



Département Des Sciences Alimentaires

Laboratoire de bioéconomie, sécurité alimentaire et santé

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences alimentaires

Spécialité : Nutrition et Pathologie.

Thème

**Exploration des activités antioxydantes et
antimicrobiennes de quelques huiles essentielles
comme conservateurs naturels.**

Présenté par

Bakhtia Mohamed Rafik

Berdji Imene

Devant le jury composé de :

Encadreur : MOKHTAR Meriem

Professeur

Univ. Mostaganem

Président : DERAMCHIA Nawel

MCA

Univ. Mostaganem

Examineur : ZABOURI Younes

MCA

Univ. Mostaganem

Année Universitaire : 2021/2022

Avant-propos

*Nous tenons avant tout à exprimer nos sincère reconnaissances à **Pr. Mokhtar Meriem** pour avoir accepté de nous encadrer. Nous la remercions pour sa précieuse aide, son implication, son soutien, ses conseils constructifs et ses encouragements tout au long de ce travail.*

*Mes respectueux remerciements s'adressent à **Dr. Deramchia Nawel**, Maître de conférences A à l'université de Mostaganem, merci d'avoir accepté de donner de votre temps pour critiquer et juger ce travail. Vos conseils me seront précieux.*

*Nous sommes extrêmement reconnaissants envers **Dr. Zabouri Younes**, Maître de conférences A à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.*

Nous tenons à remercier tous les enseignants du Département Des Sciences Alimentaires.

Par la même occasion, nous remercions les ingénieurs de laboratoire

Mr. Azzouz Redouane, Mme. Ketrouti Nadia et Bentahar Cherif Mohamed.

Finalement, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie cet ouvrage à mon défunt père الله يرحمه de qui je tiens mon sens de la communication et ma fibre littérature , à ma chère maman qui m'a soutenu et encouragé durant toutes ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mes chers frères, Walid et Abderrahmane, à ma chère tante Habiba et aussi ma chère fiancée, ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A ma famille, mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

BAKHTIA MOHAMED RAFIK

Je dédie ce modeste travail à mon très cher père qui est mon soutien dans la vie et qui ma donné du courage et la volonté et à ma très chère défunte mère الله يرحمها qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, ceci est ma profonde gratitude pour son éternel amour.

A mes chers frères Djamel et Hmida et mes sœurs Marina, Aya et ma sœur cadette Samia qui m'avais toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout la réussite.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me respectent et qui m'aiment.

BERDJI IMENE

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والميكروبات لبعض الزيوت الأساسية من قشر الكليمنتين والليمون، بالإضافة إلى أوراق النعناع الأخضر ولوزة والشمر لاستغلال محتمل بقدر المواد الحافظة الطبيعية للأطعمة. تم استخراج الزيوت الأساسية بتقطير البخار. تم إجراء تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال اختبار DPPH، والنشاط المضاد للميكروبات عن طريق طريقة انتشار القرص والحد الأدنى من التركيزات المثبطة بواسطة طريقة التخفيف الدقيقة. كان لجميع الزيوت الأساسية نشاط جيد مضاد للأكسدة مما أدى إلى تثبيط تركيز الجذور الحرة DPPH الذي يتراوح من 0.0117-0.0114 ملغم/مل، وتم تسجيل أفضل النتائج مع النعناع والكليمنتين. وفيما يتعلق بالفاعلية المضادة للميكروبات، كان لجميع الزيوت الأساسية نشاط جيد ضد جميع السلالات التي تم اختبارها مع مناطق تثبيط تتراوح من 11.75 إلى 21 ملغم، وتركيز مثبط أدنى من 0.0781 إلى 0.625 ملغم/مل. الزيوت الأساسية لقشر الكليمنتين، تليها أوراق النعناع، ثم قشر الليمون كان له أكبر نشاط مضاد للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: زيت أساسي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، مادة حافظة طبيعية.

Abstract

The present study aims to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of some essential oils from clementine and lemon peels, as well as spearmint, verbena and fennel leaves for possible use as natural food preservatives. The extraction of essential oils was carried out by steam distillation. The evaluation of antioxidant activity was carried out with the DPPH test, the antimicrobial activity by the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentrations by the microdilution method. All essential oils had a good antioxidant activity with free radical DPPH inhibitions ranging from 66.05% to 93.82% at only 0.02 mg/mL concentration. The IC₅₀ concentrations were ranged from 0.0114 to 0.0117 mg/mL, the best results were recorded with mint and clementine. In which concern the antimicrobial potency, all essential oils had good activity against all tested strains recording inhibition zones ranging from 11.75 to 21 mm, and a minimum inhibitory concentration of 0.0781 to 0.625 mg/mL. Essential oils from clementine peels, followed by mint leaves, then lemon peels had the highest antimicrobial activity.

Keywords: Essential oil, antioxidant activity, antimicrobial activity, natural preservative

Résumé

La présente étude a pour objective l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne de quelques huiles essentielles issues des écorces de la clémentine et du citron, ainsi que les feuilles de la menthe verte, de la verveine et du fenouil pour une possible exploitation autant que conservateurs naturels des aliments. L'extraction des huiles essentielles a été réalisée avec la distillation à vapeur d'eau. L'évaluation de l'activité antioxydante a été effectuée avec le test de DPPH, l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque et les concentrations minimales inhibitrices par la méthode de microdilution. Toutes les huiles essentielles possédaient une bonne activité antioxydante qui s'est traduit par des inhibitions du radical libre DPPH qui varient de 66.05% à 93.82% à seulement 0.02 mg/mL de concentration. Les concentrations IC50 calculées étaient de 0.0114- 0.0117 mg/mL, les meilleurs résultats ont été enregistrés avec la menthe et la clémentine. En ce qui concerne le pouvoir antimicrobien, toutes les huiles essentielles avaient une bonne activité vis-à-vis de toutes les souches testées en enregistrant des zones d'inhibition qui varient entre 11.75 à 21 mm, et une concentration minimal inhibitrice de 0.0781 à 0.625 mg/mL. Les huiles essentielles des écorces de la clémentine, suivi des feuilles de la menthe, ensuite les écorces du citron avaient la plus grande activité antimicrobienne.

Mots clés : Huile essentielle, activité antioxydante, activité antimicrobienne, conservateur naturel.

Liste des tableaux

Tableau 1 : IC50 calculées des différentes huiles essentielles	24
Tableau 2 : Zones d'inhibitions et concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles.....	26

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques de quelques constituants des huiles essentielles	6
Figure 2 : Principe de l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	12
Figure 3 : Principe de l'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau.	13
Figure 4 : Distillateur à courant de vapeur sous basse pression (MOD SPRING 12L)	16
Figure 5 : Rendements de l'extraction des huiles essentielles.....	21
Figure 6 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par les huiles essentielles.....	23
Figure 7 : Zones d'inhibition obtenues avec les huiles essentielles.....	28
Figure 8 : Concentration minimal inhibitrice des différentes huiles essentielles	29

Liste des abréviations

ATP	: Adénosine triphosphates
bars	: Unité de pression
°C	: Degré Celsius
C₅H₈	: Terpènes
C₁₀H₁₆	: Adamantane
C₁₅H₂₄	: Sesquiterpènes
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
CO₂	: Dioxyde de carbone
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DPPH	: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
g	: Gramme
GRAS	: Généralement reconnus comme sains (generaly recongnized as safe)
HE	: Huile essentielle
IC₅₀	: Concentration Inhibitrice 50
ISO	: Organisation internationale de normalisation
L	: litre
mg	: Milli gramme
min	: Minute
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
mmol	: Millimole
nm	: Nanomètre
P	: Pression
R	: Rendement

SFME : Solvent Free Microwave Extraction

T : Température

UFC : Unité Faisant Colonie

% : Pourcent

µl : Microlitre

µg : Microgramme

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
ملخص	
Abstract	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction Générale.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.Définition.....	3
I.2.Synthèse et stockage des huiles essentielles	3
I.3.Biosynthèse des huiles essentielles.....	4
I.4.Composition chimique	5
I.4.1.Les terpènes.....	5
I.4.2.Phénylpropènes.....	7
I.5.Notion de chémotype.....	7
I.6.Facteurs influençant la composition des huiles essentielles	7
I.7.Rôle des huiles essentielles	8
I.8.Propriétés des huiles essentielles	8
I.8.1.Physio-chimiques.....	8
I.8.2.Aromatique.....	9
I.8.3.Antioxydantes.....	9
I.8.4.Antimicrobienne.....	10

I.9.Huiles essentielles et conservation des aliments.....	11
I.10.Les techniques d'extraction	12
I.10.1.Distillation par l'eau	12
I.10.2.Expression à froid.....	15
I.10.3.Extraction au CO₂ supercritique.....	15

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1.Matériel végétal.....	16
II.2.Extraction et conservation des huiles essentielles	16
II.3.Conservation des huiles essentielles.....	17
II.4.Détermination du rendement de l'extraction	17
II.5.Détermination de l'activité antioxydante	17
II.6.Détermination de l'activité antimicrobienne.....	18
II.6.1.Nature et origine des souches testées	18
II.6.2.Mise en évidence du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélose.....	18
II.6.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	19

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1.Rendement de l'extraction des huiles essentielles.....	20
III.2.Evaluation de l'activité antioxydante.....	22
III.2.1.Inhibition du radical DPPH.....	22
III.2.2.Calcul des IC₅₀.....	24
III.3.Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	25
Conclusion.....	30
Les références bibliographiques.....	32

Introduction

Introduction

Les risques microbiens et l'oxydation des aliments ont acquis une importance économique, éthique et juridique considérable dans l'industrie alimentaire. L'administration d'une variété d'additifs alimentaires ainsi que des processus de conservation stricts sont appliqués pour éviter le développement de micro-organismes pathogènes et les réactions d'oxydation, ainsi que pour prolonger la durée de conservation des aliments ([Kourkoutas et al., 2020](#)).

Aujourd'hui, une pression croissante s'exerce sur les fabricants de produits alimentaires pour qu'ils évitent complètement l'utilisation de conservateurs chimiques ou adoptent des alternatives "naturelles". L'utilisation de composés bioactifs naturels, de cultures de départ microbiennes fonctionnelles et d'antioxydants pour des produits "sans conservateur synthétique" figure parmi les réalisations les plus récentes et les plus réussies de l'industrie alimentaire ([Mei et al., 2019](#)).

Ces bio-préservateurs peuvent contribuer à la sécurité microbienne et à l'activité antioxydante et peuvent également offrir des avantages organoleptiques, technologiques, nutritionnels et sanitaires. Ces agents peuvent offrir des avantages supplémentaires par rapport aux conservateurs et aux cultures de démarrage actuellement utilisés dans la fabrication des aliments et devraient permettre d'améliorer et d'optimiser les processus de production alimentaire, ce qui conduira à des produits plus sûrs et plus sains. Les exemples incluent des composés bioactifs naturels ayant des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et favorables à la santé, ainsi que des micro-organismes capables de synthétiser des molécules antimicrobiennes ayant un effet positif sur la santé ([Kourkoutas et al., 2020](#)).

Ces dernières années, on observe une tendance croissante à l'utilisation de conservateurs naturels pour donner aux aliments une image naturelle ou "verte/organique". Une attention particulière a été portée sur les applications des huiles essentielles (HE) de plantes comme conservateurs alimentaires. Les huiles essentielles et les extraits de plantes

semblent être une alternative aux produits chimiques de synthèses qui posent des problèmes de résistance et de toxicité par leurs résidus.

L'objectif de notre recherche est orienté vers l'extraction, l'exploration des propriétés antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles issues de quelques plantes largement utilisées en Algérie, comme le citron, la clémentine, la verveine, la menthe, ainsi que le fenouil afin d'exploiter la possibilité de leur utilisation comme des alternatifs aux substances synthétiques pour la conservation des aliments.

Chapitre I :
Partie bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.Définition

Définition d'une huile essentielle selon la norme ISO 9235 : « Produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de citrus (agrumes), soit par distillation sèche, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques».

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

Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur. Elles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques pour lesquelles les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques (Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007).

I.2.Synthèse et stockage des huiles essentielles

Les HE peuvent être synthétisées par tout organe végétal et stockées dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Burt, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008). Elles se localisent dans toutes les parties des plantes aromatiques :

- Les fleurs : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang) ;
- Les feuilles : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin ;
- Les organes souterrains : racines (vétiver, angélique), rhizomes (gingembre, acore) ;

- Les fruits : fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- Les graines : noix de muscade ;
- Le bois et les écorces : cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs (comme dans la menthe, canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores. La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15% ([Hurtel, 2006](#)).

Les plantes considérées riches en HE appartiennent le plus souvent à la famille des Lamiacées (origan, lavande, thym, sauge, menthe... etc), des Apiacées (anis, cumin, carvi...etc), des Myrtacées (eucalyptus, niaouli... etc), des 6 Pinacées (pin, cèdres...etc), des Rutacées (citron, orange), et des Lauracées (cannelle, camphrier...etc) ([Lardry et Haberkorn, 2007](#)).

I.3.Biosynthèse des huiles essentielles

La biosynthèse des substances odorantes a lieu dans les feuilles, où la plupart d'entre elles se trouvent et restent jusqu'à la floraison. Lors de la floraison, les huiles essentielles migrent dans les fleurs, et une partie est consommée dans le processus de la fertilisation. Après la fécondation, elles s'accumulent dans les fruits et les graines ou il y a une migration vers les feuilles, l'écorce et les racines ([Bakari et Yusuf, 2018](#)).

Au cours de la maturation des plantes, la composition des huiles essentielles change : chez les jeunes plantes, elles contiennent principalement des hydrocarbures terpéniques et des molécules plus simples, tandis que les organes reproducteurs contiennent des huiles éthériques plus riches en composés oxygénés. Bien que leur rôle dans l'organisme végétal soit partiellement connu, les huiles éthériques ont de multiples usages. Il existe plus de 3 000 huiles essentielles caractérisées physiquement et chimiquement, dont environ 150 sont fabriquées à l'échelle industrielle ([Nikolova et Georgieva, 2018](#) ; [Rahimian et al., 2018](#)).

I.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges à plusieurs composants ; dans les huiles individuelles, on peut identifier jusqu'à 400 produits chimiques (figure 1). Dans de nombreuses huiles essentielles, on trouve de 2 à 5 composants qui, ensemble, constituent plus de 50 à 60 % de l'ensemble de l'huile. Dans certaines huiles, cependant, il y a un ingrédient dominant.

I.4.1. Les terpènes

Les terpènes appartiennent à la plus grande classe de métabolites secondaires et sont le groupe le plus important de produits chimiques présents dans les huiles essentielles est constitué de terpènes. Les terpènes sont des produits chimiques hydrocarbonés fabriqués à partir d'unités isoprènes à 5 atomes de carbone (C_5H_8). À partir de ces unités, de nombreuses molécules peuvent être construites par biosynthèse, qu'il s'agisse de produits chimiques à chaîne linéaire ou de molécules présentant une ou plusieurs structures cycliques (Noriega, 2020 ; Masyita et al., 2022).

Il existe plusieurs classes de terpènes basées sur leur nombre d'unités isoprènes ; dans les huiles essentielles, les plus importantes sont les monoterpènes et les sesquiterpènes. Les monoterpènes possèdent 10 atomes de carbone et sont construits à partir de 2 unités isoprènes ($C_{10}H_{16}$), qui peuvent former différents squelettes carbonés (Shuai-Hua et al., 2018 ; Masyita et al., 2022).

Il existe 3 formes de monoterpènes : linéaire (acyclique), monocyclique et bicyclique. Les sesquiterpènes possèdent 15 atomes de carbone ; ils sont construits à partir de 3 unités isoprènes ($C_{15}H_{24}$) et peuvent se présenter sous forme acyclique, monocyclique, bicyclique et tricyclique. Ce sont les terpènes dont la température d'ébullition est la plus élevée. Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les principaux composants des huiles essentielles, les sesquiterpènes représentant environ 25% de la fraction terpénique (Perveen, 2018 ; Noriega, 2020 ; Masyita et al., 2022).

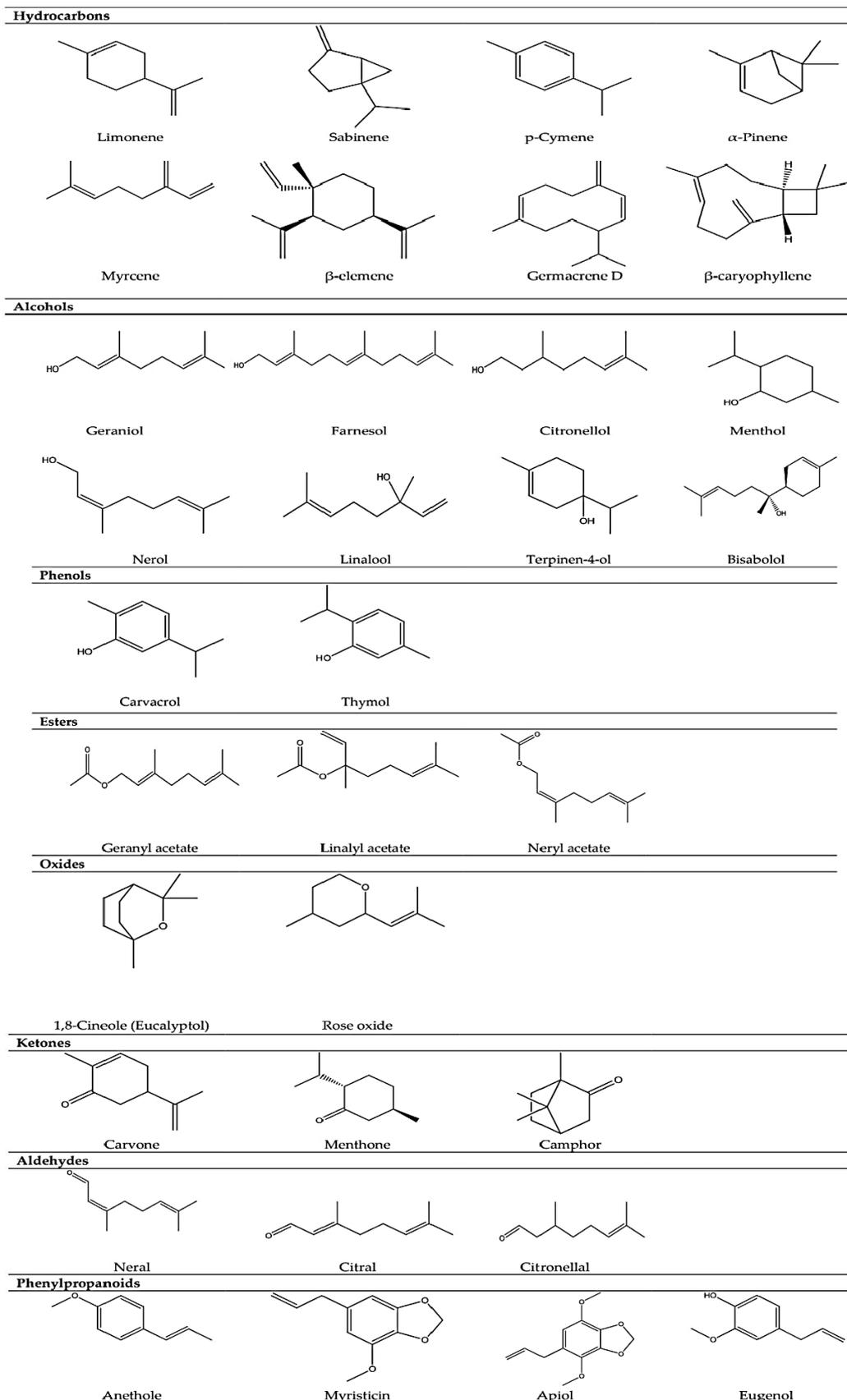


Figure 1 : Structures chimiques de quelques constituants des huiles essentielles (Sharmeen et al., 2021).

I.4.2. Phénylpropènes

Chez les plantes, la synthèse des phénylpropènes s'effectue à partir du précurseur de l'acide aminé la phénylalanine, constituant une sous-famille parmi les différents groupes de composés organiques appelés phénylpropanoïdes. Une proportion relativement faible des huiles essentielles est composée de phénylpropènes. Parmi les phénylpropènes les plus étudiés sont le safrole, l'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde (Chouhan *et al.*, 2017).

I.5. Notion de chémotype

Le chémotype d'une HE est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir le pays, le climat, le sol, l'exposition des végétaux, les facteurs phytosociologiques et la période de récolte qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle. Cette variation chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* et *Eucalyptus Spp.* (Zhiri et Baudoux, 2005).

I.6. Facteurs influençant la composition des huiles essentielles

La composition des huiles essentielles peut varier considérablement d'un pays à l'autre, d'un producteur à l'autre, et même d'une année à l'autre pour un même producteur et une même culture (Fokou *et al.*, 2020).

Les facteurs susceptibles d'influencer la composition chimique des huiles sont notamment les suivants : les paramètres végétaux (par exemple, l'espèce, les plantes cultivées ou sauvages), les paramètres environnementaux (par exemple, l'origine de la plante, le climat, les conditions du sol et la fertilisation), les paramètres de récolte et de post-récolte/prédistillation (par exemple, la saison de la récolte, le prétraitement de la biomasse et les conditions de stockage du matériel végétal), et les paramètres de production (par exemple, le mode de production, les paramètres de distillation), et d'autres paramètres (les conditions et la durée de stockage des huiles essentielles, l'âge de l'huile essentielle, le vieillissement par exposition à l'oxygène et aux rayons ultraviolets, et les paramètres analytiques) (De Groot et Schmidt, 2016).

I.7. Rôle des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques présentes dans les cellules ou les glandes spécialisées de certaines plantes utilisées par celles-ci pour se protéger des prédateurs et des parasites, mais aussi pour attirer les pollinisateurs. En d'autres termes, les huiles essentielles font partie du système immunitaire de la plante (Kliszcz *et al.*, 2019).

Les huiles essentielles sont censées servir de médiateurs dans la relation d'une plante avec des facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, le courant d'air, les niveaux de CO₂ et d'ozone, et des facteurs biotiques tels que les concurrents (interspécifiques et intraspécifiques), les pathogènes microbiens, les herbivores et autres insectes nuisibles, et les animaux bénéfiques tels que les pollinisateurs et les disperseurs de graines. Cependant, bien que les preuves d'un rôle écologique général soient nombreuses, le rôle spécifique de la majorité des molécules impliquées reste inconnu (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

I.8. Propriétés des huiles essentielles

I.8.1. Physico-chimiques

Les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques ainsi que les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau. Elles sont généralement liquides et très rarement colorées à température ambiante. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, saffras et vétiver) (Bruneton, 2008 ; Baser et Buchbauer, 2010).

Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaires par exemple les points d'ébullition du caryophyllène, du géraniol, du citral et du α -pinène sont 260°, 230°, 228° et 156°C respectivement. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart ont la capacité à dévier la lumière polarisée (Bruneton, 2008).

I.8.2.Aromatique

Les huiles essentielles sont très utilisées comme arômes alimentaires aussi bien dans plusieurs produits alimentaires tels que : les boissons alcooliques et non alcooliques, les confiseries, les produits laitiers, les produits carnés, les sauces, les soupes, les snacks, et les produits de boulangerie. Bien que des substances chimiques trouvées dans les HE ne puissent pas être ajoutées aux aliments, elles sont cependant autorisées lorsqu'elles sont apportées par le biais d'une HE en raison de leur occurrence naturelle dans ces composés aromatiques. Ainsi, les HE et leurs composants, pourraient de ce fait être utilisés comme arôme alimentaire et sont pour la plupart classés comme GRAS « généralement reconnus comme sains » (generally recognized as safe) (Mascret, 2010).

De nombreuses huiles essentielles d'herbes et d'épices sont largement utilisées dans l'alimentation comme additifs. Leur principale fonction est de conférer des saveurs et des arômes désirables. Par conséquent, il est possible que des données supplémentaires sur la sécurité et la toxicologie soient nécessaires avant l'approbation réglementaire de leur utilisation comme nouveaux conservateurs alimentaires. Les HE et leurs constituants ont été largement utilisés comme ingrédients aromatiques dans une grande variété d'aliments, de boissons et de produits de confiserie (Mariod, 2016).

La composition et la présence des HE peuvent clairement déterminer l'arôme spécifique des plantes et la saveur des condiments. Les HE des herbes et des épices peuvent également être utilisées comme ingrédients fonctionnels. Le basilic doux est largement utilisé pour ajouter un arôme et une saveur distinctifs aux aliments, tels que les salades, les pizzas, les viandes et les soupes. Les HE issues des baies du piment de la Jamaïque (*Pimenta dioica*) sont utilisées comme agent aromatisant dans les produits carnés et les confiseries. La teneur maximale autorisée en huile de baies dans les produits alimentaires est d'environ 0,025 % (Mariod, 2016).

I.8.3.Antioxydantes

De nombreuses études ont démontré les propriétés antioxydantes des huiles essentielles. Le potentiel antioxydant d'une huile essentielle dépend de sa composition. Il est

bien établi que les métabolites secondaires avec des doubles liaisons conjuguées présentent généralement des propriétés antioxydantes substantielles (Koh *et al.*, 2002 ; Dhifi *et al.*, 2016).

Plusieurs composés des huiles essentielles ont une structure qui imite les phénols végétaux bien connus ayant une activité antioxydante. Parmi les principaux composés disponibles dans l'huile, le thymol et le carvacrol ont été signalés comme possédant la plus grande activité antioxydante.

Les huiles essentielles ont plusieurs modes d'action en tant qu'antioxydants, tels que la prévention de l'initiation de la chaîne de réaction, des piègeurs de radicaux libres, des agents réducteurs, l'élimination des peroxydes (Mao *et al.*, 2006). Grâce à ces fonctions, les huiles essentielles peuvent servir d'antioxydants naturels potentiels, qui peuvent être utilisés pour prévenir l'oxydation des lipides dans les systèmes alimentaires (Tongnuanchan *et Benjakul*, 2014).

I.8.4. Antimicrobienne

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs constituants ont été examinées et le mécanisme d'action a été étudié en détail. Une caractéristique importante des huiles essentielles est leur hydrophobie, qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries, en perturbant la structure et en la rendant plus perméable (Wińska *et al.*, 2019 ; Bhavaniramya *et al.*, 2019).

Cela peut alors provoquer une fuite d'ions et d'autres molécules cellulaires. Bien qu'une certaine quantité de fuite de cellules bactériennes puisse être tolérée sans perte de viabilité, une perte plus importante du contenu cellulaire ou une production critique de molécules et d'ions peut conduire à la mort cellulaire (Nazzaro *et al.*, 2013 ; Chouhan *et al.*, 2017 ; Wińska *et al.*, 2019 ; Bhavaniramya *et al.*, 2019).

Les huiles essentielles et/ou leurs constituants peuvent avoir une cible unique ou des cibles multiples de leur activité. Par exemple, le trans-cinnamaldéhyde peut inhiber la croissance d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* sans s'introduire dans la

membrane externe ni épuiser l'ATP intracellulaire (Nazzaro *et al.*, 2013 ; Chouhan *et al.*, 2017). Il a été signalé que les HE contenant principalement des aldéhydes ou des phénols, comme le cinnamaldéhyde, le citral, le carvacrol, l'eugénol ou le thymol, se caractérisaient par la plus grande activité antibactérienne, suivies par les HE contenant des alcools terpéniques.

I.9. Huiles essentielles et conservation des aliments

Les substances phytochimiques, telles que les huiles essentielles, sont des antimicrobiens naturels que l'on trouve dans de nombreuses plantes et dont l'efficacité a été démontrée dans une variété d'applications en diminuant la croissance et la survie des micro-organismes (Callaway *et al.*, 2011 ; Calo *et al.*, 2015).

En outre, les HE présentent des propriétés antimicrobiennes qui peuvent en faire des alternatives appropriées aux antibiotiques (Chaves *et al.*, 2008; Calo *et al.*, 2015). Ces qualités, en plus de la demande croissante des consommateurs de l'utilisation des additifs alimentaires naturels, ont suscité un intérêt pour l'utilisation des HE autant que conservateurs naturels dans divers produits alimentaires (Calo *et al.*, 2015).

Des recherches sur l'utilité des huiles essentielles dans la conservation des produits alimentaires afin d'améliorer leur durée de vie ont été menées avec succès ces dernières années. Divers chercheurs ont utilisé des huiles essentielles, soit sous forme pure, soit sous forme de formulation, pour améliorer la durée de conservation des denrées alimentaires et ont observé une amélioration significative de la durée de conservation (Tripathi et Kumar, 2007 ; Pandey *et al.*, 2014a).

Une étude antérieure a rapporté que certains constituants de l'huile essentielle tels que le citral, la citronnelle, le citronnelol, l'eugénol, le farnésol et le nérol pouvaient protéger les fruits contre les infections fongiques jusqu'à 6 mois. L'huile essentielle *d'Ageratum conyzoides* a réussi à contrôler l'altération des mandarines par les moisissures bleues et a augmenté la durée de conservation des mandarines jusqu'à 30 jours (Pandey *et al.*, 2017).

I.10. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

I.10.1. Distillation par l'eau

A- Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode la plus utilisée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de sa qualité. Ce procédé est de loin le plus répandu car il convient à la majorité des plantes. Il consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, et comme les HE sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles (figure 2) (Fetsy, 2007).

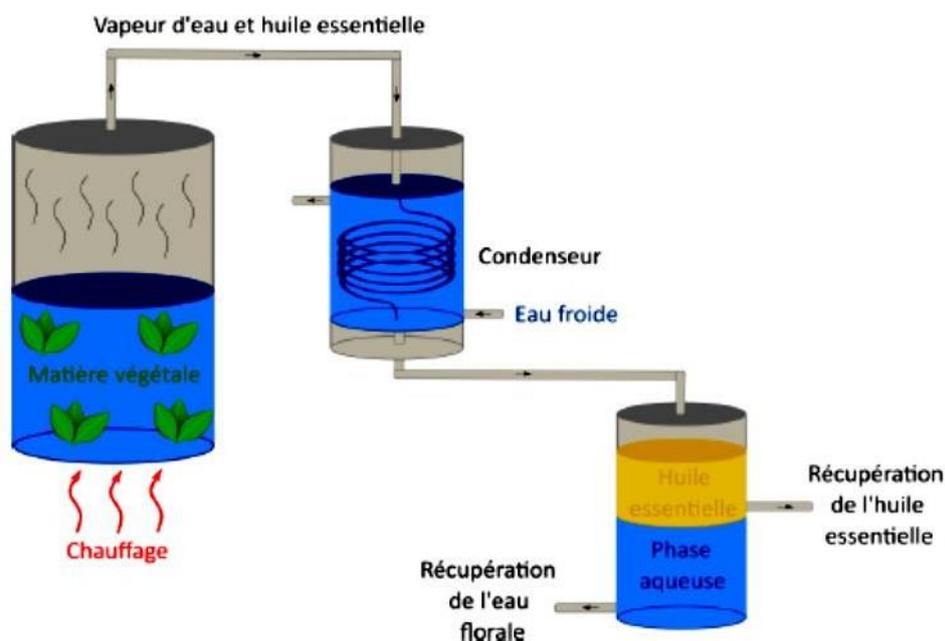


Figure 2 : Principe de l'extraction des huiles essentielles par hydro-distillation (Fetsy, 2007).

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotrope. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la

pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotrope « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation (Franchomme et Péroël, 1990).

B-Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (figure 3). A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique.

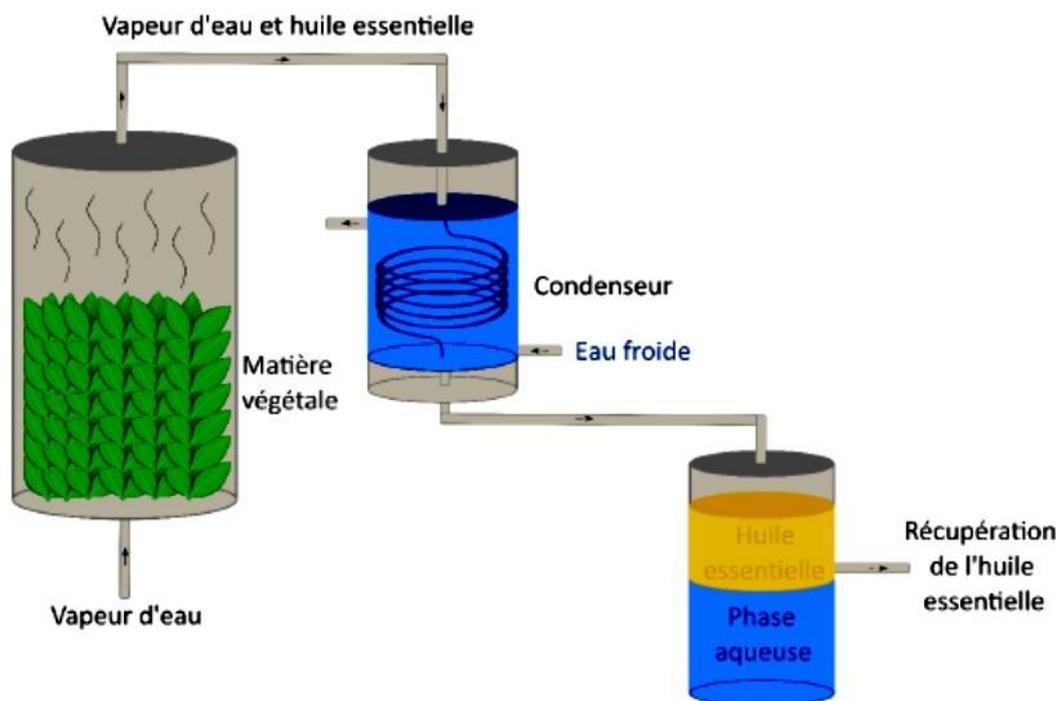


Figure 3 : Principe de l'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (Fetsy, 2007).

La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentín de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits (Dastmalchi *et al.*, 2008).

C- Hydrodistillation par micro-ondes sous vide

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction ou SFME) a été conçue pour des applications en laboratoire pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes aromatiques (Chemat *et al.*, 2004a). Cette technologie est une combinaison de chauffage micro-ondes et d'une distillation à la pression atmosphérique. Basée sur un principe relativement simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes, sans ajout de solvant organique ou d'eau. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante, permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle.

Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par le végétal. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation. D'un point de vue qualitatif et quantitatif, le procédé SFME semble être plus compétitif et économique que les méthodes classiques telles que l'hydro-distillation ou l'entraînement à la vapeur (Lucchesi *et al.*, 2004a ; Lucchesi *et al.*, 2004b).

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes. Cette technique présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Lucchesi *et al.*, 2004a).

I.10.2.Expression à froid

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Chaintreau *et al.*, 2003).

I.10.3.Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé : le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique (P = 73.8 bars et T = 31.1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique, est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (Pellerin, 2001).

En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (Richard, 1992). Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (Guan *et al.*, 2007).

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal

Dans le cadre de cette étude, cinq plantes odorantes ont été sélectionnées : la menthe verte (*Mentha spicata* L.), la verveine odorante (*Aloysia citrodora* L.), le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le citron (*Citrus limon* L.) et la clémentine (*Citrus clementina* L.). Ces plantes ont été obtenues d'un marché local de Mostaganem, et ont été broyées et conservées au congélateur jusqu'à leur utilisation.

II.2. Extraction et conservation des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir des différentes plantes sélectionnées a été effectuée avec un distillateur à courant de vapeur sous basse pression (MOD SPRING 12L). Le procédé consiste à faire traverser par de la vapeur d'eau, durant 2 heures, une cocotte remplie de la plantes aromatique sélectionnée (500 g), à la sortie de la cuve de distillation et sous pression contrôlée, la vapeur d'eau enrichie d'huile essentielle traverse un serpentín où elle se condense dans une burette graduée (Figure 4). La différence de densité entre les deux liquides (eau distillée et huiles essentielles) permet une séparation aisée de l'huile essentielle.



Figure 4 : distillateur à courant de vapeur sous basse pression (MOD SPRING 12L).

II.3. Conservation des huiles essentielles

Pour éviter tout risque de dégradation de l'huile essentielle due à l'action de l'air et de la lumière, nos échantillons étaient conservés au réfrigérateur (4-6°C) dans des flacons bruns bien fermés.

II.4. Détermination du rendement de l'extraction des huiles essentielles

Après chaque extraction, nous avons déterminé le rendement (R) de l'extraction de chaque huile essentielle en calculant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse végétale utilisée pour l'extraction (Carré, 1953) :

$$R = P_1 \cdot 100 / P_0$$

R : rendement de l'extraction des huiles essentielles exprimé en pourcentage (% p/p).

P₁ : poids en (g) des huiles essentielles obtenues.

P₀ : poids en (g) de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

II.5. Détermination de l'activité antioxydante des huiles essentielles

L'activité antioxydante des huiles essentielles des différentes plantes a été calculée par la méthode de piégeage du radical de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH•) selon Karamać *et al.* (2005). Brièvement, 2 mL de 0.5 mmol de DPPH ont été mélangés avec un volume de 100 µL de différentes concentrations des huiles essentielles issues de la menthe, la verveine, le fenouil, les écorces du citron et de la clémentine. Après 20 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm avec un spectrophotomètre ultraviolet-visible (UV/VIS) (Genesys 10UV, Thermo Scientific). Le pourcentage de la capacité de piégeage des radicaux libres a été calculé par l'équation suivante :

$$\text{Capacité de piégeage des radicaux (\%)} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}} \times 100$$

Où A échantillon : est l'absorbance du DPPH mélangé à l'huile essentielle et A blanc est l'absorbance du DPPH dans lequel l'échantillon a été remplacé par du méthanol toutes les mesures ont été effectuées en triplicata et rapportées en tant que valeur moyenne.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration

des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC50). Une faible valeur d'IC50 correspondant à une grande efficacité de l'huile essentielle.

II.6.Détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

II.6.1.Nature et origine des souches testées

Les souches pathogènes : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), ainsi que la souche commensale *Escherichia coli* (ATCC 25922) et la levure *Saccharomyces cerevisiae*, proviennent de la collection du laboratoire de bioéconomie, sécurité alimentaire et santé (Université de Mostaganem).

II.6.2.Mise en évidence du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélose

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de la menthe, la verveine, le fenouil, des écorces de citron et des clémentines vis-à-vis de quelques souches d'altération alimentaire a été évalué.

Pour réaliser cette expérience, la préculture des souches à tester a été préparée 16 h au préalable et les différentes huiles essentielles ont été dissous dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde). Avant l'expérimentation, les souches ont été ajustées à une concentration de 10^8 UFC/mL et ensemencées dans 20 mL du milieu de culture. Après 15 min de repos, 10 μ L de l'échantillon à tester ont été déposés sur les disques filtres stériles (6 mm). Un autre disque contenant du diméthyl suloxyde a été utilisé comme témoin négatif. Les boîtes sont incubées après 30 min à 37°C (30°C pour la levure) pendant 24h et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés ([Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008](#)).

II.6.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h ([Teresa Fera et al., 1998](#)). La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de micro-dilution en milieu liquide tel que cela est stipulé par le CLSI ([Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008](#)).

Dans cette technique, 100 μL de chaque suspension bactérienne ou de levure ont été ajoutés aux puits d'une microplaque de 96 contenant déjà 100 μL de l'échantillon dilué d'une façon géométrique de raison de 2. La concentration finale de l'inoculum est 5×10^5 CFU/mL et la concentration maximale des échantillons testés est de 1 mg/mL.

Des puits contenant du milieu de culture seul ou bienensemencé avec la souche testée mais sans l'échantillon ont été utilisés comme témoin. Les microplaques ont été incubées à 37°C pour les bactéries et 30°C pour *S. cerevisiae*. Après 24h d'incubation, la plus faible concentration qui a totalement inhibé le germe étudié est considérée comme la CMI.

Chapitre III :
Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et Discussion

Les préoccupations croissantes des consommateurs quant aux dangers associés aux additifs synthétiques dans la transformation des aliments ont conduit les chercheurs à concentrer leurs recherches sur les matériaux écologiques et les substances antimicrobiennes naturelles provenant de sources animales, de micro-organismes et de matières végétales.

Au cours des dernières décennies, les huiles essentielles (HE) des plantes aromatiques et médicinales ont été utilisées comme de nouvelles alternatives aux agents antibactériens alimentaires courants, car il s'agit de produits naturels, et présentent moins d'effets secondaires.

Le but de la présente étude est d'explorer l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles issues des feuilles de la menthe, de la verveine, de fenouil, ainsi que les écorces du citron et des clémentines comme conservateurs naturels pour les jus.

III.1. Rendement de l'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir des différentes plantes sélectionnées a été effectuée avec un distillateur à courant de vapeur sous basse pression. Le rendement des extractions a été calculé et les résultats sont représentés dans la [figure 5](#). En ce qui concerne les résultats, on remarque que le rendement de l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces d'agrumes comme le citron et la clémentine était plus important que celui des autres plantes.

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle obtenu par traitement distillation à la vapeur à partir des écorces de la clémentine est de (3.9%) après 2 h d'extraction. L'huile essentielle récupérée est jaune pâle et présente une odeur caractéristique de clémentine. Cette valeur du rendement est très supérieure à celle obtenue par [Bousbia \(2011\)](#) dans le cas de l'extraction par hydro-distillation des huiles essentielles d'orange. Cet auteur a obtenu un rendement de 1.1 % pour une durée de 3h.

Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par la nature de l'espèce d'agrume utilisée, la région géographique, le choix de la période de récolte, et la méthode d'extraction. D'après (Verkiari *et al.*, 2002), le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisée, le degré de fraîcheur, le séchage et la méthode d'extraction employée sont des facteurs qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement.

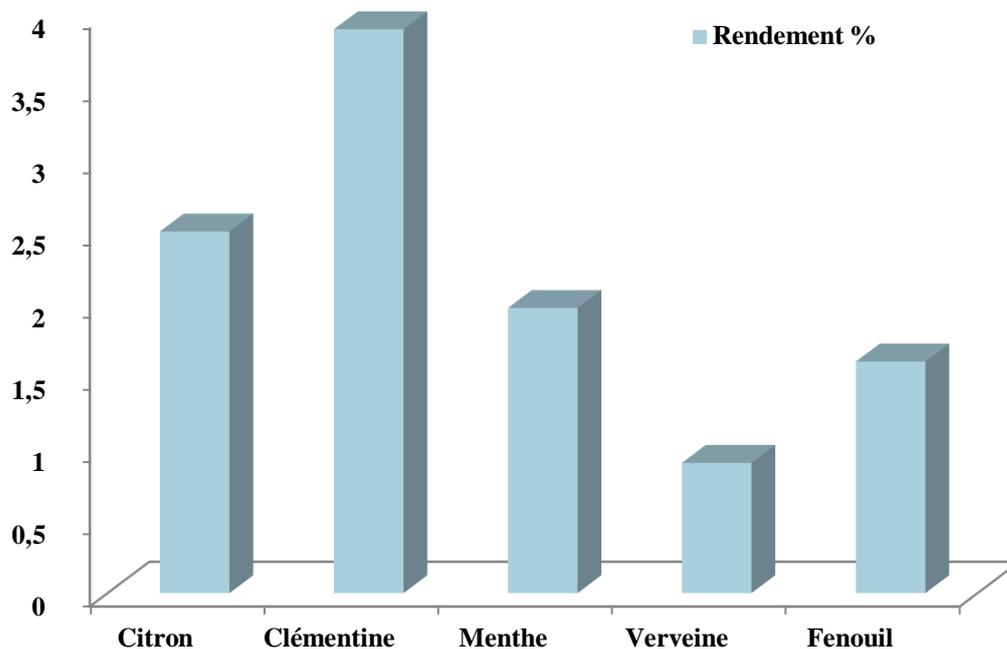


Figure 5 : Rendements de l'extraction des huiles essentielles.

En ce qui concerne le citron, on a obtenu des valeurs de l'ordre de 2.5% de rendement une durée de 2 h d'extraction par distillation à la vapeur d'eau. L'huile essentielle récupéré est jaune et présente une odeur caractéristique du citron. Pour les feuilles de menthe, fenouil et la verveine, les rendements demeurent moins importants avec des valeurs de l'ordre de 1.97%, 1.3% et 0.9% respectivement.

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante

III.2.1. Inhibition du radical DPPH

Les antioxydants sont des substances qui neutralisent les effets néfastes du stress oxydatif, et ils peuvent être naturels ou synthétiques. Les antioxydants naturels sont généralement préférés par les consommateurs en raison des risques potentiels pour la santé liés à la consommation d'antioxydants synthétiques (Atta *et al.*, 2017).

Les plantes et différentes parties de plantes telles que les fleurs, les tiges et les racines peuvent être la source d'antioxydants naturels, notamment de polyphénols, de caroténoïdes et de vitamines. Les huiles essentielles de ces plantes présentent une activité antioxydante en plus de plusieurs activités biologiques telles que des activités antimicrobiennes, anticancéreuses, anti-inflammatoires et anti-âge (Snuossi *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2017).

Le radical DPPH• est généralement l'un des composés les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et coll.*, 2008). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• et comparés à un antioxydant de référence (acide ascorbique).

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH sont représentés dans la [figure 6](#). Les courbes ont une allure logarithmique, à partir de cela nous avons déterminé les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur de l'IC50 de cinq huiles essentielles (citron, orange, menthe, verveine, fenouil). Les résultats obtenus du pouvoir anti-radicalaire pour des différentes concentrations des huiles essentielles de citron, orange, menthe, verveine, et fenouil montrent une relation dose-dépendante entre le pourcentage d'inhibition obtenu et la concentration des extraits.

Nous avons remarqué que l'huile essentielle de la clémentine a donné une très grande inhibition du DPPH à 93.82% à seulement 0.02 mg/mL. Les huiles essentielles de la menthe viennent en deuxième position avec une inhibition de 91.27% du DPPH avec la même concentration, suivies des huiles essentielles du fenouil (90.29%).

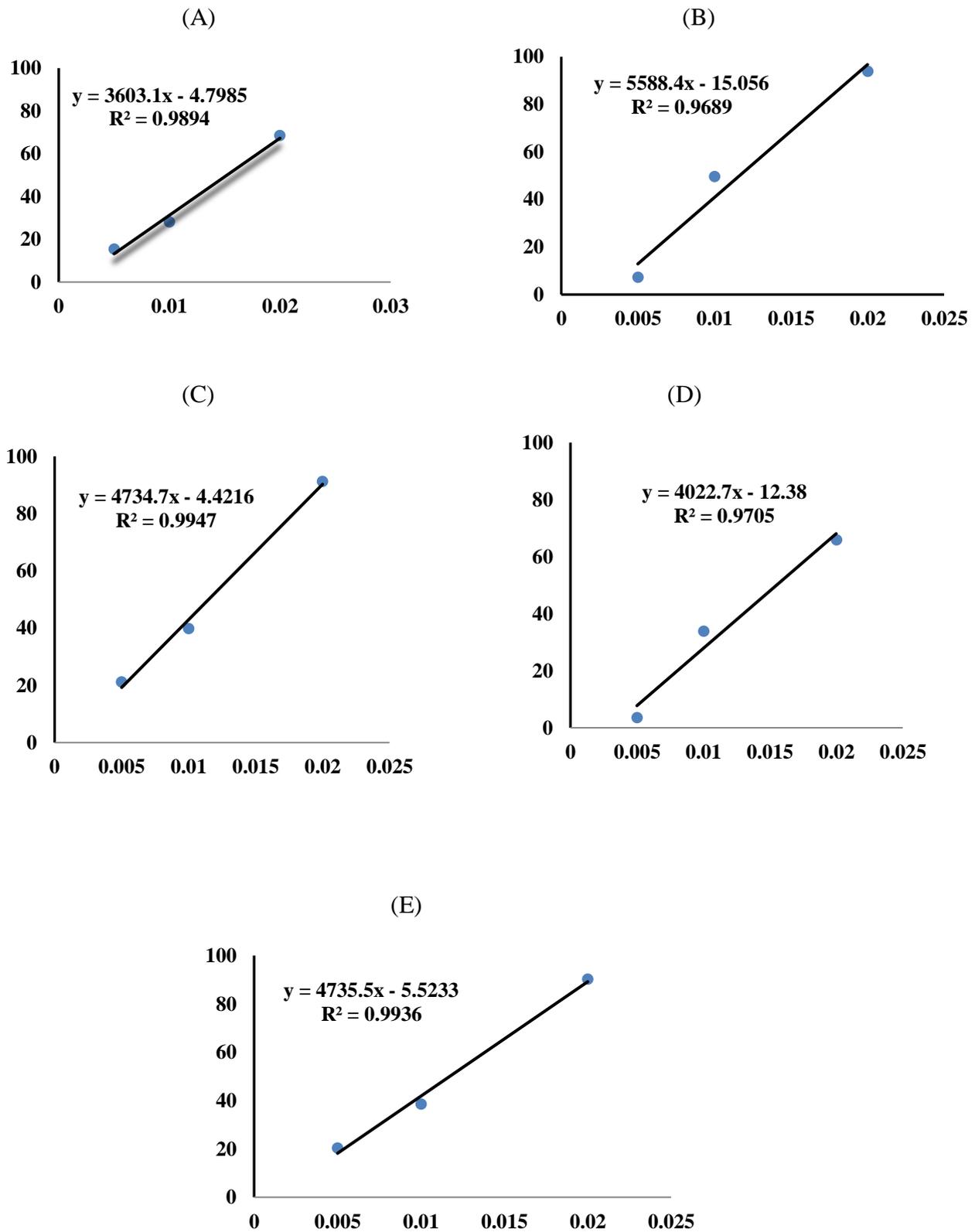


Figure 6: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par les huiles essentielles de (A) : Citron, (B) : Clémentine, (C) : Menthe, (D) : Verveine, (E) : Fenouil.

A cette même concentration (0.02 mg/mL), les huiles essentielles des écorces de citron et des feuilles de la verveine ont enregistré des taux d'inhibition les plus faibles comparativement aux autres huiles (68.34% et 66.05% ; respectivement).

III.2.2. Calcul des IC50

L'IC50 est un paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH^{*}. Plus la valeur de l'IC50 est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant, et inversement une valeur d'IC50 élevée indique une faible activité. Les concentrations IC50 des différentes huiles essentielles calculées à partir des équations des régressions logarithmiques données précédemment, sont données dans le [tableau 1](#).

Tableau 1 : IC50 calculées des différentes huiles essentielles

Huiles essentielles	IC50 (mg/mL)
Citron	0.0152±0.0004
Clémentine	0.0116±0.0009
Menthe	0.0114±0.0006
Verveine	0.0155±0.0005
Fenouil	0.0117±0.0002

De Sousa *et al.* (2015) ont étudié la composition chimique et activités biologiques des huiles essentielles de plusieurs espèces de menthe. Selon leur résultats, l'huile essentielle de *Mentha longifolia* s'est distinguée par son activité antioxydante avec une IC50 de 0.86 ± 0.01 mg/mL par le test DPPH, suivie de l'huile essentielle de *Mentha spicata* avec une valeur de l'ordre de 1.25 ± 0.06 mg/mL. Cette valeur est largement inférieure à nos résultats. En ce qui concerne le citron, une étude a évalué sa composition chimique, son activité antioxydante, et ses propriétés antibactériennes vis-à-vis la souche pathogène *Listeria monocytogenes*. Selon leurs résultats, les huiles essentielles du citron ont un bon profil antioxydant avec une IC50 de 15.056 µg/mL qui est presque identique à la valeur calculée

dans notre étude (Ben Hsouna et al., 2017). Dans une autre étude, les huiles essentielles de la clémentine ont aussi montré une bonne activité antioxydante avec une valeur équivalente à $79.83 \pm 1.72 \mu\text{g/mL}$ (Šafranko et al., 2021).

III.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

En s'inspirant de leur rôle naturel comme agents de protection et de défense contre divers pathogènes qui infectent les plantes, les huiles essentielles sont intensivement explorées pour leur application potentielle comme antimicrobiens à la place ou en association avec les agents conventionnels. Cette utilisation fait sens dans le contexte actuel de propagation accrue de souches résistantes limitant de plus en plus l'efficacité des antimicrobiens conventionnels.

Le potentiel inhibiteur des huiles essentielles de la clémentine, du citron, de la menthe verte, de la verveine, et le fenouil a été étudié par la méthode de diffusion sur milieu gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice vis-à-vis les bactéries *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

D'après les résultats illustrés dans le [tableau 2](#), l'effet antimicrobien varie d'une souche à une autre et dépend aussi de type de l'huile essentielle testée. Toutes les huiles essentielles avaient un bon pouvoir antimicrobien vis-à-vis de toutes les souches testées qui s'est traduit par des zones d'inhibition qui varient entre 11.75 à 21mm. Les plus grandes zones d'inhibitions obtenues ont été enregistrées généralement avec les huiles essentielles du citron, de la clémentine, et de la menthe.

Les huiles essentielles obtenues à partir des écorces de la clémentine avaient le pouvoir antimicrobien le plus important, et ont donné des zones d'inhibitions qui varient

Tableau 2 : Zones d'inhibitions et concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Zones d'inhibition (mm)						
Citron	13±0.25	17.5±0.75	16.75±0.25	17±0	16±0.25	17±0.75
Clémentine	15.5±0.5	17.75±0.25	21±0.75	19±0.75	15.75±0.5	20.5±0.75
Menthe	12.75±0	17±0.5	20±0.5	19.5±0.25	12.25±0.5	17.25±0.25
Fenouil	15.25±0.5	15.5±0.5	14.75±0.5	15±0	12±0	17.5±0.25
Verveine	12±0.25	12.75±0.25	11.75±0.25	15±0.5	15.5±0.5	15±0
CMI (mg/mL)						
Citron	0.625	0.1562	0.1562	0.1562	0.3125	0.1562
Clémentine	0.3125	0.1562	0.0781	0.0781	0.3125	0.0781
Menthe	0.625	0.1562	0.0781	0.0781	0.625	0.1562
Fenouil	0.3125	0.3125	0.3125	0.3125	0.625	0.1562
Verveine	0.625	0.625	0.625	0.3125	0.3125	0.3125

entre 15.5 et 21 mm. *Pseudomonas aeruginosa* était la souche la plus sensible à l'action des huiles de clémentine avec une zone d'inhibition de 21 mm, suivie de *Saccharomyces cerevisiae* (20.5 mm), et *Salmonella typhimurium* (19 mm). Les concentrations minimales inhibitrices enregistrées avec les huiles essentielles de la clémentine varient de 0.0781 à 0.3125 mg/mL (figure 7, 8).

Les huiles essentielles issues des feuilles de la menthe ont exprimé une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées en enregistrant des zones d'inhibition importantes de 20 mm et une CMI de l'ordre de 0.0781 mg/mL avec *P. aeruginosa*. La même concentration minimale inhibitrice a été obtenue avec *S. typhimurium* et une zone de 19.5 mm. La levure *Saccharomyces* était légèrement plus résistante avec une zone d'inhibition de 17.25 mm et une CMI de 0.1562 mg/mL. Les plus faibles zones d'inhibition ont été calculées avec la bactérie *Escherichia coli* (12.75 mm) et une plus grande CMI de 0.625 mg/mL.

La carvone est le constituant majeur des huiles essentielles de la menthe et sont des molécules monoterpéniques ayant des activités intéressantes, notamment antibactériennes, antifongiques, et cytotoxiques pour les lignées cellulaires cancéreuses (Moro et al., 2018).

Les huiles essentielles des écorces du citron ont exercé un bon effet antimicrobien sur toutes les souches, en donnant des zones d'inhibition qui varient de 13 à 17.5 mm. La bactérie *Staphylococcus aureus* s'est montrée la plus sensible à l'action des HEs du citron avec la plus grande zone d'inhibition (17.5 mm) et la plus faible CMI (0.1562 mg/mL), suivie de la levure *S. cerevisiae* (17 mm, 0.1562 mg/mL). La souche *E. coli* est la souche la plus résistante avec une zone d'inhibition de 13 mm et une CMI de 0.625 mg/mL.

Les huiles essentielles sont considérées comme des conservateurs alimentaires naturels potentiels et des agents antimicrobiens et ont été largement utilisées pour la conservation des aliments (Ribeiro Santos et al., 2019). Le limonène (1-méthyl-4-(1-méthyléthényle) est l'un des terpènes les plus courants dans la nature et est largement présent dans les huiles volatiles de diverses plantes (poivre noir, citron et orange, etc.) (Sun, 2007 ; Han et al., 2019).

Le limonène a de larges perspectives d'application dans le domaine des agents antibactériens et de la conservation des aliments en raison de son activité bactéricide à largespectre, de son innocuité et de sa faible toxicité. De plus, le D-limonène peut inhiber de manière significative les bactéries gram-négatives et gram-positives ainsi que l'activité fongique. En outre, de nombreux chercheurs ont confirmé que le D-limonène peut inhiber efficacement la croissance des bactéries d'altération, telles que *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Han et al., 2019).

En ce qui concerne les huiles essentielles de la verveine ou de fenouil, les résultats montrent que leur action est moins importante que celle des huiles essentielles de la clémentine, de la menthe ou bien du citron avec le plus faible pouvoir antimicrobien obtenu avec les HEs des feuilles de la verveine (des zones d'inhibition de 11.75 à 15.5 mm et des CMI de 0.3125 à 0.625 mg/mL).

Thielmann et al. (2019) ont testé l'effet antimicrobien 179 huiles essentielles contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, les résultats varient selon HE testée et la souche, mais la CMI obtenue avec les écorces de citron était de 6.4 mg/mL avec *S. aureus* alors que *E. coli* était résistante. La menthe verte s'est montrée plus efficace avec une CMI de 0.8 mg/mL avec les deux souches.

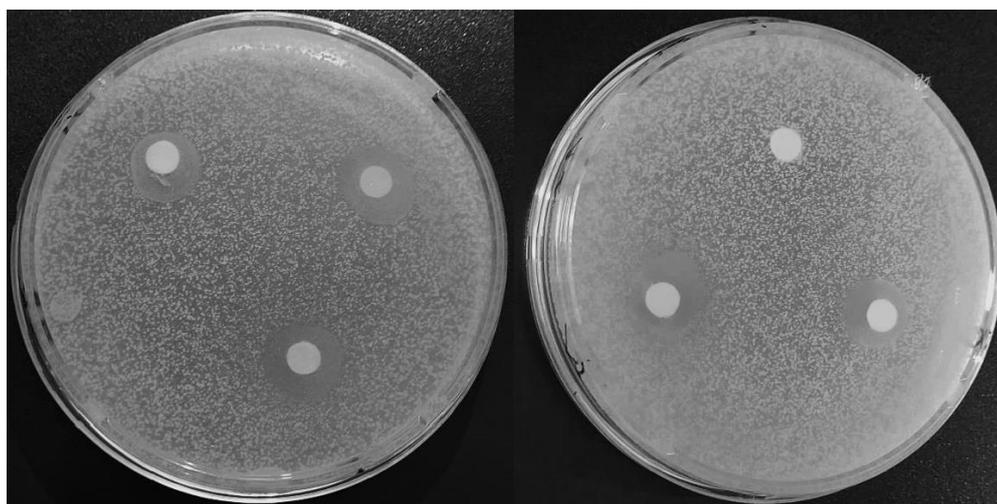


Figure 7: Zones d'inhibition obtenues avec les huiles essentielles.

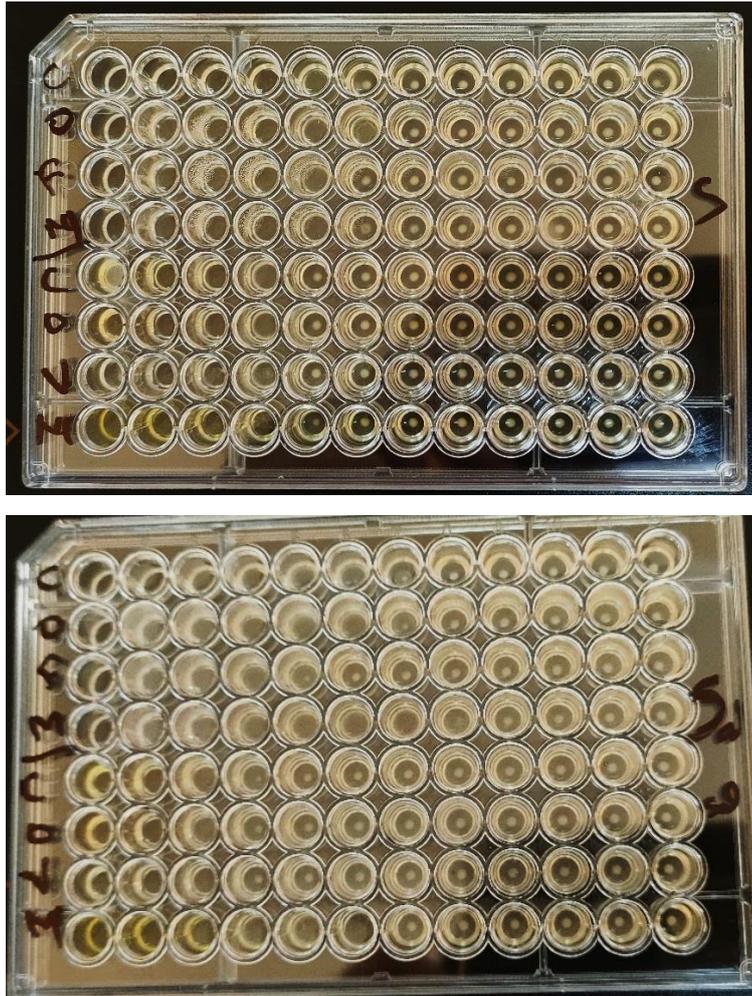


Figure 8: Concentration minimal inhibitrice des différentes huiles essentielles.

Conclusion

Conclusion

Ces dernières années, la qualité et la sécurité des aliments ont suscité une grande préoccupation chez les consommateurs, qui recherchent de plus en plus des produits alimentaires plus sains, plus nutritifs et plus sûrs. Cette tendance se reflète dans la recherche de technologies avancées pour une meilleure conservation des aliments pendant la production, le stockage et le transport. C'est pourquoi de nouvelles alternatives issues de sources naturelles ont été étudiées, comme l'utilisation d'huiles essentielles.

L'Algérie possède une grande richesse en biodiversité végétal et considérée un réservoir assez important de molécules aux propriétés thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui nécessitent d'être exploitées. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à explorer les effets antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de quelques plantes largement utilisées en Algérie (la clémentine, le citron, la menthe, fenouil, et la verveine) afin d'exploiter la possibilité de leur utilisation autant que préservateurs naturels.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée à partir des écorces de la clémentine et du citron, ainsi que les feuilles de la menthe et la verveine en utilisant un distillateur à courant de vapeur sous basse pression. Le rendement le plus élevé des huiles essentielles a été obtenu avec les écorces de la clémentine, suivi des écorces de citron, ensuite les feuille de la menthe.

L'activité antioxydante des différentes huiles essentielles a été évaluée par le test de DPPH. Selon les résultats, l'huile essentielle des écorces de clémentine a donné une très bonne inhibition du radical libre DPPH à 93.82% avec seulement une faible concentration de 0.02 mg/mL. Les huiles essentielles de la menthe ont aussi une bonne activité antioxydante avec une inhibition de 91.27% du DPPH avec la même concentration, suivi des huiles essentielles du fenouil (90.29%). De faibles valeurs d'IC₅₀ ont été calculées avec les différentes huiles essentielles testées (0.0114- 0.0117 mg/mL).

Le pouvoir antimicrobien de ces huiles essentielles a été étudié par la méthode de diffusion sur milieu gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice vis-

à-vis des bactéries *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Toutes les huiles essentielles avaient un bon pouvoir antimicrobien vis-à-vis de toutes les souches testées qui s'est traduit par des zones d'inhibition qui varient entre 11.75 à 21mm, et une concentration minimal inhibitrice de 0.0781 à 0.625 mg/mL. Les meilleurs résultats ont été enregistrés avec les écorces de clémentine, suivi des feuilles de la menthe, ensuite les écorces du citron.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

1 .Atta, E.M., Mohamed, N.H., Abdelgawad, A.A. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *Eur. Chem. Bull.*, 6 : 365–375.

-B-

2 .Bakari, M., Yusuf, H. O. (2018). Utilization of locally available binders for densification of ricehusk for biofuel production, *Banat's Journal of Biotechnology.*, 9(19) : 47-55.

3 .Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils, *Food, Chem.Toxicol.*, 46: 446–475

4 .Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2010). Essential oils science, technology and applications. Florida, Estados Unidos: CRC Press. doi, 10, 9781420063165-c3.

5 .Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., Hamdi, N. (2017). Citrus lemon Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities with Its Preservative Effect against *Listeria Monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. *Lipids Health Dis.* 146.

6 .Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain and oil science and technology.*, 2(2) : 49-55.

7 .Bozin B., Mimica-Duric, N., Samojlik I., Goran, A., Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae). *Food Chem.*, 111: 925-929.

8 .Bruneton, J. (2008). Acides phénols. In: *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. Ed: Tec et Doc. Lavoisier, Paris. p.p. 198-260.

9 .Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology.*, 94(3): 223-253.

-C-

10 .Callaway, T. R., Carroll, J. A., Arthington, J. D., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Ricke, S. C., Crandall, P., Collier, C., Nisbet, D. J. (2011). Citrus products and their use against bacteria: Potential health and cost benefits, (Chapter 17). In: Watson, R., Gerald, J.L., Preedy, V.R., (Eds), *Nutrients, Dietary Supplements, and Nutraceuticals: Cost Analysis versus Clinical Benefits*. (pp. 277-286). New York, NY : Humanapress.

-
- 11 .Calo, J.R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Ricke, S.C. (2015).** Essential oils as antimicrobials in foodsystems—A review. *Food control.*, 54 : 111-119.
- 12 .Chaves, A. V., He, M. L., Yang, W. Z., Hristov, A. N., McAllister, T.A., Benchaar, C. (2008).** Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science.*, 88 : 117-122.
- 13 .Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P. V., Chemat, F. (2004).** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal.*, 19(3) : 188-195.
- 14 .Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017).** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines.* , 4 : 58.
<https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- 15 .Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017).** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel).*, 4(3): 58. doi: 10.3390/medicines4030058. PMID: 28930272; PMCID: PMC5622393.
- 16 .Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008).**

-D-

- 17 .Dastmalchi, K., Dorman, H. D., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R. (2008).** Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology.*, 41(3) : 391-400.
- 18 .De Groot, A.C., Schmidt, E. (2016).** *Essential Oils: Contact Allergy and Chemical Composition.* Boca Raton, USA: CRC Press Taylor and Francis Group.
- 19 .Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W. (2016).** Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines.*
- 20 .De Sousa Barros, A., de Morais, S. M., Ferreira, P.A.T., Vieira, Í.G.P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., de Sousa, H. A. (2015).** Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products.*, 76 : 557-564.

-F-

- 21 .Fetsy, D. (2007).** *Ma bible des huiles essentielles.* Leduc Editions, 20 p.

22 .Fokou, J. B. H. , Dongmo, P. M. J., Boyom, F. F. (2020). Essential Oil's Chemical Composition and Pharmacological Properties. In (Ed.), Essential Oils - Oils of Nature. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86573>

23 .Franchomme, P., Péroël, D., Jollois, R. (1990). L'aromathérapie exactement - Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Éditions Jollois, 445 pages.

-H-

24 .Han, Y., Sun, Z., Chen, W. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*.doi: 10.3390/molecules25010033. PMID: 31861877; PMCID: PMC6982812.

25 .Hurtel, J. M. (2006). Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé.

-K-

26 .Karamać, M., Kosińska, A., Pegg, R.B. (2005). Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish J Food NutrSci.* ,14:165–9.

27 .Kliszcz, A., Danel, A., Puła, J., Barabasz-Krasny, B., Możdżeń, K. (2021). Fleeting Beauty—The World of Plant Fragrances and Their Application. *Molecules.*, 26(9):2473. <https://doi.org/10.3390/molecules26092473>

28 .Koh, K.J., Pearce, A.L., Marshman, G., Finlay-Jones, J.J., Hart, P.H. (2002). Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *Br. J. Dermatol.*, 147 : 1212–1217.

29 .Kourkoutas, Y., Proestos, C. (2020). Food Preservation: Challenges and Efforts for the Future. *Foods.* , 9 : 391. <https://doi.org/10.3390/foods9040391>

-L-

30 .Lardry, J. M., Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev*, 61, 14–17.

31 .Lucchesi, M. E., Chemat, F., Smadja, J. (2004a). An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2), 134-138.

32 .Lucchesi, M. E., Chemat, F., Smadja, J. (2004b). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography a*, 1043(2), 323-327.

-M-

33 .Mao, L.C., Pan, X., Que, F., Fang , X.H. (2006). Antioxidant properties of water and ethanolextracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *Eur Food Res Technol* 222: 236– 41.

34 .Mariod, A. A. (2016). Effect of essential oils on organoleptic (smell, taste, and texture) properties of food. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 131-137). Academic Press.

35 .Mascret, C. (2010). La réglementation régissant les huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, 49(492), 54–56.

36 .Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food chemistry: X*, 100217.

37 .Mei, J., Ma, X., Xie, J. (2019). Review on Natural Preservatives for Extending Fish Shelf Life. *Foods*, 8, 490.

38 .Moro, I. J., Gondo, G. D. G. A., Pierri, E. G., Pietro, R. C. L. R., Soares, C. P., Sousa, D. P. D., Santos, A. G. D. (2018). Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 53.

-N-

39 .Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, Nov25, 6(12):1451-74. doi: 10.3390/ph6121451. PMID: 24287491; PMCID: PMC3873673.

40 .Nikolova, I., Georgieva, N. (2018). Effect of biological products on the population of aphids and chemical components in alfalfa. *Banat's Journal of Biotechnology* 9(19), 38-46.

41 .Noriega, P. (2020). Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications. In S. Perveen, et A. M. Al-Taweel (Eds.), *Terpenes and Terpenoids - Recent Advances*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93792>

-P-

- 42 .Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., Bajpai, V. K. (2017).** Essential oils: Sources of antimicrobials and foodpreservatives. *Frontiers in microbiology*, 7, 2161.
- 43 .Pandey, A. K., Palni, U. T., Tripathi, N. N. (2014a).** Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. for the safety of pigeon pea seeds). *J. Food Sci. Technol.* 51, 4066–4071. doi: 10.1007/s13197-012-0896-4
- 44 .Perveen, S. (2018).** Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. In S. Perveen, et A. Al-Taweel (Eds.), *Terpenes and Terpenoids*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.79683>
- 45 .Pourmortazavi, S. M., Hajimirsadeghi, S. S. (2007).** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.*, 1163: 2-24.

-R-

- 46 .Rahimian, Y., Akbari, S. M., Karami, M., Fafghani, M. (2018).** Effect of different levels of Fenugreek powder supplementation on performance, Influenza, Sheep red blood cell, New Castle diseases anti-body titer and intestinal microbial flora on Cobb 500 broiler chicks. *Banat's Journal of Biotechnology* 9(19), 29-37.
- 47 .Ribeiro Santos, R., Andrade, M., Melo, N.R.D., Sanches Silva, A. (2017).** Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 61:132–140. doi: 10.1016/j.tifs.2016.11.021.
- 48 .Richard, F. (1992).** *Manuel des corps gras*, Paris, Ed: Lavoisier, Tec. Et Doc, p.p. 1228-1242.

-S-

- 49 .Šafranko, S., Stanković, A., Hajra, S., Kim, H.J., Strelec, I., Dutour-Sikirić, M., Weber, I., Bosnar, M.H., Grbčić, P., Pavelić, S.K., Széchenyi, A., Mishra, Y.K., Jerković, I., Jokić, S. (2021).** Preparation of Multifunctional N-Doped Carbon Quantum Dots from Citrus clementina Peel: Investigating Targeted Pharmacological Activities and the Potential Application for Fe³⁺ Sensing. *Pharmaceuticals* , 14, 857. <https://doi.org/10.3390/ph14090857>
- 50 .Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R., Ademiluyi, A.O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S.A., Iriti, M. (2017).** Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules.*, 22(1):70.

51 .Sharmeen, J.B., Mahomoodally, F.M., Zengin, G., Maggi, F. (2021). Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules*, 26(3):666.

52 .Shuai-Hua, T., Chen, Z., Ke-Wu, Z., Ming-Bo, Z., Yong, J., Peng-Fei, T. (2018). Sesquiterpenoids from *Artemisia vestita*. *Phytochemistry*, 147:194-202. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.01.00e4

53 .Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G., De Feo, V. (2016). *Laurusnobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethumgraveolens* essential oils: Composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules*, 21, 1414. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]

54 .Sun, J.J. (2007). D-Limonene: Safety and clinical applications. *Altern. Med. Rev*, 12:259–264.

-T-

55 .Teresa Fera, M., Carbone, M., De Sarro, A., Blandino, G., Riggio, G., Cusumano, V., Battista De Sarro, G., Anzani Ciliberti, F. (1998). Bactericidal activity of lansoprazole and three macrolides against *Helicobacter pylori* strains tested by the time-kill kinetic method. *Int. J. Antimi. Ag*, 10: 285–289.

56 .Thielmann, J., Muranyi, P., Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon.*, 5(6):e01860. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01860. PMID: 31194064; PMCID: PMC6551464.

57 .Tongnuanchan, P., Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231–R1249.

58 .Tripathi, N. N., and Kumar, N. (2007). Putranjivaroxburghii oil- A potential herbal preservative for peanuts during storage. *J. Stored Prod. Res.* 43, 435–442. doi: 10.1016/j.jspr.2006.11.005.

-W-

59 .Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., Szumny, A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*, 24(11):2130.

-X-

60 .Xu, D.P., Li, Y.; Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.J., Li, H.B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. Int. J. Mol. Sci, 18, 96.

-Z-

61 .Zhiri, A., Baudoux, D. (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir Development, rue Goethe, 1 - L-1637 Luxembourg.