'*Eucalyptus camaldulensis* contre *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* et *E. coli*, ces auteurs ont indiqué que *S. aureus* était la seule à montrer une certaine sensibilité à l'H.E. Cette sensibilité plus marquée des bactéries à Gram positif (*S. aureus*) vis-à-vis des H.Es a été aussi déjà observée par plusieurs auteurs (COX *et al.*, 2000; FREIDMAN *et al.*, 2002; BURT, 2004b; LEFSIH *et al.*, 2010 et IDIR, 2010). Ainsi, OUSSALAH *et al.* (2007), ont remarqué que *S. aureus* était quatre fois plus sensible qu'*E. coli* et *S. Typhimurium* à l'action de l'H.E de la sarriette.

Contrairement à nos résultats, plusieurs auteurs ont démontré que les bactéries à Gram (-) peuvent être sensibles à l'action des H.Es. MOREIRA *et al.* (2005), ont montré que l'H.E de *C. limonum* était efficace contre 3 souches d'*E. coli* avec des diamètres des halos d'inhibition variant de 9 à 12 mm.

PICCAGLIA *et al.* (1993) ont étudié le pouvoir antibactérien de l'H.E de la sarriette (*Satureja montana*) à chimiotype carvacrol (41%) contre *Ps. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus*. Ils ont enregistré des activités variables de la sarriette envers les bactéries cibles. En effet, *Ps. aeruginosa* à Gram (-) a montré une certaine résistance à l'H.E ($\varnothing=7,1$ mm), par contre *E. coli* (Gram -) et *S. aureus* (Gram +) ont montré une sensibilité qui va du sensible ($\varnothing=10,5$ mm) au très sensible ($\varnothing=15,4$ mm), respectivement.

SMITH-PALMER *et al.* (1998), en utilisant la méthode de puits sur milieu gélosé, ont rapporté que l'H.E de lime était plus efficace contre *S. Enteritidis* (Gram -), qu'avec l'H.E de citron pour *S. aureus*.

Par ailleurs DORMAN & DEANS (2000), ont révélé une importante activité de l'H.E d'*Origanum vulgare* contre *E. coli* ($\varnothing=24,30$ mm) et *S. aureus* ($\varnothing=33,18$ mm). Dans le même contexte GHALEM & MOHAMED (2008) ont rapporté des résultats en testant la sensibilité de *S. aureus* et *E. coli* aux différentes concentrations d'H.E d'*Eucalyptus globulus* (5 μ l, 7,5 μ l, 10 μ l et 20 μ l); les halos d'inhibition obtenus étaient de l'ordre de: 16, 25, 29, et 40 mm pour *S. aureus* et de 13, 15, 20 et 24 mm pour *E. coli*.

Récemment, LEFSIH *et al.* (2010) ont réalisé des travaux « *in vitro* » sur l'utilisation de cinq H.Es en l'occurrence *Saturiae hortensis*, *Lavendula angustifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita* et *Pistacia lentiscus* contre *S. Enteritidis*. Les auteurs de ces travaux ont observé des sensibilités variables de la bactérie cible envers les H.Es appliquées. En effet, les diamètres d'inhibition bactérienne ont été de 51, 41, 35, 26 et 14 mm, respectivement pour *S. hortensis*, *L. angustifolia*, *E. globulus*, *M. piperita* et *P. lentiscus*. Ainsi, dans l'étude réalisée par IDIR (2010) a montré que sur cinq espèces bactériennes (*S. aureus*, *S. Paratyphi A*, *Bacillus cereus*, *E. coli* et *Shigella flexneri*); *S. aureus* était l'espèce la plus sensible à l'action des H.Es testées (Sarriette, Menthe poivrée, Myrte, Eucalyptus, Lentisque, Lavande et Citron). En revanche, *S. paratyphi* a manifesté une résistance à l'action de ces H.Es sauf à celle de la sarriette (37,6 mm).

En comparant les données obtenues des différentes études, la plupart des publications font état d'une généralisation de l'activité antibactérienne d'une H.E, ou d'un extrait de plante contre les bactéries à Gram (+) et à Gram (-).

D'après KALEMBA & KUNICKA (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux H.Es dépend des propriétés de l'H.E et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux H.Es que les bactéries à Gram (-). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des H.Es confirment ce phénomène (POOLE, 2001 ; CIMANGA *et al.*, 2002 ; BURT, 2004b; BEKHECHI *et al.*, 2008).

Selon (POOLE, 2001 ; BURT, 2004a ; BUSATTA *et al.*, 2008), la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux H.Es est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+).

À l'inverse, CELIKEL & KAVAS (2008) ont souligné, que l'action des H.Es volatiles a peu d'influence sur l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram (-) et Gram (+). Cependant, quelques H.Es semblent être plus spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries à Gram (+) que sur Gram (-). Les mécanismes d'action des H.Es et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés.

Les principaux composants actifs des H.Es contre les agents pathogènes d'origine alimentaire contiennent généralement 1% des composés phénoliques tels que le carvacrol, l'eugénol, et le thymol (DORMAN & DEANS, 2000 ; LAMBERT *et al.*, 2001) ; le citral, 1,8-cinéole et le linalol (CRISTIANI *et al.*, 2007). Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires ; dégradation de la paroi cellulaire (HELANDER *et al.*, 1998), dommages de la membrane

cytoplasmique (KNOBLOCH *et al.*, 1989 ; ULTEE *et al.*, 2002), dommages des protéines membranaires (JUVEN *et al.*, 1994 ; ULTEE *et al.*, 1999), fuites du contenu des cellules (OOSTERHAVEN *et al.*, 1995 ; LAMBERT *et al.*, 2001), coagulation du cytoplasme et l'épuisement de force motrice des protons (ULTEE & SMID, 2001).

Il est à noter aussi, qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur des composants chimiques et l'activité antibactérienne des H.Es de *Citrus* testées. En effet, le limonène constitue le composant majoritaire de l'H.E de *C. sinensis*. Il s'avère d'après les tests antibactériens « *in vitro* » que l'H.E de *C. sinensis* à chimiotype limonène (77,4%) a démontré une efficacité antimicrobienne inférieure à celle de l'H.E de *C. aurantium* relativement pauvre en limonène (2,20%). D'après ces observations, il est évident que le limonène n'a exercé aucune influence sur le potentiel antibactérien des H.Es testées.

Nos observations rejoignent celles qui ont été faites par INOUYE *et al.* (2001), que les H.Es contenant du phénol ou de l'alcool comme composés majoritaires étaient plus actives, que celles contenant le limonène (hydrocarbure monoterpénique) comme composé majoritaire. Ces mêmes observations ont été également partagées par DORMAN & DEANS, (2000), qui ont montré que les hydrocarbures monoterpéniques, abondants dans les H.Es de *Citrus* contenant le limonène comme constituant principal est faiblement inhibiteur contre une panoplie de microorganismes.

Les travaux de GHALEM & MOHAMED, (2008), ont indiqué que les composés présents dans les plus grandes proportions peuvent ne pas être nécessairement responsables de l'activité antibactérienne des H.Es. Ainsi, l'H.E d'*Eucalyptus deglupta*, dont les composés 1,8-cinéole et α -pinène sont représentés à des pourcentages de 30% et de 5% respectivement. Cette H.E a montré le spectre d'activité antibactérienne semblable à celui de H.E de l'espèce d'*Eucalyptus alba* qui présente les mêmes composés à des faibles concentrations: 1,8-cinéole (10%) et α -pinène de 2,5%. Les mêmes résultats ont été mentionnés pour l'H.E d'*Aframomum sptipulatum* (thymol à 10%) comparée à celle de l'H.E de *M. myristica* (thymol à 1%). *Eucalyptus camadulensis* (cryptone à 2%) comparée à *Eucalyptus deglupta* (cryptone à 20%).

Et selon DELAQUIS *et al.* (2002) ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines H.Es pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à de faibles taux non négligeables tels que: le nérol, le néral, bornéol, linanol, cinnamaldehyde, carvacrol, géraniol, myrténal et eugénol connus pour exhiber une activité antibactérienne impliquées dans les phénomènes de synergie entre les différents constituants qui peuvent être à l'origine d'une activité antimicrobienne beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires.

Ainsi, les effets antibactériens des H.Es de *Citrus* ont été expliqués principalement par la présence des terpènes C₁₀ et C₁₅, les hydroxyles des groupements phénoliques sont capables de se lier aux sites actifs des enzymes cibles par des liaisons d'hydrogène. Les alcools terpéniques (trans-pinocarvenol, borneol, linalol, p-cymène-8-ol, α -terpinéol etc.) sont connus par leur fort pouvoir antimicrobien, dû à leur solubilité dans l'eau, ce qui leur confère une haute habilité à pénétrer les parois des cellules bactériennes (BELLETI *et al.*, 2004).

INOUYE *et al.* (2001), ont rapporté que les alcools aliphatiques par exemple: le linanol possède une activité modérée sur plusieurs bactéries. La position de groupe fonctionnel de l'alcool s'est avérée importante dans l'activité antimicrobienne, par exemple le terpinène-4-ol est plus actif contre *Ps. aeruginosa*, que le terpinéol. D'autre part, les esters peuvent aussi

participer à l'effet antimicrobien, tels que: l'acétate de géranyl, acétate de néryl et α -terpenyl qui possèdent une grande activité antibactérienne. D'après ces mêmes auteurs ont rapporté que l'analyse chimique de l'H.E de lavande a révélée que les composés majeurs identifiés sont l'acétate de linalyle (36,6%) et le linalol (30,1%). Afin de connaître le composé le plus actif parmi les deux, ils ont procédé par comparaison de l'activité antibactérienne des deux composants séparément. Ils ont constaté que l'acétate de linalyle n'est pas l'élément le plus actif, et que le contribuant actif était le linalol. En revanche, d'après DORMAN & DEANS, (2000), ont démontré que l'acétate de géranyl est plus actif que le géraniol contre une gamme d'espèces de bactéries à Gram (+) et à Gram (-).

Cependant la comparaison de l'efficacité des H.Es à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables: comme la composition chimique des H.Es qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce. Donc les activités antimicrobiennes d'une H.E peuvent changer par sa composition chimique, par les génotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution) les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différents; selon le choix et conditions physiologiques des microorganismes, la période de l'exposition du microorganisme à l'H.E, aux doses d'H.E utilisées, le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les H.Es. Ceux-ci autant de facteurs pouvant expliquer parfois des résultats contradictoires des différentes études.

3.2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats des CMI des H.Es testées sont représentés dans (le tableau XV).

Tableau XV: Les valeurs des CMI des H.Es testées sur *S. aureus* en (μ l/ml).

Huiles essentielles	CMI (μ l/ml)	Pourcentages (%)
<i>Citrus aurantium</i>	1,95	0,2
<i>Citrus limonum</i>	3,90	0,4

Les résultats de la diffusion sur gélose ont montré que parmi les trois H.Es testées, l'H.E de *C. sinensis* est caractérisée par une faible activité antimicrobienne par rapport aux autres huiles. En revanche les H.Es de *C. limonum* et *C. aurantium* ont révélé une activité antibactérienne intéressante. Les CMI ont été calculées uniquement pour les H.Es qui ont préalablement exhibé un effet antibactérien important. Ainsi, et pour des raisons de performance antimicrobienne, les H.Es sélectionnées sont *C. limonum* et *C. aurantium*. Cependant, d'après les résultats d'aromatogrammes, *S. aureus* est la seule bactérie parmi l'ensemble des bactéries testées qui a révélé une sensibilité importante envers les H.Es de *Citrus*.

L'H.E de *C. limonum* a montré un effet inhibiteur à la dilution de 0,4% ce qui correspond à une concentration équivalente à 3,90 μ l/ml, par contre pour l'H.E *C. aurantium*

l'effet inhibiteur a été observé à la dilution de 0,2% correspondant à la concentration de 1,95 µl/ml. D'après les CMI obtenues l'H.E de *C. aurantium* a montré une meilleure performance antimicrobienne par rapport à l'H.E de *C. limonum* vis-à-vis de *S. aureus*.

OUSSALAH *et al.* (2007) ont réalisé une étude sur la détermination des CMI de plusieurs H.Es vis-à-vis de *S. aureus*. Ils ont rapporté que parmi vingt huit (28) H.Es testées, vingt six (26) ont exhibé une CMI $\leq 0,4\%$ vis-à-vis de la bactérie cible.

SMITH-PALMER *et al.* (1998) ont étudié l'activité antimicrobienne de deux H.Es de *Citrus* (orange douce et lime) contre deux types de bactéries à Gram négatif (*S. Enteritidis*) et Gram positif (*S. aureus*) en utilisant la méthode de diffusion sur gélose en puits. Les résultats obtenus ont montré que l'H.E d'orange douce est active sur *S. Enteritidis*, et celle de lime présente un effet antibactérien sur *S. aureus* avec des CMI de 6,4 mg/ml, et 12,8 mg/ml respectivement. Pour sa part, MOREIRA *et al.* (2005), ont testé l'effet antibactérien de l'H.E de *C. limonum* contre *E. coli*. Les résultats ont montré une CMI de 2,5 mg/ml vis-à-vis de cette bactérie.

NAZER *et al.* (2005) ont évalué les composants les plus actifs des H.Es de *Citrus* en l'occurrence le citral à 0,5%, et le linalol à 3,5% contre les souches de *Shigella sonnei* et de *Salmonella sp.* avec une charge initiale de 5 log₁₀ UFC/ml. Le citral a réduit approximativement de 10% la charge microbienne, alors que la molécule de linalol a inhibée totalement la population microbienne après 2 heures de contact direct. Egalement, l'effet antibactérien des H.Es de citron, de l'orange douce, de la bergamote et leurs composants : le linalol et le citral ont été étudiés « *in vitro* » par contact direct contre *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*), *E. coli O157 H: 7*, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Le linalol et le citral ont présenté des CMI allant de 0,06, à 0,125 (v/v), (KIM *et al.*, 1995b; FISHER & PHILLIPS, 2006). Dans le même contexte FUSELLI *et al.* (2008) ont estimé des valeurs de CMI respectivement de 839,9 mg/l et 763,8 mg/l pour les H.Es de *C. sinensis* et *C. limonum* contre *Paenibacillus larvae*, et par conséquent, ces deux huiles sont caractérisées par une faible performance antimicrobienne vis-à-vis du microorganisme à cause de leurs CMI élevées.

BEKHECHI *et al.* (2008) ont rapporté que *Ps. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, et *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*) se révèlent résistantes à l'action de l'H.E d'*origanum glandulosum*. Cette huile présente des CMI de 15980, 2180 et 2350 µg/ml respectivement, vis-à-vis des 3 bactéries. Par contre *Proteus mirabilis* (*P.mirabilis*), *E. coli*, *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) et *Citrobacter fundii* (*C. fundii*) sont inhibées à des CMI plus faibles allant de 930 à 1660 µg/ml. D'après ces mêmes auteurs *S. aureus* est la souche la plus sensible avec des CMI situées entre 480 et 660 µg/ml.

Il est également intéressant de mentionner pour des H.Es, telles que la sauge (espèce de *Salvia*), l'aneth (*Anethum graveolens*), le citron (*C. limonum*), l'orange (*C. aurantium*, *C. sinensis*), la bergamote (*Citrus bergamia*), l'estragon (*Artemisia dracuncululus*), le niaouli (*Melaleuca quinquenervia*), le thé (*Melaleuca alternifolia*), le safran (*Curcuma longa*), le basilic (*Ocimum basilicum*), le céleri (*Apium graveolens*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*) n'ont que peu ou pas d'effet antimicrobien contre *Pseudomonas putida* (BAGAMBOULA *et al.*, 2003). Contrairement à ces observations, HAMMER *et al.* (1999) ont rapporté que les H.Es d'origan et du piment ont inhibé le développement « *in vitro* » de *Ps. aeruginosa*, réputée très résistante, lorsqu'elles sont appliquées à une concentration de 1%

(v/v). En appui à cette dernière observation, DELAQUIS et *al.* (2000) ont estimé des valeurs de CMI contre *Pseudomonas fragi* à 0,3 % (v/v) pour l'H.E d'*Eucalyptus*, et à 0,15% pour l'H.E de coriandre.

Dans une étude récente IDIR (2010), a testé l'efficacité antibactérienne des H.Es de *Saturja hortensis*, *Mentha piperita*, *Lavandula angustifolia* vis-à-vis d'*E. coli*, *Sh. Flexneri*, *S. paratyphi A*, *S. aureus* et *B. cereus*. Ce même auteur a constaté que l'H.E de *S. hortensis* a montré un effet inhibiteur très prononcé sur l'ensemble des bactéries testées par rapport à l'H.E de *L. angustifolia*. Avec des CMIs de l'ordre de (5,02 à 8,06µl/ml) pour l'H.E. de *S. hortensis*. *S.aureus*, *B. cereus* et *E. coli* sont sensibles à l'H.E de *M. piperita*, avec des concentrations allant de (16,94 à 111 µl/ml), en revanche l'H.E de *L. angustifolia* a un effet uniquement sur *B. cereus* et *S.aureus* à la CMI de (250 µl/ml).

3.3. Activité antibactérienne des H.Es de *C. limonum* et de *C. aurantium* appliquées sur la sardine (*Sardina pilcardus*)

En raison de l'utilisation des écorces d'agrumes en gastronomie et en médecine traditionnelle, cette étude visait en premier lieu à déterminer l'efficacité antibactérienne « *in vitro* » des HEs obtenues à partir de ces espèces végétales cultivées dans la région de Tizi-Ouzou et en deuxième lieu évaluer leur application sur un produit de la pêche largement consommé en Algérie pour tester leur efficacité antimicrobienne.

En se basant sur les résultats obtenus « *in vitro* », nous avons pu suivre la cinétique de développement de *S. aureus* inoculé dans la sardine en présence des deux huiles essentielles de *C. limonum* et de *C. aurantium*. Les autres souches à savoir *E. coli*, *Ps. aeruginosa* et *S. Enteritidis* ont été écartées, puisque dans les tests « *in vitro* » se sont révélées insensibles aux H.Es testées.

Les Figures 21 et 22 montrent les résultats de développement de *S. aureus* sur le poisson conservé à $6 \pm 1^\circ\text{C}$ en présences de différentes concentrations en H.Es de *C. limonum* et *C. aurantium*. D'après ces résultats, il ressort que l'effet antibactérien exercé est proportionnel à la concentration de chaque H.E rajoutée sur le produit.

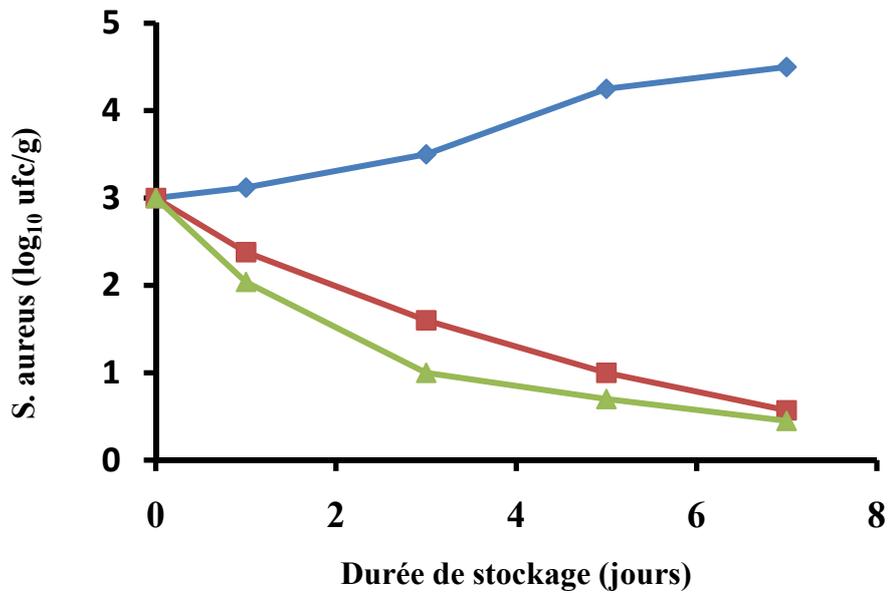


Figure 21: Effet inhibiteur de l’H.E de *C. limonum* à différentes concentrations vis-à-vis de *S. aureus* inoculée sur la sardine (*Sardina pilcardus*) pendant le stockage à $6\pm 1^{\circ}\text{C}$: (♦) Témoin; (■) *C. limonum*: 1×CMI; (▲) *C. limonum*: 4×CMI.

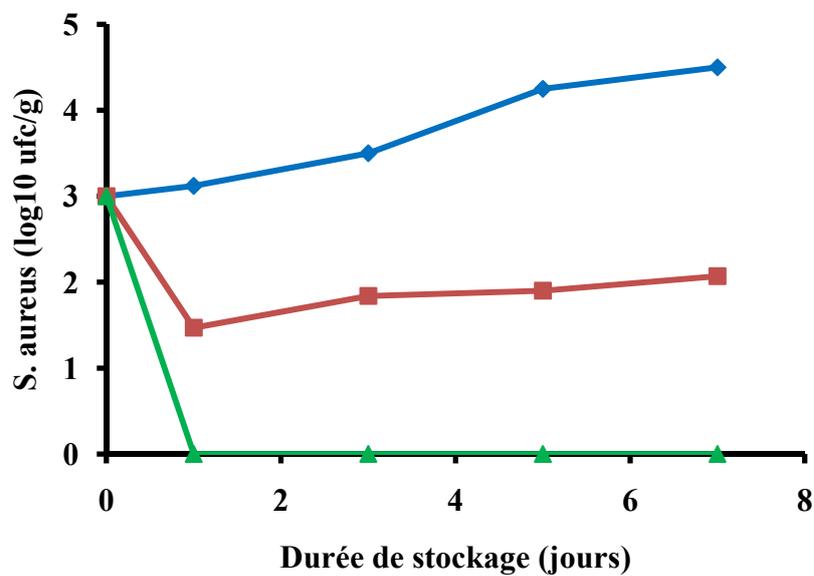


Figure 22: Effet inhibiteur de l’H.E de *C. aurantium* à différentes concentrations vis-à-vis de *S. aureus* inoculée sur la sardine (*Sardina pilcardus*) pendant le stockage à $6\pm 1^{\circ}\text{C}$: (♦) Témoin; (■) *C. aurantium*: 1×CMI; (▲) *C. aurantium*: 4×CMI.

Les figures (21 et 22) montrent que le nombre de *S. aureus* sur les poissons non supplémentés (témoins) avec des H.Es a atteint au 5^{ème} jour de stockage une charge bactérienne de 4,25 log₁₀ ufc/g et, deux jours plus tard (7^{ème} jour), la charge atteint une valeur de 4,5 log₁₀ UFC/g. Il ressort de ces résultats que lorsque les deux H.Es sont appliquées sur le produit à une concentration égale 1×CMI, l'ensemble ont exercé un effet antibactérien significatif (p<0,05) par rapport aux échantillons non traités (témoins). Cet effet est évident dès le 3^{ème} jour de stockage, en effet, une réduction de 3,93 et 2,43 log₁₀ UFC/g a été enregistrée en dernier jour de stockage (7^{ème} jour), respectivement pour *C. limonum* et *C. aurantium*.

Selon les résultats, les deux H.Es se sont révélées actives contre la bactérie *S. aureus* (p<0,05). Cependant, l'effet de la concentration reste déterminant. Toutefois, une application de l'H.E de *C. limonum* à l'ordre de 4×CMI a permis une réduction légère de développement de *S. aureus* par rapport au traitement précédent de 1×CMI. En effet, des réductions par rapport au traitement de 1×CMI de 0,6 et 0,3 log₁₀ UFC/g ont été enregistrées pendant le 3^{ème} et 5^{ème} jour de stockage.

Il est évident d'après nos résultats qu'une application de l'H.E de *C. aurantium* de l'ordre de 4×CMI a permis une réduction bactérienne plus accentuée par rapport à l'H.E de *C. limonum*. La Figure 23 montre qu'à partir de 1^{ème} jour de stockage, la charge de *S. aureus* a atteint des valeurs nulles. En effet, des taux d'inhibition par rapport aux échantillons témoins de 100% ont été enregistrés du 1^{er} au dernier jour de stockage.

Il ressort que lorsque les H.Es sont appliquées sur le poisson à une faible concentration, l'effet observé est aussi meilleur. Toutefois, l'activité bactéricide a été prononcée, surtout pour l'H.E de *C. aurantium* et en particulier lorsqu'elle est appliquée à une concentration supérieure (4×CMI).

Il est à noter, que l'H.E de *C. limonum* semble être plus appropriée pour avoir une activité antibactérienne « *in vitro* » plus importante que celle de *C. aurantium* dans la matrice alimentaire. Cela pourrait s'expliquer à la façon dans laquelle les H.Es se diffusent dans la matrice alimentaire, et à la variation dans la composition chimique de chaque H.E. Plusieurs H.Es ont une activité antibactérienne avérée « *in vitro* », mais elles sont moins efficaces lorsqu'elles sont appliquées dans des matrices alimentaires. Des analyses identiques ont été menées par FIROUZI *et al.* (1998) sur poulet, en étudiant l'effet antibactérien des H.Es d'origan et de muscade contre *L. monocytogenes*.

Il faut souligner qu'une H.E testée expérimentalement « *in vitro* » peut ne pas présenter le même effet dans un produit alimentaire. En général, selon BURT, (2004b) pour obtenir un effet antibactérien significatif dans une matrice alimentaire, il faut des concentrations plus élevées de l'ordre de (5 - 20µl/g). En général, les H.Es possèdent des odeurs assez forte et puissante ce qui peut être un facteur limitant pour leurs applications dans des denrées alimentaires. Cependant, selon CAILLET & LACROIX (2007) les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'H.E selon le type d'aliment considéré. D'autre part, plusieurs chercheurs ont eu recours à des systèmes combinés l'H.E avec d'autres moyens de conservation. DJENANE *et al.* (2002) ont rapporté que les viandes traitées avec des antioxydants naturels, emballées sous atmosphère modifiée (AM), ont montré une stabilité chimique et microbiologique durant une longue période par rapport aux viandes non traitées. L'utilisation par exemple de l'acide lactique combiné avec

de l'H.E a permis de diminuer la charge bactérienne de *Brochothrix thermosphacta* et *Pseudomonas spp* au dessous du seuil d'altération ($< 7 \log_{10}$ UFC/cm²) et augmente la durée de conservation des produits sans altérer leurs propriétés sensorielles.

CAILLET & LACROIX (2007) ont rapporté aussi que l'H.E combinée à un chauffage modéré (55°C pendant 1mn) a permis d'inhiber totalement *Salmonella sp*; alors qu'en absence d'huile, un chauffage de plus d'une heure était nécessaire pour arriver au même résultat.

OUSSALAH *et al.* (2007), ont rapporté que la différence dans les activités antibactériennes des H.Es peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et, leur interaction synergique possible.

La disponibilité d'éléments nutritifs dans les aliments comme les graisses/protéines/substances antioxydantes, le sel, et d'autres substances, ainsi que, le pH, la température, le type de conditionnement, et les caractéristiques du microorganisme, sans nul doute peuvent influencer sur l'activité des H.Es. Ainsi, selon HOLLEY & PATEL (2005), à pH bas, l'hydrophobicité de certaines H.Es augmente ce qui leur permet de se dissoudre facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne.

BURT (2004b), a suggéré qu'une faible teneur en eau dans les aliments peut entraver l'action des agents antimicrobiens envers les sites cibles dans la cellule bactérienne. Ainsi, un niveau élevé d'eau et du sel faciliterait l'action des H.Es. Le même auteur a constaté aussi, qu'une teneur élevée en graisses peut réduire sensiblement l'action des H.Es dans les produits carnés. Par formation d'une couche protectrice de graisses autour des bactéries ou bien la fraction lipidique dans l'aliment peut absorber l'agent antimicrobien en diminuant sa concentration et son efficacité dans la phase aqueuse.

Chez les poissons, tout comme les produits carnés, une teneur élevée en matière grasse semble réduire l'efficacité de l'effet antimicrobien des H.Es. Par exemple l'H.E d'origan à (0,5µl/g) est plus efficace contre la bactérie de détérioration *Photobacterium phosphoreum* sur les filets de morue que sur le saumon qui est un poisson gras (MEJLHOLM & DALGAARD, 2002). En revanche, les H.Es de moutarde, de coriandre, de menthe et de la sauge sont moins efficaces ou inefficaces dans des produits carnés à un niveau élevé en matière grasse (TASSOU *et al.*, 1995).

De nombreux microorganismes psychrotrophes pathogènes (*Yersnia enterocolitica*, *Aeromonas hydrphila*, *Salmonella* et *E. coli*) et d'altération Gram (-) constituent un problème particulier pour leur résistance inhérente à la majorité des agents antimicrobiens. Cette résistance est attribuée à la présence des polysaccharides constituant de la membrane cellulaire, agissant comme une barrière efficace contre les macromolécules et des substances hydrophobes (MOTLAGH *et al.*, 1991). Certaines études ont démontré avec succès les applications potentielles des H.Es afin de réduire ou de contrôler la flore pathogènes dans les produits alimentaires Les H.Es les mieux adaptées pour l'application sur de la viande et les produits carnés sont l'eugénol, la coriandre, clou de girofle, l'origan et le thym.

CONNER, (1993) a montré que les HEs de Clou de girofle, Thym, Origan, Piment et du Romarin révèlent une forte capacité inhibitrice contre divers microorganismes pathogènes et d'altération dans différents aliments.

BARATTA *et al.* (1998) ont observé que l'H.E extraite du romarin exerce une activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs microorganismes: *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, et *Brochothrix thermosphacta*; On pense que cette activité antimicrobienne est due principalement à la présence de plusieurs composés dans les H.Es.

SANCHEZ-ESCALANTE *et al.* (2003) ont rapporté que l'usage d'extrait d'Origan à différentes concentrations a permis de retarder l'apparition des signes d'altération organoleptique des produits carnés.

Selon TASSOU *et al.* (2000), des extraits phénoliques ont été appliqués à une concentration de 0,4% sur une salade de thon inoculée avec une charge microbienne de $7 \log_{10}$ UFC/g (*S. aureus*, *Pseudomonas fragi* et *S. Enteritidis*). Les résultats ont pu montrer que ces extraits exercent une activité sur ces microorganismes.

MAHMOUD *et al.* (2004), ont montré l'efficacité de deux composants abondants dans le citron et l'orange (le citral et le linalol), testé à des concentrations de 2% et de 3% (p/v) respectivement, sur la microflore de surface et des intestins du poisson (*Acinetobacter spp.*, Entérobactéries, *Moraxella spp.* et *Vibrionaceae*), conservés à 2°C pendant 48 heures.

Selon DEL CAMPO *et al.* (2000), l'H.E de Romarin exerce une meilleure activité antimicrobienne à basses températures.

Les travaux de LIN *et al.* (2004) ont examiné plusieurs composés chimiques de certaines HEs de plantes diététiques. Ils ont remarqué que ces composés possèdent un effet antibactérien contre *L. monocytogenes*.

DJENANE *et al.* (2009), ont testé des H.Es de lentisque et de la sarriette inoculées avec *L. monocytogenes* dans de la viande hachée bovine. Ces auteurs ont constaté, que l'H.E de la sarriette avait une activité antilesteria significativement supérieure à celle de l'H.E de lentisque.

De même LEFSIH *et al.* (2010), a testé l'efficacité de plusieurs H.Es comme la sarriette, la lavande, et lentisque vis-à-vis de *S. Enteritidis* inoculé à $5 \log_{10}$ UFC/ml dans les œufs liquides.

D'après l'étude d'IDIR (2010), les H.Es de la menthe poivrée et de la sarriette ont inhibées significativement la croissance d'*E. coli* inoculée sur de la viande hachée avec des taux respectivement de (68% et de 72,7%).

4. Activité antioxydante des H.Es de *C. limonum* et *C. aurantium* appliquées sur la sardine (*Sardina pilchardus*)

Les consommateurs considèrent plus sûrs et sains les produits élaborés à partir des ingrédients naturels, en rejetant les additifs synthétiques. Cette situation justifie l'intérêt pour l'identification des nouvelles substances naturelles capables d'être utilisées comme ingrédients alimentaires. Sur la base de nombreuses études réalisées, les antioxydants naturels (extraits d'herbe) sont apparus comme une alternative aux antioxydants de synthèses qui sont de moins en moins utilisés dans les denrées alimentaires. L'activité inhibitrice des extraits d'herbes est attribuée fondamentalement à sa richesse en composés phénoliques. Différents extraits de plantes aromatiques tels que: la sauge, le thym, l'origan, la moutarde, le cumin, le romarin, l'ail, la bourrache, le fenugrec, l'olive, citrus, les graines de sésame, les épices et les H.Es sont des sources potentielles de composants chimiques naturels responsables d'activité antioxydante. A cet effet, plusieurs essais ont été menés par certains auteurs pour tester l'activité antioxydante de ces différents extraits, additionnés dans les préparations carnées et semblent assez prometteuse pour freiner l'oxydations lipidique (DJENANE *et al.*, 2002; 2003; SANCHEZ-ESCALANTE *et al.*, 2003; NISSEN *et al.*, 2004 ; FASSEAS *et al.*, 2007; BOUZOUITA *et al.*, 2008 ; MISHARINA *et al.*, 2008 ; LEFSIH *et al.*, 2010).

Les H.Es possèdent des propriétés antioxydantes et antiradicalaires qui améliorent la durée de vie des aliments. Ainsi l'incorporation des H.Es directement dans les aliments, sous forme de vapeurs ou sous forme d'emballage actif contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (CAILLET & LACROIX, 2007; DJENANE *et al.*, 2011c).

C'est dans ce contexte que, nous avons évalué l'activité antioxydante de deux H.Es *C. limonum* et *C. aurantium* sur la sardine (*Sardina pilchardus*) pendant 7 jours de conservation à $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Les données expérimentales obtenues par le test de sr-TBA sont les représentées dans les Figures 23 et 24.

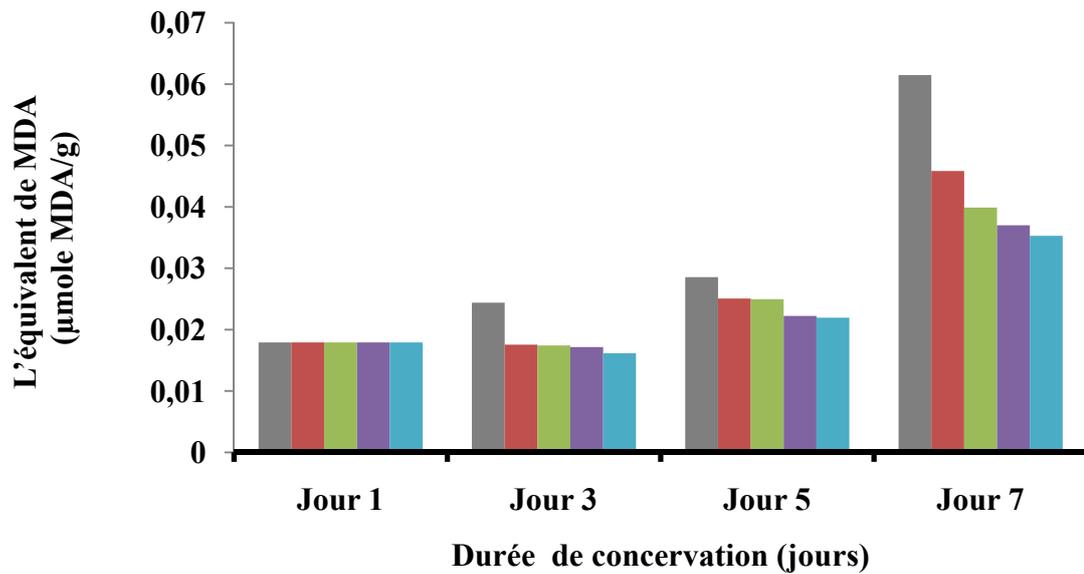


Figure 23: Effet antioxydant de l’H.E de *C. aurantium* sur la formation du MDA à différentes concentrations appliquées sur la sardine (*Sardina pilchardus*) pendant le stockage à $6\pm 1^\circ\text{C}$: (■) Témoin (0 ppm); (■) 500 ppm; (■) 1000 ppm; (■) 2000 ppm; (■) 3000 ppm

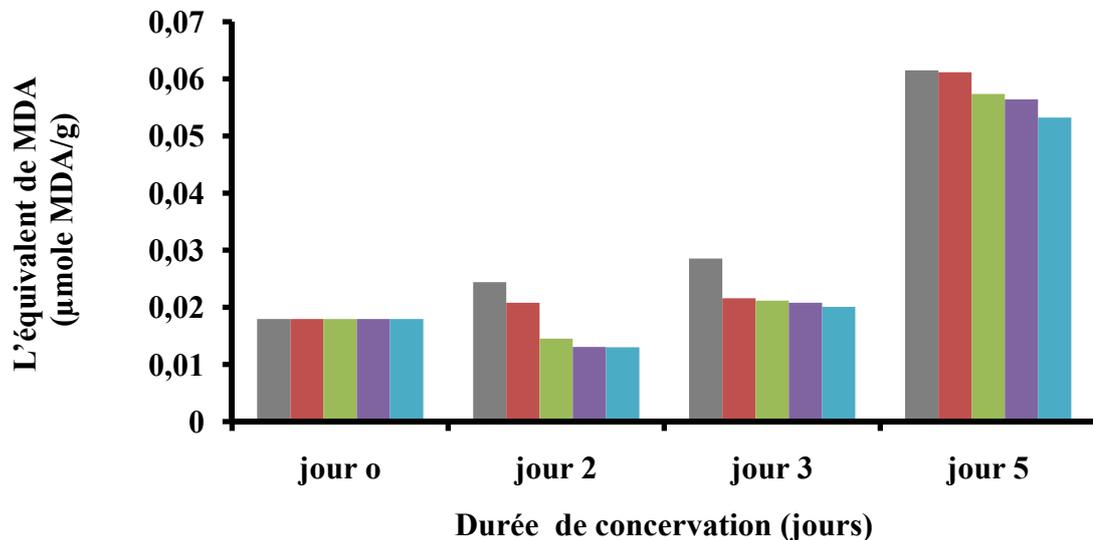


Figure 24: Effet antioxydant de l’H.E de *C. limonum* sur la formation du MDA à différentes concentrations appliquées sur la sardine (*Sardina pilchardus*) pendant le stockage à $6\pm 1^\circ\text{C}$: (■) Témoin (0 ppm); (■) 500 ppm; (■) 1000 ppm; (■) 2000 ppm; (■) 3000 ppm

Dans les échantillons témoins, les niveaux d'oxydation sont relativement élevés par rapport aux échantillons traités avec les H.Es. Nous remarquons globalement que l'oxydation lipidique augmente pendant la durée de la conservation, l'effet étant nettement marqué pour le témoin. Dans l'ensemble les échantillons traités avec l'H.E de *C. aurantium* affichent une activité antioxydante plus importante que le témoin durant le stockage du 1^{er} jusqu'aux 7^{ème} jours. En effet, le taux d'oxydation est inversement proportionnel à la concentration en H.E. Aux concentrations de 500, 1000, 2000 et 3000 ppm les taux d'inhibition sont de 0,045-0,039-0,036 et 0,035 $\mu\text{mol/g}$ et, correspondant à des pourcentages d'inhibition de 26,23%, 36,07%, 40,99%, 42,63% respectivement (Tableau XVI).

Tableau XVI: Effet du pourcentage d'inhibition des deux huiles sur la formation du MDA

Concentration en ppm	Concentration en ppm			
	500	1000	2000	3000
Taux d'inhibition (%)				
<i>C. aurantium</i>	26,23	36,07	40,99	42,63
<i>C. limonum</i>	1,64	6,56	8,20	14,24

C'est au bout de 7^{ème} jours que l'effet protecteur antioxydant de l'H.E de *C. aurantium* est plus marqué. Par comparaison au témoin (0,061 $\mu\text{mol/g}$), et à l'H.E de *C. limonum*..

Toutefois, l'ajout d'un antioxydant peut offrir une protection suffisante. Vu les valeurs élevées de sr-TBA des témoins par rapport aux échantillons traités avec les H.Es.

Avec ces résultats, il est difficile de parvenir à une conclusion sur la contribution additive ou synergique des composés qui ont une activité antioxydante individuellement sur l'activité antioxydante globale de l'H.E. Bien que, l'activité antioxydante de l' H.E de *C. aurantium* serait probablement liée aux composants majoritaires, aux proportions dans lesquels ils sont présents et aux interactions entre eux, leur solubilité et/ou hydrophobicité des HEs, mais il ne faut pas négliger aussi l'effet des autres composants mineurs. Les effets antioxydants des H.Es de *Citrus* ont eu des résultats variables. L'H.E de *C. limonum* ne contient pas les mêmes composants que celle de *C. aurantium* tels que l'acétate de linalyle et le linalol, ceci peut expliquer le rôle modeste comme antioxydant moins efficace de cette huile. Alors qu'une autre étude a signalé que les deux constituants chimiques en l'occurrence le β -pinène et le limonène ont présenté des propriétés antioxydantes importantes, ils ont ralenti le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyl. De même les composés phénoliques ont empêché la rancidité (TANG *et al.*, 2001). Des résultats similaires ont été observés dans le poisson traité avec l'H.E de romarin (GIMENEZ *et al.*, 2004).

D'autres études ont été menées sur le muscle rouge du thon traité avec l'extrait de romarin. L'oxydation des lipides a été évaluée par le dosage de sr-TBA, ce dernier a permis d'obtenir une protection après 18 jours d'entreposage.

D'après les résultats obtenus par EYMARD (2003), les concentrations en sr-TBA augmentent dans un poisson après 36 heures de conservation. En effet, dès que les réactions d'oxydation des lipides sont amorcées elles s'amplifient très rapidement. Il est indispensable de conserver les poissons sous glace, le délai de conservation ne doit pas dépasser 36 heures. Au cours de la conservation sous glace, la formation des produits d'altération des lipides et les perceptions sensorielles évoluent différemment en fonction des espèces. La sardine conserve une bonne qualité durant deux jours de conservation sous glace, entre deux et cinq jours de conservation, la qualité est qualifiée d'acceptable et devient inacceptable au-delà de 5 jours de conservation.

SANCHEZ-ESCALANTE *et al.* (2001) ont signalé l'effet protecteur des extraits de romarin et de raisin sur l'oxydation des lipides des produits d'origine animale. Dans une autre étude menée par ces auteurs deux ans plus tard SANCHEZ-ESCALANTE *et al.* (2003), ont démontré que diverses plantes contenant du lycopène par exemple la tomate et le piment rouge ont des activités antioxydantes. D'autres investigations ont été menées par plusieurs auteurs en testant différentes substances ayant des activités antioxydantes comme par exemple : les cathéchines du thé sur la viande rouge et le poisson (TANG *et al.*, 2001), les caroténoïdes (VILJANEN *et al.*, 2002), les épices sur la viande de porc (TANABE *et al.* 2002) ; α -tocophérols, taurine, et le romarin sur la viande bovine (DJENANE *et al.* 2002 ; NISSEN *et al.* 2004) ; l'incorporation des H.Es de l'origan et de la sauge dans la viande rouge (DJENANE *et al.* 2003 ; DJENNANE *et al.* 2006 ; CAILLET & LACROIX, 2007 ; FASSEAS *et al.* 2007) ; les H.Es de myrte, d'*Eucalyptus*, de lentisque, et de la sauge sur les viandes (DJENANE *et al.* 2010 ; DJENANE *et al.* 2011a, 2011b, et 2011c).ont également empêché l'oxydation des lipides.

FASSEAS *et al.* (2007) ont évalué l'activité antioxydante de deux H.Es d'origan et de la sauge à une concentration de 2,5% dans les viandes porcine et viande bovine conservées pendant une période de 12 jours à 4°C. L'H.E d'origan paraît plus puissante que la sauge qui a entraîné une baisse d'oxydation des lipides dans les deux types de viande.

RENERRE (2000) a analysé des steaks hachés de bœuf à 15% de matière grasse, dans lesquels il a incorporé des extraits végétaux antioxydants, les doses préconisées sont de 0,4 à 2,5g/kg de viande. Ces steaks ont été comparés à un steak témoin sans ajout d'antioxydant, puis conservés à l'air à 5°C pendant 7 jours. L'oxydation des lipides a été mesurée par le test sr-TBA après 1, 4, 7 jours de conservation. Les résultats sont exprimés par mg MDA/ Kg de viande. Au bout de 7 jours une inhibition d'oxydation moyenne de 74% a été mesurée avec les antioxydants par rapport au témoin.

Conclusion et perspectives

Les H.Es sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires.

L'analyse par chromatographie CG/SM des H.Es de *Citrus* a révélé:

- ❖ Une abondance de composés monoterpéniques dominés par la présence du limonène (51,355%), β -pinène (17,041%) et γ -terpinène (13,462%) pour l'H.E de *C. limonum*.
- ❖ L'H.E de *C. aurantium* est caractérisée par la présence de composés comme l'acétate de linalyle (37,288%) et de linalol (23,369%).
- ❖ L'H.E de *C. sinensis* est de chemotype limonène (77,370%).

Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence les activités antibactérienne et antioxydante des H.Es de *Citrus* étudiées. Ainsi, les H.Es de *C. limonum* et *C. aurantium* ont exercé une importante activité antibactérienne à l'encontre de *S. aureus* par rapport à l'H.E de *C. sinensis*. Nous avons constaté que la sensibilité de *S. aureus* est plus accentuée avec l'H.E de *C. limonum* qu'avec l'H.E de *C. aurantium*. En revanche les bactéries à Gram négatives à savoir *E. coli*, *S. Enteritidis* et *Ps. aeruginosa* ont manifesté une résistance à l'égard de ces H.Es.

Quant aux résultats des tests de l'application des H.Es (*C. aurantium* et *C. limonum*) sur la sardine, l'H.E de *C. aurantium* s'est révélée très intéressante par son pouvoir antibactérien et antioxydant par rapport à l'H.E de *C. limonum*.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'H.E de *C. aurantium* semble être plus appropriée comme agent naturel dans la préservation des produits de la pêche.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée de l'activité antibactérienne, et antioxydante non seulement sur les H.Es utilisées seules ou leurs composants majoritaires, mais également en mélange, permettant ainsi une éventuelle synergie. Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité ou non des H.Es de *Citrus*.

L'utilisation des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après incorporation d'extraits végétaux antimicrobiens et/ ou antioxydants pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la place de certains conservateurs ou antioxydants de synthèse pourrait être envisagée dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire.

Références bibliographiques

AFNOR NF T-75- 111, 112 & 202: (Association Française de Normalisation, Norme). « Huiles essentielles ». Paris, France.

AKIN M. & AKTUMSEK A. (2009). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, **9**, 531-535.

ANTOLOVITCH M., PRENZLER P.D., PATSALIDES E., McDONALD S. & ROBARDS K. (2002). Methods for testing antioxydant activity. *The Royal Society of Chemistry Analyst*, **127**, 183-192.

AUBOURG S.P., SOTELO C.G. & PEREZ-MARTIN R. (1998). Assessment of Quality Changes in Frozen Sardine (*Sardina pilchardus*) by Fluorescence Detection. *Journal American of Oils Chemistry Society*, **75**, 575-580.

AZEREDO H.M.C., FARIA J.A.F. & DASILVA MA.A.P. (2004). Minimization of peroxyde formation rate in soybean oil by antioxydant combinations. *Food Reshearch International*, **4**, 141-158.

BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., & IDAOMAR M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446-475.

BANDARRA N. M., BATISTA I., NUNES M.L., EMPIS J.M. & CHRISTIE W.W. (1997). Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Science*, **62**, 40-42.

BAGAMBOULA C.F., UYTENDAELE M. & DEBEVERE J. (2003). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection*, **66**, 668–673.

BARDEAU F. (2009). Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editions Lanore, 315.

BARATTA M.T., DORMAN H S.J., DEANS S.G., BIONDI D.M. & RUBERTO G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 618-627.

BASSOLE I.H.N., OUATTARA A.S., NEBIE R., OUATTARA C.A.T., KABORE Z.I. & TRAORE S.A. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistr*, **62**, 209-212.

BEKHECHI C., ATIK-BEKKARA F. & ABDEL OUAHID D.E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentiellles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, **6**, 153-159.

BELLETTI N., NIDAGIJIMANA, M., SISTO C., GUERZONI, M.E., LANCIOTTI, R. & GARDINI F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, **52 (23)**, 6932-6938.

- BENDIMERAD N., TALEB S.A., BENDIAB A., BENABADJI B., FERNANDEZ X., VALETTE L. & LIZZANI-CUVELIER L. (2005).** Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) essential oil from Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2947-2952.
- BENJELALI B., TANTAOUI E.A. & ESMAILI-ALAOUI M. (1986).** Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, **20**, 155-167.
- BERSET C. & CERVELIER M.E. (1996).** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, **16**, 219-245.
- IDIR L. (2010).** Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des espèces végétales de la région de la kabylie. *Mémoire de Magister. Option Technologie Alimentaire*. Université M'hamed Bougara. Boumerdes.
- BESOMBES C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle*. France.
- BEUCHAT L.R. (1976).** Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *Journal of Food science*, **41**, 899-902.
- BOELEN M. H. (1991).** A critical review on the chemical composition of Citrus oils. *Perfum Flavor*, **16(2)**, 17-34.
- BOUCHONNET S. & LIBONG D. (2002).** Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex.
- BOURGEOIS C.M., MESCLES J.F. & ZUCCA J. (1990).** Microbiologie Alimentaire. Tome I: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. *Technique et documentation, 1^{er} Edition, Lavoisier, Paris*.
- BOUSBIA N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option *Sciences Alimentaires*, INA. Algérie.
- BOUZOUITA N., KACHOURI F., BEN HALIMA M. & CHAABOUNI M. (2008).** Composition chimique et activités: antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, **10**, 119-125.
- BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3^{ème} Edition Lavoisier, Paris. 1120.
- BURT S.A. & REINDERS R.D. (2003).** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *E. coli* O 157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, **36 (3)**, 16 -167.
- BURT S.A. (2004a).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **94 (3)**, 22-25.
- BURT S.A. (2004b).** Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen. *Journal International de Microbiologie des Aliments*, **94**, 223-253.

- BUSATTA C., VIDAL R.S., POPIOLSKI A.S., MOSSI A.J., DARIVA C., RODRIGUEZ M.R.A., CORAZZA M.L., VLADIMIR O.J. & CANSIAN R.L. (2008).** Application of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, **25**, 207-211.
- CAILLET S. & LACROIX M. (2007).** Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS - Institut Armand - Frappier, Université de Laval (Québec).
- CAVALLI J-F. (2002).** Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse.
- CHARPENTIER B., HAMON-LORLEAC'H F., HARLAY A., HUARD A., RIDOUX L., & CHANSELLE S. (2008).** Guide du préparateur en pharmacie. 3^{ème} édition, Elsevier Masson, 1358.
- CELIKEL N. & KAVAS G. (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, **26**, 174-181.
- CLEMENT J.M. (1981).** Les agrumes. Librairie Larousse, Paris, 3-37.
- CIMANGA K., KAMBU K., TONA L., APERS S., DE BRUYNE T., HERMANS N., TOTTE J., PIETERS L. & VLIETINCK A.J. (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 213-220.
- COHEN N. & KARIB H. (2006).** Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés: Un réel problème de santé publique? *Les technologies de Laboratoire*, **1**, 4-9.
- CORBO M.R., LANCIOTTI R., GARDINI F. & SINIGLAGLIA GUERZONI M. E. (2000).** Effects of Hexanal, trans-2-Hexanal and storage Temperature on Shelf Life of Fresh Sliced Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2401-2408.
- CONNER D.E. (1993).** Naturally occurring compounds. In: Antimicrobials in Food Davidson P, Branen AL, Marcel Dekker publishing company New York.
- CORRAZE G. & KAUSNIK S. (1999).** Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux, Corps gras, Lipids*, **6 (1)**, 111-115.
- COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J.R., & WYLLIE S.G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 170 – 175.
- CRESSY H.K., JERRETT A.R., OSBORNE C.M. & BREMER P.J. (2003).** A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *Journal of Food Protection*, **66**, 390-395.
- CRISTIANI M., D'ARRIGO M., MANDALARI G., CASTELLI F., SARPIETRO M.G. & MICIELI D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils

with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6300-6308.

CROTEAU R., KUTCHAN T.M. & LEWIS N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: **BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.)**, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*, 1250-1268.

CUTTER C.N. (2000). Antimicrobial effet of herb extracts against *E. coli* O157: H7. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium associated with beef. *Journal of Food Protection*, **63(5)**, 601-607.

DE BILLERBECK V.G., ROQUES C., VANIERE P. & MARQUIER P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiène (Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière)*, **10**, 248-251.

DE BILLERBECK V.G. (2007). Huiles essentielles et bactérie résistantes aux antibiotiques. *Phytotérapi*, **5**, 249-253.

DELAQUIS P.J., STANICH K., GIRARD B. & MAZZA G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, *cilantro*, *coriander* and *eucalyptus* essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, **74 (1-2)**, 101-109.

DELARRAS C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Technique et Documentation. Lavoisier, Paris*.

DEL CAMPO J., AMIOTIM J. & NGUYEN-THE C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Production*, **63**, 1359-1368.

DEVRIESE L.A, VANCNNAYT M., BAELE M., VANECHOUTTE M., DE GRAF E., SNAUWAERT C., CLEENWERCK I., DAWYNOT P., SWINCS J., DECOSTRE A. & HAESBROUCK F. (2005). *Staphylococcus pseudointemedius* sp ; a coagulase positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1569-1573.

DIDIER C. (1984). La culture des agrumes en Irak. Edition IRFA Fruits, **39**, 184.

DJENANE D., SÁNCHEZ-ESCALANTE A., BELTRÁN J.A. & RONCALÉS P. (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, **76**, 407-415.

DJENANE D., SÁNCHEZ-ESCALANTE A., BELTRÁN J.A. & RONCALÉS P. (2003). The shelf-life of beef steaks treated with dL-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. *Food Microbiology*, **20**, 1-7.

DJENANE D., MEDDAHI A. & RONCALES P. (2006). Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des Aliments*, **26**, 37-73.

DJENANE D., YANGÜELA J., AMROUCHE T., BOUBRIT S., BOUSAAD N. & RONCALES P. (2009). Algerian *Pistacia lentiscus* and *Satureja hortensis* essential oils: Their chemical compositions and their perspective effets against *Listeria monocytogenes* 935-ATCC 13932 inoculated in meat. New challenges in food preservation. Processing-Safety-SUSTAINABILITY. 11-13 NOV. Budapest-Hongrie.

DJENANE D., YANGÜELA J., AMROUCHE T., BOUBRIT S., BOUSAAD N. & RONCALES P. (2011a). Chemical Composition and Antimicrobial Effects of Essential Oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in Minced Beef. *Food Science and Technology International*. DOI: 10.1177/1082013211398803.

DJENANE D., YANGÜELA J., MONTAÑÉS L., DJERBAL M. & RONCALÉS P. (2011b). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, **22**, 1046-1053.

DJENANE D., LEFSIH K., YANGÜELA Y. & RONCALES P. (2011c). Composition chimique et activité anti-*Salmonella* Enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia* et *Satureja hortensis*; Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7±1°C. *Phytothérapie*.(accepté pour publication).

DJENANE D., YANGÜELA Y., GOMEZ D., RONCALES P. (2011d). Perspectives on the use of essential oils as antibacterials against *Campylobacter jejuni* CECT7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmosphere. *Journal of Food* (Submitted),

DORANTES L., COLMENRO R., HERNANDEZ H., MOTA L., JARAMILLO M.E., FERNANDEZ E. & SOLANO C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal Food Microbiology*, **57**, 125-128.

DORMAN H.J.D. & DEANS S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88** (2), 308-316.

EYMARD S. (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés: Spécialité Biochimie. Nante. France.

FASSEAS M.K., MOUNTZOURIS K.C., TARANTILIS P.A., POLISSIOU M. & ZERVAS G. (2007). Antioxydant activity in meat treated with Oregano and Sage essential oils. *Food Chemistry*, **106**, 1188-1194.

FISHER K. & PHILLIPS C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *E.coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, **101** (6), 1232-1240.

FISHER K., ROWE C. & PHILLIPS C. (2007). The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components in vitro and food. *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 495-499.

FISHER K. & PHILLIPS C. (2008). Potentiel antimicrobien des huiles essentielles dans les aliments: est-ce la réponse? A review. *Trends in Food Science and Technology*, **19**, 156-164.

FIROUZI R., AZADBAKHT M. & NABINEDJAD A.M. (1998). Anti-Listerial activity essential oils of some plants. *Journal of Applied Animal Research*, **14**, 75-80.

FOUCHE J.G., MARQUET A. & HAMBUECKERS A. (2000). Les plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman*.

FRIEDMAN M., HENIKA P.R. & MANDRELL R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enterica*. *Journal of Food Protection*, **65**, 1545-60.

FUSELLI R., SUSANA B., GARCIA D.L.R., MARTIN J. & ROSALIA F. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, 2067-2072.

GANCEL A. L., OLLITRAUET P., FROELICHER Y., TOMI F., JACQUEMOND C., LURO F. & BRILLOUET J.M. (2005). Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange and grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2224-2230.

GENOT C., MEYNIER A., RIAU BLANC A. & CHOBERT J.M. (2003). Protein alteration due to lipid oxidation in multiphase systems. In lipid oxidation pathways. KAMAL-ELDIN A. (ED). *AOACS Press Champig.*, 265-292.

GERMAN J.B. & KINSELLA J.E. (1985). Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 680-683.

GHALEM B. & MOHAMED B. (2008). Antibacterial activity of leaf oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacology*, **2**, 211-215.

GILL A.O., DELAQUIS P., RUSSO P. & HOLLEY R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, **73**, 83-92.

GIMENEZ B., RONCALES P. & BELTRAN J.A. (2004). The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality characteristics of gilt-head sea bream fillets (*Sparus aurata*) packaged in a modified atmosphere. *Journal Science Agricultural*, **84**, 1053-1060.

GLIŠIĆ S.B., MIŠIĆ D.R., STAMENIĆ M.D., ZIZOVIĆ I.T., AŠANIN R.M., & SKALA D.E. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, **105**, 346-352.

GUBA R. (2001). Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, **11**, 76-83.

GUERIN-FAUBLEE V. & CARRET G. (1999). L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.

GUIGNARD J.L. (2001). Botanique, Systématique moléculaire. Ed. Masson, 290.

HADDOUCHI F., LAZOUNI H., AHAMMER K.A., CARSON C.F. & RILEY T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985-990.

HAMMER K.A., CARSON C.F. & RILEY T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985-990.

HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDHOLM T., POL I., SMID E.J., GORRIS L.G.M. & VONWRIGHT A. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** (9), 3590-3595.

HEMWIMON S., PAVASANT P. & SHOTIPRUX A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, **54**, 44-50.

HERNANDEZ-OCHOA L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.

HOLLEY R.A. & PATEL D. (2005). Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, **22**, 273-292.

HSIEH R.J. & KINSELLA J.E. (1989). Lipoxygenase Generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 279-286.

HUANG C.H., HULTIN H.O. & JAFAR S.S. (1993). Some aspects of Fe²⁺ catalysed oxidation in fish saccoplasmic reticular lipid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1886-1889.

HULTIN H.O. (1992). Lipid oxidation in fish muscle. In advances in seafood. *Biochemistry, processing, Technology and Quality*. Blackie Academic et Professional. New-York. 47-49.

HUSS H.H. & RYE-PETERSON E. (1980). The stability of *Clostridium botulinum* type E toxin insalty and or acid environment. *Journal of Technology*, **15**, 619-623.

INOUE S., TAKIZAWA T. & YAMAGUCHI H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **47**, 565-573.

JASET-DONGMO P.M., TATSADJIEU N.L., TCHINDA SONWA E., KUATE J., AMVAM ZOLLO P.H. & MENUT C. (2008). Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 4045-4050.

JEANNOT V., CHAHBOUN, J., RUSSELL D. & BARET, P. (2005). Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium L. ssp. aurantium*). *International Journal of Aromatherapy*, **15** (2), 94-97.

JOLY B. & RENAUD A. (2002). Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. Edition Lavoisier.

JUVEN B.J., KANNER J., SCHVED F. & WEISSLOWICZ H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**, 626-631.

- KALEMBA D. & KUNICKA A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 813-829.
- KELEN M. & TEPE B. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, **99**, 4096-4104.
- KIM J.M., MARSHALL M.R. & WEI C.I. (1995a).** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2839-2845.
- KIM J.M., MARSHALL M.R., CORNELL J.A., PRESTON J.F. & WEI C.I. (1995b).** Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella* Typhimurium on culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, **60** (6), 1364-1374.
- KNOBLOCH K., PAULI A. IBERL B., WEIGAND H. & WEIS N. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 119-128.
- KOBA K., SANDA K., RAYNAUD C., NENONENE Y.A., MILLET J. & CHAUMONT J.P. (2004).** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 202-206.
- KORSAN N., KLINQUART A. & DAUDE G. (2004).** *Salmonella* sp. Dans les denrées alimentaires d'origine animale: un réel problème de santé publique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 174-193.
- KUDA T., IWAI A. & YANO T. (2004).** Effect of red pepper *Capsicum annum* var. conides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxicology*, **42**, 1695-1700.
- LAMBERT R.J.W. & PEARSON J. (2001).** Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 784-790.
- LARDY J-M. & HABERKORN V. (2007).** L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Revue de Kinésithérapie*, **61**, 14-17.
- LEFSIH K. RONCALES P., YANGUELA J. & DJENANE D. (2010).** Biological effects of Algerian essential oils and their application in liquid eggs. *New challenges in food preservation. Processing-Safety-Sustainability*, 11-1" Nov. Budapest- Hongrie.
- LIN Y-T., LABBE R.G. & SHETTY K. (2004).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems using *Oregano* and *Cranberry* synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5672-5678.
- LOUSSERT R. (1989).** Les agrumes. 2. Production Edition Lavoisier, Paris, 157.
- LUCCHESI M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.

- MAHMOUD B.S.M., YAMAZAKI K., IL-SHIK S., DONG-SUK C. & SUZUKI T. (2004).** Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, **21(6)**, 657-666.
- MALECKY M. (2007).** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de Doctorat de l'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement* (Agro. Paris, Tech.).
- MANIL J. (2004).** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*E.coli*: IV) souches necrotoxiques. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 121-132.
- MANN C.M. & MARKHAM J.L. (1998).** A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 538-544.
- MANN C.M., COX S.D. & MARKHAM J.L. (2000).** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, contribute to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 294-297.
- MARINO M., BERSANI C. & COMI G. (2001).** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiacea* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, **67**, 187-195.
- MEDJEDOUB F. (1996).** Biologie de l'aleurode floconneux, *Aleurothrixus floccosus* Maskell (Homoptera, Aleurodidae) dans un verger d'agrumes de la région de Draâ Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Magistère en Biologie & Ecologie des Populations. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 73.
- MEJLHOLM O. & DALGAARD P. (2002).** Antimicrobial effect of essential oils on seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 27-31.
- MILLER N.J., RICE-EVANS C.A., DAVIES M.J., GOPINATAN V. & MILNER A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinic Science*, **84**, 407-412.
- MINH TU N.T., THANK L.X., UNE A., UKEDA H. & SAWAMURA M. (2002).** Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, 169-174.
- MIQUEL-BECKER E., NIESSEN L.R. & SKIBSTED L.H. (2004).** Antioxidant evaluation protocols: foods quality or health effects. *Food Research and Technology*, **219**, 561-571.
- MISHARINA T.A. & SAMUSENKO A.L. (2008).** Antioxidant properties of essential oils from lemon grapefruit. *Phytothérapie*, **5**, 234-240.
- MOHAMMEDI Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option: Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des Sciences. Université ABB. Tlemcen. Algérie.
- MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E. & ROURA S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Science and Technology*, **38**, 565-570.

- MOUFIDA S. & MARZOUK B. (2003).** Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, **62 (8)**, 1283-1289.
- MOTLAGH A.M., JOHNSON M.C. & RAY B. (1991).** Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. *Journal Food Protection*, **54**, 873-878.
- NAZER A.I., KOBILINSKY A., THOLOZAN J.L. & DUBOIS-BRISONNET F. (2005).** Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, **22**, 391-398.
- NEDOROSTOVA L., KOUCEK P., KOKOSKA L., STOLCOVA M. & PULKRABEK J. (2009).** Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, **20**, 157-160.
- NEGI P.S., JAYAPRAKASHA G.K., JAGAN RAO MOHAN L. & SAKARIAH K.K. (1999).** Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4297-4300.
- NISSEN L.R.L., BYRNE D.V., BERTELSEN G. & SKIBSTED L.H. (2004).** The antioxidant activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*, **68**, 485-495.
- NOGATA Y., SAKAMOTO K., SHIRATSUCHI H., ISHII T., YANO M. & OHTA H. (2006).** Flavonoid composition of fruit tissue of citrus species. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **70(1)**, 178-192.
- OMIDBEYGI M., BARZEGAR M., HAMIDI Z. & NAGHDIBADI H. (2007).** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, **18**, 1518-1523.
- ONAWUNMI G.O. (1989).** Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, **9**, 105-108.
- OOSTERHAVEN K., POOLMAN B. & SMID E.J. (1995).** S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. *Industrial Crops and Products*, **4**, 23-31.
- OURAINI D., AGOUMIL A., ISMAILI-ALAOUI M., ALAOUI K., CHERRAH Y., AMRANI M. & BELLABAS M.A. (2005).** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, **4**, 147-157.
- OUSSALAH M., CAILLET S., SAUCIER L. & LACROIX M. (2006).** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **69 (5)**, 1046-1055.
- OUSSALAH M., CAILLET S., SAUCIER L. & LACROIX M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18**, 414-420.
- OUSSOU K.R., COFFI K., NATHALIE G., SERIYOLOU, GERARD K., MIREILLE D., YAO T.N., GILLES F. & JEAN-CLAUDE C.H. (2004).** Activités antibactériennes des

Références bibliographiques

huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, **7**, 1081-1086.

PADRINI F. & LUCCHRONI N. (2003). Le grand livre des huiles essentielles: Médecine douce, bien être. Edition de Vecchi S-A. PARIS.

PAOLINI J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et deux *Asteraceae* Endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum subsp. Corsicum* et *Doronicum Corsicum*. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse. France.

PAULI A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, **11**, 126-133.

PIBIRI M.C. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne.

PICCAGLIA R., MAROTTI M. & GIOVANELLI E. (1993). Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Corps and Products*, **2**, 47-50.

PINCEMAIL J., MEURISSE M., LIMET R. & DEFRAIGNE J.O. (1998). Mesure et utilisation des antioxydants. *Journal of Medecine Sphère*, **73**, 233 – 239.

PINTORE G., USAI M., BRADESI P., JULIANO C., BOATTO G., TOMI F., CHESSA M. CERRI R. & CASSANOVA J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Oils from Sardina and Corsica. *Flower and Fragrance Journal*, **17**, 15-19.

PIOCHON M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Quebec à Chicoutimi, Canada.

POKORNY J., YANISHLIEVA N. & GORDON H. (2001). Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre.

PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. & ROURA S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, **36**, 679-684.

POOLE K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 500-508.

POURMORTAZAVI S.M. & HAJIMIRSADEGHI S.S. (2007). "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis" *Journal of Chromatography A*, **1162**, 2-24.

PRUDENT D., PERINEAU F., BESSIERE J.M., MICHEL G.M. & BACCOU J.C. (1995). Analysis of the essential oil of oregano with oregano evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 165-173.

Références bibliographiques

- REFSGRAARD H.H.F., BROCKNOFF P.M.B. & JENSEN B. (2000).** Free polyunsaturated fatty acids cause late deterioration of Salmon during frozen storage. *Journal of Agricultural and Chemistry*, **48**, 3280-3285.
- REGA B., FOURNIER N., GUICHARD E. & RUSSELL R. (2003).** Citrus flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 117-133.
- REHMAN S.U., HUSSEIN S., NAWAZ H., MUSHTAQ A.M., MURTAZA M.A. & RIZVI A.J. (2007).** Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistanian Journal of Nutrition*, **6 (6)**, 558-561.
- RENERRE M. (2000).** In antioxidants in muscle. *FoodS John Wiley, New-yor*, 113.
- ROBERT-DEMUET S. (1995).** Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, 131-137. Montréal-Canada.
- ROUX D. (2008).** Conseil en aromathérapie. 2^{ème} édition, *Pro-Officina.*, 187.
- SANCHEZ-ESCALANTE A., DJENANE D., TORRESCANO G., BELTRAN J.A. & RONGALES P. (2001).** The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, **58**, 421-429.
- SANCHEZ-ESCALANTE A., DJENANE D., TORRESCANO G., BELTRAN J.A. & RONGALES P. (2003).** Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 187-194.
- SANCHEZ-MORENO C. & LARRANI J.A. (1998).** Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Science and Technology International*, **4**, 391-399.
- SCHUHMACHER A. & REICHLING P. (2003).** Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped viruses Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine*, **10(6-7)**, 504-510.
- SENATORE F., NAPOLITANO F. & OZCAN M. (2000).** Composition and antibacterial activity of essential oil from *Crithmum maritimum L.* (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, **15**, 186-189.
- SHARMA N. & TRIPATHI A. (2006).** Fungitoxicity of *Citrus sinensis L.* essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology*, **22**, 587-593.
- SHAW P.E. (1979).** Review of quantitative analysis of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**, 246-257.
- SKANDAMIS P.N. & NYCHAS G.J.E. (2001).** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 1011-1022.
- SMITH D.C., FORLAND S., BACHANOS E., MATEJKA M. & BARRETT V. (2001).** Quantitative analysis of citrus fruit extracts by GC/MS: An undergraduate experiment. *Chemical Educator*, **6**, 28-31.

SMITH-PALMER A., STEWART J. & FYFE L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important foodborne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, **26**, 118-122.

SMITH-PALMER A., STEWART J. & FYFE L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, **18**, 463-470.

SUTRA L., FEDERIGHI M. & JOUVE J.L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. *Polytechnica*, Paris.

SOVOBODA K. & GREENAWAY R.I. (2003). Lemon scented plants. *International Journal of Aromatherapy*, **13(1)**, 23-32.

TANABE H., YOSHIDA M. & TOMITA N. (2002). Comparaison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *Animal Science Journal*, **73**, 389-393.

TANG S., SHCCHAN D., BUCKLEY D.J., MORRSEY P.A. & KERRY J.P. (2001). Anti-oxidant activity of added tea catechines on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**, 685-692.

TASSOU C.C., DROSINOS E.H. & NYCHAS G.J.E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**, 593-600.

TASSOU C.C., KOUTSOUMANIS F. & NYCHAS G.J.E. (2000). Inhibition of *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, **33**, 273-280.

TEIXEIRA-DUARTE M.C., MARA FIGUEIRA G. & SARTORATTO A. (2005). Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 305-311.

TEUSHER E., ANTON R. & LOBSTEIN A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc*, Paris, 522.

ULTEE A., KETS E.P.W. & SMID E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **174 (4)**, 233-238.

ULTEE A. & SMID E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, **64**, 373-378.

ULTEE A., BENNIK M.H.J. & 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 (4)**, 1561-1568.

VEKIARI S.A., PROTOPAPADAKIS E.F., PAPADOPOULOU P., PAPANICOLAOU D., PANOU C. & VAMVAKIAS M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **5 (1)**, 147-153.

Références bibliographiques

VLJANEN K., SUNDBERG S., OHSHIMA T. & HEINONEN M. (2002). Caroténoïds as antioxidants to prevent photooxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 353-359.

VINCENOT F., SALEH M. & PREVOST G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, **407**, 61-69.

VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNANDEZ-LOPEZ J. & PEREZ-ALVAREZ J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.), essential oils. *Food Control*, **19**, 1130-1138.

WEILL F.X. (2009). *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. Supplément au N°409, 25-35.

WOLFORD R.W., KESTERSON J.W. & ATTAWAY J.A. (1971). Physicochemical properties of citrus essential oils from Florida. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19** (6), 1097-1102.

ZHIRI A. (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News*. Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8.

Annexes

ANNEXE 01 : Composition des principaux milieux de culture utilisés**➤ Milieux liquides****• Eau physiologique stérile**

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl).....9g

Eau distillée.....1000ml

pH = 7

Stérilisation à 121°C/15mn.

• Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB) CM 225

Composition en g/l :

Protéose-peptone.....10g

Infusion de cervelle de veau.....12,5g

Infusion de cœur de bœuf.....5g

Chlorure de sodium.....5g

Phosphate disodique.....2,5g

Glucose.....2g

Eau distillée qsp.....1000ml

pH = 7,4

Stérilisation à 121°C/15mn.

• Eau peptonnée tamponnée (EPT)

Composition en g/l :

Protéose Peptone.....10g

Peptone.....10g

Chlorure de sodium.....5g

pH = 8,6

Stérilisation à 121°C/15mn.

➤ Milieux solides**• Gélose Mueller Hinton (M.H)**

Composition en g/l:

Extrait de viande.....3g

Hydrolysate acide de caséine.....17,5g

Agar.....18g

pH = 7,4

Stérilisation à 121°C/15mn.

Après refroidissement, 5ml de l'additif Hektoen sont rajoutés au 225ml de la gélose Hektoen.

- **Gélose Salmonella-Shigella (SS)**

Composition en g/l :

Protéose-peptone.....5g

Extrait de levure.....3g

Extrait de viande.....5g

Lactose.....10g

Sels biliaires.....2g

Sodium citrate.....8,5g

Vert brillant.....0,33g

Rouge neutre.....0,025g

Agar.....18g

pH = 7, 2

Stérilisation à 121°C/15mn.

- **Gélose King A**

Composition en g/l:

Peptone de viande.....20g

Glycerol (Glycerine).....10ml

Potassium sulfate.....1,5g

Agar.....20g

pH = 7,2

Stérilisation à 121°C/15mn.

- **Gélose de conservation**

Composition en g/l :

Extrait de viande.....3g

Protéose peptone.....10g

Chlorure de sodium.....3g

Disodium phosphate.....0,8g

Agar.....10g

pH = 7

Stérilisation à 121°C/15mn.

Le milieu est livré prêt à l'emploi.

Amidon.....1,5g
 Agar.....16g
 pH = 7,3
 Stérilisation à 121°C/15mn.

- **Gélose Nutritive (GN)**

Composition en g/l :

Peptone..... 10g
 Extrait de viande..... 3g
 Extrait de levures..... 3g
 Chlorure de sodium.....5g
 Agar.....18g
 pH = 7,3 ± 0,2
 Stérilisation à 121°C/15mn.

- **Gélose Chapman**

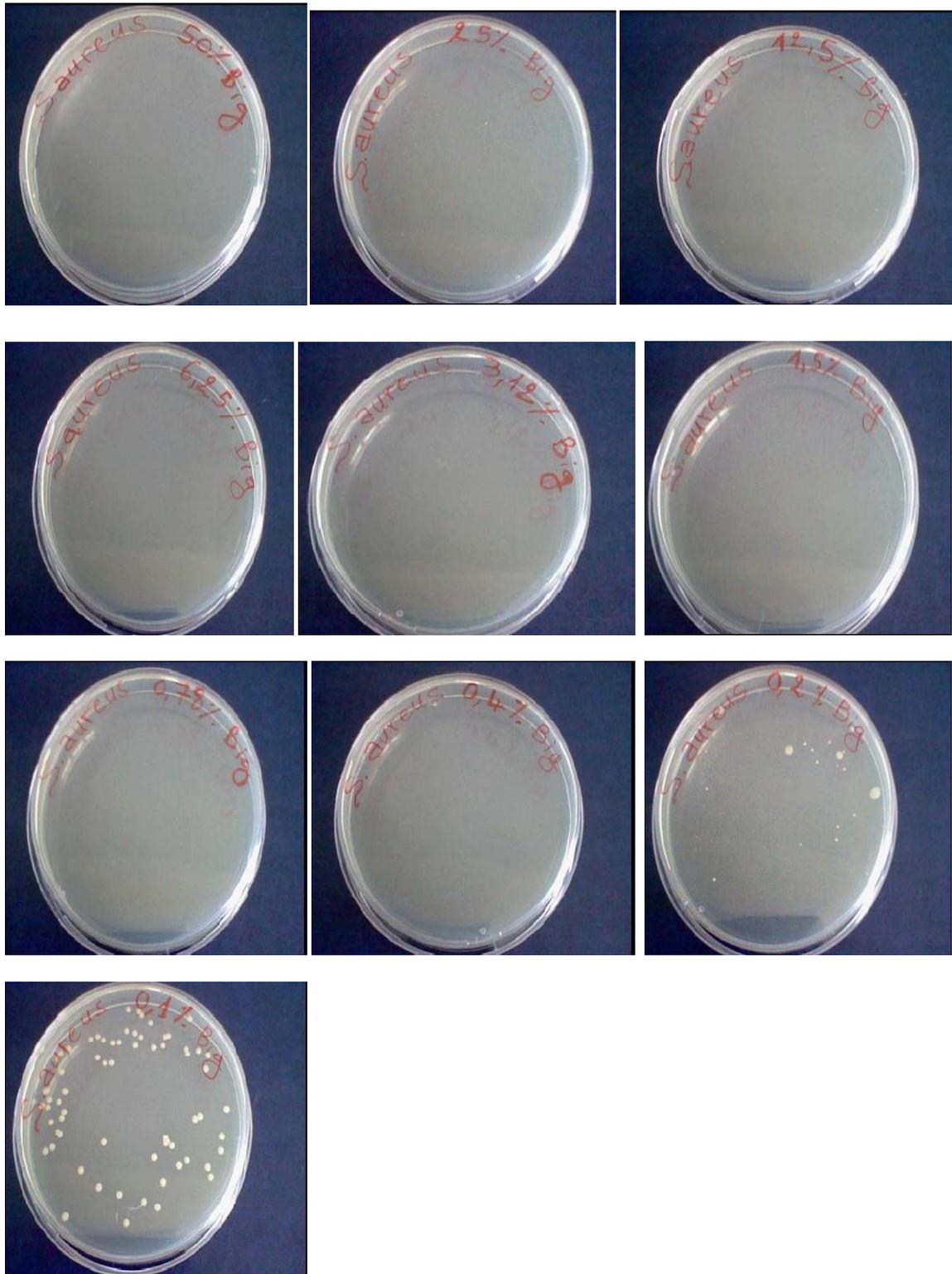
Composition en g/l :

Extrait de viande.....1g
 Extrait de levure.....3g
 Tryptone.....5g
 Peptone bactériologique.....10g
 Chlorure de sodium.....70g
 Mannitol.....10g
 Rouge de phénol.....0,025g
 Agar.....15g
 pH = 7,4
 Stérilisation à 121°C/15mn.

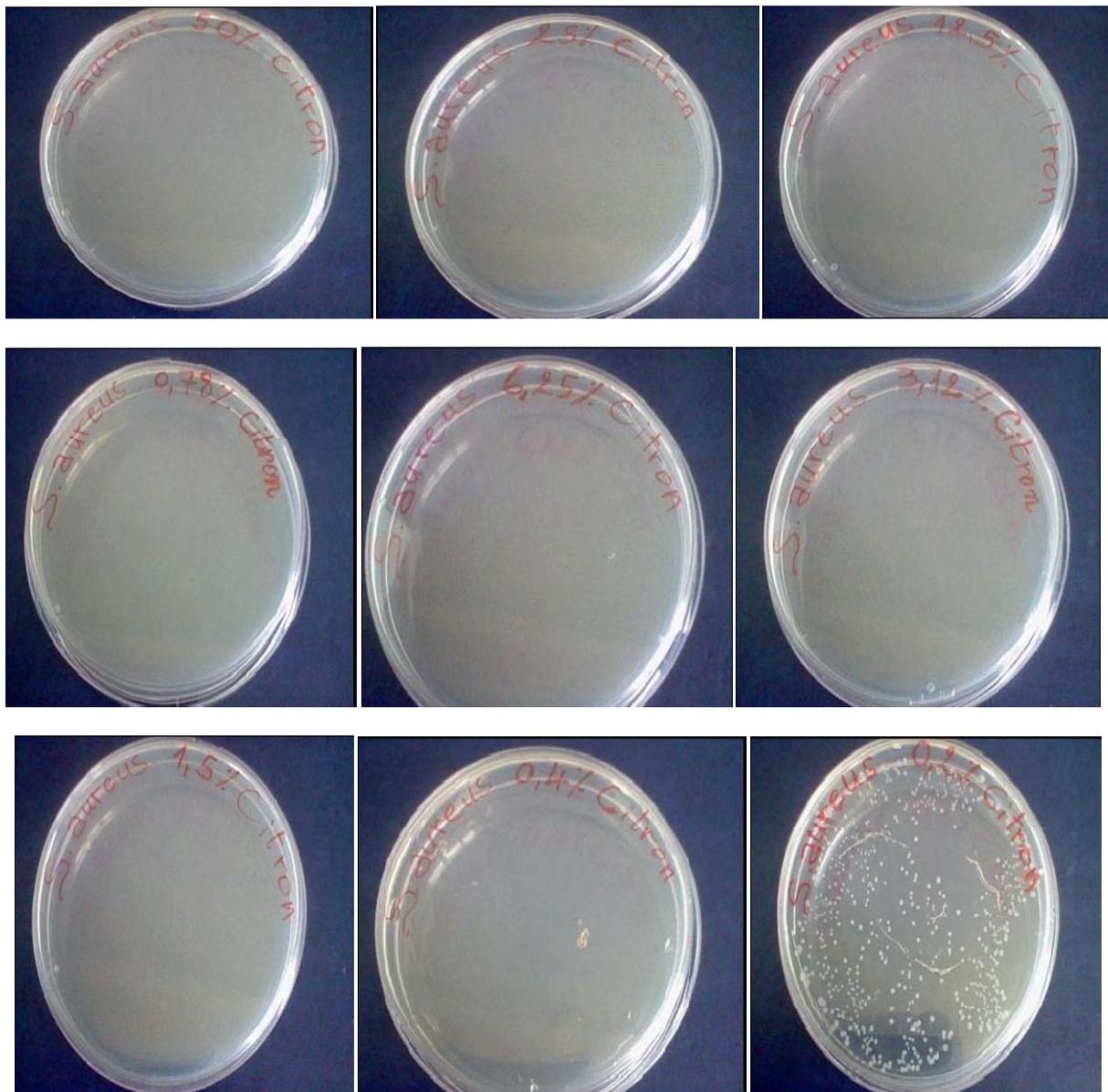
- **Gélose Hektoen**

Composition en g/l :

Peptone pepsique de viande.....15g
 Extrait de viande.....3g
 Extrait de levure.....3g
 Lactose.....12g
 Salicine.....2g
 Saccharose.....12g
 Chlorure de sodium.....5g
 Thiosulfate de sodium.....5g
 Citrate de fer ammoniacal.....1,5g
 Sels biliaires.....4g
 Bleu de Bromothymol.....0,064g
 Fuchsine acide.....0,1g

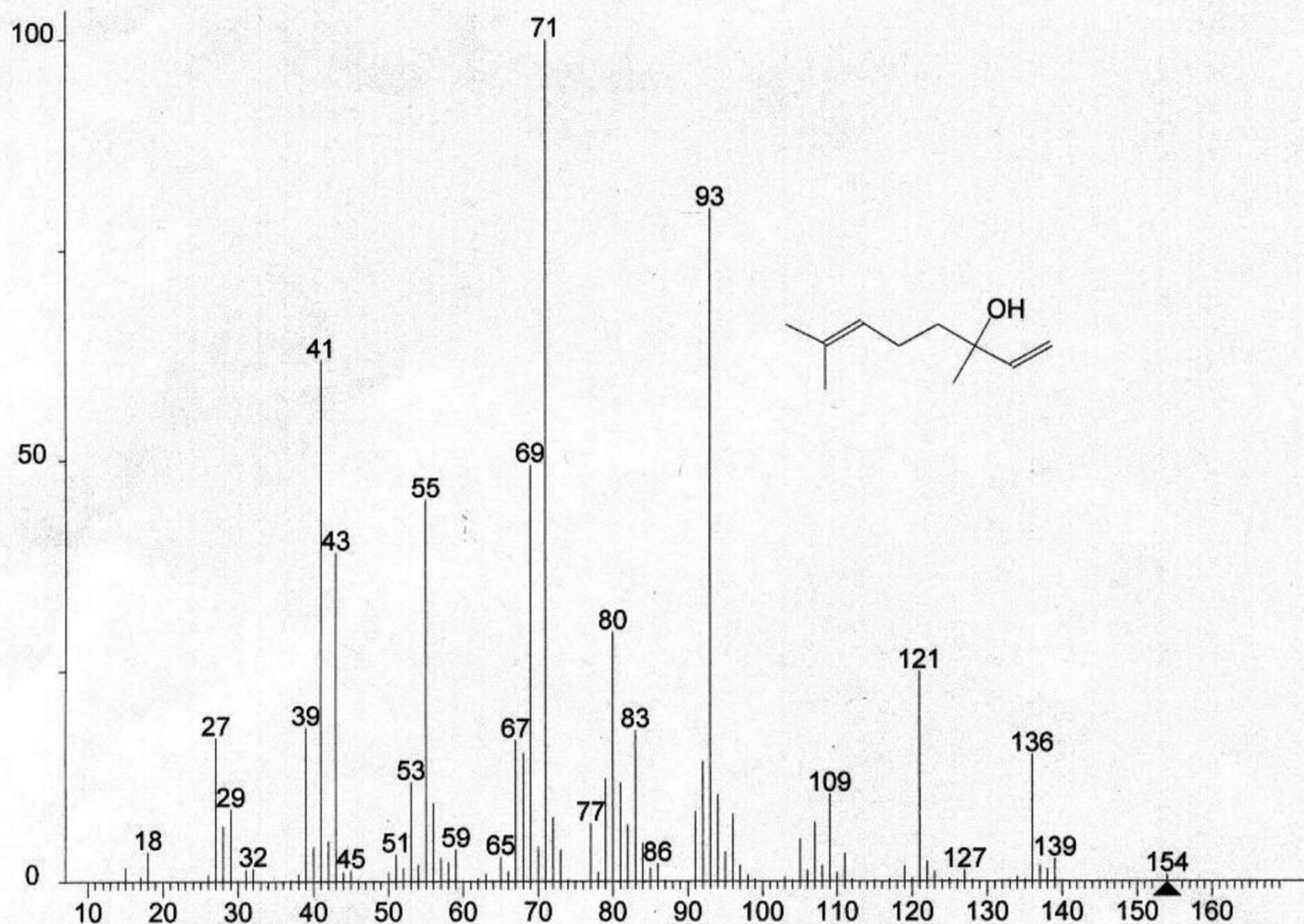


Annexe 2: Photos montrant la CMI = 0,2% de l'H.E de *C. aurantium* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

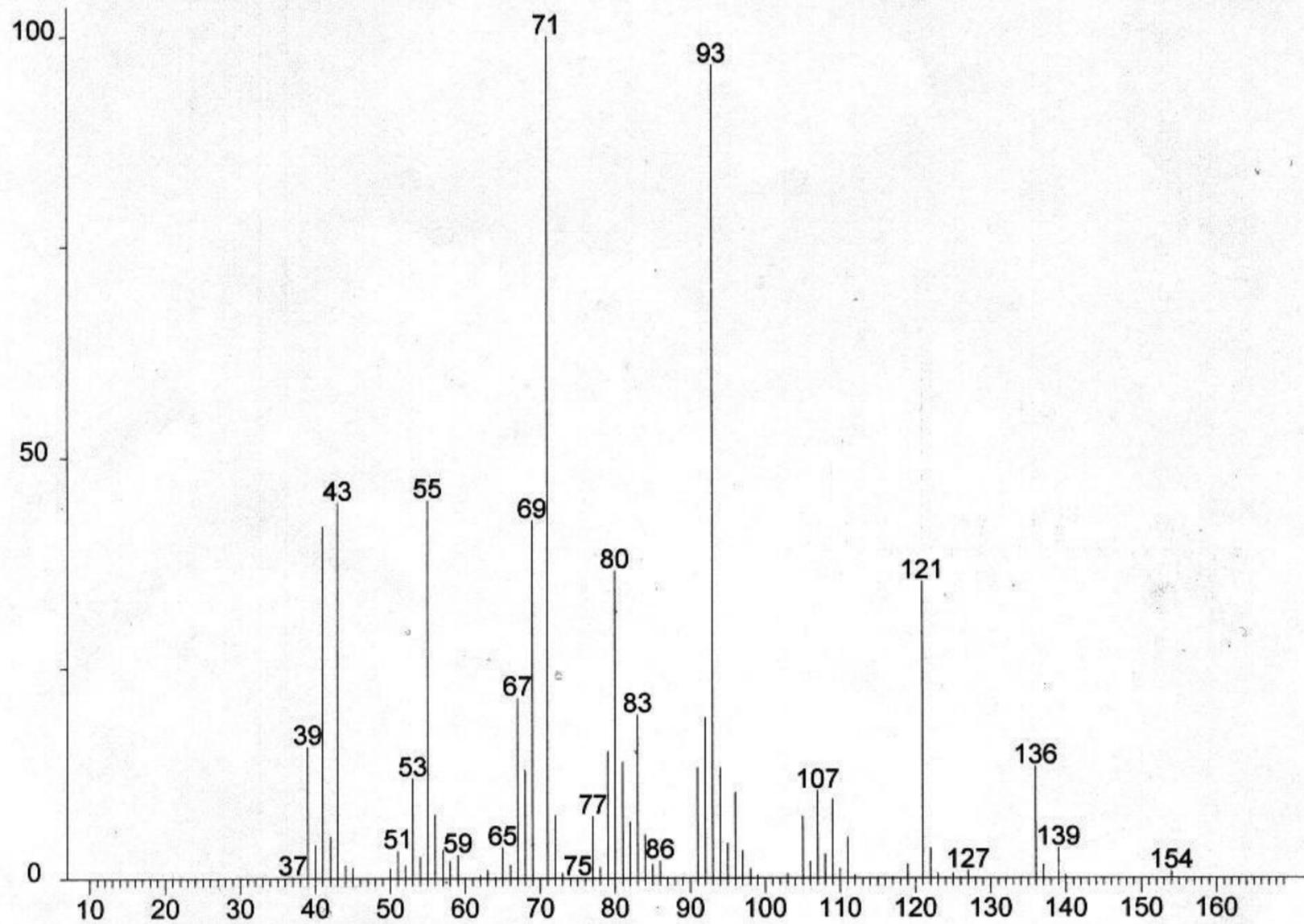


Annexe 3: Photos montrant la CMI = 0,4% de l'H.E de *C. limonum* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Linalol

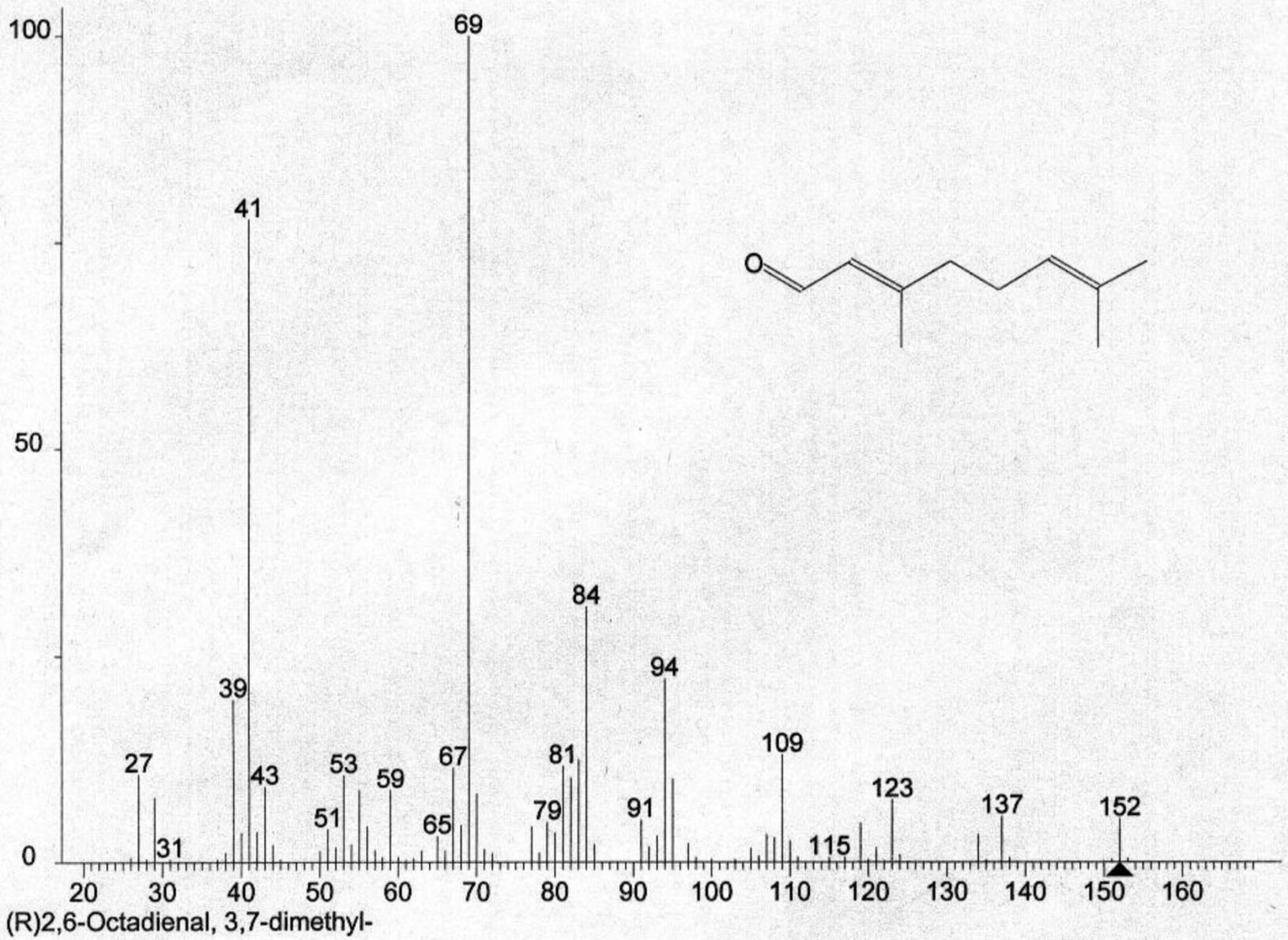


(R)-1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-

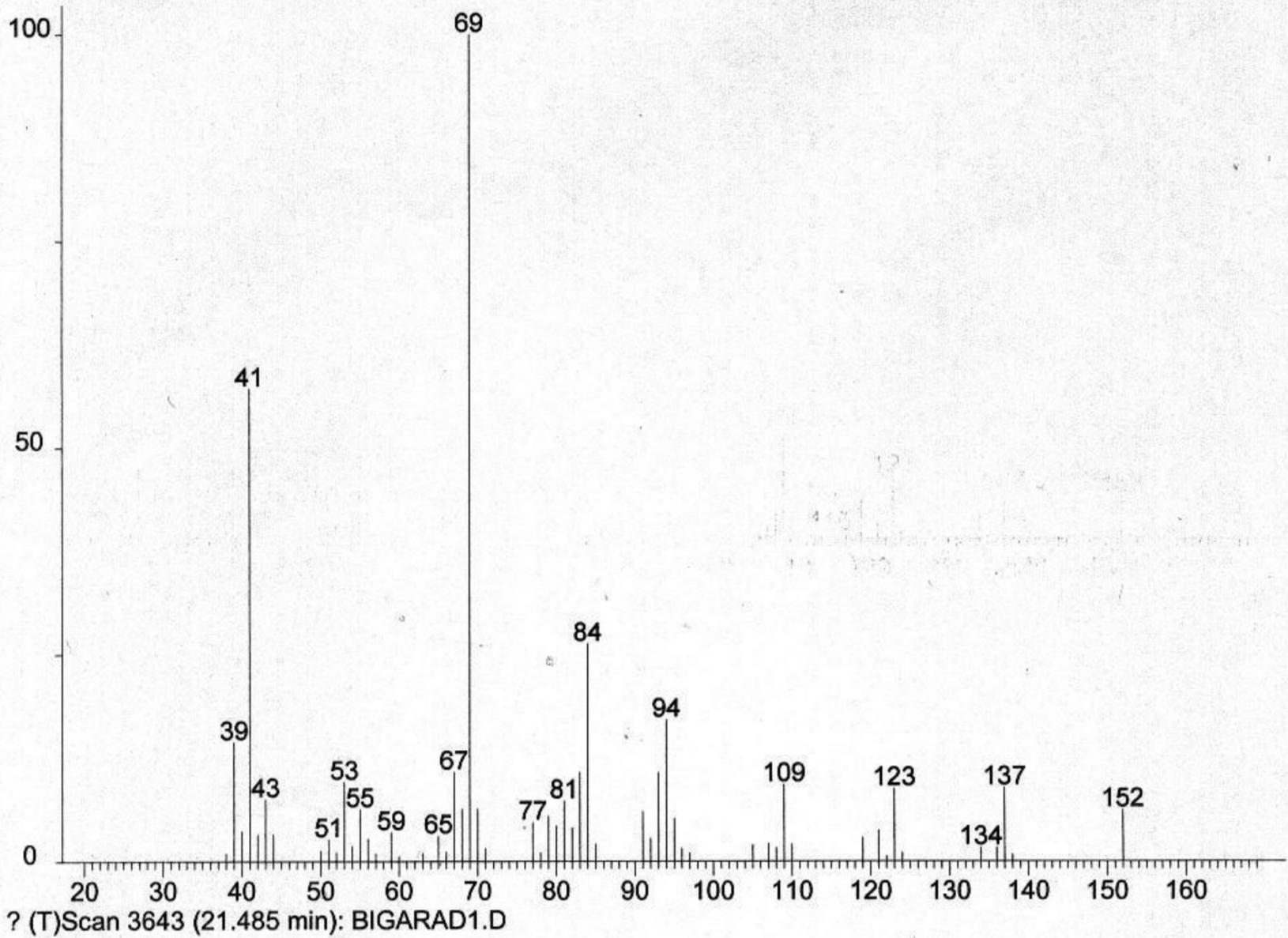


? (T)Scan 2926 (17.272 min): BIGRAD1.D

Citral

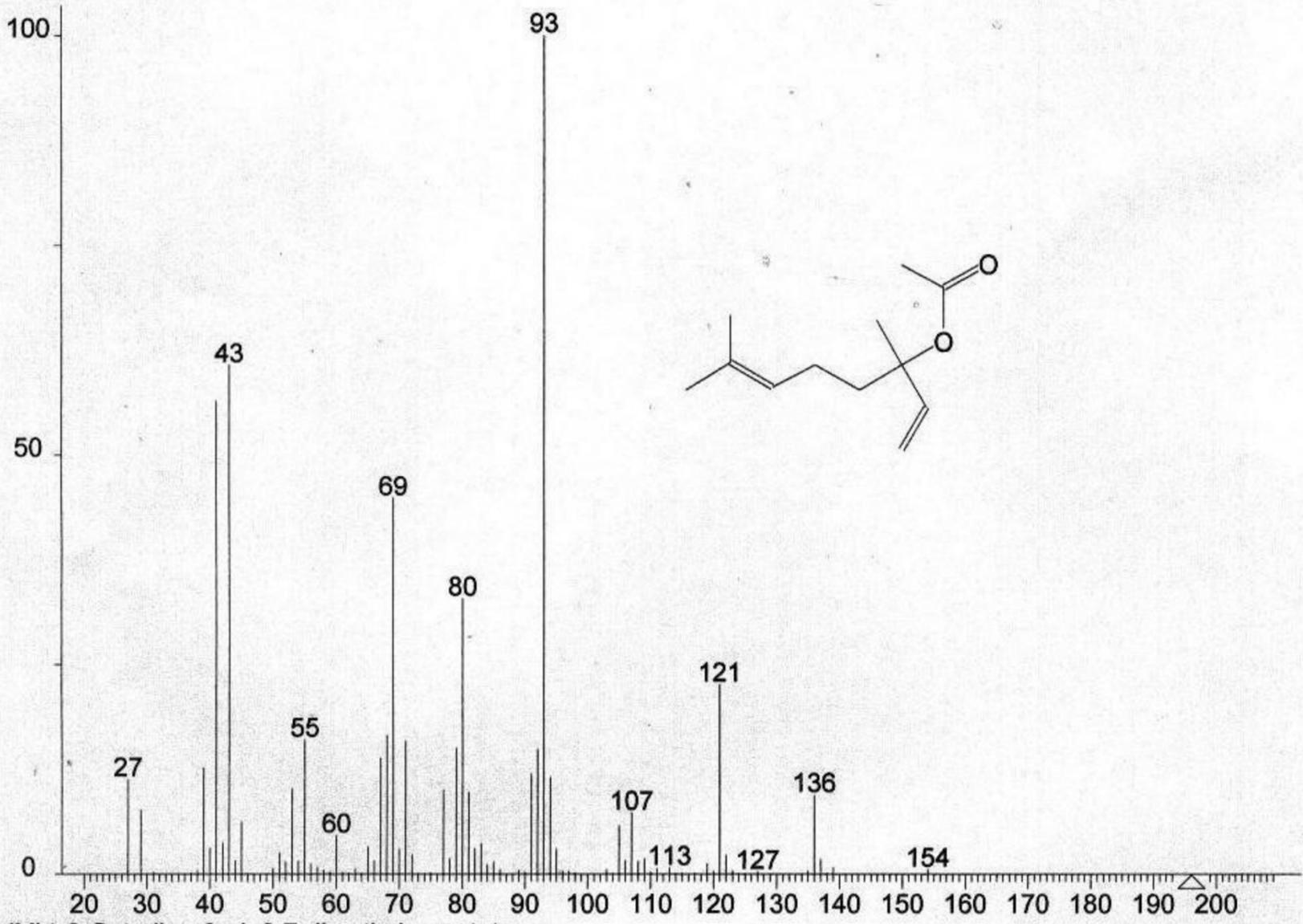


(R)-2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-

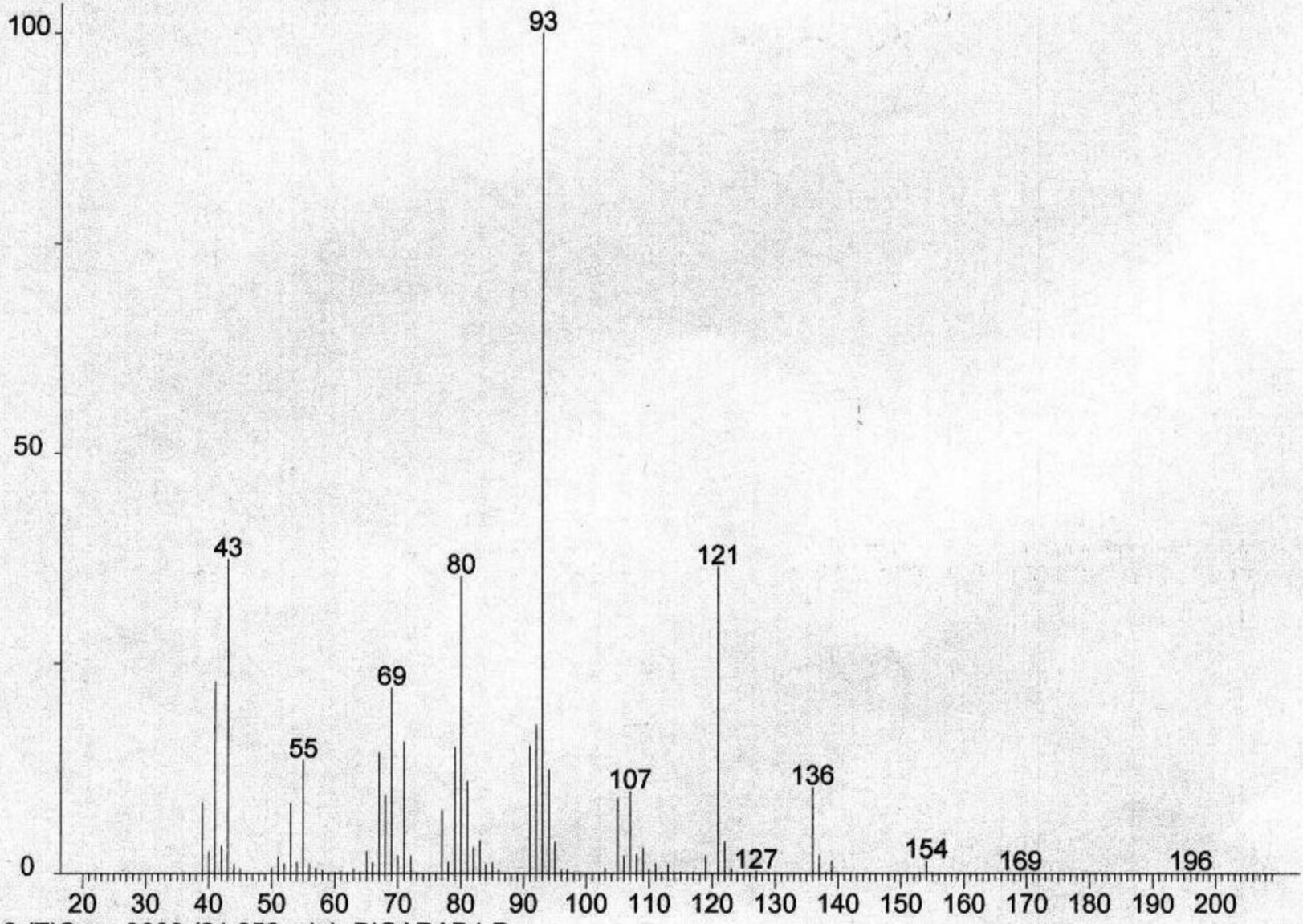


? (T)Scan 3643 (21.485 min): BIGRAD1.D

Acétate de linalyle



(M)1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate



? (T)Scan 3603 (21.250 min): BIGARAD1.D

Gamma Terpinène

