

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb, Blida



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Science de la Nature et de la Vie
Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Thème :

Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des extraits végétaux de deux
espèces d'agrumes

Présenté par :

Soutenu le : 02/07/2019

CHAANANE Chaima

MOHEMMED ALI Leila

Devant le jury composé de :

| | | | |
|----------------|-------------|-----------------------|--------------|
| Mme Arrar | MAA | U.S.D.B | Président |
| Mme Chabata N. | MAA | U.S.D.B | Examinatrice |
| Mme Ghanai R. | MAA | U.S.D.B | Promotrice |
| Mr Ashir M. | Superviseur | PROMASIDOR DJAZAIR | Co-promoteur |

2018/2019

Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant, de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour accomplir ce modeste travail.*

*Il est difficile d'exprimer, en quelques lignes, nos remerciements à l'égard de notre encadreur de mémoire, **Mme Ghanai** maitre assistante à l'université de Blida, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un rapport considérable sans le quel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port, pour ces bons explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche et sa collaboration avec nous dans l'accomplissement de ce modeste travail.*

Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à **Mr Bendali**.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à **Mr Ashir Mouloud**, superviseur à l'entreprise PROMASIDORE DJAZAIR, qui nous était d'une aide indispensable pour commencer ce travail pour sa grande générosité et sa gentillesse.*

Nos grands remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche, d'avoir accepté de juger notre mémoire.

***Mme Arrar** maitre assistante à l'université de Blida d'avoir acceptée de présider le jury.*

***Mme Chabata**, maitre assistante à l'université de Blida d'avoir acceptée d'examiner ce mémoire.*

Nous sommes sûres que leurs remarques et leurs interventions éclaireront nos chemins durant nos carrières.

*Nous exprimons nos vifs remerciements aux membres de laboratoires de l'entreprise **PROMASIDORE DJAZAIR**, pour leurs aides et leurs conseils.*

Enfin mais pas en dernier, nous remercions tous les enseignants du laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques du département de Biotechnologie, qui ont contribué à la réussite de cette année universitaire.

Nous exprimons nos profonds remerciements à nos amis et à tous ceux qui nous ont apporté leur aide, de près ou de loin, afin de réaliser notre projet de fin d'études.



Chaima et Leila

Liste des abréviations

| | |
|---------------------------|---|
| A | Absorbance. |
| <i>A. niger</i> | <i>Aspergillus niger</i> . |
| C | <i>Citrus</i> . |
| DL | Doses létales. |
| DPPH : | 2, 2- diphenyl-1- picrylhydrazyl. |
| EAR : | Espèces azotées réactives. |
| <i>E.coli:</i> | <i>Escherichia coli</i> . |
| EOR | Espèces réactives d'oxygène. |
| Fe CL3 : | Chlorure ferrique |
| GPX: | Glutathion peroxydase. |
| HD : | Hydrolat. |
| HE : | Huile essentielle. |
| HCL : | Chlorure d'hydrogène. |
| I: | Inhibition. |
| IC50: | Concentration inhibitrice à 50%. |
| INRAA : | Institut national de recherche agronomique d'Algérie. |
| LPS: | Lipo-polysaccharides. |
| <i>S. aureus :</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| SOD : | Oxydedismutase. |
| Var : | Variété. |
| ZI : | Zone d'inhibition. |

Liste des tableaux

| N° de tableau | Titre | pages |
|----------------------|---|--------------|
| Tableau 01 | Les principaux composés chimiques d'orange. | 08 |
| Tableau 02 | Sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de zone d'inhibition. | 29 |
| Tableau 03 | Rendements en pourcentage des huiles essentielles des écorces de deux espèces du genre Citrus | 32 |
| Tableau 04 | Métabolites secondaires présents dans la poudre végétale et l'hydrolat des deux espèces du genre Citrus | 33 |
| Tableau 05 | Diamètre de zones d'inhibition (ZI en mm) de la croissance microbienne des huiles essentielles et des hydrolats de <i>Citrus limonum</i> et de <i>Citrus sinensis</i> . | 35 |

Liste des figures

| N° de figure | Titre | Pages |
|--------------|---|-------|
| Figure 01 | Coupe transversale de fruit d'un <i>Citrus</i> | 04 |
| Figure 02 | Coupe transversale de fruit de <i>Citrus sinensis</i> | 05 |
| Figure 03 | Feuilles, fleurs et fruits de citron | 06 |
| Figure 04 | Feuilles, fleurs et fruits d'oranger | 07 |
| Figure 05 | Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation | 11 |
| Figure 06 | Schéma du principe de la technique de l'entraînement à la vapeur d'eau | 12 |
| Figure 07 | Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion | 12 |
| Figure 08 | Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne | 20 |
| Figure 09 | Les fruits de Citrus A) : <i>Citrus limonum</i> , B) : <i>Citrus sinensis</i> . | 22 |
| Figure10 | Les écorces fraîches de Citrus a) : <i>Citrus limonum</i> b) : <i>Citrus sinensis</i> | 23 |
| Figure11 | Présentation géographique de la station de récolte d'Oued El Alleug. | 23 |
| Figure 12 | Illustration de la méthode d'aromatogramme. | 28 |
| Figure 13 | Pourcentage d'inhibition pour l'acide ascorbique, et les huiles essentielles du <i>C.limonum</i> (citron) et <i>C. sinensis</i> (orange). | 38 |
| Figure 14 | Valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% de DPPH des différents extraits en µg/ml. | 39 |

Résumé :

Dans la présente étude nous nous sommes intéressées à la valorisation des écorces de quelques variétés d'agrumes provenant de la région de Blida: *Citrus limonum* var. *Eureka* et *Citrus sinensis* var. *Washington navel*. De ce fait nous avons procédé par le test screening phytochimique qui nous a permis de mettre en évidence la richesse des écorces en composés bioactifs.

Les résultats de screening phytochimique des écorces de *C. limonum* et *C. sinensis* ont révélé la présence des anthocyanes, les tanins, les tanins galliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les mucilages pour le citron et la présence des anthocyanes, les tanins catéchiques, les tanins galliques, les alcaloïdes, les glucosides et les mucilages pour l'orange et la présence des tanins catéchiques et les flavonoïdes pour son hydrolat.

Nous avons également extrait les huiles essentielles à partir des écorces fraîches par hydrodistillation. les rendements en HE de *C. limonum* et de *C. sinensis* obtenus sont de l'ordre de 0.20 et 0.23 % respectivement.

Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence les activités antimicrobiennes et antioxydant des HEs de *Citrus* étudiées. Ainsi, les HEs de *C. limonum* et *C. sinensis* ont exercé une importante activité antibactérienne à l'encontre des levures avec des diamètres d'inhibition de (14.33±0.47 et 10.66±0.74mm) respectivement. Nous avons constaté que la sensibilité de *Candidat albicans* est plus accentuée avec l'HE de *C. limonum* qu'avec l'HE de *C. sinensis*. En revanche les bactéries à savoir *E. coli*, *S. aureus* et les moisissures, *l'Aspergillus niger* ont manifesté une résistance à l'égard de ces HEs

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de réduction du radical libre DPPH a montré que l'huile essentielle de citron (IC₅₀ = 343.11 µg/ml) est plus efficace que celle d'orange (IC₅₀ = 438.1µg/ml). Ainsi ces HEs présentent un pouvoir antioxydant moins efficace que l'acide ascorbique (IC₅₀ = 258.07µg/ml).

Les écorces d'agrumes sont une matrice hautement valorisable en vue sa richesse en ingrédients fonctionnels ayant des applications très variées dans plusieurs domaines.

Mots clés : Huiles essentielles, hydrolats, *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, screening phytochimiques, activité antimicrobiennes, activité antioxydant.

ملخص

تهدف هذه الدراسة التثمين قشور الفاكهة لنوعين من الحمضيات الموجودة في منطقة البليدة: الليمون *Citrus limonum* النوعية: يوريكا و البرتقال *Citrus sinensis* النوعية: واشنطن نافل. سمح اختبار الكشف الكيميائي النباتي بتسليط الضوء على ثراء القشرة بالمركبات النشطة البيولوجيا. كشفت نتائج الفحص الكيميائي النباتي عن وجود الأنثوسيانين، التانينات الغالية، الفلافونويدات، القلويات والصمغيات في لحاء الفاكهة لكلا النوعين. ولوحظ وجود الجلوكوزيدات في *Citrus sinensis* النوعية: واشنطن فقط. كما أظهر الاختبار وجود التانينات الكاتشينية و القلويات، في هيدرولا البرتقال (*C. sinensis*). تم استخراج الزيوت الأساسية من قشرة *C. sinensis* و *C. limonum* باستعمال طريقة التقطير المائي. وكان المردود 0.20% و 0.23% على التوالي. كما تم اختبار النشاط مضاد الميكروبات للزيت الاساسي و هيدرولا لكل من *Citrus limonum* و *Citrus sinensis* ، فأظهرت الزيوت الأساسية ل *C. limonum* و *C. sinensis* نشاطا مضادا للفطريات ضد الخمائر بأقطار تثبيط 14.33 مم ± 0.47 و 10.66 مم ± 0.74 مم على التوالي. كما أن الزيت الاساسي ل *C. limonum* اكثر فعالية مقارنة بالزيت الاساسي ل *C. sinensis* على *Candidat albicans*. و من ناحية اخرى أظهرت البكتيريا *E. coli* و *S. aureus*، العفن والفطر *Aspergillus niger* مقاومة لكليهما. إضافة إلى ذلك، تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة بواسطة تقنية DPPH، النتائج أظهرت أن الزيت الأساسية للليمون (*C. limonum*) (IC50 = 343.11 ميكروغرام / مل) أكثر فعالية من الزيت الأساسية للبرتقال (*C. sinensis*) (IC50 = 258.07 ميكروغرام / مل). و أن النشاط المضاد للأكسدة بالنسبة لكلا النوعين أقل فعالية من حمض الأسكوربيك (IC50 = 258.07 ميكروغرام / مل)

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية، هيدرولا، *C. limonum*, *C. sinensis*, الحمضيات، الفحوصات

الكيميائية النباتية، نشاط مضاد الميكروبات، نشاط مضاد الأكسدة.

Sommaire

| | |
|--|----------|
| Résumé | |
| Liste des abréviations | |
| Listes des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction..... | 1 |
| Chapitre I : Les agrumes et les espèces étudiées | 3 |
| I.1. Généralités: | 3 |
| I.2. Importance de l'agrumiculture en Algérie :..... | 3 |
| I.3. Caractères généraux des <i>Citrus</i> : | 4 |
| I.3.1. Description botanique des Citrus :..... | 4 |
| I.3.2. Effet thérapeutique des Citrus: | 5 |
| I.4. Exemple de quelques espèces de Citrus: | 6 |
| I.4.1. <i>Citrus limonum</i> (Citron) : | 6 |
| I.4.1.1. Description botanique : | 6 |
| I.4.1.2. Caractéristiques morphologiques de la variété <i>Eureka</i> : | 7 |
| I.4.1.3. Composition :..... | 7 |
| I.4.2. <i>Citrus sinensis</i> (Orange douce) :..... | 7 |
| I.4.2.1. Description botanique : | 7 |
| I.4.2.3.Composition chimique..... | 8 |
| Chapitre II: Les huiles essentielles et les hydrolats | 9 |
| II. 1 Les huiles essentielles : | 9 |
| II.1.1 Définition :..... | 9 |
| II.1.2. Localisation et lieu de synthèse :..... | 9 |
| II.1.3. Propriétés physico-chimiques:..... | 10 |
| II.1.4. Composition chimique : | 10 |
| II.1.5. Facteurs influençant la composition chimique : | 10 |
| II.1.6. Notion de chémotype :..... | 11 |
| II.1.7. Méthodes d'extraction des huiles essentielles : | 11 |
| II.7.1.1.Distillation : | 11 |

| | |
|--|-----------|
| II.7.1.2. Extraction par solvants volatils : | 13 |
| II.7.1.3. Extraction à froid : | 13 |
| II.7.1.4. Extraction assistée par micro-ondes : | 14 |
| II.1.8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles : | 14 |
| II. 1.8.1. Pharmacie et aromathérapie : | 14 |
| II. 1.8.2. En Parfumerie et cosmétiques : | 15 |
| II. 1.8.3. En industries agroalimentaires : | 15 |
| II. 1.8.4. En lutte biologique..... | 15 |
| II. 1.9. Toxicité des huiles essentielles : | 16 |
| II. 1.10.Conservation des huiles essentielles : | 16 |
| II.2. Les hydrolats : | 16 |
| II.2.1. Définition : | 16 |
| II. 2.2. Conservation des hydrolats : | 17 |
| II. 2.3. Composition chimique : | 17 |
| II.2.4.Domaines d'applications : | 17 |
| Chapitre III: Activités biologiques et huiles essentielles..... | 18 |
| III.1. Activité antioxydant : | 18 |
| III.1.1.Stress oxydatif : | 18 |
| III.1.3. Antioxydants : | 18 |
| III.1.4. Activité antioxydant et huiles essentielles : | 19 |
| III.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles : | 19 |
| III.3.Activité antifongiques des huiles essentielles : | 21 |
| Matériels et méthodes | 22 |
| 1. Matériel : | 22 |
| 1.1. Matériels biologiques : | 22 |
| 1.1.1. Matériel végétal : | 22 |
| 1.1.2. Les souches microbiennes : | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2. Matériels non biologiques :..... | 24 |
| 2. Méthodes :..... | 24 |
| 2.1. Extraction des huiles essentielles :..... | 24 |
| 2.2. Test du screening phytochimique : | 25 |
| 2.3. Etude du pouvoir antimicrobien :..... | 27 |
| 2.4. Activité antioxydant :..... | 30 |
| Résultats et discussion..... | 32 |
| 1. Rendement des huiles essentielles : | 32 |
| 2. Test du screening phytochimique: | 33 |
| 3. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et des hydrolats :..... | 35 |
| 4. Activité antioxydant :..... | 38 |
| Conclusion..... | 41 |
| Références bibliographiques..... | 43 |
| Annexes. | |

Introduction :

Depuis longtemps, les plantes ont été une source d'inspiration pour les nouveaux composés médicamenteux. Presque toutes les civilisations et les cultures de l'antiquité ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité et la faible toxicité qui est liée à la dose (**koudaly et al., 2014**).

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 HE 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 (**Hellal, 2011**).

L'Algérie, de par sa gamme de climats très variée et sa situation géographique, possède un ensemble considérable d'espèces naturelles qui représentent un patrimoine phytogénétique de très grande importance vu leur mode de répartition spatiale et leur rôle dans l'équilibre écologique (**Snoussi et al., 2003**).

Parmi ces plantes, nous avons les agrumes qui représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes dans le monde. Leur production mondiale est estimée à plus de 115 millions de tonnes par an dont 517 milles tonnes ont été produits en Algérie. Cette dernière occupe la 19ème place mondiale et la 2ème dans l'Union Maghrébin Arabe **Lagha-Benamrouche et al, 2016**)

La consommation et l'industrie de transformation des agrumes génèrent de gigantesques masses de sous-produits tels que les écorces, les pulpes et les pépins. Ces derniers présentent une marge de 45 à 60 % du fruit entier et qui sont souvent rejetés dans la nature (**Goreinstein et al., 2001 ; Li et al., 2006**) Cité par **Lagha- Benamrouche et al, 2016**). Au cours de la transformation des agrumes, les écorces sont les sous produits primaires, non traitées, elles deviennent une source de pollution environnementale (**Bocco et al., 1998 ; Wang et al., 2008**) Cité par (**Lagha- Benamrouche et al, 2016**). Des études récentes ont montré que ces écorces sont une source de composés biologiquement actifs. Elles sont riches en vitamine C et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques en particuliers les flavonoïdes et les huiles essentielles (**Huang et al., 2010 ; Moulhi et al., 2012**) Cité par(**Lagha- Benamrouche et al, 2016**) . Ces dernières sont les composés les plus

importants grâce à leurs diverses activités biologiques tels que les activités antimicrobiennes, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (**Hosni et al., 2010**) Cité par(**Lagha-Benamrouche et al, 2016**)

D'autre part, en revanche des huiles essentielles qui présentent en général de faibles rendements, les hydrolats font un intérêt pour certains auteurs.(**Souza et al., (2007) ; mali et Ozcan., (2006) ; Sagdic et Ozcan., (2003)**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à étudier l'effet antimicrobien et antioxydant de deux espèces d'agrumes *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* dans un but d'exploitation des écorces d'agrumes d'une part et de contribuer à résoudre le problème de contamination et d'oxydation des produits alimentaires en utilisant les extraits des plantes ce qui permet de limiter l'utilisation des produits synthétiques ou chimiques.

Dans cette optique, nous nous sommes assignés, dans le présent travail, les objectifs suivants :

- Recherche des métabolites secondaires par le screening phytochimique à partir des écorces de deux espèces du genre *Citrus* : *Citrus limonum* et *Citrus sinensis*
- Extraction des huiles essentielles à partir des écorces fraîches de *Citrus limonum* et *Citrus sinensis*.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante (effet scavenger vis-à-vis du DPPH et le pouvoir réducteur).
- Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne.

Matériel et méthodes

Notre travail consiste à l'étude de l'effet antimicrobienne et antioxydant des huiles essentielles de deux espèces du genre Citrus ; *Citrus sinensis* et *Citrus limon* provenant de la région de Mitidja la ville d'Oued El Alleug.

L'étude expérimentale a été réalisée, durant la période allant du mois de février jusqu'à la fin du mois de mai 2019, au niveau des laboratoires suivants :

- Laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales, Département de Biotechnologie, université de Blida 1, où ont été réalisées les extractions des huiles essentielles, l'étude de l'effet antioxydant et le test du screening phytochimique.
- Laboratoire de l'entreprise PROMASIDOR DJAZAIR de Blida pour l'étude de l'effet antimicrobien des huiles essentielles.

1. Matériel :

1.1. Matériels biologiques :

1.1.1. Matériel végétal :

Les plantes choisies comme modèle d'étude sont : *Citrus limonum* Var. *Eureka* et *Citrus sinensis* Var. *Washington* de la famille des Rutaceae. Les fruits ont été récoltés à partir d'une exploitation agrumicole privée située dans la région d'Oued El Alleug wilaya de Blida. La récolte a été faite d'une manière aléatoire en fonction de la période de maturation de chaque variété durant la période allant du mois de février au mois de mars 2019. Les fruits fraîchement récoltés sont nettoyés, lavés, séchés avec une serviette en coton propre. Le zeste (épicarpe d'agrume) est récupéré à l'aide d'un économe (en évitant d'inclure l'albédo). Les écorces sont coupées en petits morceaux d'environ 1 cm² maximum.



A)



B)

Figure 11: Les fruits de *Citrus* **A)** :*Citrus limonum*, **B)** :*Citrus sinensis*.



a)



b)

Figure 12 : Les écorces fraîches de *Citrus* **a)**: *Citrus limonum* **b)**: *Citrus sinensis*.

1.1.2. Présentation de la région de Mitidja :

- **Situation géographique :**

La Mitidja est la plus vaste plaine sub-littorale d'Algérie elle s'étend sur 140.000 hectares, s'étirant sur une centaine de kilomètres de long, et 5 à 20 kilomètres de large. Elle est isolée de la mer par la ride de Sahel, prenant appui sur le vieux massif de Chenoua. Au sud et sur les marges orientales et occidentales, la Mitidja est bornée par tout un ensemble de montagnes. Au nord-ouest et à l'ouest, le Djebel Chenoua et la retombée de la chaîne de Boumaad avec Djebel Zaccar ferment la plaine. Au sud, l'Atlas Mitidjien constitue une barrière continue. A l'est, le relais est pris par les premières chaînes de calcaire du massif Kabyle (Djebel Bouzegza). En fin,

ce sont les hauteurs et les collines de Basse Kabyle qui ferment la plaine à l'est. (Mutin, 1977).

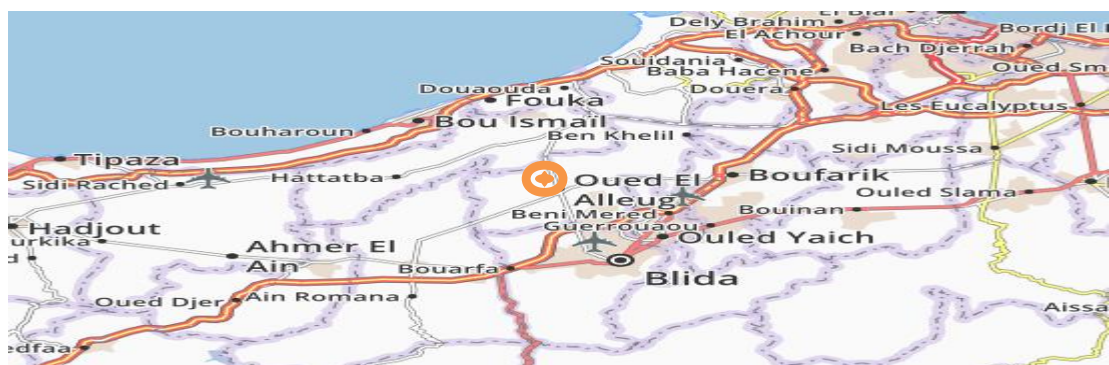
- **Le Climat**

Les précipitations mensuelles en Mitidja ont un régime typiquement méditerranéen avec un maximum en hiver et un minimum en été, varient entre 600 et 900 mm en fonction de la région considérée (Mutin, 1977).

Les vents les plus redoutés pour les vergers de la Mitidja sont ceux qui soufflent en hiver de l'ouest et du nord-ouest modérés, ils frappent, parfois, fortement à la fin de l'automne (novembre) et en hiver, or les vents desséchant (sirocco) du sud provoquent des dommages aux vergers lorsqu'ils sont insuffisamment protégés. (Mutin, 1977 ; Mutin, 1969).

1.2.3. Présentation de la station de récolte :

La région de Oued El Alleug située au niveau de l'Atlas Blidéen dans la Mitidja centrale, Il est situé à $36,55528^\circ$ Nord et $2,79028^\circ$ Est. La hauteur de l'Oued el Alleug est de 47 mètres d'altitude. (Figure 12).



○ La localité de récolte.

Figure 12 : Présentation géographique de la station de récolte d'Oued El Alleug.

1.1.4. Les souches microbiennes :

Le choix des bactéries a été porté sur deux souches (*S. aureus* et *E. coli*), fréquentes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif). Ces deux espèces bactériennes sont souvent responsables d'infections nosocomiales qui constituent un problème majeur de santé publique (diarrhée, infection urinaire, méningite, septicémie, infections cutanées). L'émergence de la multirésistance chez ces bactéries est une des principales causes d'échec thérapeutique.

Ces souches bactériennes (*E. coli* et *Staphylococcus aureus*) et les deux autres souches fongiques : *Candida albicans* et *Aspergillus niger*, nous ont été fournies par le responsable de laboratoire de microbiologie de l'entreprise pharmaceutique : EL KINDI de la wilaya d'Alger

Les souches fongiques (moisissures et levures) nous ont été fournies par le responsable de laboratoire de contrôle de qualité de l'entreprise PROMASIDOR, il s'agit de levures et moisissures, qui attaquent souvent les produits alimentaires.

1.2. Matériels non biologiques :

Le matériel utilisé au laboratoire « l'appareillage, la verrerie, et les réactifs » est énuméré en Annexe 1.

2. Méthodes :

2.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation :

- **Principe :**

Cette méthode consiste à immerger directement la plante aromatique dans un volume d'eau, on porte le mélange à ébullition, puis les vapeurs qu'il dégage sont condensées. L'huile essentielle est récupérée à la surface de l'eau aromatique (ou phase aqueuse) ainsi obtenue. (Millet, 2013).

- **Mode opératoire :**

Mètre 50g du matériel végétal (dans notre cas l'épicerpe frais de l'orange douce et citron) dans un ballon rond de 1000 ml et introduire 750 ml d'eau dans le même ballon.

Chauffer le contenu avec un chauffe ballon, la vapeur se charge de substance volatils qui vont être condensées grâce à un réfrigérant, et cela pendant deux à trois heures. La récupération des HE est faite après la lecture du rendement à l'aide de la burette graduée attaché à l'appareil.

A la fin de chaque extraction, ces huiles essentielles sont récupérées directement sur un eppendorf.

La distillation est répétée plusieurs fois et le volume globale de l'huile essentielle est estimé en (ml).

Les huiles essentielles obtenues sont conservées au réfrigérateur à +4 °C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation pour les tests biologiques

- **Détermination du rendement en huiles essentielles :**

Le rendement est obtenu par rapport à la matière végétale fraîche et exprimé selon la formule ci –dessous :

$$\mathbf{RH = (V / MMV) .100}$$

Où :

RH : Rendement des huiles essentielles en (ml) par apport à 100g de matière fraîche (%).

V : volume d'huile essentielle en (ml).

MMV : masse de la matière végétale fraîche (g).

2.2. Test du screening phytochimique :

Ce test consiste à détecter les différents familles chimiques existant dans la partie étudiée de la plante soit sur la poudre de broyat, soit sur un infusé par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé (**Bouyer, 1996**).

2.2.1. Préparation de l'infusé :

Les écorces de *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* ont été séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 4 jours, ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine. Cette dernière est tamisée dans le but d'obtenir une poudre très fine de diamètre inférieur à 50µm qui est utilisée pour la préparation de l'infusé.

A 10 g de poudre végétale, sont ajoutés 100 ml d'eau distillée bouillante, laissé infuser pendant 15 min avec agitation de temps en temps, après filtrer et récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette.

2.2.2. Identification de quelques métabolites secondaires :

➤ Les anthocyanes :

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés quelques gouttes d'ammoniaque 1/2. L'apparition d'une couleur rouge, indique la présence des anthocyanes.

➤ Les tanins :

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés quelques gouttes d'une solution de Fe CL₃ à 5 %.

La réaction donne une coloration bleu noir en présence des tanins.

➤ Les tanins catéchiques :

15 ml d'infusé, sont additionnés à 7 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% et 5 ml d' HCL concentré).

La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchiques.

➤ Les tanins galliques :

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de Fe CL₃.

La réaction donne une coloration bleue foncée en présence des tanins galliques.

➤ **Les flavonoïdes :**

A 5 ml d'infusé, sont additionnés 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isomylique.

La réaction donne une coloration rouge orangée en présence des flavonoides.

➤ **Les alcaloïdes :**

Introduire 1g de poudre végétale dans un tube à essai, ajouter 10 ml d'acide sulfurique (10%)

Agiter énergiquement pendant 2 minutes et filtrer, ajouter 2 gouttes du réactif de Dragendorff.

Résultats : apparition d'un précipité rouge orangé.

➤ **Les glucosides :**

A 2 g de poudre végétale, sont ajoutées quelques gouttes d'acide sulfurique.

La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides.

➤ **Les mucilages :**

On introduit 1 ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5 ml d'éthanol absolu, l'obtention d'une précipitation floconneux indique la présence des mucilages..

2.3. Etude de pouvoir antimicrobien :

Cette étude a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque.

2.3.1. Méthode de diffusion par disque :

• **Milieus de culture utilisés :**

Pour les souches bactériennes :

- Milieu VRBL (pour *E.coli*).
- Milieu PCA (pour les germes aérobies).
- Milieu BPAB (pour les *Staphylococcus aureus*).

Pour les souches fongiques :

- Milieu Sabouraud.

- **Méthode de l'aromatogramme :**

Selon Sallé, (1991), Cette méthode est une technique microbiologique qui permet d'étudier la sensibilité des germes à différentes huiles végétales, c'est à-dire leur pouvoir antibactérien et antifongique.

- **Principe :**

Cette technique est comparable à l'antibiogramme. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du produit à tester en milieu solide, dans une boîte pétri préalablementensemencée. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu, créant une zone claire d'inhibition de croissance du germe, autour du disque chargé d'agent antimicrobien (figure 15).

La lecture des résultats est effectuée en fonction de l'existence ou non des zones d'inhibition (Saïhi, 2011). En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes (Amana, 2007).

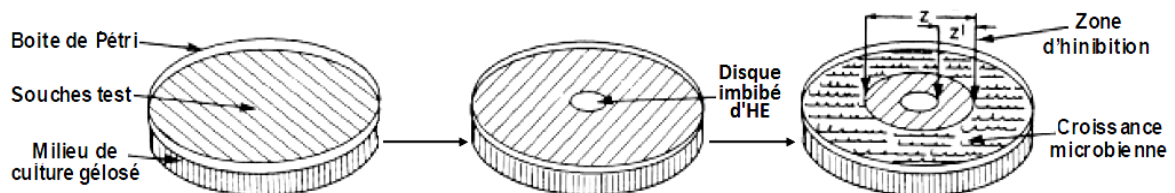


Figure 15: Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de pétrie (Pibiri, 2006).

- **Mode opératoire :**

Le protocole adopté est celui de la **Pharmacopée européenne (2002)**.

✓ Préparation de l'inoculum :

Préparer une suspension microbienne à partir de cultures jeunes de bactéries (24H) ou de levure (48H). Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant 5 ml de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes.

✓ Préparation des milieux de culture :

Liquéfier les milieux de cultures VRBL, PCA, BPAB (pour les souches bactériennes) et Sabouraud (pour les souches fongiques) dans un bain marie.

Verser aseptiquement les milieux de culture gélosés sur les boîtes de Pétrie à raison de 20 ml par boîte.

Fermer et laisser refroidir et solidifier à température ambiante, et conserver dans des conditions évitant toutes contaminations ou modification de leur composition.

✓ Ensemencement :

Imbiber aseptiquement un écouvillon stérilisé avec la suspension microbienne. Presser le fermement en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger du surplus de suspension. (Annexe)

Ensemencer aseptiquement une boîte de Pétri en frottant délicatement l'écouvillon sur la surface de la gélose en stries serrées, répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte à 60° de façon à croiser les stries, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

✓ Préparation et dépôt des disques :

A l'aide d'une micropipette mouiller les disques stériles de 6 mm de l'huile essentielle pure (ou hydrolat), qui va être absorbée par capillarité.

A la surface de la gélose de chaque boîte Pétri, déposer stérilement trois disques mouillés. (Annexe).

Incuber les boîtes à 37°C durant 24h pour les bactéries et à 25°C durant 48h pour les champignons.

✓ Lecture des résultats :

L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'un pied à coulisse mesurant le diamètre de la zone d'inhibition si elle existe. Le degré de sensibilité ou de résistance des souches microbiennes est estimé selon le diamètre de la zone d'inhibition (**Tableau 06**).

Tableau 06 :Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition.

| Echelle de sensibilité des souches | Diamètre de la zoned'inhibition (mm) |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Non sensible/ résistante (-). | $\varnothing < 8$ mm. |
| Sensible (+) | $9 < \varnothing < 14$ mm. |
| Très sensible (++) | $15 < \varnothing < 19$ mm. |
| Extrêmement sensible | $\varnothing > 20$ mm. |

N.B : Afin d'assurer les conditions d'asepsie locale indispensables, le travail s'est effectué près d'un bec Bunsen (pour stériliser les instruments en les passant dans la flamme).

2.4. Activité antioxydant :

L'activité antioxydant des HE et hydrolats extraites des écorces fraîches a été déterminée par le test de piégeage du DPPH : le radical libre DPPH (2,2 diphényl-picrylhydrazyl : (C₁₈H₁₂N₅O₆) est utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse aux stress externes ou internes. (Djeddi et al., 2015).

- **Principe :**

Le principe est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle des piégeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétique ou naturels, le radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picryl hydrazy), qui est caractérisé par sa couleur violette, se réduit en 2,2 diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune. La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant est peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants.

(Molyneux, 2004)

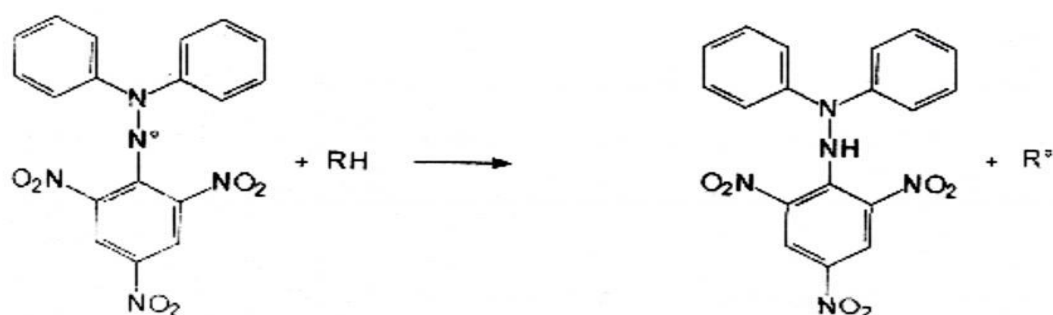


Figure 14 : Réaction du DPPH avec un antioxydant (Obame, 2009).

- **Mode opératoire :**

L'activité antioxydant in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH selon la méthode décrite par (Burits et Bucar), où 50µl de chacune des solutions méthanoliques de l'huile essentielle testées à différentes concentrations (200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) sont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm.

L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine C a été également analysée à la même concentration pour comparaison. On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine C et pour l'huile essentielle (pourcentage d'inhibition, l'index IC₅₀).

- **Détermination du pourcentage d'inhibition :**

Selon Sharififar et al. L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Avec :

A_{blanc} : Absorbance du blanc (méthanol).

Aéchantillon : Absorbance du composé d'essai.

La cinétique des réactions des huiles essentielles et de la vitamine C avec le DPPH a été inscrite à chaque concentration examinée. Les concentrations en huile essentielle et en vitamine C, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50%.

Résultats et **discussions**

Résultats et discussion

1. Rendement des huiles essentielles :

L'extraction menée pour les différentes huiles essentielles a permis d'obtenir des rendements qui varient en fonction de l'espèce étudiée. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Rendements en pourcentage des huiles essentielles des écorces de deux espèces du genre citrus.

| L'huile essentielle | <i>Citrus limonum</i> | <i>Citrus sinensis</i> |
|---------------------|-----------------------|------------------------|
| Rendement en (%) | 0.20 % | 0.23 % |

Les résultats représentés dans le tableau 3, montrent que les rendements en HE de *C. limonum* et de *C. sinensis* obtenus par hydro distillation sont de l'ordre de 0.20 et 0.23 % respectivement. En termes de valeurs, les deux espèces de *Citrus* utilisées ont donné des rendements presque similaires.

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'HE(RE200). Les résultats obtenus dans notre travail sont inférieurs aux autres résultats cités. En effet, **Jeannot *et al.*, (2005)** et **Fuselli *et al.*, (2008)** ont noté des rendements allant de 0,6 à 0,8% pour l'HE de *C. sinensis* et 0,7 à 0,9% pour l'H.E de *C.limonum* Cependant, les résultats publiés par **Kamal *et al.*, (2011)** ont montré des rendements plus élevés des HEs extraites par hydrodistillation des écorces séchées à température ambiante de *C. sinensis*.

Des résultats proches des nôtres ont toutefois été obtenus par **Ferhat *et al.*, (2010)** , **ce dernier**, en travaillant sur l'huile essentielle (extraite par hydrodistillation) des écorces de *C. limonum* provenant de la région de Boufarik, a obtenu un rendement de 0.21%.

Rega *et al.*, (2003) ont rapporté que les rendements en HE 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 et Tepe., (2008)** par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'HE. 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 HE (**Vekiari *et al.*, 2002**).

Nous pouvons dire que les quantités obtenues en HE pour les 2 espèces de *Citrus* utilisées, dans la pratique restent satisfaisantes par rapport à l'ensemble, pour mener à bien une telle étude car les quantités en HE nécessaires sont généralement de l'ordre des microlitres.

Résultats et discussion

2. Test du screening phytochimique:

Le test phytochimique est une analyse qualitative qui nous permet de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires existant dans les écorces d'agrumes. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de colorations par des réactifs spécifiques. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, ou de coloration, qui sont proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

Les résultats de ses tests préliminaires sont motionnés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Métabolites secondaires présents dans la poudre végétale et hydrolat des deux espèces du genre *Citrus*.

| Plantes / Métabolites | Les écorces du <i>Citrus limonum</i> | Hydrolat de <i>Citrus limonum</i> | Les écorces de <i>Citrus sinensis</i> | Hydrolat de <i>Citrus sinensis</i> |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Les anthocyanes | Présence ++ | Absence | Présence + | Absence |
| Les tanins | Présence ++ | Absence | Absence | Absence |
| Les tanins catéchiques | Absence | Absence | Présence +++ | Présence + |
| Les tanins galliques | Présence +++ | Absence | Présence +++ | Absence |
| Les flavonoïdes | Présence +++ | Absence | Absence | Présence + |
| Les alcaloïdes | Présence + | - | Présence +++ | - |
| Les glucosides | Absence | - | Présence +++ | - |
| Les mucilages | Présence + | Absence | Présence ++ | Absence |

+++ : Fortement positif / ++ : moyennement positive / + : faiblement positive.

D'après les résultats du tableau 4, l'hydrolat de *C. limonum* ne renferme aucun métabolite secondaire recherché tandis que l'hydrolat du *C. sinensis* renferme les tanins catéchiques et les flavonoides en faible quantité. Contrairement aux huiles essentielles, il existe peu de travaux portant sur la composition chimique et l'activité biologique des hydrolats (Yann et Olivier., 2015).

L'huile essentielle de *C. limonum* renferme les anthocyanes, les flavonoides en grande quantités, et en faible quantité les alcaloïdes, et les mucilages, nous constatons aussi la présence des tanins et les tanins galliques, cependant, nous marquons l'absence des tanins catéchiques et les glucosides. Ces résultats corroborent ceux de Ashok et al. pour les écorces d'oranges douces et citron.

Concernant l'huile essentielle de *C. sinensis* nous remarquons la présence des tanins catéchiques, les tanins galliques, les alcaloïdes, les glucosides et les mucilges en quantités abondantes, tandis que les tanins et les flavonoides sont absent et les anthocyanes existe en

Résultats et discussion

faible quantité. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par **Lagha-Benamrouche et al, (2016)**. Ces derniers ont révélé la présence des composés phénoliques (tanins et coumarines), des terpénoïdes, des sucres (sucres réducteurs, oses et holosides) et des mucilages dans les écorces d'orange, avec des proportions variables, avec une différence qui est l'absence des alcaloïdes et la présence des flavonoïdes.

Nous avons notées la présence des flavonoïdes chez le *C. limonum* et l'absence pour le *C. sinensis*. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Lagha- Benamrouche et al, 2016** qui ont révélé la présence des flavonoïdes dans les écorces de *C. sinensis*.

Selon **Gorinstein et al., (2001) Londono-londono et al.,(2010) Moulehi et al. et Ballester et al. ,** Les écorces d'agrumes contiennent différents types de flavonoïdes. Cette variabilité de la teneur en flavonoïdes chez le citron et l'orange a également été signalée par d'autres auteurs (**Ghasemi et al, 2009 ; Ramful et al, 2010**).

Selon **Lagha-Benamrouche et al, 2016**).Les tanins sont présents dans les écorces de *C. sinensis*, sous formes de tanins totaux, catéchiques et galliques tandis que notre test révèle l'absence des tanins totaux.

Pour les anthocyanes nos résultats sont différents de ceux obtenus par **Bernardi et al.** qui ont trouvés que les anthocyanes sont identifiés uniquement dans les variétés rouges (Sanguinelli, Double fine et Portugaise). Ce qui explique la pigmentation de leurs chairs et peaux en rouge violacé.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **He et al., (2011)** qui affirment également la présence des alcaloïdes dans les écorces de différents hybrides d'agrumes. Selon (**Lagha-Benamrouche et al, (2016)** Cette présence peut être expliquée par la différence des méthodes et des solvants d'extraction utilisés, par des facteurs génétiques, climatiques et édaphiques de la région de la récolte.

1. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et hydrolats :

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, la technique utilisée est celle de l'aromatogramme (la méthode de diffusion par disque), identique à celle de l'antibiogramme pour les antibiotiques. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.

Les résultats de la mesure du diamètre des zones d'inhibition des huiles essentielles du *C. limonum* et *C. sinensis* vis-à-vis les bactéries, champignon, levure et moisissures sont résumés dans le **tableau 10**.

Résultats et discussion

Tableau 10 : Diamètre de zones d'inhibition (ZI en mm) de la croissance microbienne des huiles essentielles et hydrolats de *Citrus limonum* et *Citrus sinensis*.

| Les souches microbiennes | | Zones d'inhibition (mm) | | | | | | Normes |
|--------------------------|----------|-------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------|-------------|-------------------------------|
| | | E. coli | S.aureus | <i>Candidas albican</i> | <i>Aspergillus niger</i> | Levure | moisissures | |
| <i>Citrus limonum</i> | HE | 6 ± 0 | 7.33 ± 0.47 | 9 ± 0.81 | <6 | 14.33 ± 0.47 | <6 | Souche résistante Ø<8 mm |
| | Hydrolat | 7 ± 0 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | Souche sensible 9≤Ø≤14 |
| <i>Citrus sinensis</i> | HE | 7 ± 0.81 | <6 | <6 | <6 | 10.66 ± 0.47 | <6 | Très sensible 15≤Ø≤19 |
| | Hydrolat | 6.33 ± 0.47 | <6 | <6 | <6 | <6 | <6 | Extrêmement sensible Ø> 20 |

Les huiles essentielles présentent une activité inhibitrice sur la croissance de certains germes microbiens, la sensibilité des bactéries aux HE est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur disque.

Les résultats obtenus, montrent que la variation de l'activité antimicrobienne des HES testé est en fonction e la souche cible. Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis d'*E.coli* pour l'huile essentielle de *C.limonum*. En revanche la souche d'*E. coli* a manifesté une résistance relative vis-à-vis de huile essentielle de *C. sinensis* et son hydrolat et pour l'hydrolat de *C. limonum* malgré les faibles zones d'inhibitions observées (7mm 6.33mm et 7 mm respectives). Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par (Hellal., 2011) qui ont révélé que la souche d'*E. coli* a manifesté une

Résultats et discussion

résistance relative vis-à-vis des huiles essentielles de *C. limonum* et *C. sinensis* malgré les faibles zones d'inhibitions observées (8,33 et 8 mm respectivement).

Selon **Moreira et al, (2005)** l'huile essentielle de *C. limonum* était efficace contre 3 souches d'*E.coli*. Au contacte des Gram positifs, l'huile essentielle extraite des écorces fraîches de *C. limonum* montre une action légèrement inhibitrice de la croissance de *S. aureus* ($7.33\pm 0.47\text{mm}$).

De Billerbeck (2007) a rapporté que *S. aureus* a présenté une sensibilité variable envers les HE de quelques espèces de *Citrus* testées, en effet, les HEs 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.

D'après **Kalembe et Kunicka, (2003)**, la sensibilité d'un microorganisme aux HEs dépend des propriétés de l'HE et le microorganisme lui-même. **Zaika (1988) et Hussein (1990)**, ont montré que les bactéries à Gram positifs résistent mieux aux huiles essentielles, que les bactéries à Gram négatifs, ce qui est contraire aux résultats trouvés par **Farbood et al. (1976), Farag et al. (1989), Jay (1996), Inouye et al. (2001)**, auteurs qui ont révélé que les bactéries à Gram positifs sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles que celles à Gram négatifs.

Chao et al. (2000), ont expliqué que les bactéries à Gram négatifs sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huiles ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis des huiles.

Elgayyar et al. (2001) et Delaquis et al. (2002) sont en désaccord avec ce rapport, car pour ces auteurs, il est très difficile de faire de telles généralisations du fait que chaque essence est unique dans sa composition et chaque bactérie à Gram positif diffère considérablement l'une de l'autre en structure et en fonctionnalité.

Deans et al. (1995) et Dorman et Deans (2000), ont proposé que la susceptibilité des bactéries envers les huiles essentielles, ne semble avoir qu'une petite influence sur l'inhibition de la croissance microbienne. Les mécanismes d'action des HEs et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés (**Hellal., 2011**).

Concernant l'activité inhibitrice des HEs et hydrolats sur les souches fongiques utilisées, il apparaît clairement que l'HE de *C. limonum* et de *C. sinensis* présente un pouvoir anti-fongique contre les levures avec des diamètres d'inhibition (14.33 ± 0.47 et $10.66\pm 0.47\text{mm}$) respectivement et une action légèrement inhibitrice contre *Candidas albican*

Résultats et discussion

avec une diamètre d'inhibition ($9\pm 0.81\text{mm}$). Contrairement à *A. niger* et les moisissures qui présentent des résultats négatifs.

Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules bactériennes et fongiques (**Cristiani et al., 2007**). Les constituants majeurs de l'huile essentielle de citron β - pinene et le D- limonene, peuvent inhiber l'activité respiratoire dans les cellules intactes de levures et dans les mitochondrie isolées (**Uribe et al., 1985**).

Giordani et Kaloustian (2006) ont souligné que les composé terpéniques des HEs et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure.

En comparant les données obtenues des différentes études, nos résultats pour l' *A. niger* concordent avec les résultats obtenus par (**Adjebli et al., 2017**) qui ont trouvés des résultats négatifs pour les huiles essentielles de *C. limonum* et *C. sinensis* vis-à-vis l' *A. niger* .

Concernant les levures nos résultats sont presque en accord avec ceux obtenus par (**Sayah et al., 2013**) pour les écorces d'oranges douces et citron. Ces derniers ont révélé une activité inhibitrice claire mais dont l'importance varie d'une huile à une autre. Bien qu'elles aient toutes le même composé majoritaire (le limonène), l'inhibition de la croissance microbienne varie de 69,1% (*Citrus sinensis*) à 100% (*Citrus limonum*). Ceci peut être expliqué par « l'effet de matrice », c'est l'action des composés minoritaires conjuguée à celle du limonène (composé majoritaire).

La variabilité des résultats est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les microorganismes testés et les huiles essentielles utilisées (**Pattnaik et al., 1996**). Cela a été confirmé par **Suhr et Nielsen (2003)**, qui ont mentionné que l'effet antifongique des huiles dépend de la méthode d'application.

Dans nos résultats, nous remarquons que l'HE de *C.sinensis* est la plus faible en termes d'inhibition de la croissance microbienne par rapport l' HE de *C.limonum*. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (**Sayah et al., 2013**).

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limonum* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalol (**Alma et al., 2004 ; Tepe et al., 2006**). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers

Résultats et discussion

composant (Deba et al., 2008). Veldhuizen et al., (2006) ont attribué cette activité aux composés phénoliques dont l'amphipathicité de ces composés peut expliquer leurs interactions avec les constituants membranaires et ainsi l'activité antimicrobienne. Cependant la comparaison de l'efficacité des HE à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externe comme la composition chimique des HEs qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce, les génotypes, les méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne, le choix et conditions physiologiques des microorganismes, la période de l'exposition du microorganisme à l'HE, aux doses d'HE utilisées, le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les HE. Ceux-ci autant de facteurs pouvant expliquer parfois des résultats contradictoires des différentes études (Hellal., 2011).

4.L'activité antioxydant :

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits (Figure 16) (Annexe 1)

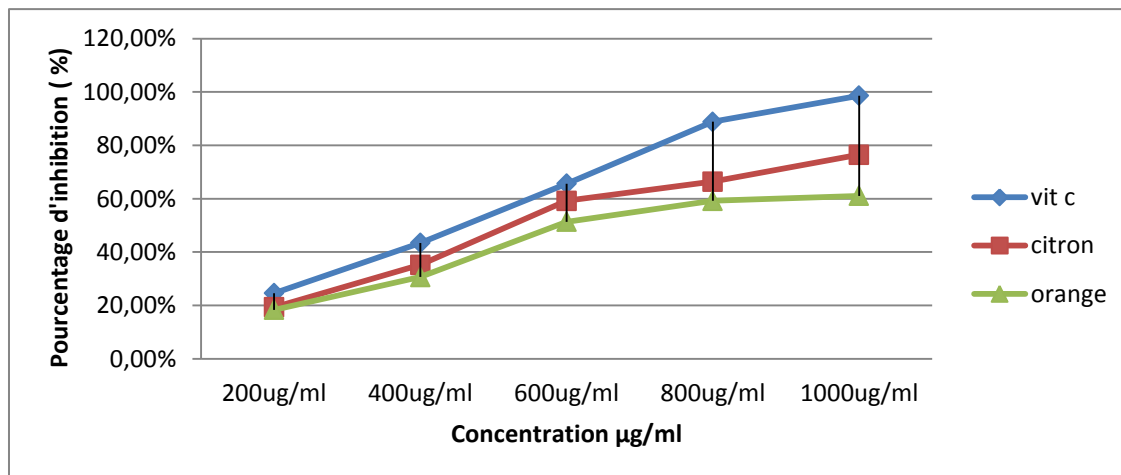


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition pour l'acide ascorbique, et les huiles essentielles du *C.limonum* (citron) et *C. sinensis* (orange).

D'après les résultats montrés dans la figure 16, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente avec l'augmentation de concentration (de 200ug/ml jusqu'à 1000ug/ml) soit pour l'acide ascorbique ou pour les deux HE *C.limonum* et *C. sinensis*.

Les résultats obtenus ont montré que la capacité antioxydant est plus élevée pour l'huile essentielle de *Citrus limonum* par rapport à celle de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, mais les deux sont inférieurs à celui d'acide ascorbique.

Résultats et discussion

Détermination d'IC50 :

L'activité antioxydante évaluée pour les deux extraits d'agrumes *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* et le standard utilisé est exprimé en IC50 (concentration inhibitrice 50) ; c'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% de radical libre (DPPH), plus l'IC50 est faible plus l'extrait est doté d'un potentiel antioxydant puissant. L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC50 est représenté dans la **figure 17** :

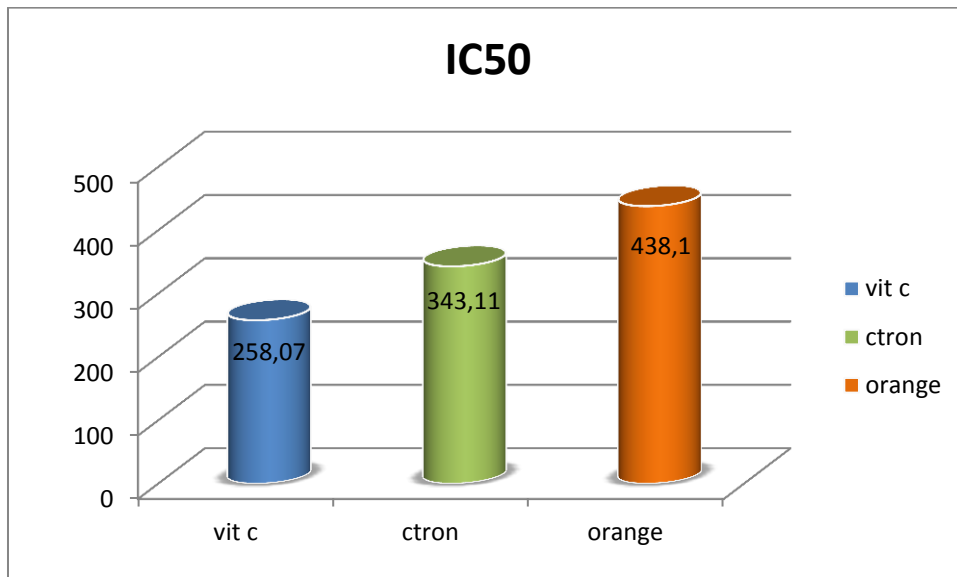


Figure 17 : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% de DPPH des différents extraits en µg/ml.

D'après ces résultats, nous avons constatés que l'activité antioxydant de l'huile essentielle de *C. limonum* (IC50 = 343.11 µg/ml) est supérieur à celle de l'huile essentielle de *C. sinensis* (IC50 = 438.1µg/ml). D'autre part, ces valeurs sont inférieures à celle de l'acide ascorbique avec un IC50 de 258.07µg/ml. L'étude de pouvoir antioxydant a confirmé la propriété antioxydant que possède les huiles essentielles de Citrus mais avec une efficacité anti-radicalaire beaucoup moins important que celle de l'acide ascorbique.

L'activité antioxydant des HE testées est probablement liée aux composants majoritaires qui sont principalement les monoterpènes notamment le D-limonène, le β-pinène et le γ-terpène (Misharina et Samusenko, 2008). Selon Tang et al., (2001), le β-pinène et le limonène présentent des propriétés antioxydant importante ; ils oont minimisé le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyl.

Moufida et Marzouk, (2003) ont confirmé que ces HE sont constituées majoritairement de limonène.

Résultats et discussion

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydant, mais il peut avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (**Svoboda et Hampson., 1999**).

Majnooni et al. (2012) suggèrent la possibilité d'utiliser l'huile essentielle de citrus comme une source potentielle d'antioxydants. Ils ont démontré que l'huile essentielle de citrus avait une forte capacité à piéger les radicaux libres (DPPH,) et un grand pouvoir réducteur. Cette activité antioxydant du citrus a été aussi confirmé par **Siddique et al.,(2011)** Nos résultats sont en accord avec ceux déjà publiés qui ont montré que l'écorces de citrus représentent la fraction la plus riche en polyphénols, laquelle a révélé un potentiel antioxydant puissant (**Bacco et al., 1998 ; Gorinstein et al., 2001**).

Suhr K.I. et Nielson P.V. (2003). Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application technique against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. **94** :665-674.

DEANS S.G., NOBLE R.C., HILTUNEN R., WURYANI W. et PENZES L.G., 1995 : Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry : Impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour and Fragrance J.*, Vol. 10, pp : 323 – 328

SAYAH M.Y., TAOUDA H., CHABIR R., YOUSFI L.K., DERWICH E., KANDRI RODI Y., OAZZANI F., ERRACHIDI F., (2013). Valorisation des déchets industriels d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles. *Gestion et Protection de l'Environnement Proceedings G-ENVIRON-5, Volume 3 (2013) 124-129*

Adjebli A., Nedjai I., Nedjai S., (2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles. Université A. MIRA. Béjaia. Pp :64.

DORMAN H.J. et DEANS S.G., 2000 : Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 88, pp : 308-316.

DELAQUIS P.J., STANICH K., GIRARD B. et MAZZA G., 2002 : Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill , Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 74, pp : 101-109.

ELGAYYAR M., DRAUGHON F.A. GOLDEN D.A. et MOUNT J.R., 2001 : Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protec.*, Vol. 64, N°7, pp : 1019 – 1024.

CHAO S.C., YOUNG D.G. et OBERG G. J., 2000 : Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 12 (Sep/Oct 2000), pp : 639-649.

-Kalemba D et Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.

INOUE S., TAKIZWA T. et YAMAGUCHI H., 2001 : Antibacterial Activity of Essential oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. *J. Antimi. Chemo.*, Vol. 47, pp : 565-573.

JAY J.M., 1996 : Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Sci.*, Vol. 43, pp : S59 – S66.

FARBOOD M.I., MACNEIL J.H., et OSTOVAR K., 1976 : Effects of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. *J. milk food technol.*, Vol. 39, pp : 675 - 679.

FARAG R.S., DAW Z.Y., HEWEDI F.M. et EL-BAROTY G.S.A., 1989 : Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. *J. Food Protec.*, Vol. 52, N° 9, pp : 665 – 667.

HUSSEIN A.M.S., 1990 : Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants. *Planta Medica*, Vol. 56, pp : 644 – 649.

ZAIKA L.L., 1988 : Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Nutr.* Vol. 9, pp : 97 – 118.

Moreira M. R., Ponce A. G., Del Valle C. E. and Roura S. L., 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT.* 38 : pp. 565-570.

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

Ghasemi, K., Ghasemi, Y., and Mohammed, A.E. (2009). Antioxydant Activity, Phénol and Flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm*, **22** (3): 277- 281.

Résultats et discussion

Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O.I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**: 75-87.

D. He, Y. Shan, Y. Wu, G. Liu, B. Chen, S. Yao, Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS., *Food Chem.*, 127 (2011) 880-885.

-

-S. Gorinstein, O. Martin-Belloso, Y. S. Parck, R. Haruenkit, A. Logek, M. Ciz, I. Libman, S. Traktenberg, Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits, *Food Chem.*, 74 (3) (2001) 309-315.

-Moulehi, S. Bourgou, I. Ourghemmi, T. M. Saidani, Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, *Ind. Crops Prod.*, 39 (2012) 74- 80.

-J. Londoño-Londoño, V. R. Lima, O. Lara, T. B. Crecsynski Pasa, G. J. Arango, A. Gil, J. R. Ramirez Pineda, Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method, *Food Chem.*, 119 (2010) 81-87.

-A. R. Ballester, M. T. Lafuente, R. C. H. Vos, A. G. Bovy, L. González-Candelas, Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits, *Food Chem.*, 136 (2013) 178-185

-K. Ashok kumar, M. Narayani, A. Subanthini, M. Jayakumar, Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels - Utilization of Fruit Waste, *Inter. J. Eng. Sci. Technol.*, 3 (2011) 5417-5421.

-

-J. Bernardi, C. Licciardello, M. P. Russo, M. L. Chiusano, G. Carletti, G. R. Recupero, A. Marocco, Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening, *J. Plant Physiol.*, 167 (2010) 301-310.

-D. He, Y. Shan, Y. Wu, G. Liu, B. Chen, S. Yao, Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS., *Food Chem.*, 127 (2011) 880-885.

Snoussi S.A., Djazouli Z.E., Aroun M.E.F., Sahli Z, 2003, Les plantes maraichères, industrielles, condimentaires, aromatiques, médicinales et ornementales. *Annexes sur La Biodiversité Importante pour l' Agriculture en Algérie MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31*

A

- **Aazza, Smail, Badiâ Lyoussi, Maria G. Miguel. 2011.** “antioxidant activity of some morrocan hydrosols.” *Journal of Medicinal Plants Research* 5(30):6688–96.
- **Aburjai T., Natsheh F.M. 2003,** Plants used in cosmetics. *Pytother. Res*, 17, 987-1000 p.
- **Adelon, N. P., 1835.** Dictionnaire de Médecine. Tome XI. Édition non précisée. 519 p.
- **Adjebli A., Nedjai I., Nedjai S. 2017.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles.Université A. MIRA. Béjaia. p :64.
- **Alma M.H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F T Yilmaz N. 2004.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera L.*), *J.Agric. Food Chem.*, 52:3911-3914p.
- **Ashok K., Narayani M., Subanthini A., Jayakumar M. 2011.** Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels -Utilization of Fruit Waste, *Inter. J. Eng. Sci. Technol.*, 3: 5417-5421p.
- **Atawodi S.E. 2005.**antioxidant potential of African plant. *African journal of biotic*.4 (2):128-133p.

B

- **Badre Al –Deen R., Al Amir L. 2012.** Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils extracts from citrus fruit peels, National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria.
- **Bajpai V.K., Kang S.C. 2010.** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc*, 87(3): 327-336p.
- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475p.
- **Ballester A.R., Lafuente M.T., Vos R.T., Bovy A.G., González-Candelas L. 2013.** Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits, *Food Chem.*, 136:178-185p.
- **Baranauskiene R., Venskutonis P.R., Viskelis P., Dambrauskiene E. 2003.** Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *J.Agr. Food Chem*, 51(26): 7751-7758p.

- **Barouki R. 2006.** Stress oxydant et vieillissement. *m/s*, 22: 266-72p.
- **Baser K.H.C., Buchbauer G. 2010.** Handbook of essential oils: Science, technology, and applications. *CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton. New York*, 994p.
- **Bassolé I.H.N., Juliani H.R. 2012.** Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4) : 3989-4006p.
- **Belaiche P. 1979.** Aromatogramme. In *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Edition Maloine-S-S, tome I. p: 9-20.
- **Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996.** *Anal. Biochem.* p : 239, 70 –76.
- **Berkani A., 1989.** Possibilité de régulation d'*Aleurothrixus floccosus* MASK (Hom. - Aleurodidae) en Algérie. Thèse Doc.Sci.3^{ème} cycle. Univ Marseille, Paris, France, 140p.
- **Bernadet M. 2000.** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Dictionnaire thérapeutique de 530 affections courantes. *Dangles, Toulouse, France*, 384p.
- Bernardi J., Licciardello C., Russo M.P., Chiusano M.L., Carletti G., Recupero G.R., A. Marocco A. (2010). Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening, *J. Plant Physiol.*, 167:301-310p.
- **Bocco M.E., Cuvelier E., Richard H., Berset C. 1998.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2123–2129p.
- **Bousbia N. 2011.** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse de Doctorat en sciences. Université d'Avignon et des Pays deVaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 128p.
- **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition, *Tec & Doc. Lavoisier. Paris*, 915p.
- **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 1120 p.
- **Buchbauer G., Jirovetz L. 1994.** Aromatherapy- Use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance Journal*, 9: 217-222p

- **Burits M., Bucar F. 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, *14*: 323-328p.
- **Burt S. 2004.** Essential oils: Antibacterial properties and potential applications in food: A review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**(3): 223-253p.

C

- **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, Canada*, 89p.
- **Cazau-Beyret N. 2013.** Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université Toulouse III sabatier. 194p.
- **Chao S.C., Young D.G., Oberg G. J. 2000:** Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res., Vol. 12*: 639-649p.
- **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, Paris, 1358p.
- **Chavanne, P. 2011.** 200 remèdes au citron. *Editions First – Grund, Paris*, 255p.
- **Choi S., Hee-chu K., Soo-youn K., Joon-HO H., Ji-Gweon P., shin-hae K., Sanghun H., Su-Hyun E.T., Se-Jae k. 2007.** Correlation between Flavonoid content and the no production inhibitory Activity of peel extracts from various citrus fruits. *Boil. Pharm. Bull.* **30**(4): 772-778p.
- **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 antimicrobialaction of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88**(1): 170-175p.
- **Crespo M.E., Jiménez J., Navarro C. 1991.** Special methods for the essential oils of the genus *Thymus*. In: Modern Methods of Plant Analysis, (edited by H.F. Linskens and J.F. Jackson, Vol *12*: 41-46p.
- **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**(15): 6300-6308p.

D

- **Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G. 2000.** GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agr. Food Chem.*, **48**(6): 2576-2581p.
- **D'Auria F., Tecca M., Strippoli V., Salvatore G., Battinelli L., Mazzanti G. 2005.** Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology.*, **43**(5): 391-396p.
- **Davies K.J.A. 2000.** Critical review oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.*, **50**: 279–289p.
- **Davidson P.M., Parish M.E., 1989.** Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology.*, **43**(1):148-155p.
- **Dayan F.E., Cantrell C.L., Duke S.O. 2009.** Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **17**: 4022-4034p.
- **Deans S.G., Noble R.C., Hiltunen R., Wuryani W., Penzes L.G. 1995.** Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry : Impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour and Fragrance J.*, Vol. **10**: 323 – 328p.
- **Deba F., Xuan T. D., Yasuda M., Tawata S. 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiatauda*, *Food Control*, Vol. **19**:346-352p.
- **DE Billerbeck V.G. 2007.** Huiles essentielles et bactérie résistantes aux antibiotiques. *Phytotérapie*, **5**: 249-253p.
- **Degryse A.C., Delpla I., Voinier M.A. 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement-IGS-EHESP*, 87p.
- **Del Rio J.A., Fuster M.D., Gomez P., Porrás I., Garcia-Lidon A., Ortuno A. (2004).** *Citrus limon* : a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food chem.*, **84**:457-461p.
- **Denyer S.P., Hugo W.B. 1991.** Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: *Mechanisms of action of chemical biocides*, *The Society for Applied Bacteriology, Technical Series 27*: 171-188p.

- **Desmares C., Laurent A., Delerme C. 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *AFSSAPS. Anatole, France*, 18p.
- **Dethier M. 1996.** Contribution à l'étude des plantes aromatiques du Burundi. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 182p.
- **Djeddi S., Yannakopoulou E., Papadopoulos K., Skaltsa H. 2015.** Activité anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Alger. *Afrique Science II(2)* : 58-65p.
- **Dorman H.J., Deans S.G. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol., Vol. 88*: 308-316p.
- **Duan L., Guo L., Liu K., Liu E H., Li P. 2014.** Characterization and classification of seven citrus herbs by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *J Chromatogr A, 1339*: 118- 127p.
- **Duarte M.C., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L., Delarmelina C. 2005.** Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol, 97(2)*: 305-311p.
- **Dugo G., Di Giacomo A. 2002.** *Citrus: The genus Citrus, Collection Medicinal & Aromatic Plants, Taylor & Francis Ltd, London*, 656p.
- **Dupont F., Guignard J.L. 2007.** Botanique, Systématique moléculaire. *Ed. Masson*, 189 p.
- **Duraffound C., Hervicourt L., Lapraz J.C. 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. *2ème éd. Masson, Paris*.
- **Durand G., Beaudoux J.L. 2011.** Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. *2ème édition, Lavoisier, Paris*, 607p.

E

- **Edris A.E. 2007.** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res, 21*:308-323p

- **Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A., Mount J.R. 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protec.*, Vol. **64**(7): 1019 – 1024p.
- **Ercan B., Ilhami G.U. 2011.** Polyphénol contents and *in vitro* antioxydant activites of lyophilised aqueous extract of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International.*, **44**: 1482-1489p.

F

- **Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M., EL-Baroty G.S.A. 1989.** Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. *J. Food Protec.*, Vol. **52**(9): 665 – 667p.
- **Farbood M.I., Macneil J.H., Ostovar K. 1976.** Effects of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. *J. milk food technol.*, Vol. **39**: 675 – 679p.
- **Faucon M. 2015.** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. *Édition sang de la terre, Paris*, p: 39-455.
- **Favier A. 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **14** :108-115p.
- **Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F. 2010.** Citrus d'Algérie, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. Office des Publications Universitaires. p :52-57.
- **Fillatre Y. 2011.** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat. Université d'Angers. France, 288p.
- **Fisher K., Phillips C. 2009.** In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.*, **66**(4): 180-185p.
- **Franchomme P., Pénéol D. 1990.** Thérapie. Eléments de médecine aromatique. L'aromathérapie exactement. *R.J. édition. Limoges*, 61p.
- **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**: 2067-2072p.

G

- **Gauriat E. 2015.** Accompagnement d'une rééducation physique posttraumatique par l'aromathérapie. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Limoges, 150p.
- **Ghasemi K., Ghasemi Y., Mohammed A.E. 2009.** Antioxydant Activity, Phénol and Flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm*, **22** (3): 277-281p.
- **Giordani R., Kaloustian J. 2006.** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie*, pp :121-124.
- **Gollium F., Tonelli N., 2013.** Des fruits et des graines comestible du monde entier. *Edition Brigitte Peyrot Poos. Paris Lavoisier SAS*, pp: 186-195.
- **Gonzalez-molina E., Dominguez-perles R., Moreno D.A., Garcia V. 2010.** Natural bioactive compounds of *citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**: 327-345p.
- Gorinstein S., Martin-Belloso O., Parck Y.S., Haruenkit R., Logek A., Ciz M., Libman I., Traktenberg S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits, *Food Chem*, **74**(3): 309-315p.
- **Govindarajan R., Vijayakumar M., Pushpangadan P. 2005.** Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol*, **99**: 165–178p.
- **Grysole J. 2005.** La commercialisation des huiles essentielles. *In* : Huile essentielle : de la plante à la commercialisation : Manuel pratique (coordonné par F.-X Garneau., G.J Collin., Université du Québec à Chicoutimi., Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales), p :1-24.
- **Guignard J.L. 2001.** Botanique, Systématique moléculaire. *Ed. Masson*, 290p.
- **Guimaraes R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa M. J., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R. 2010.** Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, Vol. **48**: 99 –106p.

H

- **Harley I. M., Richard S. B., Smith V.E., Deborah W., Craig R. E. 2006.** *Citrus* and *Fortunella* (kumquat). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry, pp: 2-22.
- **He D., Shan Y., Wu Y., Liu G., Chen B., Yao S. 2011.** Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS., *Food Chem.*, **127**: 880–885p.
- **Hellal Z, 2011,** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*).Mémoire de magister. Université de Tizi-Ouzou, Algérie, 120p.
- **Hemwimon S., Pavaasant P & Shotiprux A. 2007.** Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology.*, **54**: 44-50p.
- **Hendrix C M., Redd J B. 1995.** Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In : Ashurst, P.R., Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. *Edition Blackie Academic & Professional*, p: 53-87.
- **Hercberg S., Galan P., Preziosi P., Bertrais S. 2004.** Etude SU.VI.MAX : Essai randomisé, contrôlé par placebo, des effets sur la santé des vitamines et des minéraux antioxydants. *Internal medicine.*, **164** (21) :35-42p.
- **Hosni k., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Ben Brahim N., Sebei H. 2010.** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence, *Food Chem.*, **123**:1098–1104p.
- **Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., Dufossé L. 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments.*, **18**(6) :563-582p.
- **Huang Y.S., Ho S.C. 2010.** Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel, *Food Chem.*, **119**:868-873p.
- **Hussein A.M.S. 1990.** Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants. *Planta Medica.*, *Vol. 56*: 644 – 649p.

I

- **Ilboudo. 2009.** Activité biologique de quatre huiles essentielles contre *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera : *Bruchidae*), insect ravageur des stocks de niébé au Burkina Faso. Thèse de Doctorat, 126p.
- **Inouye S., Takizwa T., Yamaguchi H. 2001.** Antibacterial Activity of Essential oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. *J. Antimi. Chemo., Vol. 47*: 565-573p.
- **Isman M.B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection, 19*:603-608p.

J

- **Janati S.S.F., Beheshti H.R., Feizy J., Fahim N.K. 2012.** Chemical composition of lemon (*Citrus limon*) and peels its considerations as animal food. *GIDA, 37*(5): 267-271p.
- **JAY J.M. 1996.** Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Sci., Vol. 43*: S59 – S66.
- **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):94-97p.

K

- **Kalemba D., Kunicka A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry., 10*: 813-829p.
- **Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.F. 2008.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie, 6*(3): 160-164p.
- **Kamal G. M., Anwar F., Hussain A., Sarri N., Ashraf M. Y. 2011.** Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal., 18*: 1275-1282p.
- **Karboa M. 2001.** L'agrumiculture en Algérie. Option méditerranéenne n° 43. Ed : *CIHEAM*, p :21-26.

- **Kelen M., Tepe B. 2008.** Chemical composition, antioxydant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology.*, **99**:4096-4104p.
- **Kim D. k., Lee C.Y. 2004.** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 253–273p.
- **Kocić-Tanackov S.D., Dimić G.R. 2013.** Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *In: Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education* (edited by *A Méndez-Vilas*), p:838-849.
- **Koechlin-Ramonatxo C. 2006.** Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**(4), 165-177p.
- **Koudaly S., benemasaoud E., left D., Essaqui A., zerbouti M., AZZI M., benaissa M.(2014).**Study of antioxidant activity and anticorrosion of the methanol extracts of drawf palm leaves (*chamaerops humilis L.*) from morocco. **5**(3) :887-898p.
- **Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y. 1981.** Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry.*, **45**(4): 945-952p.

L

- **Lakhdar L. 2015.** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro. Thèse de Doctorat.Université Mohammed V de Rebat. 164p.
- **Lakshmi G., Smitha N., Ammu S.V., Priya C.L., Bhaskara Rao K.V. 2014.** Phytochemical profil, *in vitro* antioxydant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea nouchali Linn*: an in vitro study. *Int J Pharm Pharm Sci*, **6**(6): 548-552p.
- **Lagunez –Rivera L. 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE , p : 31-42.

- **Li B., Smith M. D., Hossain M. 2006.** Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method, *Sep. Purif. Technol.*, **48** : 182-188p.
- **Londoño-Londoño V. R., Lima O., Lara T. B., Crecsynski Pasa G. J., Arango A., Gil J. R., Ramirez P. 2010.** Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method, *Food Chem.*, **119**: 81-87p.
- **Longevialle P. 1981.** Spectrométrie de masse des substances organiques, *Edition Masson, Paris*, 208p.
- **Loussert R. 1985.** Les agrumes, Arboculture. *Ed. Baillière, Paris*, 136p.
- **Loussert R. 1989.** Les agrumes. 2. Production. *Edition Lavoisier, Paris*, 157p.
- **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. 2004.** Solvent-free microwave extraction of essential oils from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr A*, **1043**(2) : 323-327p.
- **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, Université de la Réunion, France, 146p.

M

- **Majnooni M.B., Mansouri K., Gholivand M.B., Piriyaie M. 2012.** Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L. *African journal of Biotechnology* **11**: 498-503p.
- **Mapoli G. 2003.** Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de *E. citriodora* acclimaté à Pointe-Noire (Congo-Brazzaville). Mémoire d'études approfondies, Université de Congo, 58p.
- **Martini M.C., Seiller M. 1999.** Actifs et additifs en cosmétologie. *Tec & Doc édition, Paris*, 656p.
- **May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L. 2000.** Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, **45**(5): 639-643p.
- **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, 73p.

- **Miguel M.G. 2010.** Antioxidant and anti-Inflammatory activities of essential oils: A Short Review. *Molecules*, **15**: 9252 – 9287p.
- **Millet F. 2013.** Le grand guide des huiles essentielles, Marabout Ed., Unigraf Espagne, 479p.
- **Misharina T.A., Samusenko A.L. 2008.** Antioxidant properties of essential oils from lemon grapfruit. *Phytothérapie.*, **5**: 234-240p.
- **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**, 565-570p.

- **Moufida S., Marzouk B. 2003.** Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry.*, **62 (8)** :1283-1289p.
- Moulehi S., Bourgou I., Ourghemmi T., Saidani M. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, *Ind. Crops Prod.*, **39**: 74- 80p.
- **Muther, L. 2015.** Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université d'Auvergne.156p.
- **Mutin G. 1969.** L'Algérie et ses agrumes. Extrait de la revue de geo. *Lyon*, *Vol 441*, 36p.
- **Mutin G. 1977.** La Mitidja décolonisation et espèces géographiques. *Ed.OPU ,Alger*, 607p

O

- **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** : 147-157p.
- **Orfila, M. et al. 1837.** *Codex, Pharmacopée Française.*

P

- **Paris R.R., Moyse H. 1976.** Précis de matière médicale, Tome1, *deuxième édition*, Masson, Paris.
- **Park P.J., Jung W.K., Nam K.S., Shahidi F., Kim S.K. 2001.** purification and characterization of ant oxidative peptides from protein hydrolysate of lethin free egg yolk. *Journal of the American oil chemists society.*,78(6):651-656.
- **Pattnaik S., Subramanyam V., Bapaji M., Kole R. (1996).** Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios* 86(2) :37-46p.
- **Pauli A. 2001.** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromathérapie.*, **11**(3):126-133p.
- **Pavel M., Ristic M., Stevic T. 2009.** Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc.*, **75**(1): 27-34p.
- **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. France.
- **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme.*, **16**(4) : 233-239p.
- **Piochon M. 2008.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiasues et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Quebec à Chicoutimi, Canada.
- **Polese J. M. 2008.** la culture des agrumes .*Edition artémis* ,94p.
- **Price L., Price S. 2004.** *A Guide for Health Professionals.*

R

- **Ramful D., Bahorun T., Bourdon E., Tarnus E., Aruoma O.I. 2010.** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology.*, **278**: 75-87p.
- **Ramful D., Tarnus E., Aruoma O., Bourdon E., Bahorun T. 2011.** Polyohénol composition, vitamin C content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. *Food Research International.*, **44**: 2088-2099p.
- **Razafindrakoto B.S. 1988.** Huiles essentielles d'*Eucalyptus* de Madagascar ; Variabilité de la composition et du rendement en fonction de la période de récolte ;

essais de classement chemotaxonomique et propriétés pharmacodynamiques. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 225p.

- **Rebour H. 1948.** La culture des agrumes en Algérie. Documents Algériens. Série économique Agrumiculture. N° 49, 4p.
- **Rega B., Fournier N., Guichard E., Russell R. 2003.** Citrus flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **51** : 117-133p.
- **Regnault-Roger C., Hamraoui A. 1995.** Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Stored Prod. Res.*, **31** : 291-299p.
- **Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. 2010.** Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked. *Free Rad Bio Med.*, **49**:1603–1616p.
- **Richard H. 1992.** Epices et aromates. *Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris*, 339p.
- **ROUX D. 2008.** Conseil en aromathérapie. 2ème édition, *Pro-Officina*, 187p.

S

- **Sagdic O., Ozcan M. 2003.** “Antibacterial Activity of Turkish Spice Hydrosols.” *Food Control.*, **14**:141–43p.
- **Saihi R. 2011.** Etude phytochimique, Extraction des produits actifs de la plante *Artimisia campistris* de la région de Djelfa. Mise en évidence de l’activité biologique., Université d’Oran.
- **Sallé J.L. 2004.** Les huiles essentielles, Synthèse d’aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. 2ème édition, *Frison Roche*, 168p.
- **Sathiya J., Satitha J., Ananthalakshmi R., Rajkumari S., MandKrishenan R. 2015.** Enzymatic antioxidants and its role in oral disease, *Journal of pharma bio allied science.*, **7**(2):331-333p.
- **Sayah M.Y., Taouda H., Chabir R., Yousfi L.K., DERWICH E., Kandri R.Y., Oazzani F., Errachidi F. 2013.** Valorisation des déchets industriels d’agrumes par l’extraction des huiles essentielles. Gestion et Protection de l’Environnement. *Proceedings G-ENVIRON-5, Volume 3*: 124-129p.
- **Sharfifar F., Mudeh G D., Mirtajaldini M. 2009.** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium*. *L. Food, Chem.*, **112** (4): 885-888p.

- **Sharma N., Tripathi A. 2006.** Fungitoxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology.*, **22**(6): 587-593p.
- **Senatore F. 1996.** Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food. Chem.*, **44**:1327-1332p.
- **Siddiq M., Lezzoni A., Khan A., Breen P., Sebolt A.M., Dolan K. D. 2011.** Caractérisation de la nouvelle cerise acidulée (*Prunus cerasus* L.) : selection en fonction de la qualité du fruit, des anthocyanes totales et de la capacité antioxydante. *Journal international des propriétés alimentaires.*, Vol **14** :471-480p.
- **Snoussi S.A., Djazouli Z.E., Aroun M.E.F., Sahli Z. 2003.** Les plantes maraichères, industrielles, condimentaires, aromatiques, médicinales et ornementales. *Annexes sur La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31.*
- **Suhr K.I., Nielson P.V. 2003.** Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application technique against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology.*, **94** :665-674p.
- **Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., Bigger S.W. 2003.** Antimicrobial properties of Basil and its possible application in food packaging. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(11): 3197-3207p.
- **Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M., Lima E.O. 2006.** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, **87**(1): 22-25p.
- **Sovoboda K., Greenaway R.I. 2003.** Lemon scented plants. *International Journal of Aromatherapy.*, **13**(1): 23-32p.
- **Souza K. S., Chaar J.S., Oliveira K.M.T., Gomes E.O., Portela C.N. 2007.** “Atividade Biológica de Extratos, Hidrolatos E Óleos Voláteis de Pau-Rosa (*Aniba Duckei* Kostermans) E Quantificação Do Linalol No Hidrolato de Folhas.” *Rev. Bras. Pl. Med.* **9**:1-7p.

T

- **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. *Internaational Journal of Food Science and Technology*, **36**: 685-692p.
- **Tepe B., Akpulat H.A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E. 2006.** Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of Pimpinella anisetum and Pimpinella flabellifolia from Turkey. *Food Chemistry.*, **97** (4) :719-724p.
- **Terol J., Soler G., Talon M., Cercos M. 2010.** The aconitate hydratase family from *Citrus*. *BMC Plant Biology*, **10**: 222p.
- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Edition TEC & DOC Lavoisier*, 77p.
- **Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. 2009.** Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food. Chem.*, **57**:5987-6000p.
- **Tohidpour A., Sarrari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. 2010.** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine.*, **17**:142-145p

U

- **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*. *Appl Environ Microbiol.*, **68**(4), 1561-1568p.
- **Uribe S., Ramirez J., Pena A. 1985.** Effects of beta-pinene on yeast membrane function. *Journal of bacteriology.*, 161: 1195-1200p.

V

- **Valero M., Salmerón M.C. 2003.** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology.*, **85**(1-2): 73-81p.
- **Valnet J. 2001.** La santé par les fruits, légumes et les céréales. *Ed Vigot*, p: 207-281.

- **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):147-153p.
- **Vekiari S.A., Protopapadakis E.F., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C., Veldhuizen J. E., Tjeerdsma J., Zweijtzer C., Burt S., Haagsman H P. 2006.** Structural Requirement for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* *J. Agric. Food Chem.*, 54(5): 1874-1879p.
- **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**(12) :1130-1138p.
- **Voda K., Boh B., Vrtacnik M. 2004.** A quantitative structure-antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. *Journal of Molecular Modeling.*, **10**(1) :76-84p.

W

- **Wang Y. C., Chuang H. W. 2008.** The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chem.* **106** :277-284p.
- **Werner M. 2002.** Les huiles essentielles: réveil du corps et de l'esprit. *Edition Vigot, Collection Santé Bien-être*, 95p.

Y

- **Yann M., Olivier Marie H., Christine R. 2015.** La complexité des simples - caractérisations chimique et biologique de combinaisons hydrolats-huiles essentielles et huiles essentielles-huiles essentielles pour l'objectivation d'effets conservateurs de produits phytothérapeutiques. Thèse de Doctorat .Université de Toulouse. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).Sciences des Agroressources, 185p.

Z

- **Zaika L.L. 1988.** Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Nutr. Vol. 9* : 97 – 118p.