



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**Mlle Abderrahmane Fatima Zohra**

**Mlle Harrati Mansouria**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER ENBIOLOGIE**

**Spécialité:valorisation des substances naturelles végétales**

**THÈME**

**Etude de l'activité antimicrobienne de  
l'huile essentielle extraite de Citrus limon,  
en vue de son utilisation comme  
conservateur alimentaire, application sur un  
poisson bleu**

Soutenu publiquement le 04/07/2017

DEVANT LE JURY

Présidente **Mme S. Bergheuil**

**M.CU. Mostaganem**

Encadreur **Mme M. Terbeche**

**M.AU. Mostaganem**

Examinatrice **Mme I. Drissi**

**M.A U. Mostaganem**

*Thème réalisé au Laboratoire de biochimie et de microbiologie*

## **Remerciements**

Je tiens à remercier Madame Terbeche M. la promotrice de ce mémoire, pour avoir encadrée ce travail. Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos conseils, votre objectivité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Il m'est aussi d'un agréable devoir de vous adresser un grand merci pour la sympathie, la confiance et la liberté d'action dont j'ai bénéficié tout au long de ce mémoire. Soyez assuré de ma sincère estime.

Je tiens à exprimer ma respectueuse reconnaissance à Mme I. Drissi pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de jury de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mes profonds remerciements.

Mes reconnaissances vont également à Mme S. Bergheuil qui m'a fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes du laboratoire de biochimie et de microbiologie, pour leur accueil au sein de leur unité et pour le bon déroulement du travail.

Enfin, mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont aussi à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

# DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents qui  
M'ont toujours encouragé et  
Que dieu les protège.

Mes chères sœurs et mon frère :

Aziza, Amani, Mansour

Toute ma famille paternelle et  
maternelle

Toutes mes amies et collègues

Toute la promotion de valorisation des  
substances naturelles et végétales  
2016 :2017.

**Harrati mansouria**

# DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents qui  
M'ont toujours encouragé et  
Que dieu les protège.

Mes chères sœurs et mon frère :  
Mohammed, Mostapha, Djilali, Lila  
Toute ma famille paternelle et  
maternelle

Toutes mes amies et collègues  
Toute la promotion de valorisation des  
substances naturelles et végétales  
2016 :2017.

Abderrahmane Fatima Zohra

## Liste des figures

	<i>Pages</i>
Figure 1. Arbre de <i>Citrus limon</i>	19
Figure 2. Poches sécrétrices des huiles essentielles des citrus.	19
Figure 3. Alambic hydrodistillation	20
Figure 4. Alambic d'entraînement à la vapeur.	20
Figure 5. Expression à froid des agrumes	21
Figure 6. Maquereau espagnol <i>Scomber japonicus</i>	21
Figure 7. Distribution géographique du Maquereau espagnol	22
Figure 8. le matériel végétal <i>Citrus limon</i>	22
Figure 9. <i>Scomber japonicus</i>	22
Figure 10. les souches bactériennes.	23
Figure 11. Schéma d'extraction d'H.E.	23
Figure 12. Schéma du test de l'activité antibactérienne de H.E de <i>Citrus limon</i> sur la <i>Scomber japonicus</i> inoculée avec <i>S. aureus</i> .	24
Figure 13. Schéma résumé le protocole de contrôle de qualité de poison	24
Figure 14. Pourcentage en H.Es obtenu pour <i>Citrus limon</i>	25
Figure 15. observation macroscopique des souches sur des milieux sélectifs : <b>A : Escherichia Coli, B : Pseudomonas aeruginosa, C : Staphylococcus aureus</b>	25
Figure 16. Coloration de Gram obsarvation microscopie (X 100).	26
<b>A : Escherichia Coli, B : Pseudomonas aeruginosa, C: Staphylococcus aureus</b>	
Figure 17. résultat de test de catalase ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	26
Figure 18. l'effet de l'H.E de citron sur <i>staphylococcus aureus</i> .	34
Figure 19. l'effet de l'H.E de citron sur <i>E. coli</i> .	35
Figure 20. l'effet de l'H.E de citrus limon sur <i>P. aeruginosa</i>	36
Figure 21. Effet inhibiteur de <i>citrus limon</i> à différents concentration vis-à vis <i>S. aureus</i> inoculée sur la <i>Scomber japonicus</i> .	39

## Liste des tableaux

	<i>Pages</i>
Tableau 1. Composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais)	28
Tableau 2. caractères morphologique étudié pour identification bactérienne	41
Tableau 3. Etude macroscopique des bactéries testées	43
Tableau 4. l'effet de l'H.E de citron sur les trios souches utilisées.	62
Le tableau 05. les résultats des différentes concentrations de l'H.E de citron sur <i>S. aureus</i> et le CMI est 1/16.	71
Tableau 6. les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur notre matrice alimentaire.	76

## *Abréviations*

% : Pour cent.

°C : Degré Celsius.

µl : Microlitre.

cm : Centimètre.

CMI : concentration minimale inhibitrice

DO : densité optique

g : Gramme.

H : Heure.

HE : Huile Essentielle.

m : Mètre.

Max : Maximum.

mg : Milligramme.

Min : Minimum.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

sec : Seconde.

SM : Solution mère.

t : Temps.

# Table de matière

	<i>Pages</i>
Remerciement	2
Dédicace 1	3
Dédicace 2	4
Résumé	5
Abstract	5
Liste des figures	6
Liste des tableaux	7
Liste des annexes	8
Abréviations	9
Introduction général	10
Revue bibliographique	
I. Systématique	12
I.1. Ordre, famille	12
I.2. Genre et espèce	12
I.3. Variétés	13
I.4. Description morphologique	13
I.5. Classification botanique	15
I.6. Composition du fruit	16
II. Les huiles essentielles	17
II.1. Bref historique	17
II.2. Définition	18
II.3. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	19
II.4. Propriétés physiques	20
II.5. Le rôle des huiles essentielles	20
II.6. Composition chimique	20
II.7. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles	22
II.8. Technique d'extraction des huiles essentielles	22

II.8.1. Hydrodistillation	22
II.8.2. Entraînement à la vapeur	23
II.8.3. Expression à froid	24
II.8.4. Autres techniques	24
II.9. Toxicité des huiles essentielles	25
II.10. Méthodes de caractérisation des H.Es	25
II.11. Domaines d'application des huiles essentielles	26
II.12. La conservation des huiles essentielles	28
II.13. Activités biologiques	28
II.13.1. Activité antioxydant	28
II.13.2. Activité antibactérienne	29
II.13.3. Activité antifongique	30
II.14. Application des H.Es dans les produits alimentaires	31
II.15. Conservation des aliments	32
Introduction	33
III. Maquereau espagnol : <i>Scomber japonicus</i>	35
III.1. Position systématique	35
III.2. Biologie de maquereau espagnol	35
III.3. Caractère distinctif	35
III.4. Coloration	36
III.5. Distribution géographique et habitat	36
III.6. Qualité nutritionnel de poisson (Scombridés)	37
III.7. Les contaminants	41
III.8. La toxi-infection alimentaire	41
III.9. Altération de poisson	42
III.9.1. Altération microbienne	42
III.10. Les bactéries responsables du contaminant	43
III.10.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	43
III.10.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
III.10.3. <i>Salmonella</i>	44
III.10.4. <i>Escherichia coli</i>	44

III.11. Intoxication à la scombrottoxine	45
Matériel et méthodes	46
I- Matériel	46
I-2. Choix du matériel végétal	47
I-3. Les milieux de culture	47
I-4. Poisson ( <i>Scomber japonicus</i> )	47
I-5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	47
I-6. Les souches utilisées	48
II- les méthodes	48
II-1. Méthode d'extraction des H.Es	48
II-2. Détermination du rendement d'extraction	50
II-3. Testes microbiologiques	50
II-3-1. Teste de confirmation des souches	50
II-3-2. Coloration de Gram	50
II-3-3. Test de catalase	51
II-4. Méthode de diffusion ou des aromatoigrammes	52
II-5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	53
II-5.1. Méthode de dilution en milieu solide	53
II-5.2. Préparation de la gamme de dilutions	54
II-6. Effet inhibiteur de H.Es de <i>citrus limon</i> sur des bactéries pathogène inoculées sur la scomber	54
II-6.1. Protocole expérimentale	54
II-6.1.1. Préparation des échantillons	54
II-6.1.2. Analyse microbiologiques	55
II-6.1.2.1. Préparation des solutions mères et des dilutions décimales	55
II-6.1.2.2. Dénombrement des staphylocoques	55
II-7. Contrôle de qualité	57
II-7.1. Recherche de la flore totale aérobie mésophile	57
II-7.2. Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux	57
II-7.3. Recherche des levures et des moisissures	57

Résultats et discussion	59
I.    Rendement d'extraction	60
II.   Identification des bactéries testées	60
II-1. Observation macroscopique des colonies	60
II-2. Observation microscopique des colonies	61
II-3. Test biochimique	61
II-3-1. Test de catalase	61
III.   Méthode de diffusion ou des aromatoigrammes :	62
III.1. Concentrations minimal inhibitrice (CMI)	63
IV.   Activité antibactérienne de l'H.E de <i>citrus limon</i> appliqués sur le poisson <i>Scomber japonicus</i>	64
V.   Contrôle de qualité du poisson	65
Discussion	65
1. Rendement :	65
2. Activité antibactérienne	
3. Activité antibactérienne de H.E de <i>citrus limon</i> appliquées sur le maquereau espagnol ( <i>scomber japonicus</i> )	69
4. Contrôle de qualité	71
Conclusion	
Références	
Annexes	

La qualité microbiologique d'un aliment constitue l'une des bases essentielles de son aptitude à satisfaire la sécurité du consommateur. Un aliment, exposé à la détérioration par les bactéries et les moisissures peut voir diminuer ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires (**Rozier et al., 1986; Guiraut, 2003**). Malgré l'amélioration des techniques de conservation des aliments, la nature des conservateurs alimentaires reste une des questions les plus importantes pour la santé publique (**Burt, 2004**).

Le maquereau *Scomber japonicus* est un produit alimentaire qui renferme, en plus de sa teneur élevée en eau, plusieurs autres nutriments tels que les protéines, les glucides, les vitamines liposolubles et surtout la matière grasse, ce qui la rend sujette à différents types d'altérations microbiennes.

Une altération de la qualité hygiénique des poissons met en cause la santé du consommateur, cette altération est généralement invisible, elle est due à un développement de microorganismes pathogènes responsables d'intoxications alimentaires de gravités diverses. Une autre altération de la qualité marchande de le poisson modifie ses caractéristiques organoleptiques (rancissement, altération du goût), cette altération bien que non dangereuse pour le consommateur, rend ce produit non commercialisable (**Bouix et Leveau, 1984**).

L'oxydation de la matière grasse est probablement la transformation chimique causant le problème majeur en technologie halieutique surtout dans les scombridées en raison de sa teneur élevée en matière grasse (**Collomb et Spahni, 1996**). La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables qui conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (**Prior, 2003**).

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Aprotosoie et al., 2010**). D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**Holley et al., 2005**).

Plusieurs études ont été menées sur les activités biologiques des huiles essentielles de *Citrus limon*, telles que l'activité antioxydante (**Himed, 2011 et Hellal 2011**) et l'activité antimicrobienne (**Hammer et al., 1999; Caccioni et al., 1998; Moreira et al., 2005**). Ces dernières sont avérées un moyen très prometteur pour pallier les risques d'altérations causés par les microorganismes ou par l'oxydation des lipides.

C'est dans cette optique que s'articule la présente étude, dont les principaux objectifs visent la possibilité d'utilisation de leur huile essentielle comme agent naturel conservateur dans le poisson.

Hormis l'introduction et la conclusion, le manuscrit est donc structuré en trois grandes parties. La première partie consiste en une synthèse bibliographique mettant l'accent sur deux principaux volets qui sont l'huile essentielle de *Citrus limon* et le poisson *scomber japonicus*. Dans la deuxième partie, nous avons tout d'abord décrit le matériel végétal utilisé ainsi que la méthode d'extraction et d'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *C. limon*. Enfin, nous avons appliqué l'huile essentielle (avec ses différentes concentrations) au poisson, en effectuant des tests de sensibilité pour évaluer « *in vitro* » l'activité antibactérienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de huile extraite sur un ensemble de bactéries pathogènes qui sont à l'origine d'intoxication alimentaire comme (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa*) et effectuant des analyses microbiologiques. La troisième partie a été consacrée aux résultats obtenus. Suivis d'une conclusion générale.

## I. Systématique :

### I.1. Ordre, famille :

Le citronnier appartient à la famille des *Rutaceae*, ordre des *Térébenthales*. Les *Térébenthales* ont des fleurs à disque nectarifère inta-staminal (Disciflores) (Ozenda, 1977).

Les *Rutaceae* s'identifient par la présence, sur leurs organes aériens, de poches sécrétrices de type Schizolysigène. Certaines *Rutaceae* sont des herbacées à petites baies et au goût poivré dont la pluparts sont des arbres odoriférants, à fruits juteux comme le citron. Ils constituent la sous-famille des *Aurantioideae*.

Le caractère distinctif de la sous-tribue des *Citrinae* ou Hespéridées est le fruit appelé Hespéridie : les parois de ses loges sont garnies de poils vésiculaires, se développant dans la cavité ovarienne en sacs remplis de grosses cellules à paroi mince et contenant le jus. Ce nom est issu de la mythologie grecque où les trois nymphes du couchant aux voix claires, appelées Hespérides, veillaient sur les "pomme d'or" du verger des Dieux.

Les trois genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* regroupent les plantes fruitières exotiques couramment appelées Agrumes.

### I.2. Genre et espèce :

Le citronnier appartient au genre *citrus* qui se caractérise par :

- Des petits arbres épineux,
- Des feuilles à une foliole dont le limbe est articulé sur un pétiole plus ou moins ailé,
- Des fleurs à l'aisselle des feuilles, avec un calice odorant à 4 ou 5 sépales, des étamines 4 à 10 fois plus nombreuses que les pétales, un disque nectarifère et un ovaire de 8 à 18 loges et 4 à 8 ovules par loges.

Il peut être cité sous d'autres synonymes comme *citrus limonum* Risso, *Citrus medica* Linné, *v.limonum*, mais aussi sous divers noms vernaculaires comme limone en italien, lemon en anglais, zitrone en allemand, lymon et limoun en arabe. (Faouzi.M, 2006).

### I.3. Variétés :

Les variétés de citronnier les plus exploitées sont sélectionnées selon un plusieurs de ces trois critères :

- Le rendement en fruits,
- La qualité du jus de citron,
- La résistance de l'arbre aux principales maladies parasitaires.

Les cinq principales variétés de *citrus limon* (L.) Burman sont : *Euréka* ou des 4 saisons, *Lisbon*, *Femminello*, *Monachello* et *Verna*.

### I.4. Description morphologique :

- **L'arbre :**

Le citronnier est un arbre de petite taille (3 à 5 m), vigoureux, affectionnant les sols non calcaires sous un climat humide et chaud. Sa longévité naturelle peut approcher les 200 ans, mais en culture, son existence d'arbre productif se limite à 50 – 60 ans.

- **Les racines :**

Principales sont fortement pivotantes et s'enfoncent à plus de 1,5 m ; les secondaires sont toutes proches de la surface du sol, entre 15 et 80 cm sous terre.

- **Le tronc :**

Est court et d'un bois dense, jaune veiné.

- **La frondaison :**

Est formée d'une succession de demi-sphères superposées. Son développement s'effectue de trois manières :

1. En trois flux végétatifs, le plus important au printemps, en été et au début de l'automne.
2. Le citronnier émet aisément, sur ses branches âgées, des rameaux ou gourmands qui se développent verticalement du fait de la dominance apicale ;

ils dépassent alors la frondaison et constituent un nouvel étage. (Faouzi. M, 2006).

3. Des bourgeons adventifs latents, d'origine endogène, existent sur les branches et permettent de régénérer la charpente d'un arbre endommagé.

- **L'ensemble des caractères des feuilles :**

D'agrumes permet l'identification des genres et espèces. La feuille de citronnier a une foliole. Elle est lancéolée, persistante contrairement au genre *Poncirus*, de couleur verte, brillante sur la face supérieure, constellée de petites glandes riches en huile essentielle et peu nervurée. Le pétiole est articulé au limbe et contrairement aux autres agrumes, très faiblement ailé.

- **Les fleurs :**

Se situent à l'aisselle des feuilles et en bouquets sur les rameaux courts de l'année. La corolle, dite dialypétale, est constituée de 5 pétales, épais et libres, blancs bordés de pourpre, très odorants par leur huile essentielle très recherchée en parfumerie. Le calice, en cloche, est formé de 5 sépales verts, soudés. Les étamines sont généralement en nombre supérieur à 4 fois celui des pétales. Leurs filets sont soudés à la base en un verticille contenant le disque nectarifère sur lequel est fixé l'ovaire. Ce dernier est pluriloculaire, avec 8 à 12 carpelles entièrement indépendants qui deviendront autant de quartiers dans le fruit. L'ovaire se prolonge par un style de diamètre inférieur à celui du stigmate, comparativement gros. La floraison est dite remontante : en toute saison, des fleurs s'épanouissent alors que les fruits de l'année précédente sont encore parfois sur l'arbre. (Faouzi. M, 2006).

- **Le Citron :**

Le fruit du citronnier est une baie cortiquée. Cet agrume de taille moyenne (5 à 10 cm) est dit "limoni forme", c'est-à-dire, ovoïde et avec, à l'extrémité stylaire, un mamelon souvent cerné d'une dépression circulaire, sans persistance d'aucune pièce florale.

La peau du citron est appelée écorce ou zeste. Elle est brillante et d'une couleur variant du vert au jaune vif selon la maturité du fruit. Elle est utilisée pour son arôme et son amertume dans les préparations culinaires et pharmaceutique, ou en parfumerie.

Le zeste se développe à partir des parois externe et moyenne des carpelles floraux. Elle est constituée par le flavédo comprenant l'épicarpe et le mésocarpe externe, et l'albédo ou mésocarpe interne.

L'épiderme interne des carpelles floraux est à l'origine de l'endocarpe ou pulpe. Elle est formée d'un ensemble de poils vésiculeux, à paroi mince, contenant un jus plus ou moins acide, et groupés en 8 à 12 quartiers séparables les uns des autres.

- **Les pépins :**

Fusifformes, proviennent des deux rangs d'ovules. Ils sont blancs, à un seul embryon et le plus souvent exalbuminés. Un principe amer, la lémonine, et une huile grasse en sont extraits.

### **I.5. Classification botanique :**

Selon **Padrini et Lucheroni (1996)**, la classification de citron est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Eudicotylédones

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : Citrus

Espèce : *Citrus limon*



**Figure 01** : Arbre de *Citrus limon*

### **I.6. Composition du fruit :**

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le fruit du a une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (naringosides et hespéridosides). La teneur de ce fruit en glucides est faible mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron à une concentration de 0,5g/100g dont le potassium est le minéral le plus abondant (**tableau 1**) (**Valnet, 2001**).

L'arôme du citron résulte de ses huiles essentielles (HE) abondantes dans les vacuoles de l'écorce; il s'agit d'un mélange de limonène, du citral, du citronnellal et des coumarines (**Leclerc, 1984**).

**Tableau 1.** Composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais) (Souci *et al.*, 1996).

<b>Composition</b>	<b>Teneur</b>
Eau	90,20 g
Glucides	3,16 g
Protéines	0,70 g
Lipides	0,60 g
Acides organiques	4,88 g
Fibres alimentaires	0,50 g
Les vitamines	51,26 mg
Les minéraux	211,95 mg
Apports énergétiques	36,48 K Calories

## **II. Les huiles essentielles :**

### **II.1. Bref historique :**

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (Baser et Buchbauer, 2010). Les huiles essentielles

semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses.

Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc. **(Besombes, 2008)**.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec la civilisation arabe, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. **(Baser et Buchbauer, 2010)**.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice **Attéfosse** a créé, en **1928**, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches. **(Besombes, 2008)**.

## **II.2. Définition :**

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés

Et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid ; Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de La plante. **(Bruneton, 1993)**.

Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme AFNOR (Association Française De Normalisation). **(Afnor, 2000)**.

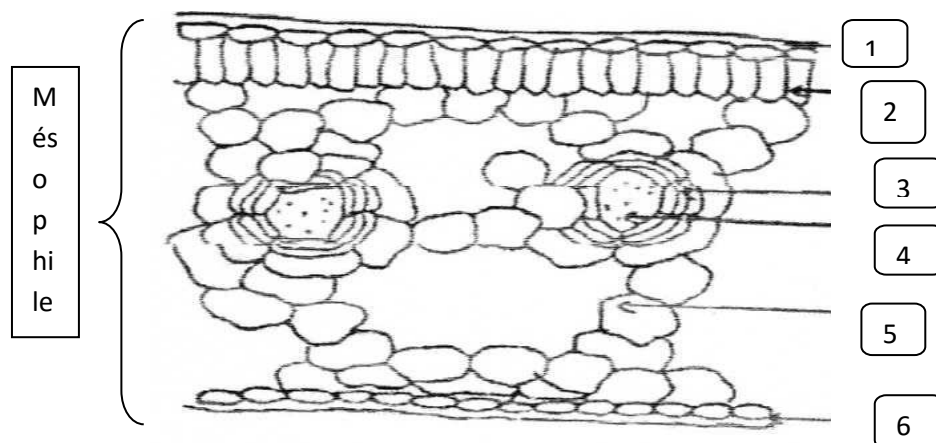
Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des

pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang ,bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles(citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante.(Anton et Lobstein, 2005).

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante. (Bruneton, 1993).

### II.3. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus limon*

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (Goris, 1967). Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Le fruit du *citron* se compose de l'épicarpe, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (Figure 2) (Ferhat *et al.*, 2010).



- |                            |                        |
|----------------------------|------------------------|
| 1- Epiderme supérieur      | 4- poches à essence    |
| 2- Parenchyme palissadique | 5- parenchyme lacuneux |
| 3- Cellules sécrétrices    | 6- Epiderme inférieur  |

**Figure 02** : Poches sécrétrices des huiles essentielles des citrus.

#### II.4. Propriétés physiques :

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

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

#### II.5. Le rôle des huiles essentielles :

En plus des propriétés thérapeutiques des huiles essentielles à l'extérieur des plantes, il ne faut pas négliger non plus la fonction de ses huiles dans la plante.

Toutefois, les parfumsémis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs. **(Deroin, 1988)**.

De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées «phytoalexines». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine. **(Mann, 1987)**.

L'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques, a été rattachée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes. Les vapeurs aromatiques ont pour propriété de saturer l'air autour de la plante, empêchant la température du jour de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de façon excessive, aussi les huiles essentielles constituent une ressource énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. **(Belaiche, 1979)**.

## II.6. Composition chimique :

Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont : les terpènes, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les esters et les éthers. Ces molécules peuvent agir en synergie, ce explique à la fois leur efficacité, mais aussi la polyvalence, dans la mesure où elles y sont le plus souvent, certes à des concentrations différentes, toutes présentes dans les huiles essentielles. L'ensemble de leurs constituants se caractérise par un faible poids moléculaire **(Girard, 2010)**. D'après **Mondello et al., 2005**, les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges comportant plus de 200 composés qui peuvent être regroupés en fractions non volatile (1-15 %) et volatile (85- 99 %). Cette dernière fraction contient principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes ainsi qu'une petite quantité de monoterpènes oxygénés (fonctions aldéhydes, cétones, alcools et esters). Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène  $C_5H_8$  (2-méthylbutadiène) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire  $(C_5H_8)_n$ . Les monoterpènes ont pour formule  $C_{10}H_{16}$  et les sesquiterpènes  $C_{15}H_{24}$ . La partie non volatile contient des acides gras, des stérols, des caroténoïdes, des cires, des coumarines, des psoralènes et des flavonoïdes **(Mondello et al., 2003)**. L'essence de Citrus limon est composée de 92% à 93% de terpènes dont le d-limonène est le

plus abondant (Iserin et al., 2001 ; Ferhat et al., 2010), de sesquiterpenes, d'aldéhydes (dont le citral est le plus dominant) et d'esters (Iserin et al., 2001).

## II.7. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée (Besombas, 2008). Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences (Olle et Bender, 2010). Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Aprotosoiaie et al., 2010).

## II.8. Technique d'extraction des huiles essentielles :

Plusieurs techniques et procédés d'extraction ont été employés depuis longtemps et autres ont été développées pour obtenir les huiles essentielles :

### II.8.1. Hydrodistillation :

Est l'un des procédés les plus simples et le plus ancien. Il repose sur le fait que la plupart des matières odorantes peuvent être entraînées à la vapeur d'eau. L'appareil utilisé est un alambic, où la partie végétale est mélangée à l'eau. L'ensemble est porté à ébullition (Benteaud, 2001 ; Jacqueline, 2009)

Sous l'action de la chaleur, les cellules des végétaux éclatent et libèrent des composés organiques odorants et volatils. La vapeur d'eau formée entraîne les composés organiques à l'état gazeux vers le col de cygne de l'alambic puis s'acheminent par un serpentin refroidi dans un circuit d'eau. (Patrice et Franck, 2014).

La condensation de ce mélange gazeux, permet de récupérer un condensat liquide. Ce condensat est constitué de deux phases non miscibles :

- Une phase organique huileuse et très odorante, appelée " huile essentielle", contenant la majorité des composés odorants.
- Une phase aqueuse, odorante, appelée " eau aromatique", qui n'en contient que très peu.

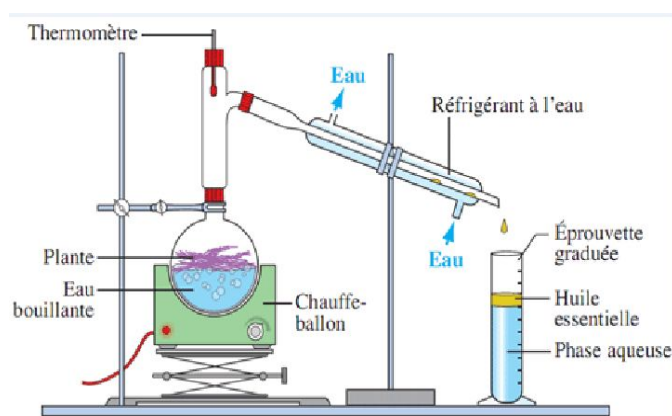


Figure 03 : Alambic hydrodistillation

La séparation entre eau et huile essentielle se fait par différence de densité, ce qui permet de récupérer facilement l'huile essentielle.

La distillation doit être faite à très basse pression et à une température la plus basse possible (100°C environ) pour éviter la décomposition de certains composants et l'odeur de brûlé. (Patrice et Franck, 2014).

### II.8.2. Entraînement à la vapeur :

Cette méthode consiste à faire passer de la vapeur de l'eau à travers la matière végétale placée dans l'alambic.

La vapeur permet le relâchement des molécules aromatiques de la matière végétale en forçant l'ouverture des cavités qui contiennent l'huile. Les molécules de ces huiles volatiles s'échappent alors de l'élément végétal en s'évaporant. Cette vapeur doit être juste assez chaude pour permettre le relâchement de l'H.E, mais pas trop pour ne pas brûler l'élément végétal ou l'H.E.

La vapeur, qui contient alors l'H.E, est ensuite dirigée à travers un système de refroidissement où elle se liquéfie, ce qui sépare l'H.E de l'eau. Pour que la vapeur soit produite, la pression doit dépasser celle de l'atmosphère. Dans ces conditions, le point d'ébullition se situe au-dessus de 100°C, ce qui permet d'extraire plus vite l'H.E tout en empêchant sa dégradation. (Patrice et Franck, 2014 ; Benteaud, 2001)

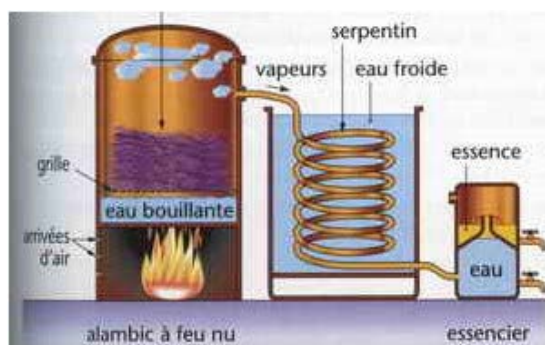


Figure 04 : Alambic d'entraînement à la vapeur

### II.8.3. Expression à froid :

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. (Basil et al., 1998)



Figure 05: Expression à froid des agrumes

### II.8.4. Autres techniques :

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques

d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités (**Ferhat et al., 2010**). Parmi ces techniques, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons (**Kaufmann et Christen, 2002 ; Hemwimon et al., 2007 ; Piochon, 2008 ; Ferhat et al., 2010 ; Dupuy, 2010**), l'extraction par les fluides supercritiques ou encore l'eau à l'état sub critique (**Kaufmann et Christen, 2002 ; Piochon, 2008 ; Ferhat et al., 2010 ; Dupuy, 2010**), l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par la flash détente (**Ferhat et al., 2010**).

## **II.9. Toxicité des huiles essentielles :**

La majorité des intoxications par les plantes connues est la cause d'un surdosage car leur accumulation dans l'organisme crée des affections dégénératives et même des effets secondaires plus banales (vomissements, vertiges, syncopes) (**Valnet, 1984**). L'abus d'essences concentrées peut aussi provoquer l'engorgement du foie et la rétention d'urine. (**Schauenberg et Paris, 2010**).

Il existe également des huiles essentielles qui peuvent provoquer des irritations cutanées lorsqu'on les utilise de façon externe (**Kothe, 2007**). Les effets toxiques se manifestent par des réactions allergiques (eczémas, abcès). Ce sont surtout les huiles essentielles et purifiées qui provoquent ces inflammations. (**Schauenberg et Paris, 2010**).

Les huiles essentielles sont des médicaments et une dose peut entraîner des troubles très graves, seul un praticien averti et apte à vous prescrire par contre les baumes, les huiles de corps, les huiles de bains vendus dans le commerce, sont sans danger, si bien sûr en respectent la posologie. (**Salle, 1987**).

## **II.10. Méthodes de caractérisation des H.Es :**

Les huiles essentielles doivent répondre à des caractéristiques imposées par les lois des pays producteurs et exportateurs et par les pays importateurs. Ces critères sont définis dans des normes internationales ISO (International Organisation for Standardisation) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation) (NF ISO 855). Ainsi, les propriétés organoleptiques et physiques sont contrôlées telles que

la coloration, l'odeur, la réfraction, la solubilité, le point éclair mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acides et d'esters (**Fillatre, 2011**).

Les huiles essentielles de Citrus extraites à partir de zeste de fruit sont largement utilisées dans les industries alimentaires et de parfumerie. Du point de vue commercial, elles présentent une importance économique considérable. Malheureusement, la production et l'introduction des huiles essentielles de mauvaise qualité et/ou altérées dans le marché est une occurrence courante. Par conséquent, les analystes des huiles essentielles des agrumes exigent le développement et la disponibilité des méthodes d'analyses de haute résolution, rapides, sensibles et sélectives (**Tranchida et al., 2011**). La plupart des méthodes appliquées dans l'analyse d'huiles essentielles reposent sur des procédures chromatographiques. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile ; elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**Paris et Godon, 1979**). La CPG couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM), permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG (**Zellner et al., 2010**).

## **II.11. Domaines d'application des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (**Grysole, 2005**).

- **Secteur parfumerie/ cosmétique**

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. L'Europe et les Etats-Unis ont développé des industries importantes qui démarquent par leur haut niveau d'exportation dans ce domaine. La consommation d'huiles dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés. Secteur parfumerie technique

La parfumerie technique (qui comprend les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels) a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Par exemple, la citronnelle dégage un parfum qui indique au visiteur que l'endroit a été fraîchement lavé. Dans ce secteur, l'industrie consomme de grandes quantités d'huiles, au meilleur prix possible, car l'industrie désire garder le prix de revient de son produit au minimum.

- **Secteur médecine**

Dans le domaine de la santé, il faut distinguer le secteur pharmaceutique de celui des médecines douces. Dans ce deuxième secteur, les vertus thérapeutiques des huiles sont reconnues et utilisées depuis des siècles dans beaucoup de pays. En effet, ce marché a donné naissance à une industrie des produits naturels comme les produits homéopathiques. Cette industrie, très développée en Europe, bénéficie d'un attrait croissant de la part des consommateurs non seulement en Europe mais aussi en Amérique du Nord. De plus, les produits naturels avec effets thérapeutiques ont attiré l'attention des divers groupes pharmaceutiques.

Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues pures en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons... ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalant pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge (**Grysole, 2004**). Par conséquent, les huiles essentielles ont une variété d'applications et, dans bien des cas, la même huile peut être recherchée pour des propriétés différentes selon les secteurs industriels. Les propriétés médicinales des HE sont nombreuses, mais chacune possède ses vertus particulières (**Nicole, 1996**).

- **Secteur alimentation**

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Pingot, 1998; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 ; Aprotosoiaie et al., 2010**). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (**Grysole, 2005**)

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Conner, 1993, Hammer et al., 1999**). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (**Grysole, 2005**). Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (**Choi et al., 2000 ; Robert et Lobstein, 2005 ; Bisignano et al. 2011**). Récemment, certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant (**Himed, 2011 et Hellal, 2011**).

## **II.12. La conservation des huiles essentielles :**

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (**Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991**).

## **II.13. Activités biologiques :**

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et anti-microbiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses. (**Valnet, 2005**)

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires. (**Lahlou, 2004**)

### **II.13.1. Activité antioxydant :**

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir. (**Richard, 1992**).

Lorsque l'on parle d'activité antioxydant, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne auto catalytique de l'oxydation (**Multon, 2002**). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que le complexe formé par des ions métalliques ou la réduction d'oxygène. (**Madhavi et al., 1996**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à le préserver des phénomènes d'oxydation. (**Caillet et Lacroix, 2007**).

### **II.13.2. Activité antibactérienne :**

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des H.Es, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. (**Carson et al., 2002**).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des H.Es sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules. (**Davidson, 1997**).

Le mode d'action des H.Es dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane. (**Cox et al., 2000; Carson et al., 2002**).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *enterobacteraerogene* sa aussi été rapportée (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995**). Les H.Es peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides. (**Coxet al., 1991**).

Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable. **(Dorman et Deans, 2000).**

### **II.13.3. Activité antifongique :**

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire. **(Lis-Balchin, 2002).**

Selon **Voukou et al. (1988)**, les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc.. Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques. Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydrocinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique :

Phénols>Alcools>Aldéhydes>Cétones>Ethers>Hydrocarbures

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol> thymol> isoeugénol> eugénol). **(Ullree et al., 2002)**

**Chao et al., 2000** ont expliqués que l'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques parait donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Avec leurs travaux ils ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait.

#### **II.14. Application des H.Es dans les produits alimentaires :**

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

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

Pour choisir les H.Es comme conservateurs alimentaires, il convient de connaître le seuil d'efficacité (la concentration la plus faible en H.E capable d'inhiber toute croissance microbienne), car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même. Chaque H.E possède une activité spécifique variable selon les microorganismes, les conditions de stockage de l'aliment (le pH, la température, pression d'oxygène etc.) ou la nature des aliments peuvent avoir une influence sur l'action des H.Es. Ainsi, la généralisation de l'utilisation des H.Es n'est

pas facilement envisageable à tous les aliments (**Cutter, 2000**). Mais le recours aux H.Es s'avère être un choix pertinent à la nécessité de réduire ou de remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques.

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

De nombreux auteurs (**Kim et al., 1995a et 1995b ; Smith-Palmer et al.,2001 ; Pintore et al.,2002 ; Lin et al., 2004 ; Fisher et Philips, 2006 ; Oussalah, 2006 ; Caillet et Lacroix, 2007**), ont rapporté que les H.Es peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. Les H.Es d'origan, de thym, de cannelle, ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, et la charcuterie, l'H.E de menthe pour les produits frais, les H.Es à base de carvacrol ou de citral pour les poissons. L'incorporation d'H.E dans la viande hachée a contribué au maintien de la qualité microbiologique et à la réduction de l'oxydation lipidique au-delà de sa durée normale d'entreposage.

## **II.15. Conservation des aliments :**

Les méthodes de conservation des aliments visent à éliminer complètement les microorganismes pathogènes et d'altération, dans le but d'empêcher leur prolifération (**HOBBS ; GILBERT, 2001**). Les méthodes les plus anciennes de conservation étaient le séchage, le salage, ou le sucrage qui diminuaient la disponibilité en eau des aliments pour les microorganismes.

De nos jours, la réfrigération (5°C) et la surgélation (-18°C) constituent les méthodes de conservation des aliments, car elles permettent une conservation de plus longue durée en inhibant le développement des microorganismes.

Le froid ne tue pas les microorganismes, par ailleurs, les bactéries psychrophiles peuvent se développer et altérer, des aliments même dans les chambres

froides ou réfrigérateurs. La pasteurisation, l'appertisation, c'est-à-dire l'utilisation des températures élevées, non seulement tuent les formes végétatives des microorganismes, mais aussi des formes bactériennes.

La conservation des aliments par de nombreux additifs chimiques à travers lesquels résulte le fumage, la conservation dans le vinaigre, de l'addition de divers sels (nitrite, propionates, etc.) se révèle bonne.

En outre, on peut souligner aussi l'utilisation des micro-ondes ou de l'ultra son pour la conservation des aliments (**Delagoutte ,2004**).

## Introduction :

Le maquereau *Scomber japonicus* est une espèce cosmopolite de la famille des scombridés qui habite les eaux tempérées chaudes. La distribution géographique de cette espèce est très large, on la rencontre dans l'océan Atlantique, Indien, Pacifique et leurs mers adjacentes. (Collette, 1983). On la trouve principalement dans les zones pélagiques côtières, mais aussi sur les zones épipélagiques et méso-pélagiques sur la pente continentale, elle apparaît à partir de la surface jusqu'à la profondeur de 300 m et atteint les niveaux les plus profonds pendant la journée (Collette, 1983, Lozano et al., 1952). Au niveau de la côte Atlantique, du Chili et autres, *S.japonicus* est fortement exploité par la pêche artisanale et industrielle (Arcos et al., 2001, Gerlotto, 2012) et constitue une importante ressource pélagique à haute teneur en acides gras essentiels (Celik et al., 2008). Les variations de la répartition et de l'abondance de cette espèce sont liées aux changements des facteurs abiotiques (Chozo et al., 1998 ; Arcos et al., 2001 ; Bertrand et al., 2006) et biotiques (Bertrand et al., 2006 ; Quiñones et al., 1997 ; Grechina et al., 1998 ; Bertrand et al., 2004). Le maquereau s'adapte à un large éventail de conditions océanographiques (Bertrand et al., 2004). Il est considéré comme un prédateur opportuniste (Konchina et Ichthyol, 1981 ; 1982). Sa répartition et son abondance dépendent principalement de la disponibilité de la nourriture (Bertrand et al., 2006 ; Quiñones et al., 1997 ; Konchina et Ichthyol, 1981 ; Bertrand et al., 2004). L'analyse du régime alimentaire des poissons est nécessaire pour la connaissance de leur écologie, de leur éthologie et de leur physiologie (Perrin, 1980). En effet, la qualité et la quantité de nourriture sont parmi les plus importants facteurs exogènes qui affectent directement la croissance et indirectement la maturation et la mortalité des poissons (Wootton et al., 2012). Malgré l'intérêt écologique et socio-économique du maquereau, les études traitant la biologie de cette espèce dans l'Atlantique marocain sont très rares (Techetach et al., 1998), et pour celles qui concernent son régime alimentaire, elles sont absentes. Plusieurs études ont été faites sur le régime alimentaire dans le monde : aux côtes des îles Canaries (Castro et al., 1995 ; Castro et al., 1991), à la côte égyptienne ( Rizkalla et al., 1997), à la côte coréenne (Yoon et al., 2008), à la côte péruvienne.( Alegre et al., 2015) et à la côte de la Turquie (Sever et al., 2006).

### III. Maquereau espagnol : *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1780)

#### III.1. Position systématique :

Classe : Actinopterygii

Ordre : Perciformes

Sous ordre : Scombroidei

Famille : Scombridae

Sous famille : Scombrinae (Thonidés)

Genre : *Scomber*

Espèce : *Scomber japonicus* (houttuyn, 1780)



**Figure 06 :** Maquereau espagnol *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1780)

#### III.2. Biologie de maquereau espagnol :

Le maquereau espagnol est une espèce épipélagique ou mésopélagique, occupe tous les fonds depuis les côtières atteignant même 300 m de profondeur. Il vit en bancs groupant des individus de même taille et effectue d'importantes migrations saisonnières. La reproduction s'étale de juin à août, se nourrissant de petits poissons pélagiques, particulièrement d'anchois, de Clupéidés et d'invertébrés pélagiques. (Hunter et Kimbrell, 1980).

#### III.3. Caractère distinctif :

Comme tous les scombridés, le maquereau espagnol a un corps allongé et fusiforme. Il est couvert d'écailles de tailles variables, un peu plus grandes au niveau des pectorales où elles délimitent un corselet. La tête est longue, assez haute et pointue ; les mâchoires sont

égales et les yeux beaucoup plus grands que chez l'espèce précédente, d'où l'appellation de Maqurophthalmus (gros œil).

Les deux nageoires dorsales sont nettement bien séparées, les premiers rayons de la première dorsale sont plus élevés que les suivants et les derniers rayons étant très courts. La vessie natatoire est présente, d'où l'appellation de Pneumatophorus (Collette et Nauen, 1983 ; Fischer et al., 1987).

#### III.4. Coloration :

Le dos du *Scomber japonicus* est bleu verdâtre ; il est orné de bandes sombres en forme de V très ouvert qui s'arrêtent au niveau de la ligne latérale. Les flancs et le ventre sont munis de petites tâches grises, plus ou moins nombreuses et s'orientent parallèlement à la ligne latérale (Fischer et al., 1987).

#### III.5. Distribution géographique et habitat :

Le maquereau espagnol est une espèce cosmopolite, occupant les zones tièdes et tempérées des océans Atlantique, Indien et Pacifique et des mers adjacentes. Très commun en Méditerranée (Hollowed, 1992).

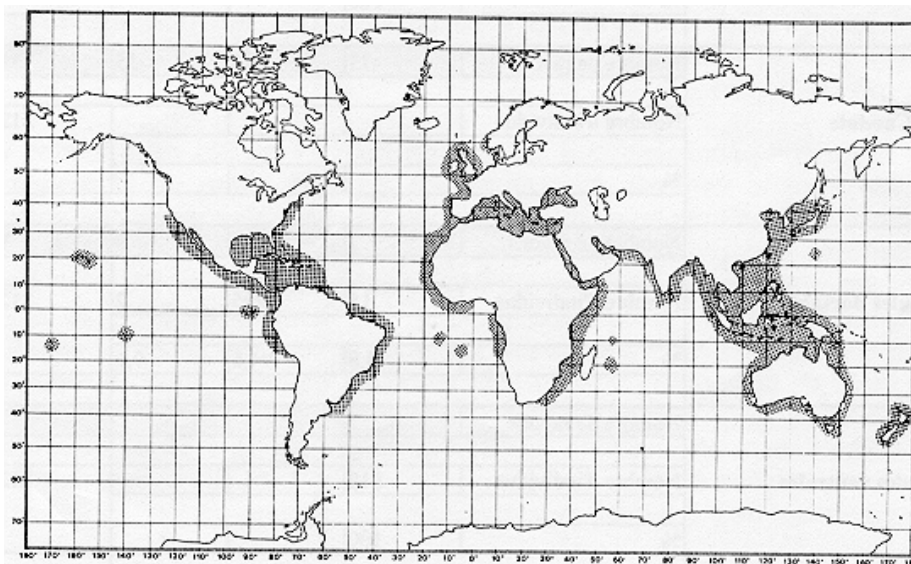


Figure 07 : Distribution géographique du Maquereau espagnol (Colette et Nauen, 1983)

### III.6. Qualité nutritionnel de poisson (Scombridés) :

Le maquereau est un poisson d'eau salée, très prisé pour sa chair. Il appartient à la même famille que le thon. Il est riche en vitamines du complexe B et en vitamine D, de même qu'en plusieurs minéraux tels le sélénium, le fer et l'iode. Bien entendu, ce poisson est une grande source d'acides gras oméga-3.

- **Acides gras oméga-3 :**

Le maquereau est une excellente source d'acide eicosapentaénoïque (AEP) et d'acide docosahexaénoïque (ADH), deux acides gras de la famille des oméga-3. Ceux-ci agissent comme précurseurs de messagers chimiques favorisant un bon fonctionnement immunitaire, circulatoire et hormonal. Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont mis en évidence que la consommation d'acides gras oméga-3 (provenant majoritairement de poissons gras) exerçait des effets favorables sur la santé cardiovasculaire et réduisait la mortalité par maladie cardiovasculaire (**Calder, 2004**). Ces acides gras sont connus pour agir sur plusieurs plans dans l'organisme, notamment en réduisant la tension artérielle, les triglycérides sanguins et la formation de caillots sanguins, diminuant ainsi les risques d'athérosclérose.

- **Protéines :**

D'après **Braekkan et Boge, 1962** la composition en acide aminés de protéines musculaire des maquereaux est semblable à celle des principaux poissons comestibles, sauf que leur teneur en histidine est environ deux fois plus élevée (4,5%). On considère la cystine et peut être aussi le tryptophane comme les acides aminés essentiels limitant. **Matsuura et al., 1955** ont trouvé peu de différence dans la composition en acide aminé des protéines de la chair pâle et de la chair foncée de *Scomber japonicus*.

- **Extraits azotés :**

**Dayer** a trouvé que la teneur en oxyde de triméthylamine des muscles variait de 31 à 54 mg de N/100 g de muscle, une valeur relativement faible comparativement aux autres poissons. **Mannan et al., 1961** ont trouvé une concentration variant de 27 à 55

mg de N/100 g pour différentes parties des muscles, la partie foncée étant la plus riche. C'est également dans cette partie que chez *scomber japonicus*, on retrouve la plus forte teneur en oxyde de triméthylamine. La concentration d'azote sous forme d'oxyde de triméthylamine est de 27 mg/100 g dans la chair foncée et de seulement 15 mg/100 g dans la partie pâle (**Tokunaga, 1970**).

La chair de maquereau se distingue par sa forte proportion d'histidine à l'état libre par rapport aux autres composés azotés extractibles. **Fraser et al., 1968** ont relevé une concentration d'histidine de 400 à 600 mg/100 g dans la chair pâle mais de seulement 100mg/100 g environ dans la chair foncée de 23 échantillons de maquereaux bleus capturés en juin et juillet.

**Lukton et Olcott, 1958 ; et sakaguchi et Shimizu, 1964 ; 1965** ont observé des valeurs encore plus élevées (de 550 à 800 mg /100 g ) chez *Scomber japonicus*. Certaines bactéries peuvent décarboxyler l'histidine en histamine et cette réaction a parfois causées des intoxications alimentaires attribuables à l'ingestion de thon et de maquereaux.

- **Phosphore :**

Le maquereau est une excellente source de phosphore (voir notre fiche Palmarès\_des\_nutriments\_Phosphore). Le phosphore constitue le deuxième minéral le plus abondant de l'organisme après le calcium. Il joue un rôle essentiel dans la formation et le maintien de la santé des os et des dents. De plus, il participe entre autres à la croissance et à la régénérescence des tissus et aide à maintenir à la normale le pH du sang. Il est l'un des constituants des membranes cellulaires. (**Calder, 2004**).

- **Magnésium :**

Le maquereau est une excellente source de magnésium pour la femme et une bonne source pour l'homme, leurs besoins étant différents. Le magnésium participe au développement osseux, à la construction des protéines, aux actions enzymatiques, à la contraction musculaire, à la santé dentaire et au fonctionnement du système immunitaire. Il

joue aussi un rôle dans le métabolisme de l'énergie et dans la transmission de l'influx nerveux. (Calder, 2004).

- **Sélénium :**

Le maquereau est une excellente source de sélénium. Ce minéral travaille avec l'une des principales enzymes antioxydantes, prévenant ainsi la formation de radicaux libres dans l'organisme. Il contribue aussi à convertir les hormones thyroïdiennes en leur forme active. (Calder, 2004).

- **Vitamine B2 :**

Le maquereau est une excellente source de vitamine B2. Cette vitamine est aussi connue sous le nom de riboflavine. Elle joue un rôle dans le métabolisme de l'énergie de toutes les cellules. De plus, elle contribue à la croissance et à la réparation des tissus, à la production d'hormones et à la formation des globules rouges. (Calder, 2004).

- **Vitamine B3 :**

Le maquereau est une excellente source de vitamine B3. Appelée aussi niacine, cette vitamine participe à de nombreuses réactions métaboliques et contribue particulièrement à la production d'énergie à partir des glucides, des lipides, des protéines et de l'alcool que nous ingérons. Elle interagit aussi dans le processus de formation de l'ADN, permettant une croissance et un développement normaux. (Calder, 2004).

- **Vitamine B6 :**

Le maquereau est une excellente source de vitamine B6. Cette vitamine, aussi appelée pyridoxine, fait partie de coenzymes qui participent au métabolisme des protéines et des acides gras ainsi qu'à la synthèse (fabrication) des neurotransmetteurs (des messagers dans l'influx nerveux). Elle interagit également dans la fabrication des globules rouges et leur permet de transporter davantage d'oxygène. La pyridoxine est aussi nécessaire à la transformation du glycogène en glucose et elle contribue au bon fonctionnement du système

immunitaire. Cette vitamine joue enfin un rôle dans la formation de certaines composantes des cellules nerveuses et dans la modulation de récepteurs hormonaux. (Calder, 2004).

- **Vitamine B12 :**

Le maquereau est une excellente source de vitamine B12. Cette vitamine travaille de concert avec l'acide folique (vitamine B9) pour la fabrication des globules rouges dans le sang. Elle veille aussi à l'entretien des cellules nerveuses et des cellules fabriquant le tissu osseux. (Calder, 2004).

- **Vitamine D :**

Le maquereau est une excellente source de vitamine D. La vitamine D est étroitement liée à la santé des os et des dents, en rendant disponible le calcium et le phosphore dans le sang, entre autres pour la croissance de la structure osseuse. Cette vitamine joue aussi un rôle dans la maturation des cellules, dont celles du système immunitaire. (Calder, 2004).

- **Fer :**

Le maquereau est une bonne source de fer pour l'homme et une source pour la femme, car leurs besoins respectifs en ce minéral sont différents. Chaque cellule du corps contient du fer. Ce minéral est essentiel au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang. Il joue aussi un rôle dans la fabrication de nouvelles cellules, d'hormones et de neurotransmetteurs (des messagers dans l'influx nerveux). Il est à noter que le fer contenu dans les aliments d'origine animale (dont les poissons) est très bien absorbé par l'organisme, comparativement au fer contenu dans les végétaux. (Calder, 2004).

- **Acide pantothénique :**

Le maquereau est une bonne source d'acide pantothénique. Aussi appelée vitamine B5, l'acide pantothénique fait partie d'une coenzyme clé nous permettant d'utiliser de façon adéquate l'énergie des aliments que nous consommons. Il participe aussi à plusieurs étapes de la synthèse (fabrication) des hormones stéroïdiennes, des neurotransmetteurs et de l'hémoglobine. (Calder, 2004).

- **Iode :**

Le maquereau du Saint-Laurent contient de l'iode. Il en contiendrait environ 10 fois plus que la truite arc-en-ciel, mais beaucoup moins que la morue (provenant aussi du Saint-Laurent). L'iode entre dans la composition des hormones thyroïdiennes nécessaires à la régulation de la croissance, du développement et du métabolisme. (**Calder, 2004**).

### **III.7. Les contaminants :**

Le poisson est la principale source de mercure à laquelle nous sommes exposés. Ce métal se trouve naturellement dans l'environnement, mais les rejets causés par l'industrialisation rendent la consommation de certains poissons moins sécuritaire pour la santé. Les poissons prédateurs ont des taux élevés de mercure. Les autres espèces de poisson, tel le maquereau, auraient des concentrations de mercure inférieures à la norme canadienne de 0,5 ppm. Ils peuvent donc être consommés sans danger pour la santé. De plus, selon une étude réalisée par des chercheurs de Santé Canada, les teneurs en différents contaminants (tels les BPC) décelés dans les poissons vendus au Canada sont inférieures à la norme canadienne et ne constituent donc pas un risque pour la santé. Il faut toutefois demeurer vigilant puisque plusieurs poissons que nous consommons sont importés de pays où le taux de contamination est plus élevé qu'au Canada (**Hinck et al., 2006 ; Goksoyr et al., 1991**).

### **III.8. La toxi-infection alimentaire :**

Le vocabulaire officiel, dans un souci de simplification, regroupe sous le terme de toxi-infection alimentaire (TIA) l'ensemble des accidents résultant de l'ingestion d'un aliment contaminé par des microorganismes pathogènes.

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie dont on put rapporter la cause à une même origine alimentaire (**Leyral et Vierling, 2007**).

L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près de 30% des habitants des pays industrialisés souffrent chaque année d'une toxi-infection alimentaire. Tous les cas sont susceptibles d'être provoqués par les viandes et d'autres produits carnés (viande de

boucherie, volailles, viande de charcuterie) (Bailly *et al.*, 2012). Or la majorité de ses germes provient le plus souvent des denrées alimentaires d'origine animale (Bourgeois *et al.*, 1996).

### III.9. Altération de poisson :

Le poisson est un produit alimentaire qui renferme plusieurs nutriments tels que les protéines, les glucides, les vitamines liposolubles et surtout la matière grasse en plus de sa teneur élevée en eau, ce qui la rend sujette à différents types d'altérations : microbienne et enzymatique.

#### III.9.1. Altération microbienne :

La contamination du poisson par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait alors suite à une excrétion mammaire de l'animal malade. Elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel) (Brisabois *et al.*, 1997).

Plusieurs types de microorganismes peuvent être des agents de dégradation. Tout d'abord, les bactéries peuvent entraîner une acidité très forte. Les coliformes et les entérobactéries peuvent entraîner un mauvais goût. Les bactéries lipolytiques détruisent et oxydent la matière grasse, entraînant le rancissement de poisson. Les bactéries protéolytiques peuvent dégrader les caséines. Les germes psychrophiles interviennent aussi en raison du stockage au froid. En fin les levures et les moisissures peuvent provoquer des altérations du goût (moisi, âcre, malté, caramélisé). (Guiraud, 2003). Certaines espèces de levures comme *Torula cremoris*, *Candida pseudotropicalis* et *Torulopsis sphaerica* peuvent se développer dans le poisson en provoquant l'apparition des odeurs fruitées (Wilbey, 2002 ; Rowe et Donaghy, 2011)

Une altération de la qualité hygiénique de poisson met en cause la santé du consommateur, cette altération est généralement invisible, elle est due à un développement de microorganismes pathogènes responsables d'intoxication alimentaire de gravité diverse. Ces germes pathogènes libèrent des toxines (exotoxines) qui rendent la crème dangereuse à consommer même si le microorganisme responsable n'est plus vivant dans le produit. Certains microorganismes présentent eux-mêmes un danger pour le consommateur, c'est le cas des entérobactéries qui fabriquent des endotoxines (Bouix et Leveau, 1984).

Les germes les plus souvent évoqués sont les mycobactéries, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, parmi lesquelles les *Escherichia coli* producteurs de toxines et *Salmonella*. (Brisabois *et al.*, 1997).

Une altération de la qualité marchande de poisson modifie ses caractéristiques et organoleptiques (rancissement, altération du goût), cette altération bien que non dangereuse pour le consommateur, rend le poisson non commercialisable. La défaillance de la technologie mise en œuvre pour la stabilité physiologique du produit est la cause principale de cette altération (qui se produit généralement lentement au cours du stockage de la crème) (Bouix et Leveau, 1984).

### III.10. Les bactéries responsables du contaminant :

#### III.10.1. *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas. Une espèce, *staphylococcus aureus* (*staphylocoque doré*), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Chambers, 1997).

Sont des germes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau, l'air, les poussières, le lait, lait soles, les eaux usées etc. le principale réservoir et habitat est constitué par le nez ? la gorge et la peau des animaux / humain 60% de porteurs en bonne santé sont des porteuses avec une moyenne de 25-300% de la population positif à l'égard des souches productrices d'entérotoxines (devriese *et al.*, 2005).

#### III.10.2. *Pseudomonas aeruginosa* :

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, l'eau et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, elle possède un pouvoir pathogène étendu. (Bedoui *et al.*, 2005 ; 2006).

Le bacille pyocyanique est essentiellement une bactérie pyogène qui provoque chez l'homme et chez l'animal des suppurations superficielles et profondes à partir de ces suppurations on peut l'isoler. (Bedoui *et al.*, 2005 ; 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* présente fréquemment dans le milieu hospitalier elle atteint essentiellement les sujets débilisés : cancéreux brûlés, insuffisant respiratoires. Sa présence dans certains prélèvements par exemple : les urines-témoigne de manœuvres instrumentales et du caractère iatrogène de l'infection. Il est également possible se l'isoler de coprocultures sans qu'un rôle pathogène précis puisse lui être attribué. (**Ben messaoud et Oumel 2004 ; 2005**).

En revanche, les sujets atteints de mucoviscidose sont très souvent infectés au niveau pulmonaire par un type particulier de souches ; les pyocyaniques muqueux. . (**Ben messaoud et Oumel, 2004 ; 2005**).

### **III.10.3. *Salmonella* :**

Les bactéries du genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobzctériaceae*. Genre regroupant de petits bacilles, Gram négatif habituellement mobiles par des cils péritriches, mais des mutants immobiles peuvent exister et *S. gallinarum* est toujours immobiles. Ces bactéries mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, pour 2 à 5 µm de longueur et sont aéroanaérobies facultatives, oxydase négative et nitrate réductase positive. Elles sont mésophiles, capables de se développer à des températures comprises entre 5,2 °C et 47°C et de manière optimale entre 35 et 37 °C, à des pH compris entre 4,5 et 9 et une  $a_w$  supérieure à 0,93 (**Fosse et al., 2004**).

### **III.10.4. *Escherichia coli* :**

Les germes *E.coli* sont normalement présents permis la microflore digestive de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud, comme par exemples les bovins. La plupart *E. coli* sont sans danger pour l'homme et l'animal. Cependant certains souches sont pathogène pour l'homme, à l'exemple de *Escherichia coli* entérohémorragiques ou EHEC (Entero-Hemorrhagic *E. coli*), dont la plus connus est *E.coli* O157 : H7 et ayant n lien épidémiologique assez étroit avec le bœuf (**Fernandes, 2009 ; Bailly et al., 2012**).

Les infections sont le plus souvent causées par la consommation de viande, de bœuf contaminées et insuffisamment cuite, mais peuvent également être dues à consommation d'eau, de lait cru, de fruits, de légumes, à des baignades et à contact entre personne (**Feng, 2001**). Le temps de réduction décimal est compris entre 0,5 à 3 nm à 60°C, mais une augmentation de la thermorésistance est possible si la viande est fortement riche en matière grasse (**Anses, 2001**).

### III.11. Intoxication à la scombrottoxine :

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

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

### I- Matériel :

#### I-1. Matériel végétal :

L' H.E testée a été extraite à partir des l'écorces ou zestes du Citron (*Citrus limon*).

Le zeste est la partie du fruit la plus riche en huile essentielle par rapport aux autres parties.

Le fruit a été acheté fraîchement du marché local de Mostaganem. Les caractéristiques déterminées sur le fruit sont la couleur, la forme qui sont déterminées par une analyse visuelle à l'œil nu, l'épaisseur de l'écorce par un décimètre, le poids du fruit entier ainsi celui de zeste par une balance analytique.

Avant l'utilisation du fruit, il doit subir un lavage par l'eau pour éliminer les souillures et les tâches noires qui se trouvent à la surface du fruit, puis un essuyage par un chiffon propre.



**Figure 08** : le matériel végétal *Citrus limon*

#### I-2. Choix du matériel végétal :

Le matériel végétal choisit dans la présente étude est représenté par le citron. Parmi les critères de choix de citron, et leur utilisation déjà dans l'assaisonnement de certains aliments (donc non toxique).

D'une part et le manque de travaux de recherche sur les propriétés biologique en particulier le pouvoir antimicrobien de leur H.E d'autre part.

### I-3. Les milieux de culture :

En a choisir les milieux suivant les méthodes employées, et selon les souches.

- Gélose nutritive ;
- Gélose Chapman ;
- Milieus King A, King B ;
- Mac Concky ;
- Milieu OGA ;
- Bouillon nutritive ;
- Gélose Muller Hinton (MH) ;

### I-4. Poisson (*Scomber japonicus*) :

L'effet antibactérien de nos H.Es ont utilisé le *scomber japonicus*, on a choisit ceux poisson parce qu'il est très apprécié par le consommateur, et très vulnérable à l'altération microbienne.

La qualité nutritionnelle de *Scomber japonicus*, est liée en grande parties des lipides surtout les acides gras (**Huss et peterson, 1980**).



**Figure 09** : *Scomber japonicus*

### I-5. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Les tests de l'activité antibactérienne sont réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université de Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testée a été réalisée par deux méthodes : la méthode des aromagrammes et la méthode de dilution d'agar.

### I-6. Les souches utilisées :

En a choisir 3 souches alimentaires qu'ils responsable à la santé humain.

En a sélectionné 2 groupes de bactéries :

- Des bactéries à Gram négatif : *pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli*.
- Des bactéries à Gram positif : *staphylocoques aureus*,

Les souches ont été procurées dans des tubes stériles contenant de gélose de conservation.



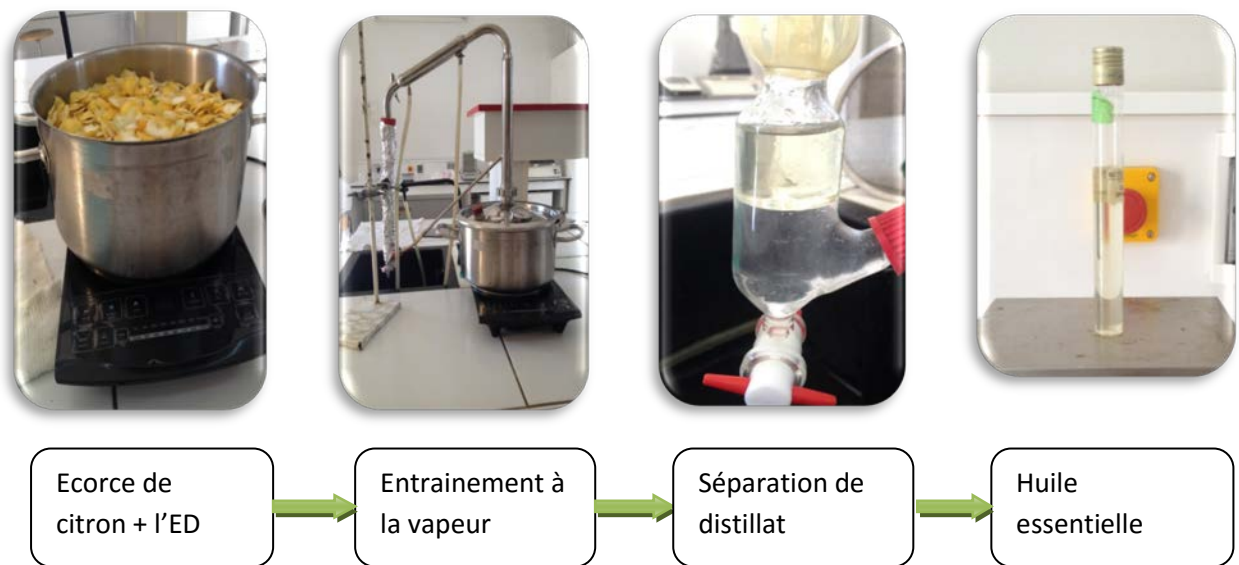
**Figure 10** : les souches bactériennes.

## II- les méthodes

### II-1. Méthode d'extraction des H.Es :

Le matériel végétal est soumis à un entrainement à la vapeur. Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, se trouve supportée par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entrainant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. L'opération consiste à introduire 2,334 kg de l'écorce frais de citron dans un plaque perforée, à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli 1/3 d'eau distillée. Les

vapeurs chargées d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans un tube à essai stérile et bien scellés à température basse (4 à 5 °C). L'opération d'extraction dure trois heures.



**Figure 11** : Schéma d'extraction d'H.E.

### II-2. Détermination du rendement d'extraction :

Selon la norme **Afnor(1986)**, le rendement en huile essentielle (Rd), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$Rd = M' / M \cdot 100$$

Rd: Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%) ;

M': Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g);

M: Masse de la matière végétale fraîche utilisée en gramme (g).

### II-3. Testes microbiologiques

#### II-3-1. Teste de confirmation des souches :

Nous avons vérifié la pureté des souches que nous avons utilisés par quelques testes biochimique et culturaux, après ensemencement des bactéries sur leur milieux sélectif.

*Staphylocoque aureus* : ensemencé sur le milieu chapman

*Pseudomonas aeruginosas* : ensemencé sur le milieu king A, king B

*Escherichia coli* : ensemencé sur le milieu gélose nutritive

Après incubation à 37°C pendant 24h.

#### II-3-2. Coloration de Gram :

L'étude des caractères morphologique sont recherchés par la coloration de Gram et l'examen microscopique du grossissement 100x il permet l'observation le mode de regroupement la forme des cellules bactériennes et le type de Gram.

La coloration de Gram selon la méthode de décrite par **Delarras, 2007**.

- Préparation un frottis de la souche test

- Recouvrir de frottis de violet de gentiane, laissé agir 1 min puis rincer à l'eau distillé.
- Verser un lugol et laisser agir pendant 1 min, rincer à l'eau distillé.
- Décolorer à l'alcool entre 10 à 15 secondes, rincer à l'eau distillée.
- Recolorer avec de la fushine pendant 10 à 3à secondes, rincer à l'eau distillé.
- Sèche au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.
- observation d'un microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion.
- Les bactéries colorés en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif, le tableau montre les observations notées.

**Tableau 02:** caractères morphologique étudié pour identification bactérienne

Espèces bactérienne	Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>Staphylocoque aerues</i>	Gélose chapman	Positif	Coccus en grappe de raisin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose king A, king B	Négatif	bacilles
<i>E. coli</i>	Gélose Hecktoen	Négative	Coccobacille

### II-3-3. Test de catalase :

Différencier les bactéries à Gram positif de la famille des *micrococceae* qui sont catalase positif, des familles *streptococceae* qui leur catalase négatif. La catalase agit en dégradation H<sub>2</sub>O et oxygène par un dégagement gazeux.

### II-3-4. Préparation de l'inoculum

- **Préparation de pré-culture :**

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

boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37°C pendant 18 heures.

- **Préparation de la suspension bactérienne :**

A partir des cultures jeunes sur (GN). On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à  $10^6$  UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm.

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

- **Préparation des disques :**

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman №40 par un perforateur à 2 trous du papier, avec un diamètre de 6mm. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante.

#### **II-4. Méthode de diffusion ou des aromatogrammes :**

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose, de 6 mm de diamètre et imprégné de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (mm ou cm) de la zone claire autour du disque (halo translucide), appelée zone d'inhibition.

Selon **Hussain et al. (2010)**, un volume de 20 ml de milieu gélosé (l'agar de Muller Hinton) en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri.

Après solidification des milieux de culture, 100  $\mu$  l de la suspension microbienne à tester sont étalés en surface.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques stériles, imbibés avec 5  $\mu$ l d'huile essentielle de *Citrus limon*, sont déposés sur la surface de la gélose. Les boîtes de pétri sont maintenues à 4°C pendant une heure pour que l'huile essentielle puisse diffuser (**Rožman et Jeršek, 2009**).

L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 24 heures.

### ➤ Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition, mesuré à l'aide d'une règle en (mm) (y compris le diamètre de disque de 6mm). **D'après Meena et Sethi (1994) et Ela et al., (1996)** la sensibilité à l'huile essentielle a été classée en fonction des diamètres des halos d'inhibition comme suit :

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

## II-5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

### II-5.1. Méthode de dilution en milieu solide :

L'utilisation des H.Es dans les produits alimentaires est souvent limitée par effets indésirables (odeur forte, changement de goût) qu'elles peuvent engendrer dans l'aliment.

Pour cette raison, il est nécessaire de déterminer la CMI (la concentration minimale inhibitrice) de l'H.E capable d'inhiber la croissance de bactéries sans altérer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment. Selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même (**Caillet & Lacroix, 2007**).

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

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des H.Es dans les milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Plusieurs substances ont été utilisées pour cette fin : éthanol (**Beuchat, 1976 ; Marino et al., 2001**) ; méthanol (**Onawunmi, 1989**), acétone en combinaison avec tween-80 (**Prudent et al., 1995**), tween -20 (**Kim et al., 1995b ; Hammer et al., 1999 ; Mann et Markham, 1998**), DMSO (**Firouzi et al., 1998**) ; propylène-glycol (**Negi et al., 1999**), *n*-hexane (**Senatore et al., 2000**), le poly éthylène glycol (**Pintore et al., 2002**), tween-80 (**Bassole et al., 2003**), et l'agar

(Mann et Markham, 1998 ; Delaquis *et al.*, 2002 ; Gill *et al.*, 2002 et Burt et Reinders, 2003).

### II-5.2. Préparation de la gamme de dilutions :

La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé. L'H.E est diluée dans du DMSO selon les proportions 1/9 (Emulsifiant / H.E) méthode décrite par Oussou *et al.*, (2004).

Les concentrations de huile des différentes dilutions sont les suivantes : 0% ; 100% ; 50% ; 25% ; 12,5% et 6,25%.

#### ➤ **Ensemencement en milieu solide :**

Liquéfier le milieu Chapman à 95°C dans un bain marie, couler la gélose dans des boîtes pétrie et laisser solidifier sur la paillasse. Après solidification de milieu, réaliser un ensemencement en surface de suspension bactérienne (cellules jeunes de 18 à 24 heures, en phase exponentielle). A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles imbibés avec des différentes dilutions, sont déposés sur la surface de la gélose. L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 24 heures.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en H.E où on observe la petite zone d'inhibition.

## II-6. Effet inhibiteur de H.Es de *citrus limon* sur des bactéries pathogène inoculées sur la scomber

### II-6.1. Protocole expérimentale

#### II-6.1.1. Préparation des échantillons :

Le poisson est acheté fraîchement au marché local de Mostaganem. Elle est acheminée au laboratoire puis étêtée, éviscérée, nettoyée, rincée à l'eau du robinet, laisser égouttée, conservée au réfrigérateur à 6°C.

Les échantillons de *scomber japonicus* sont préparés dans des boîtes de pétrie. Les différents échantillons sont répartis comme suit :

- 50 g de scomber fraîche + *S. aureus* + H.E de *Citrus limon* de concentration (1x CMI).
- 50 g de scomber fraîche + *S. aureus* + H.E de *Citrus limon* de concentration (3x CMI).
- 50 g de scomber fraîche + *S. aureus* (Témoin).

Les échantillons témoins ont été traités avec de l'eau distillée stérile. L'opération est répétée deux fois, et conservés à une température de réfrigérateur de 6°C pendant 7 jours.

### **II-6.1.2. Analyse microbiologiques :**

Les analyses sont effectuées pour suivre la cinétique de la croissance bactérienne en présence ou absence de H.E. les dénombrements des bactéries sont réalisée à partir des prélèvements de chaque deux jour (j1, j3, j5, j7).

#### **II-6.1.2.1. Préparation des solutions mères et des dilutions décimales :**

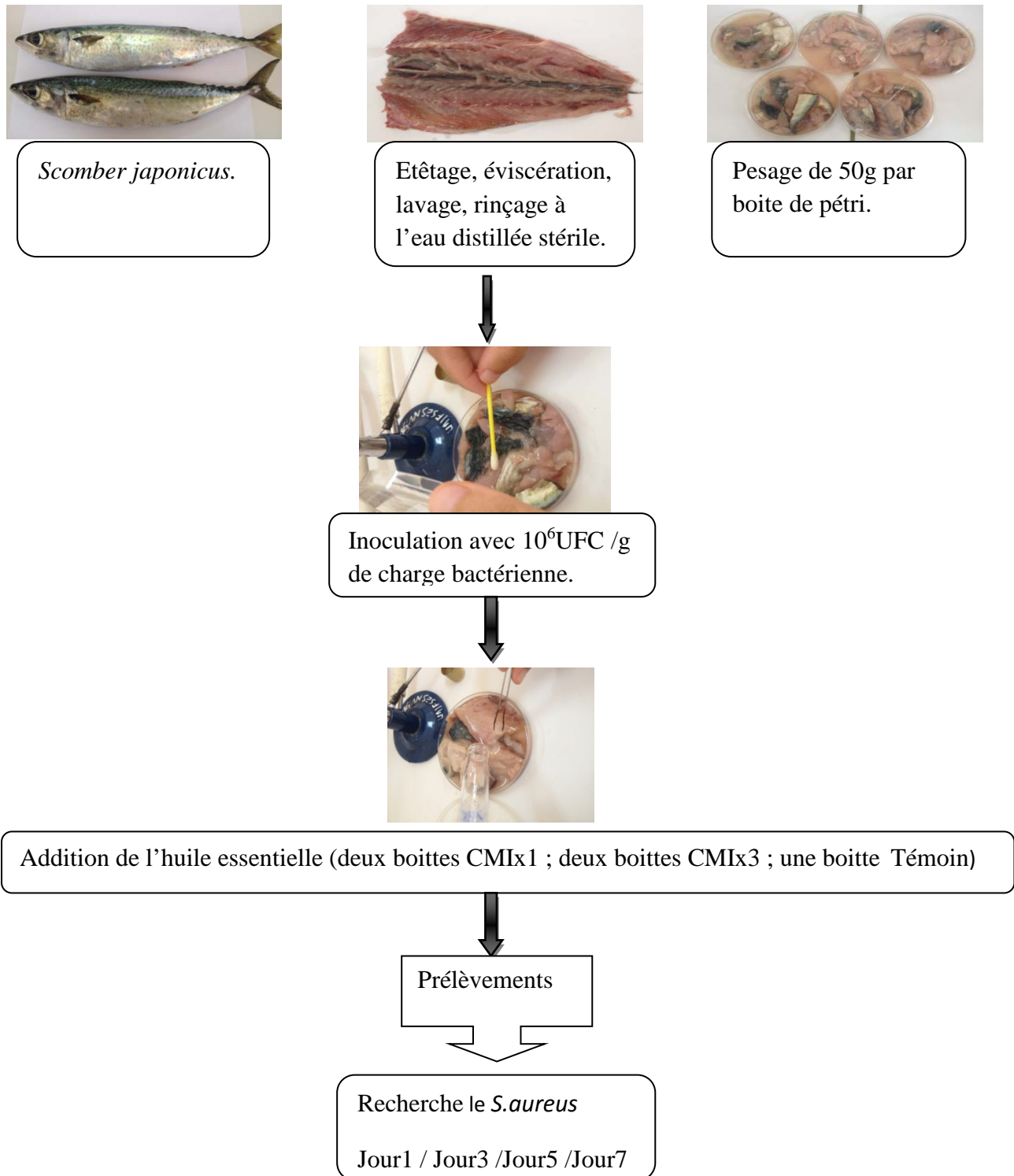
Pour chaque prélèvement 10 ml de produit à analyser a été introduit dans un flacon contenant 90 ml d'eau physiologique, ainsi la solution mère qui correspond à la dilution  $10^{-1}$  a été obtenue, à partir de laquelle des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  ont été préparées, où 1ml de la dilution  $10^{1-n}$  a été introduit dans un tube à assai contenant 9 ml de l'eau physiologique pour obtenir la dilution  $10^{-n}$  (Guiraud, 2003).

#### **II-6.1.2.2. Dénombrement des staphylocoques :**

Ensemencement de la solution mère en surface d'un milieu sélectif (Chapman) à une température de 37°C pendant 24 heures.

Un volume de 0,1 ml de la solution mère de l'échantillon a été ensemencé à la surface des boîtes pétri coulées par le milieu Chapman. L'incubation a été faite à une température de 37°C pendant 24 heures.

Les *Staphylococcus aureus* sont de couleur jaune, entourés d'un halot claire.



**Figure 12:** Schéma du test de l'activité antibactérienne de H.E de *Citrus limon* sur la *Scomber japonicus* inoculée avec *S. aureus*.

### **II-7. Contrôle de qualité :**

#### **II-7.1. Recherche de la flore totale aérobie mésophile :**

Les microorganismes aérobies et aéro-anaérobies facultatifs peuvent se développer dans un milieu nutritif non sélectif, incubés à 30°C pendant 72 h. Ils apparaissent sous formes de colonies de tailles.

Un volume de 1ml de solution mère et de dilution de  $10^{-3}$  a été introduit dans des boîtes de pétri vides, sur lesquelles le milieu gélose nutritif a été ajouté. L'ensemble a été mélangé avec précaution par rotation en forme de huit et laissé se solidifier. L'incubation a été effectuée à 30 °C pendant 72 heures.

Après 72 heures, les colonies développées quel que soit leur taille ont été comptées à l'aide d'un marqueur.

#### **II-7.2. Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux :**

Le principe consiste à compter les colonies caractéristiques des coliformes totaux qui se développent en 24 h à 37°C et les coliformes fécaux qui se développent en 24 h à 44°C, sur la gélose Mac Concky.

Dans deux séries des boîtes de pétri, transférer 1 ml de solution mère à examiner et verser rapidement 10 à 15 ml de milieu gélose en surfusion. Puis mélanger avec précaution par rotation lente en forme de huit et laisser les boîtes se solidifier.

La première série a été incubée à une température de 37°C pendant 24/48 heures pour la recherche de coliformes totaux et la deuxième série est incubée à 44°C pendant 24 heures pour la recherche de coliformes fécaux.

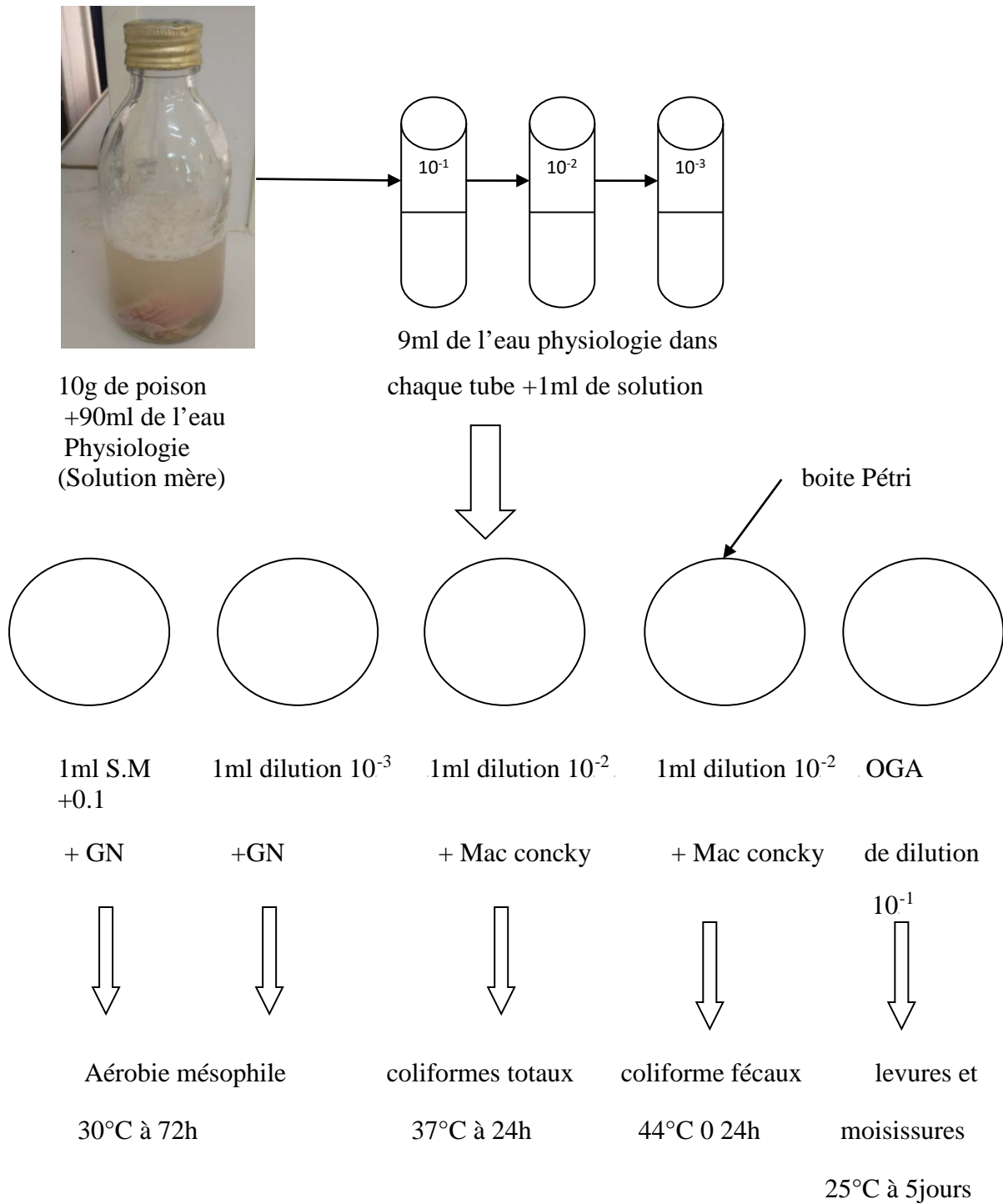
Après incubation, compter les colonies rouges violets, ayant un diamètre d'au moins de 0,5 mm.

#### **II-7.3. Recherche des levures et des moisissures :**

L'isolement des levures et des moisissures nécessite des milieux sélectifs contenant des substances antibactériennes (**Guiraud, 2003**). Le milieu OGA est le milieu le plus utilisé, auquel un antibactérien est ajouté afin d'inhiber tout développement bactérien.

La gélose OGA préalablement fondue et refroidie a été répartie dans des boîtes de pétri vides. De l'oxytétracycline (1mg/ml) lui a été ajoutée et l'ensemble est homogénéisé. Après solidification, 0,1 de la dilution  $10^{-1}$  ml a été ensemencé en surface. L'incubation a été faite à une température de 25°C pendant 3 à 5 jours.

Les levures et les moisissures sont de formes, de couleur, d'aspect et de taille variables (Sina, 1992).

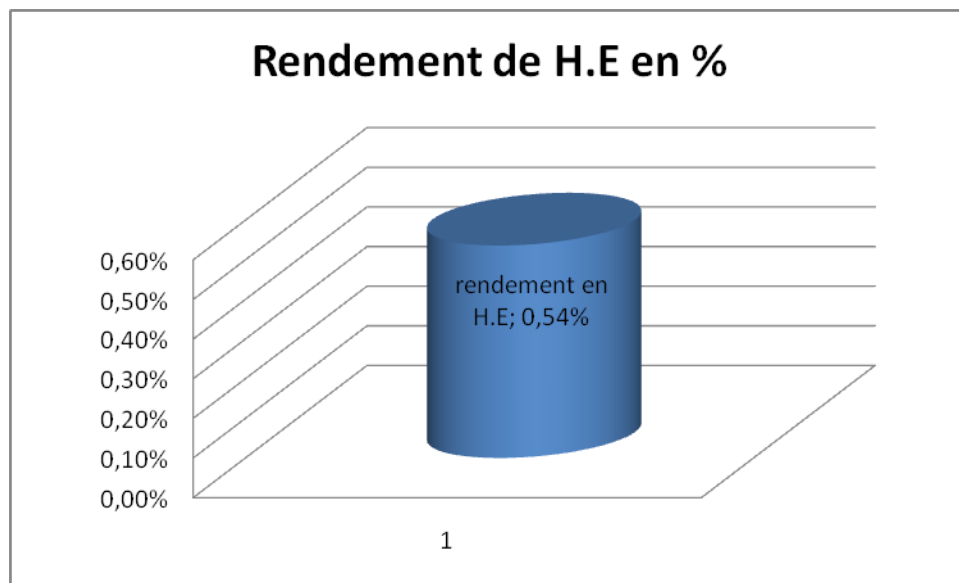


**Figure 13:** Schéma résumé le protocole de contrôle de qualité de poison.

### I. Rendement d'extraction :

L'entraînement à la vapeur réalisé sur le zeste de citron (*Citrus limon*) a permis l'obtention d'une huile de couleur jaune pâle, limpide, possédant une odeur caractéristique fraîche de citron.

Le rendement d'extraction calculé est de l'ordre de 0.54%, en fonction de la matière végétale fraîche.



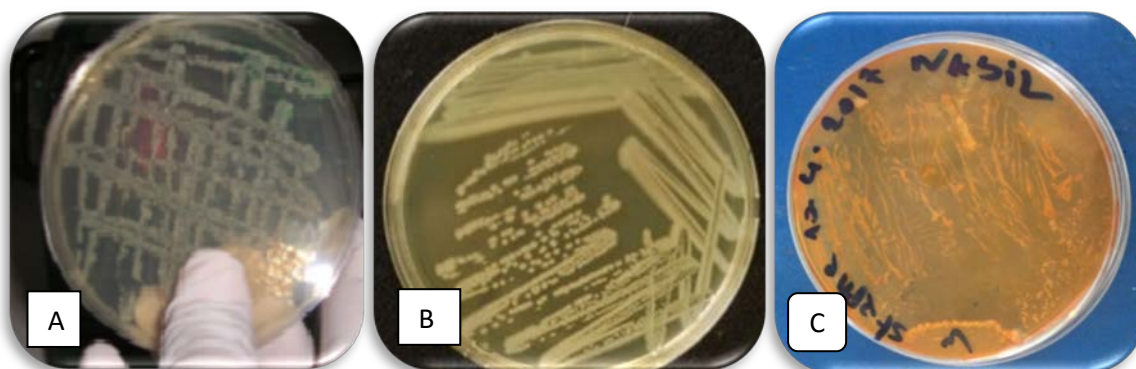
**Figure 14** : Pourcentage en H.Es obtenu pour *Citrus limon*

## II. Identification des bactéries testées

### II-1. Observation macroscopique des colonies :

**Tableau 03** : Etude macroscopique des bactéries testées.

Isolats	Milieu d'isolement	Température d'incubation	Forme macroscopique
<i>Staphylococcus aureus</i>	Géloe Chapman	37°C	couleur jaune, entourés d'un halot claire.
<i>Escherichia coli</i>	Gélose Muller Hinton	37°C	Colonies arrondies smooths, bombées.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose Muller Hinton	37°C	des colonies de quelques millimètres de diamètre, plates ou surélevées, opaques et verdissement des milieux



**Figure 15:** observation macroscopique des souches sur des milieux sélectifs : **A** : *Escherichia Coli*, **B** : *Pseudomonas aeruginosa*, **C** : *Staphylococcus aureus*

### II-2. Observation microscopique des colonies :

Après la réalisation de coloration de Gram pour les germes isolés, on a obtenu des cellules colorées avec le rose ce qui confirme qu'il sagit de bactérie à Gram négatif, et le violet ce qui confirme qu'il sagit de bactéries à Gram positif.



**Figure 16** :Coloration de Gram observation microscopie (X 100).

**A** : *Escherichia Coli*, **B** : *Pseudomonas aeruginosa*, **C**: *Staphylococcus aureus*

### II-3. Test biochimique

#### II-3-1. Test de catalase:

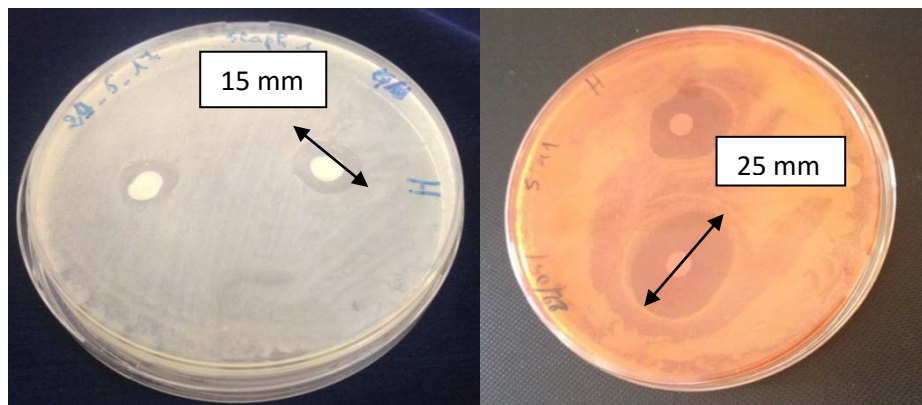
La catalase agit en dégradation  $H_2O$  et oxygène par un dégagement gazeux.



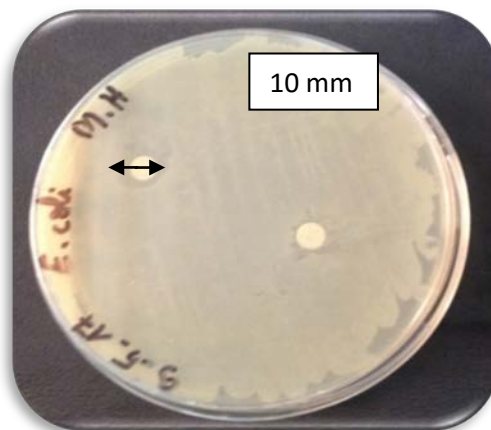
**Figure 17**: résultat de test de catalase (*Staphylococcus aureus*)

### III. Méthode de diffusion ou des aromatogrammes :

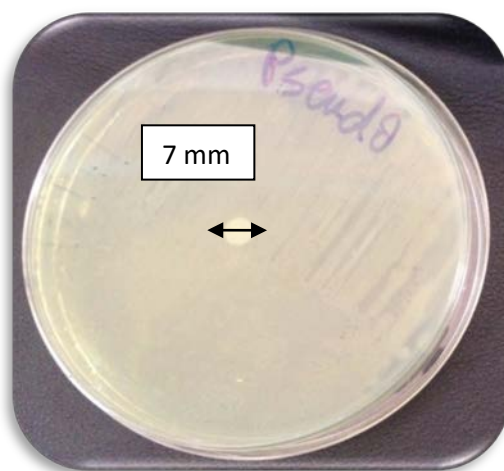
Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues, par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes, sont reportés dans la figure et le tableau 04.



**Figure 18 :** l'effet de l'H.E de citron sur *staphylococcus aureus*.



**Figure 19 :** l'effet de l'H.E de citron sur *E. coli*.



**Figure 20** : l'effet de l'H.E de citrus limon sur *P. aeruginosa*

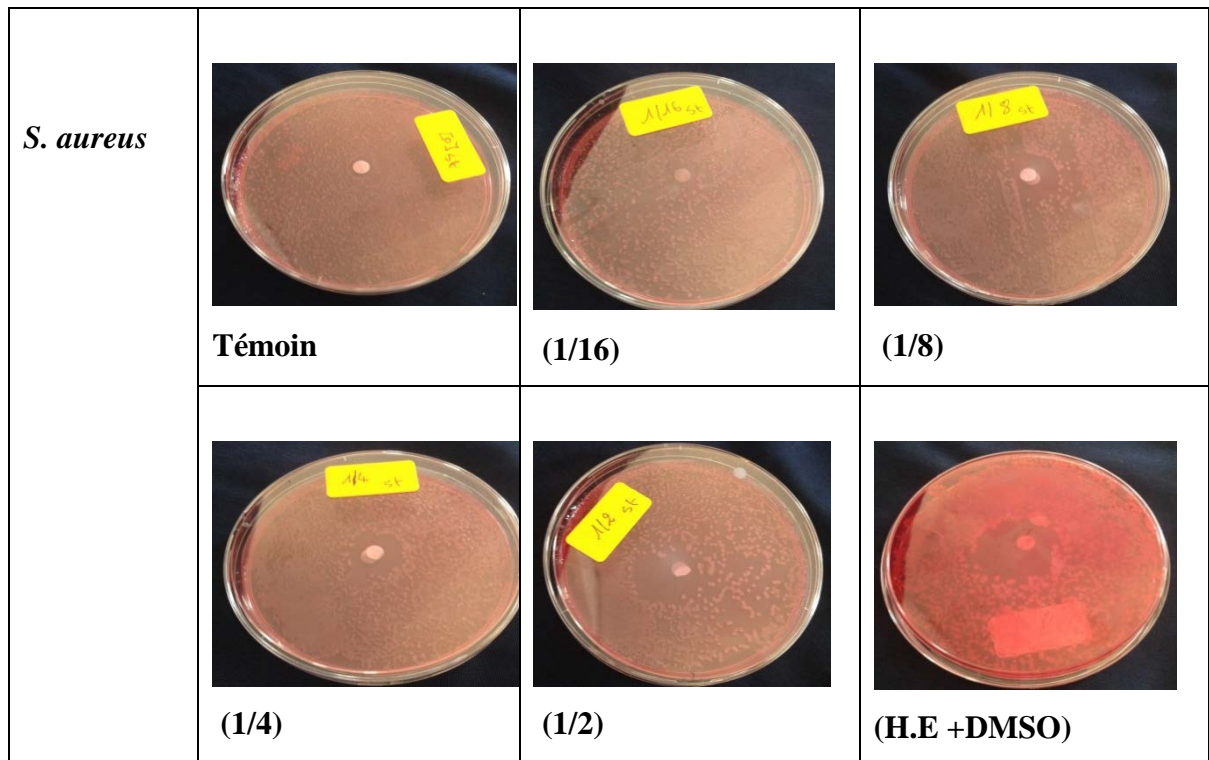
**Tableau 04** : l'effet de l'H.E de citron sur les trois souches utilisées.

Les souches	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>Diamètre d'inhibition (mm)</b>	25 mm (chapman) 15 mm (MH)	10 mm	7 mm
<b>Sensibilité</b>	Extrêmement sensible	sensible	résistance

D'après le **tableau 04** nous constatons facilement que l'H.E de citron a une bonne activité contre *S. aureus*, qui est un germe pathogène impliqué dans les intoxications alimentaires. Donc, il est intéressant d'estimer les CMI.

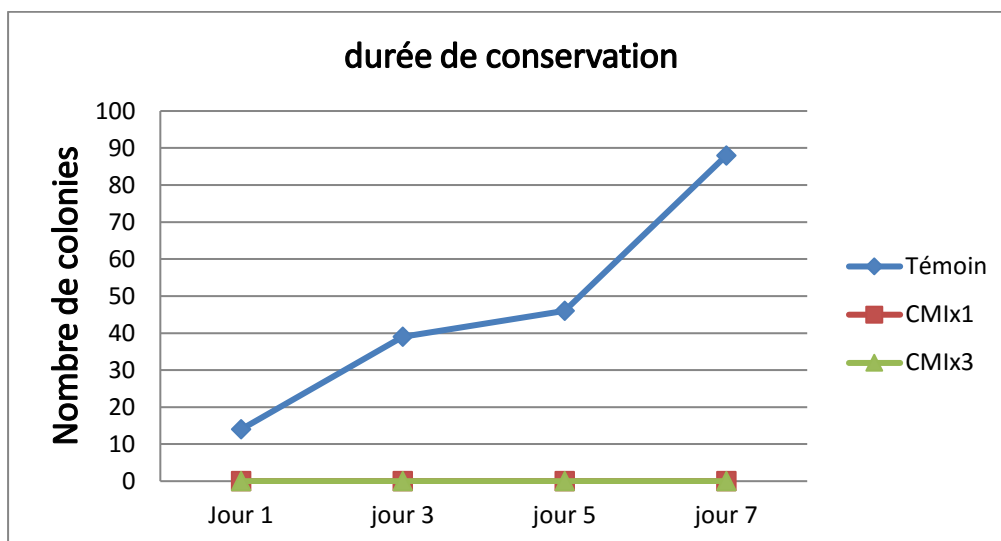
### III.1. Concentrations minimal inhibitrice (CMI) :

Le **tableau 05** montre les résultats de détermination le CMI de l'H.E de *Citron limon* sur *S. aureus*.



#### IV. Activité antibactérienne de l'H.E de *citrus limon* appliqués sur le poisson *Scomber japonicus*

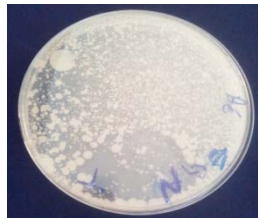
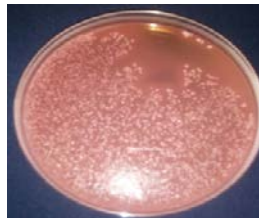
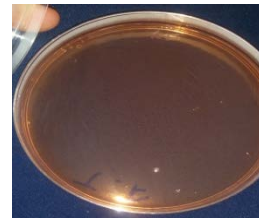
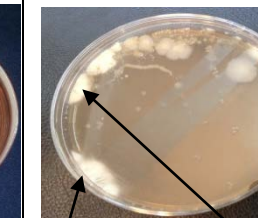
Effet inhibiteur de *citrus limon* à différents concentration vis-à vis *S. aureus* inoculée sur la *Scomber japonicus*. Dans le 1<sup>er</sup> jour jusqu'à le 7<sup>ème</sup> jour on a observé la mortalité totales de la bactérie et augmentation de nombre des colonies dans le témoin.



**Figure 21:** Effet inhibiteur de *citrus limon* à différents concentration vis-à vis *S. aureus* inoculée sur la *Scomber japonicus*.

### V. Contrôle de qualité du poisson :

Le **tableau 06** montre les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur notre matrice alimentaire.

la flore totale aérobie mésophile	coliformes totaux	coliformes fécaux	Levures et des moisissures
			
6x10 <sup>4</sup> germes/ml	4 germes/ml	0 germe	Présence des Levures et des moisissures.

$$N = C \times 1/d$$

N : nombre des germes par millilitres

C : nombre de colonies

D : dilution (10<sup>n</sup>).

### Discussion :

#### 1. Rendement :

Le rendement obtenu dans notre expérimentation est de l'ordre de 0.54%, ce rendement est supérieur aux rendements obtenus par **Blanco Tirado et al. (1995)** qui valent respectivement 0,19% mais il est inférieur aux rendements obtenus par **Ahmad et al. (2006)**, **Bourgou et al. (2012)** et par **Himed (2011)** qui sont respectivement de l'ordre de 1,12%, 1.30% et 2,18%. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet

variétal, la période de récolte, les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraîcheur) et la méthode d'extraction employée. (**Bourgou et al., 2012**).

Le degré de maturation du fruit influe remarquablement le rendement de l'huile essentielle. **Bourgou et al. (2012)** ont constaté que le rendement en HE du citron augmente au début puis diminue vers la fin de la maturation.

La région géographique apparaît aussi comme un facteur influençant le rendement en HE. Nous rappelons que le citron utilisé dans la présente étude est collecté de la région de Mostaganem, celui de **Himed (2011)** de la région de Constantine et celui de **Bourgou et al. (2012)** de la région de **Menzel Bouzelfa (Tunisie)**. Il est évident que ces régions se caractérisent par des climats différents.

### 2. Activité antibactérienne

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de citron vis-à-vis des bactéries testées.

La méthode de l'aromatogramme est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne.

Notre étude a montré que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne plus ou moins importante, sur la croissance de souches bactériennes testées. Pour l'inhibition de leur croissance, le CMI doivent être comprise 6.25%.

La méthode utilisée dans la présente étude a montré que les souches bactériennes testés (*P. aeruginosa* et *E. coli*) sont résistantes à l'effet de l'huile essentielles du citron mais *S. aureus* très sensible. Les Gram de ces bactéries peuvent expliquer cette résistance ou sensibilité. Les bactéries Gram négatif (*P.aeruginosa* et *E.coli*) 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'huile ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis de l'huile. La membrane externe des lipopolysaccharides des bactéries Gram négatif constitue une barrière à la perméabilité des substances hydrophobes, qui en entrant, empêchent la croissance des bactéries (**Chao et al., 2000**).

La haute résistance constatée de *P. aeruginosa* peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un éventail composés organiques (**Tasson et Nychas, 1995 ; chao et al., 2000 ; Mann et al., 2000 ; Innouye et al., 2001 in Ferhat et al., 2010**). Les bactéries du genre *Pseudomonas* utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie ; elles transforment le limonène (comme molécule modèle des terpènes) en alcool perillyl, en acide perillyl, en aterminéol, ou en limonène-6,8-diol (**Malekey, 2007**). **Hinou et al. (1989)** ont prouvé que *P.aeruginosa* est la bactérie la plus résistante à 32 huiles essentielles différentes. **Boontawan et Stuckey (2006)** ont montré une dégradation des terpènes par la souche *P. fluorescens*.

*E. coli* s'est avéré la plus sensible par la méthode de dilution, malgré qu'elle soit Gram négatif. Il est postulé que les différents composants des huiles essentielles montrent différents degrés d'activité contre des bactéries Gram- et Gram+ (**Dorman et Deans, 2000**) et que la composition chimique des huiles essentielles peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèque et extrinsèque (**Lahlou, 2004**). Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la croissance bactérienne.

Ces résultats concordent avec les travaux de **Lambert et al., (2001)** qui ont testé l'effet antibactérien des polyphénols de plusieurs plantes contre les bactéries à gram positif et à gram négatif. Les résultats ont indiqués que *S. aureus* était plus sensible. Pour sa part, de **Billerbeck (2007)** à rapporter que *S. aureus* a présenté une sensibilité variable envers les H.E de citron, en effet, l'H.E de citron montré de zone d'inhibition de 20 mm, respectivement. Des résultats similaires ont été enregistré avec d'autre types d'H.E par **Akin et Aktaumsek (2009)**, en testant l'H .E d'eucalyptus camaldulensis contre *S. aureus*, *P. aeriginosa* et *E. coli*, ces auteurs ont indiqués que *S. aureus* était la seule à montrer une certaine sensibilité à l'H.E. cette sensibilité plus marquée des bactéries à gram positif (*S. aureus*) vis-à-vis des H.Es a été aussi déjà observée par plusieurs auteurs (**Cox et al., 2000 ; Freidman et al., 2002 ; Burt,**

2004b ; Lefsih *et al.*, 2010 et Idir, 2010). Ainsi, Oussalah *et al.*, (2007), ont remarqué que *S. aureus* était quatre fois plus sensible qu'*E. coli* et à l'action de l'H.E de la sarriette.

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

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 (Cox *et al.*, 2000 ; Burt, 2004b ; Cristani *et al.*, 2007). Le  $\alpha$ -terpinène et le limonene affectent la perméabilité de la membrane cytoplasmique de *Candida tropicalis* entraînant la perte des composants cytoplasmiques de la cellule (Adegoke *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limon* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalol (Rodov *et al.*, 1995 ; Alma *et al.*, 2004 ; Bezic *et al.*, 2005 ; Tepe *et al.*, 2006). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (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.

Les différentes valeurs de CMI obtenues nous permettent de constater que l'activité antibactérienne est en fonction de la bactérie, ce qui confirme que le type de microorganismes est un paramètre important déterminant l'activité antibactérienne. Comme contrôle négatif, le DMSO n'ont pas affecté la croissance des souches bactériennes aux concentrations utilisées dans cette étude, comme le montre dans le **tableau 5**. Ces résultats sont en similaires avec ceux obtenus par Gachkar *et al.* (2006).

En récapitulation, l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du citron a révélé que la bactérie testée présente une sensibilité à l'effet de cette huile, qui correspond à des CMI (6.25%).

Nous ne pouvons pas appliquer les doses élevées dans le poisson, puisque elles affectent les propriétés organoleptiques en donnant un goût amer au produit. Cependant nous pouvons utiliser les faibles concentrations.

### **3. Activité antibactérienne de H.E de *citrus limon* appliquées sur le maquereau espagnol (*scomber japonicus*)**

En raison de l'utilisation des écorces de citron en gastronomie et en médecine traditionnelle, cette étude visait en premier lieu à déterminer l'efficacité antibactérienne « *in vitro* » de H.E et en deuxième lieu évaluer leur application sur produit de la pêche largement consommé en Algérie pour tester leur efficacité antimicrobienne.

En se basant sur les résultats obtenus « *in vitro* », nous avons pu suivre la cinétique de développement de *S. aureus* inoculé dans le maquereau espagnol en présence de H.E de *citrus limon*. Les autres souches à savoir *E. coli*, *P. aeruginosa* ont été écartées, puisque dans les tests « *in vitro* » se sont révélées insensibles aux H.E testée.

La figure 24 montre les résultats de développement de *S. aureus* sur le poisson conservé à 6°C. il est évident d'après nos résultats qu'une application de l'H.E de *citrus limon* de l'ordre de 1x CMI et 3xCMI a permis une réduction bactérienne à partir de 1<sup>er</sup> jour de stockage, la charge de *S. aureus* a atteint des valeurs nulles. En effet, des taux d'inhibition par rapport aux échantillons témoins de 100% ont été enregistrés du 1<sup>er</sup> à dernier jour de stockage. Le nombre de colonies de *S. aureus* dans le témoin est augmenté par les jours au 1<sup>er</sup> jour à 7<sup>ème</sup> jour.

Il ressort que lorsque que l'H.E est appliquées sur le poisson à une faible concentration CMIx1, l'effet observé est aussi meilleurs. Toutefois, l'activité bactéricide a été prononcée pour H.E testée et en particulier lorsqu'elle est appliquée à une concentration supérieures 3xCMI.

**Oussalah et al., (2007)**, ont rapporté que la différence dans les activités antibactérienne des H.Es peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu,

aux groupement fonctionnels, à la configuration des composés et, leur interaction synergique possible.

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

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

Selon **Tassou et al., (2000)**, des extraits phénoliques ont été appliqués à une concentration de 0.4% sur une salade de thon inoculée avec une charge microbienne de  $7 \log_{10}$  UFC/g (*S. aureus*, *P. fragi* et *S. enteritidis*). Les résultats ont pu montrer que ces extraits exercent une activité sur ces microorganismes.

**Mahmoud et al., (2004)**, ont montré l'efficacité de deux composants abondant dans le citron et l'orange (le citral et le linalol), testé à des concentrations de 2% et de 3% (p/v) respectivement, sur la microflore de surface et des intestins du poisson (*Acinetopacter spp.*, Enterobactéries, *Moraxella spp.* et *vibrionaceae*), conservés à 2°C pendant 48h.

Le tableau 6 montre la contamination de poisson varie en fonction de la flore recherchée et du lieu de prélèvement. D'une manière générale, on note la présence de la flore totale aérobie mésophile, coliformes totaux, les levures et moisissures. Mais on note l'absence des coliformes fécaux.

La chair du poisson est stérile. Les régions contaminées sont le mucus qui recouvre la peau, les branchies et le tube digestif (**Baross et Liston, 1970 ; Shewan 1977**). La contamination bactérienne de la chair ne survient qu'après la capture. Les

sources de cette contamination sont diverses et peuvent être réparties en deux groupes (**Bourgeois et Leveau, 1980 ; Rozier, 1985**).

- la contamination endogène,
- la contamination exogène.

#### 4. Contrôle de qualité :

Les Germes Aérobie Mésophile (GAM) assimilés à la flore totale dans un produit alimentaire reflètent la qualité microbiologique générale du produit et permet d'en suivre l'évolution. La flore totale peut donner une indication sur l'état de décomposition du produit et constitue de ce fait un indice de la qualité sanitaire (**Anihouvi et al., 2009**). Au cours des traitements technologiques, le dénombrement de la flore totale permet de juger de l'incidence des diverses opérations (**Borner, 2000**). Selon **Djinou (2001)**, les GAM sont des germes « test d'hygiène » du fait qu'ils rendent compte de l'hygiène générale ou d'une conservation inefficace. La forte contamination des Coliformes thermotolérants observée au niveau des poissons pourrait s'expliquer par le manque de la bonne pratique d'hygiène observée souvent à la halle des marées et, d'autre part, par la rupture de la chaîne de froid. La forte contamination des poissons par les Coliformes thermotolérants peut constituer un problème de santé publique dans la mesure où ces germes peuvent être des bactéries de report de contamination (**Huss, 1995**) qui peuvent se révéler parfois très pathogènes, et qui peuvent résister dans les poissons tout en constituant un maillon de la chaîne alimentaire de ces derniers. Une autre raison du risque sanitaire lié aux Coliformes thermo-tolérants est la production de l'histamine, une amine biogène résistante à la chaleur et toxique pour l'homme (**Sitti, 2001**). Selon **Borner (2000)**, les Coliformes thermo-tolérants constituent des germes de contamination fécale et sont donc des indicateurs des mauvaises conditions d'hygiène lors de la manipulation des denrées. Les résultats obtenus dans le cadre du dénombrement des spores d'anaérobies sulfite-réducteurs (ASR) sont contraires à ceux obtenus par **Ouattara (1986)** et **Knockart (2002)**. Par contre, ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **N'diaye (1998)**.

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antioxydante et antimicrobienne. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Cependant, les travaux de recherche sur les propriétés antioxydante, antibactérienne et antifongique de certaines plantes sont rares. Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antioxydant et antimicrobiens naturels.

Nous rappelons que les objectifs de cette étude sont la valorisation des écorces du citron (*Citrus limon*) par l'utilisation de son huile essentielle comme agent naturel conservateur dans le poisson. et ont permis de mettre en évidence les activités antibactérienne de cette H.E étudié à exercer une importante activité antibactérienne à *S. aureus*.

Quand aux résultats des testes de l'application de H.E de *Citrus limon* sur le *Scomber japonicus* sont intéressantes par son pouvoir antibactérienne.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'H.E de *Citrus limon* semble être plus appropriée comme agent naturel dans la préservation et la conservation des aliments.

### A

- Adegoke G.O., Iwahashi H., Komatsu Y., Obuchi K., Iwahashi Y. 2000. Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum daniellii*. *Flavour and Fragrance Journal* 15, pp. 147–150
- AFNOR, 2000, Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris.
- Ahmad M. M., Rehman S. U., Anjum F. M., Bajwa E. E., 2006. Comparative physical examination of various citrus peel essential oils. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8, pp. 186–190
- Alegre A., Bertrand A., Espino M., Espinoza P., Dioses T., Ñiquen M., Navarro I.N., Simier M., Ménard F., *Prog. Oceanogr.* 137 Part A (2015) 299–313.
- 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.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3911–3914
- Anihouvi VB, Sakyi-Dawson E, Ayernor G.S, Hounhouigan JD. 2009. Biochemical changes and aroma development during the spontaneous fermentation of cassava fish into lanhouin and their influence on product acceptability. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18: 370-384.
- Anonyme. (1997). A propos d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) à l'histamine survenue à Brest. (1997). *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. N°25/1997.
- Anton R. & Lobstein A., 2005, *Plantes aromatiques, Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*, Tec & Doc, Paris, p.522.
- Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 46-54
- Arcos D.F., Cubillos L.A., Núñez S.P., *ProgOceanogr.* 49 (2001) 597-617.
- Azeredo H.M.C., Faria J.A.F. et Dasilva MA.A.P. (2004). Minimization of peroxyde formation rate in soybean oil by antioxidant combinations. *Food Research International*, 4, 141-158.

### B

- Bailly J.D, Brugere H. Chadron H. (2012). *Microorganismes et parasites des viandes : les Connaitre pour les Maîtriser de L'Elever au Consommateur*. CIV, 150p. [www.civ-Viande.org](http://www.civ-Viande.org).
- Baross J. et Liston J., 1970. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related haemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.* 20 :179 – 186.

## Références bibliographique

---

- Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
- Basil A, Jimenez-carmonna M.M. & Clifford A.A., 1998,Extraction of rosemary by superheated water. Journal of food chemistry,p:5205-5209.
- Bassole I.H.N., Ouattara A.S., Nebie R., Ouattara C.A.T., Kabore Z.I. et Traore S.A. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of lippia chevalieri and Lippia multiflora fromBurkina Faco. Phytochemistr, 62, 209-212.
- BedouiH ; Benhammadi Z et Nacer N (2005-2006) Projet de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques ou secteur sanitaire de Ghardaïa. Diplôme supérieur en Microbiologie université de KasdiMerbah Ouargla P03
- Belaiche P., 1979, L'aromatogramme, Traité de phytothérapie et d'aromathérapie,,S.A.Editeur, Paris,Tome 1, p :204
- Ben messaoud Kawthar Oumelkheir (2004-2005), l'otite moyenne chronique ; Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla PP 18-32
- E. Beneteaud, les techniques d'extraction, Comité français du parfum, 2001.
- Bertrand A., Maria A.B., François G., Francisco L.J.C., Mar. Ecol. Prog. Ser. 311 (2006) 145-156.
- Bertrand A., Segura M., Gutiérrez M., Vásquez L., Fish. Fish. 5 (2004b) 296-316.
- Bertrand A., Barbieri M.A., Jose C., Hernández C., Gómez F., Leiva F., ICES. J. Mar. sci. 61 (2004) 1105-1112.
- Besombes C. 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289 p.
- Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro- thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle. p : 41-45
- Beuchat L.R. (1976). Sensitivity of vibrio parahaemolyticus to spices and organic acids. Journal of Food Science, 41, 899-902.
- Bisignano G., Cimino F., Saija A. 2011. BiologicalActivities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group. pp.529-548
- Blanco Tirado, C., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., Martinez, J. R. 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gaschromatography and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr.A 697, pp. 501–513
- Boontawan, A., D. C. Stuckey. 2006. A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha- pinene oxide to isonovalal by Pseudomonas

## Références bibliographique

---

- fluorescens NCIMB 11671. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, pp.643-649
- Bornert G. 2000. Intérêt et limites des analyses microbiologiques des denrées dans une stratégie de maîtrise de la sécurité des aliments : cas de la restauration collective. *Bulletin Vét. France* , 153: 433-442.
  - Bouix M. et Leveau J.Y. 1984. *Contrôle Microbiologique, biotechnologie*. Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 469 p.
  - Bourgou S., Rahali F. Z., Ourghemmi I., Saidani Tounsi M., 2012. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 10 p.
  - BOURGEOIS C.M. et LEVEAU J.Y., 1980. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol 3 : le contrôle microbiologique.- 2ème éd. Paris : Lavoisier. Tech. Doc.-454p.*
  - Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. (1990). *Microbiologie alimentaire. Tome I: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Technique et documentation, 1<sup>er</sup> édition , Lavoisier, Paris.*
  - Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. (1996). La microflore de la viande (336-345). In *Microbiologie Alimentaire ;Aspect Microbiologique de la sécurité et de la Qualité des Aliments. Lavoisier Tec & Doc : Paris :672p.*
  - Braekkan, O.R. et G. Boge, 1962, A comparative study of amino acids in the muscle of different species of fish, *Fiskeridir. (Norw). Skr. Ser. Technol. Unders. 4: 1-19.*
  - Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., de Buyser M-L., Collette C., Garin-Bastuji B. et Thorel M.-F. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (1), pp. 452-471
  - Bruneton J., 1993, *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p: 915.
  - Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition technique et documentation, 3<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris. 1120.*
  - Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 2ème Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623p.*
  - Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.
  - Burt S.A. et Reinders R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plants essential oils against *E.coli* O 157 :H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (3), 16-167.
  - Burt S.A. (2004a). *essential oils : their antibacterial properties and potentiel applications in foods. International Journal of food Microbiology*, 94 (3), 22-25.

## Références bibliographique

---

- Burt S.A. (2004b). des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen. *Journal International de Microbiologie des Aliments*, 94, 223-253.
- Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodriguez M.R.A., Corazza M.I., Vladimir O.J et Cansian R.I. (2008). Application of *Origanum Majorana L.* essentiel oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25, 207-211.

### C

- Caillet S. et Lacroix M., 2007, Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire, INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA), p. 1-8.
- Caccioni D. R. L., Guizzardi M., Biondi D. M., Agatino R., Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1e2), pp. 73-79
- Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:1-11.
- Carson CF., Rillea TV., Bosque F., 2002. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *J.Appl. Bacteriol.* 78: 264-269.
- Castro J.J., Santana Del Pino A., *Sci. Mar.* 59 (1995) 325-333.
- Castro J. J., *Ecología trófica de la caballa (Scomber japonicus Houttuyn, 1780), en aguas del Archipiélago Canario, thèse de Doctorat, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.* (1991).
- Celik M., *Int. J. Food. Sci. Tech.* 43 (2008) 933-938.
- Chao S.C, Young D.G. & Oberg G.J., 2000, Screening for inhibitory activity of essential oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *Journal of Essential oil Research.* 12, p: 639-649.
- charpentier B., Hamon-Lorleac'h F., Harlay A., Huard A., Ridoux L., & Chanselle S. (2008). *Guide du préparateur en pharmacie.* 3<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson, 1358.
- Choi H-S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. 2000. Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, 48, pp. 4156-4161
- Chozo G., Alfredo F., *Info. Inst. Mar Peru.* 136 (1998) 23-47.
- Collette B.B.E.C.N., *FAO fish. Synop.* 125 (1983) 137.
- Collette B.B et Nauen C.E. (1983). *FAO species catalogue, Scombrids of the world, An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date, FAO Fisheries Synopsis, 125 (2): 137p.*

## Références bibliographique

---

- Collomb M. et Spahni M. 1996. Revue de méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers. *Schweiz. Milchw. Forschung*, 25 (1/2), pp. 3-24
- Conner D. E., 1993. Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. ; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468
- Cox S.D., Mann C.M. & Markham J.L., 1991. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 91: pp. 492-497. Cox S.D., Mann C.M. & Markham J.L., 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 91: pp. 492-497.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R. et Wyllie S.G., 2000, The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tee tree oil), *Journal of Applied Microbiology*, p:170-175.
- Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. et Micieli D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes : Implication for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6300-6308.
- Cutter C.N. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *E. coli* O157 : H7. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63 (5), 601-607.

### D

- Davidson P.M., 1997, Methods for testing the efficacy of food antimicrobial, *Food Technology*, p:148-155.
- 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. *Radiata*. *Food Control*. 19, pp. 346-352
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., et Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oil. *International Journal of food Microbiology*, 74 (1-2), 101-109.
- Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.
- Deroin T., 1988, Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Côte D'Ivoire : *Cananga* diagnosis and epidemiology of fungal infections, p: 249-257.
- Devriese L.A, Vancnny M., Baele M., Vanechoutte M., DE Graf E., Snauwaert C., Cleenwerck I., Fawynot P., Swincs J., Decostre A et Haesebrouck F. (2005). *Staphylococcus pseudodintemedius* sp ; a coagulase

## Références bibliographique

---

- positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1569-1573.
- Djinou HPAB. 2001. Etude de la qualité microbiologique du poisson fumé artisanalement en Côte d'Ivoire et destiné à l'exportation. Thèse : Méd. Vét : Dakar; 23.
  - Dorman H. J. D. et Deans S. G., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, p: 308-316.
  - Dupuy A. 2010. Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).France. 305 p.
  - Dyer, W.J., 1952, amines in fish muscle. VI. Trimethylamine oxide content of fish and marine invertebrates, *J. fish. Res. Board Can.* 8: 314-324.

### F

- Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010. Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.
- Fernandes R, (2009). Chilled and frozen raw meat, poultry and their product (1-52). In *Microbiology Handbook Meat Products*. Leatherhead publishing, randalls Read, Leatherhead, surrey KTée 7RY, UK and Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Milton Road : Cambridge ; 297p.
- 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 (volume 1), université d'Angers, France. 266 p.
- Firouzi R., Azadbakht M. et Nabinedjad A.M. (1998). Anti-Listerial activity essential oils of some plants. *Journal of Applied Animal Research*, 14, 75-80.
- Fischer W., Bauchot M.L. et Schneider, (1987). Fiches F.A.O. d'identification des espèces pour les besoins de la pêche, (révision 1), Méditerranée et mer Noir, zone de pêche 37, Vertébrés, Rome, F.A.O., Vol 2 : 761-1530.
- Fisher K. et Phillips C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *E. coli O157*, *Listeria monocytogenes*, *bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (6), 1232-1240.
- Fraser, D.I., D.P. Pitts et W.J. Dyer, 1968, Nucleotides degradation and organoleptic quality in fresh and trawled mackerel held at and above ice temperatures, *J. fish. Res. Board Can.* 25: 239-253.

## Références bibliographique

---

- Fosse J. Margas C. (2004). Dangers Biologiques et consommation des Viandes. Ed Lavoisier: Paris; 220p.
- Friedman M., Henika P.R. et Mandrell R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Compylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 1545-60.

### G

- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*,102, pp. 898-904
- Gerlotto F., Gutiérrez M., Bertrand A., Aquat. *Living. Ressour.* 25 (2012) 341-355.
- Gill A.O., Delaquis P., Russo P. et Holley R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83-92.
- Girard G. 2010. Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco - Dentaires d'hier a au jour d'hui : Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Henri Poincare - Nancy 1. 100 p.
- Goksoyr A, Husoy AM, Larsen HE *et al.* Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway.. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1991;21:486-496.
- Goris A. 1967. Manuel de botanique. Ed. Clin. pp. 265-268
- Graziella Bourdin Copyright – Académie d'Agriculture de France – 2010. Séance du 7 avril 2010.
- Grechina A., *Biología Y Ecología Del Jurel En AguasChilenas.* (1998) 11-34.
- Grysole J. (2004) - La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 139-141.
- Grysole J. 2005. La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique : Chapitre 07.* Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162
- Guiraud, J.P. 2003. *Microbiologie alimentaire.* Ed. Paris: Dunod. 653p.

### H

- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999. Antimicrobialactivity of essential oils and other plant extracts. *Journal of AppliedMicrobiology*, 86,(6), pp. 985-990.

## Références bibliographique

---

- 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 magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.
- Hemwimon S., Pavasant P., Shotiprux A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, pp. 44-50.
- Himed L. 2011. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine. 65 p.
- Hinck JE, Schmitt CJ, Blazer VS *et al.* Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends.. *Sci Total Environ.* 2006.
- Hinou J.B. Harvala C.E., Hinou E.B. 1989. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie* 44, 4 p.
- -Hobbs, B . C. ; Gilbert, R. J. 2001. Food poisoning and food hygiene 4Ed Londres: Edward Arnold, -83p
- Holley R.A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22(4) pp. 273–292
- Hollowed A.B. (1992). Spatial and temporal distributions of Pacific mackerel, *Scomber japonicus*, larvae and estimates of survival during early life stages, *Calcofi Repot*, 23 : 100-123.
- Hunter et Kimbrell C. (1980). Early life history of pacific marckerel, *Scomber japonicus*, U.S. Fishery Bulletin, 78 :89-101.
- Huss H. 1995. Safety of Seafoods. FAO: Rome; 63p.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S., Nigam P.S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, pp.1070-1078

### I

- Idir L. (2010). Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des espèces végétales de la région de la Kabylie. Mémoire de magister. Option Technologie Alimentaire. Université M'Hamed Bougara. Bumerdes.
- Inouye S., takizawa T. et Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565-573.
- Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E. et Moulard F. et al. 2001. Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins.

## Références bibliographique

---

2ème Ed. Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française Paris.  
335 p.

### J

- Jacqueline smadja, les huiles essentielles, Université de la Réunion, 2009.

### K

- Kaufmann B. et Christen P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave- assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.*, 13, pp.105-113.
- Kim J.M., Marshall M.R., et Wei C.I. (1995a). antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2839-2845.
- Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston J.F. et Wei C.I. (1995b). Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella* Thyphimurium on culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*. 60 (6), 1364-1374.
- Knockart C. 2002. Le Fumage du Poisson (7è éd). Ifremer: Nantes; 174p.
- Konchina Y.V., *J. Ichthyol.* 21 (1981) 46-59.
- Konchina Y.V., *J. Ichthyol.* 22 (1982) 102-111.
- Kothe H.W., 2007, 1000 plantes aromatiques et médicinales, Terres Editions.

### L

- Lahlou M., 2004, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy Research*, p. 435-448.
- Lambert R.J.W. et Pearson J. (2001). Susceptibility testing : accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 784-790.
- Lavigne C, Tremblay F, Asselin G *et al.* Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats.. *Am J PhysiolEndocrinolMetab.* 2001;281:E62-E71.
- Lavigne C, Marette A, Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats.. *Am J PhysiolEndocrinolMetab.* 2000;278:E491-E500
- Leyral G, et Vierling E, (2007). Physiologie du monde bactérien (37-66). In *microbiologie et Toxicologie des Aliments : Hygiène et Sécurité Alimentaire.* Sciences des Aliments. Ed. Rueil-Malmaison Doin ; Bordeaux CRDP d'Aquitaine ; 290p.

## Références bibliographique

---

- Lefsih K. Roncales P., Yanguela J. et Djenane D. (2010). Biological effects of Algerian essential oils and their application in liquid eggs. New challenges in food preservation. Processing-Safety-Sustainability, 11-1 Nov. Budapest-Hongrie.
- Lin Y-T., Labbe R.G. et Shetty K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems using *Oregano* and *Cranberry* synergie. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5672-5678.
- Lis-Balchin M., 2002, Lavender: the genus *Lavandula*, Taylor and Francis, London, p.37, 40.
- Lozano-Rey L., Mems R. *Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. Madr.*14 (1952) 1-378.
- Lukton, A. et H.S. Olcott, 1958, content of free imidazole compounds in the muscle tissue of aquatic animals, *Food Res.* 23: 611-618.
- Leclerc H. 1984. *Le citron : Les fruits de France*. 9ème Ed. Masson. France. 274 p.

### M

- Madhavi D. L., Deshpande S. S. et Salunkhe D. K., 1996, *Food Antioxidants, Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, Marcel Dekker, Inc. New York, p.65.
- Mahmoud B. S. M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong- Suk, C., Suzuki, T. 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21(6), pp. 657-666
- Maleckey M. (2007). *Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins*. Thèse de Doctorat de L'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'environnement (Agro. Paris, Tech).
- Mann C.M., Cox S.D., Marham J.L. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.*,30, pp.294-297
- Mann J., 1987, *Secondary metabolism*, Clarendon Press, Oxford, p. 374.
- Mann C.M. et Markham J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal Of Applied Microbiology*, 84, 538-544.
- Mannan, A., D.I. Fraser et W.J. Dyer, 1961, Proximate composition of Canadian Atlantic fish. II. Mackerel, tuna and swordfish, *J. Fish. Res. Board can.* 18: 495-499.
- Marino M, Bersani C. et Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *lamiacea* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187-195.

## Références bibliographique

---

- Matsuura, F., S. Kinoshita, R. Ota, S. Katori et K. Tanaka, 1955, Chemical studies on the red muscle (Chiaï) of fishes. III. Comparative studies of the amino acid content in the protein of the ordinary and the red muscle of fishes by microbiological assay, *Nippon Suisan Gakkaishi* 20: 941-945.
- Mohamed Faouzi Kasraoui, le citronier, 2006.
- Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option : Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des sciences. Université ABB. Tlemcen. Algérie.
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Dugo P., Dugo G. 2005. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal.*, 20(2), pp.136-140
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Cicero L., Dugo P., Dugo G. 2003. Comparison of fast and conventional GC analysis for citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51(19), pp.5602-5606
- Moreira M. R., Ponce A. G., del Valle C. E., Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT e Food Science and Technology*, 38(5), pp. 565-570

### N

- Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jagan RAO Mohan L. et Sakariah K.K. (1999). Antibacterial activity of turmeric oil : a byproduct from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4297-4300.
- N'diaye A. 1998. Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche destinés à l'exportation en 1998 et 1997 Thèse Méd. Vét., Dakar 17, 73p.
- Nicole M. (1996) - Aperçu de l'aromathérapie. *Info.essence.2* :4-5.

### O

- Olle M. and Bender I., 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8 (3), pp.687-696
- Ozenda P. flore de sahara, 2<sup>ème</sup> édition, 1977.
- Onawunmi G.O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology* ? 9, 105-108.
- Oussalah M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *E. coli* O157 :H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046-1055.
- Oussou K.R., Coffi K., Nathalie G., Seriyolou, Gerard K., Mireille D., Yao T.N., Gilles F. et Jean-Claude C.H. (2004). Activités antibactériennes des

## Références bibliographique

---

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

- Ouattara B. 1986. Etude de la qualité bactériologique des filets de poissons congelés. Thèse : Méd. Vét : Dakar ; 20.

### P

- Padrini F., Lucheroni M. T. 1996. Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris, pp.11, 15, 61 et 111.
- Padrini F. et Lucchioni N. (2003). Le grand livre des huiles essentielles : Médecine douce, bien être. édition de Vecchi S-A. Paris.
- Paris R., Godon M. 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- Patrice de Bonneval et Franck Dubus, Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien, édition Désiris, Paris 2014.
- Perrin J.F., 10750obiologia. 71 (1980) 217-224.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R. et Cassanova J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Oils from Sardinia and Corsica. Flower and Fragrance Journal, 17, 15-19.
- Piochon M. 2008. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse. Thèse de doctorat. Université du Québec, pp. 5-9
- Pingot A. 1998. Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp. 230- 236
- Pintore G., Usai M., bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R. et Cassanova J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flower and Fragrance Journal*, 17, 15-19.
- Poole K. (2001). Multidrug resistance in gram négative bacteria. Current Opinion in Microbiology, 4, 500-508.
- Prior E. 2003. Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In : Graille J, ed. Lipides et corps gras alimentaires, pp. 87-147
- Prudent D., Perineau F., Bessière J.M., Michel G.M. et Baccou J.C. (1995). Analysis of the essential oil of with oregano evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. Journal of Essential Oil Research, 7, 165-173.

### Q

- Quiñones R., Serra R., Núñez S., Arancibia H., Córdova J., Bustos F., Tarifeño E., Gestión de Sistemas Oceanográficos del Pacífico Oriental, E. Tarifeño (Ed.), Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la Unesco. IOC/INF-1046 . 138 (1997) 187-202.

### R

- Richard F., 1992, Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec & Doc., p. 1228-1242.
- Rizkalla S.I., Faltas S.N., Mar. sci. 8 (1997) 127-136.
- Robert A. et Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- Rodov V., Ben-Yoshua S., Fang D. Q., Kim J. J., Ashkenazi R. 1995. Prefomed antifungal compounds of lemon fruit: Citral and its relation to disease resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, pp. 1057–1061
- Rowe M. et Donaghy J. 2011. Microbiological Aspects of Dairy Ingredients in Chandan R. C., Kilara A. Dairy Ingredients for Food Processing. Ed. Blackwell Publishing Ltd. pp. 59-102
- ROZIER J. (1985). Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments.- Paris : éd. SEPAIC.-230p.
- Rozier J., Carlier V. et Bolnot F., 1986. Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. É d. SAPALC. Paris. pp. 130-143.
- Rožman T., Jeršek B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. Acta agriculturae Slovenica, 93(1), pp.51-58

### S

- Sakaguchi, M. et W. Shimizu, 1964, muscle of aquatic animals. XLIV. Amino acids, trimethylamine oxide, creatine, and nucleotides in fish muscle extractives, Nippon suisan Gakkaishi 30: 1003-1007.
- Sakaguchi, M. et W. Shimizu, 1965, muscle of aquatic animals. XLV. Variation with season and growth in the nitrogenous extractives of mackerel muscle, Nippon suisan Gakkaishi 31: 72-75.
- Salle J.L., 1987, Les huiles essentielles : Synthèse d'aromathérapie et introduction à la Sympathicothérapie, Ed. Frison Roche, Paris.

## Références bibliographique

---

- Salle J.L. et Pelletier J. (1991) - Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.
- Schauenberg P. et Paris F., 2010, Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé, p.396.
- Senatore F., Napolitano F. et Ozcan M. (2000). Composition and antibacterial activity of essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 186-189.
- Sever T.M., Bayhan B., Bilecenoglu M., Mavili S., *J. Appl. Ichthyol.* 22 (2006) 145-148.
- SHEWAN J.M. 1977. The bacteriology of fish and spoiling fish and some related chemical changes induced by bacterial action. In: handling processing and marketing of tropical fish.- Londres Tropical product institute.
- Sina L. 1992. Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par la SOCA. Thèse de doctorat : Ecole inter-etats des sciences et médecine vétérinaires E.I.S.M.V. Université cheikh Anta Diop de Dakar, 245 p.
- Sitti AH. 2001. Contribution à l'étude de l'évolution de la qualité bactériologique des produits de la pêche de 1997-2000. Thèse : Méd. Vét : Dakar ; 17.
- Skandamis P.N et Nychas G.J.E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011-1022.
- Smith Palmer A., Stewart J et Fyfel L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 436-470.
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 1996. Fruit. In "Food composition and nutrition tables". Ed. CRC. pp.892-929

### T

- Tassou C., Drosinos E. H., Nychas G.-J. E. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, pp. 593– 600
- Tassou C.C., Koutsoumanis F. et Nychas G.J.E. (2000). Inhibition of *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33, 273-280.
- Techetch M., Hernando-Casall J.A., Saoud Y., Benajiba M.H, *Cybio*. 34 (2010) 159-165.
- 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 anisatum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), pp.719 –724

## Références bibliographique

---

- Teusheur E., Anton R. & Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Eplices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.
- Tokunaga, T., 1970, trimethylamine oxide and it's decomposition in the dark muscle of fish. I. TMAO, TMA and DMA contents in ordinary and dark muscles, Nippon suisan Gakkaishi 36: 502-509.
- Tranchida P. Q. , Dugo P., Mondello L., Dugo G. 2011. Advanced Analytical Techniques for the Analysis of Citrus Oils In Dugo G. et Mondello L. Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group. pp. 477- 511

### U

- Utree A., Slump R.A, Steging G. et Smid E.J., 2002, Antimicrobial activity of carvacrol on rice, Journal of food protection.63, p. 620-624.

### V

- Valnet J. (1984) - Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544
- Valnet J. 2001. La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. France, 411 p.
- Valnet, M. (2005).Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. Journal of Food Microbiology.85. p 73-81.
- Veldhuizen E. J., Tjeerdsma-van Bokhoven J. L., Zweijtzer C., Burt S. A., Haagsman H. P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, pp. 1874–1879
- Vokou D., Kokkini S. et Bressiere J.M., 1988, *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition, Economy botanic. 42, p. 407-412.

### W

- Wendakoon C. N. et Sakaguchi M., 1995, Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices, Journal of Food Protection 58, p. 280-283.
- Wilbey R. A. 2002. Microbiology of cream and butter. Chapter 4. In Robinson R.K. Dairy microbiology handbook. 3ème Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 123-170
- Wootton R., Fish and Fisheries Serie 1. 1 (2012) 404.

### Y

- Yoon S.J., Kim D.H., Baeck G.W., Kim J.W., Korean. J. Fish. Aquat. Sci. 41 (2008) 26-31.

### Z

- Zellner B. A., Dugo P., Dugo G., Mondello L. 2010. Analysis of essential oils. In Baser K. H. C., Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, New York,pp. 151-183

---

**Annexe 01 : Composition de principaux milieux de culture utilisés****Agar Mueller Hinton**

Eau distillée.....	1000ml
Infusion de viande de bœuf.....	02.0g
Hydrolysate de Caseine.....	17.5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	10g

pH= 7.4

**Gélose Nutritive**

Extrait de viande de bœuf.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	15g

pH= 7,2 à 7,4

**Bouillon nutritif**

Peptone.....	5 g
Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure .....	2 g
Chlorure de Sodium.....	5 g
Eau distillée .....	1000 ml

**Gélose King A**

Peptone de viande .....	20 g
Glycérol (Glycérine) .....	10 ml

---

Potassium sulfate ..... 1,5 g

Agar..... 20 g

pH = 7,2

### **Gélose Chapman**

Extrait de viande ..... 1g

Extrait de levure ..... 3 g

Tryptone .....5 g

Peptone bactériologique ..... 10 g

Chlorure de sodium ..... 70 g

Mannitol ..... 10 g

Rouge de phénol ..... 0,025 g

Agar ..... 15 g

pH = 7,4

### **Gélose Mac Conkey**

Peptone de caséine.....17g

Peptone de viande.....3g

Sels biliaires.....1,5g

Cristal violet.....0,001g

Lactose..... 10 g

Rouge neutre.....0,03g

NaCl.....5g

Agar.....13,5g

pH final = 7,1

**Le milieu OGA**

Extrait de levure déshydratée ..... 5g

Glucose: .....20g

Agar:..... 16 à 24g

pH = 6,8

**Milieu liquide**

**Eau physiologique stérile**

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

Eau distillée ..... 1000 ml

Cette étude a été conduite dans le but de valoriser les écorces du citron (*Citrus limon*) par l'utilisation de leur huile essentielle comme agent naturel conservateur dans une matrice biologique le poisson *Scomber japonicus*. L'huile essentielle a été extraite par entraînement à la vapeur, le rendement obtenu est équivalent à 0,54%.

La méthode des aromatogrammes montre que l'huile essentielle de *Citrus limon* a une forte activité antibactérienne. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été estimée par la méthode de dilution d'agar. La CMI obtenue est 6.25%.

A l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que l'huile essentielle des graines du fenouil pourrait être considérée comme un agent conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire capable d'empêcher l'oxydation des aliments et de réduire la croissance bactérienne responsable d'altération des aliments.

**MODIFIER CE RESUME C KOI CES EREUR**

**Mots clés :** huile essentielle, citron, activité antibactérienne, *Scomber japonicus*

### **Abstract**

This study was carried out with the aim of valorizing lemon peel (*Citrus limon*) by using their essential oil as a natural preservative in *Scomber japonicus*. The essential oil was extracted by steam distillation, the yield obtained being equivalent to 0.54%.

The method of aromatograms shows that the essential oil of citrus silt has a strong antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) was estimated by the agar dilution method. The MIC obtained is 6.25%.

As the study progresses, we can conclude that the essential oil of the fennel seeds could be considered as a very promising preservative for the food industry capable of preventing the oxidation of food and of reducing the responsible bacterial growth Alteration of food.

**Key words:** essential oil, lemon, antibacterial activity, *Scomber japonicus*