

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA – BOUMERDES



Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de  
MASTER

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

## THÈME

---

Appréciation des activités antioxydants et antimicrobiennes des huiles  
essentielles d'écorces de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

---

Présenté par :

*BENAISSA Abderrahmen*  
*GUERMACHE MahrezAmine*

Devant le Jury :

<i>M<sup>me</sup> Mellal Ghania</i>	<i>Présidente</i>	<i>MAA.</i>	<i>UMBB</i>
<i>M<sup>me</sup> Yahiaoui Karima</i>	<i>Examinatrice</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>
<i>M<sup>me</sup> Ait Kaki Sabrina</i>	<i>Promotrice</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>

2022/2023

# Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions notre DIEU le tout puissant qui nous a donné la santé, la volonté, la force, le courage et la patience pour pouvoir mener à bien ce modeste travail et de nous avoir guider dans les moments les plus difficiles.*

*Nos remerciements vont*

*A Mme. AIT SLIMANE-AIT KAKI Sabrina, Professeure au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, d'avoir accepté de diriger ce travail avec compétence et dévouement, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*A Mme MELLAL Ghania, Maître Assistante A. au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. Nous la remercions vivement.*

*A Mme YAHIAOUI Karima, Professeure au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, de nous avoir fait l'honneur d'être membre de ce jury et d'examiner ce travail, son expérience sera bénéfique pour la valorisation de ce travail. Nous la remercions très sincèrement.*

*Nos remerciements sont aussi adressés, à toute personne ayant contribué de près ou de loin pour la réalisation de cette étude.*

*Liste des figures et photos*

*Liste des tableaux*

*Introduction* ..... 1

## **Chapitre I. Synthèse bibliographique**

**I.1 Généralités sur les agrumes** .....03

**I.1.1 Historique** .....03

**I.1.2 Données générales sur les agrumes** .....03

**I.1.2 Taxonomie et systématique** .....04

**I.1.3 Description botanique des agrumes** .....05

**I.1.4 Production mondiale des agrumes** .....05

**I.1.5 Culture des agrumes en Algérie** .....06

**I.1.6 Composition chimique globale des écorces d'agrumes** .....06

**I.1.7 Intérêt biologiques des écorces d'agrumes** .....06

**I.2 Espèces étudiées**

**I.2.1 L'oranger *Citrus sinensis*** .....07

**I.2.2 Le Citron *Citrus limon*** .....10

**I.3 Les huiles essentielles**

**I.3.1 Généralités sur les huiles essentielles** .....11

**I.3.2 Répartition botanique, localisation des huiles essentielles** .....12

**I.3.3 Propriétés des huiles essentielles** .....13

**I.3.4 Composition chimique des huiles essentielles d'agrumes** .....14

**I.3.5 Localisation de la biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus limon*** .....14

**I.3.6 Méthodes d'extraction des huiles essentielles** .....15

**I.3.6 Activités biologiques des huiles essentielles** .....16

**I.3.6 La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques** .....17

## **Chapitre II. Matériel et méthodes**

<b>II.1 Matériel. ....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.1. Matériel non biologiques .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2. Matériel biologique .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2.1 Matériel végétal .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2.2 Microorganismes .....</b>	<b>20</b>
<b>II.2 Méthodes .....</b>	<b>21</b>
<b>II.2.1 Préparation du matériel végétale .....</b>	<b>21</b>
<b>II.2.2 Extraction des huiles essentielles .....</b>	<b>22</b>
<b>II.2.3 Etude analytique des huiles essentielles extraite .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.3.1 Propriétés organoleptiques .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.3.2 Propriétés physico-chimique .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.4 Activités des huiles essentielles .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.4.1 Activités antioxydant .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2.4.2 Activités antimicrobienne .....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4.2.1 Evaluation de l'activité antifongique .....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4.2.2 Evaluation de l'activité antibactériennes .....</b>	<b>28</b>

## **Chapitre III. Résultats et discussions**

<b>III.1. Extraction des huiles essentielles .....</b>	<b>31</b>
<b>III.1.1. Résultats des rendements d'extraction .....</b>	<b>31</b>
<b>III.1.2 Résultats des caractéristiques organoleptiques .....</b>	<b>33</b>
<b>III.1.3. Propriétés physico-chimiques .....</b>	<b>34</b>
<b>III.1.3.1 Indice de réfraction .....</b>	<b>34</b>
<b>III.1.3.2 Résultat de la mesure de la densité .....</b>	<b>35</b>
<b>III.2. Résultats de l'activité des huiles essentielles .....</b>	<b>35</b>
<b>III.2.1. Activité antioxydante .....</b>	<b>35</b>
<b>III.2.2. Activité antimicrobienne .....</b>	<b>37</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>41</b>

## **Références bibliographiques .**

**Annexes .**

**Résumé .**

## Liste des figures et photos :

<b>Figure n°1.</b> Rameaux de l'oranger Citrus sinensis (Image Google 2023).....	<b>07</b>
<b>Figure n°2.</b> Rameaux du Citron Citrus limon (Image Google 2023) .....	<b>10</b>
<b>Photo n°1.</b> Dispositif d'hydro distillation du type Clevenger contenons les écorces d'orange (Photo original 2023- Labo.2.32) .....	<b>23</b>
<b>Figure n°3.</b> Schéma récapitulatif de protocole expérimental de l'activité antioxydants .....	<b>26</b>
<b>Figure n°4.</b> Schéma de préparation des dilutions décimales .....	<b>29</b>
<b>Figure n°5.</b> Principe de la méthode de diffusion sur disques des huiles essentielles (Ouaar al., 2018) .....	<b>30</b>
<b>Photo n°2.</b> Virement de couleur la solution DPPH-extrait des huiles essentielles de Citrus limon (Originale. 2023) .....	<b>36</b>
<b>Figure n°6.</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique .....	<b>37</b>

## Liste des tableaux :

<b>Tableau n°01.</b> Composition chimique globale des écorces d'orange (g/100g bs) .....	<b>08</b>
<b>Tableau n°02.</b> Familles chimiques et activités correspondantes (Valnet, 1984 ; Amor, 2006).....	<b>13</b>
<b>Tableau n°03.</b> Souches microbienne utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	<b>21</b>
<b>Tableau n°04.</b> Présentation des deux variétés d'agrumes étudiées .....	<b>21</b>
<b>Tableau n°05.</b> Résultats du rendement en huile essentielle de Citrus sinensis et Citrus limon.....	<b>32</b>
<b>Tableau n°06.</b> Résultats des caractères organoleptiques des huiles essentielles de Citrus sinensis et Citrus limon .....	<b>33</b>
<b>Tableau n° 07.</b> Valeurs des indices de réfraction des huiles essentielles obtenues. ....	<b>34</b>
<b>Tableau n° 08.</b> Valeurs de la mesure de la densité des huiles essentielles obtenues.....	<b>35</b>
<b>Tableau n° 09.</b> Les diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes testées des HE de Citrus sinensis et Citrus limon .....	<b>38</b>
<b>Tableau n° 10.</b> Photos des zones d'inhibition des souches bactériennes testées des HE de Citrus sinensis et Citrus limon .....	<b>39</b>
<b>Tableau n° 11.</b> Les diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques testées des HE de Citrus sinensis et Citrus limon .....	<b>40</b>

## Introduction

---

### Introduction

Le secteur des huiles essentielles en Algérie, est un secteur totalement vierge et qui n'arrive pas à voir la lumière. La situation géographique exceptionnelle de l'Algérie permet une très grande richesse de la flore, située au cœur de la mer Méditerranée est caractérisée par une très grande variation de reliefs et de climats ; depuis le Tell au Nord, les hauts plateaux pour arriver aux dunes de sables du Sahara situées dans le Sud (**Ferhat *et al.*, 2010**). Les huiles essentielles des agrumes représentent une source à la fois abondante et bon marché de terpènes et de terpènes oxygénés qui intéressent de nombreux secteurs, en particulier l'agroalimentaire, la pharmacie, la cosmétique, l'industrie des arômes et des parfums ; les molécules, tels que le myrcène et le linalol, sont contenues en faible quantité dans les huiles essentielles et qui présentent une haute valeur ajoutée en raison de leur profil sensoriel particulièrement recherché ; bien que le terpène non oxygéné le limonène est un composé majoritaire de toutes les huiles essentielles des agrumes (**Dupuy, 2010**).

Le genre *Citrus* comme d'autres fruits et légumes sont une source importante de différents antioxydants (composés phénoliques, flavonoïdes, acide ascorbique.....etc.) ces composés ont des effets bénéfiques sur la santé humaine car ils possèdent de nombreuses activités biologiques comme l'activité antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérienne.....etc., ce qui protège et inhibe les effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain (**Gang *et al.*, 2020**).

Les écorces d'oranges et de citron constituent un gisement riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine c, composés phénoliques) (**EL-Akhal *et al.*, 2014**).

Aujourd'hui, Il est ainsi admis que ces substances de par leurs propriétés physicochimiques contribuent à une protection efficace contre le phénomène oxydatif (**Karou *et al.*, 2005**). Par ailleurs, les sources de ces substances sont aussi diverses et variées que le

règne végétal lui-même et des travaux de recherche scientifique ne cessent de nous enrichir par la découverte de nouvelles molécules et de nouveaux effets biologiques.

C'est dans ce contexte, que notre travail de mémoire s'inscrit visant à étudier les huiles essentielles des écorces de espèces du genre *Citrus* à savoir *Citrus sinensis* et *Citrus limon* et de tester leur pouvoir antioxydant par le test anti-radicalaire DPPH ainsi que leurs activités antimicrobiennes sur une gamme de souches fongiques et bactériennes.

1

## **Introduction**

---

Hormis l'introduction et la conclusion, le manuscrit, résultat de ce travail, est donc organisé en trois grands chapitres. Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique. Avec des généralités sur les agrumes, leurs descriptions et systématique. Suivi de la présentation des deux espèces sujet de ce travail.

Dans le deuxième chapitre sont alors exposés le large éventail des matériels et les méthodes mis en œuvre dans le cadre du travail expérimental. Les techniques et les protocoles expérimentaux sont précisés.

Les résultats sont ensuite développés dans le troisième chapitre où sont discutées les données obtenus.



### Chapitre I. Synthèse bibliographique

#### I.1 Généralités sur les agrumes

##### I.1.1 Historique

Les agrumes sont originaires des contreforts de l'Himalaya. Après la domestication de l'Inde et de la Chine, leurs traces sont retrouvées dans les manuscrits de l'empereur Tayun, qui régna entre 2205 et 2197 av. J.-C. (Douat, 2004). L'orange est présente également chez les Sumériens et dans l'ancienne Égypte. Alexandre le Grand, par ses conquêtes, poursuit au Moyen-Orient la propagation du cédratier. Les Juifs, qui utilisent le cédrat comme symbole dans la fête marchands arabes, quant à eux, propagent l'oranger en Afrique du Nord. L'orangerie trouve ses lettres de noblesse quand le roi Louis XIV, fou d'oranges, fruits du soleil, en distribuait aux femmes les soirs de bal et de comédie (Douat, 2004).

##### I.1.2 Données générales sur les agrumes

Le mot agrume provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (Beediste et Baches, 2002). Les agrumes sont des baies modifiées ou ont une forme spécialisée de baie (*Hasperidium*) résultant d'un ovaire simple. En plus du genre *Citrus*, nous observons cinq genres supplémentaires de ce type de fruit *Poncirus* (orange trifoliée), *Fortunella* (le kumquat qui est mangé tel quel avec sa peau), *Microcitrus*, *Eremocitrus*, et *Clymenta* dans la sous famille des Aurentiordae et appartenant tous à la famille des Rutaceae. Le genre *Citrus* est l'un des cultures fruitières les plus abondantes et constituent une grande famille dont les principaux membres comprennent les citrons, les oranges, les kumquats, la bergamote, les limes, les mandarines, les pamplemousses, ces fruits sont les plus consommés (Olabinjoet al., 2017).

La taille des agrumes s'étend d'environ 2,25 cm pour les kumquats (espèce de *Fortunella*) à plus de 20 cm de diamètre pour le pomelo (*C. grandis*). La forme est également variable aplatie (pour le pamplemousse, les mandarines et les tangerines) globuleuse à ovale (sphérique ou presque pour les oranges douces), oblong (pour les citrons *C. limon* et cédrats *C. Medica*) et sphérique pour les limes *C. aurentifolia* (Bousbia, 2011).

D'après Praloran (1971), les agrumes sont de petits arbres, ou des arbustes, atteignant de 5 à

15 m de hauteur, assez souvent épineux. Et à feuillage dense, persistant à l'exception de quelques variétés hybrides dont les feuilles sont caduques ou semi persistantes. D'un vert généralement très foncé, les jeunes plants et pousses étant d'un vert nettement plus clair. Le fruit est formé de segments contenant les graines. Les segments sont entourés d'un endocarpe blanc à l'extérieur d'une écorce à très nombreuses glandes à essence, devenant jaune ou orange à maturité. Selon **El Otmani (2005)**, les agrumes sont généralement classés parmi les espèces végétales pérennes moyennement sensibles au froid, ceci est dû à leur incapacité à survivre sous des températures froides que supportent les espèces ligneuses, des zones de latitudes élevées qui peuvent atteindre des valeurs voisines de 40 °C.

Le genre *Citrus sp.* Est l'un des cultures fruitières les plus abondantes et constituent une grande famille dont les principaux membres comprennent les citrons, les oranges, les kumquats, la bergamote, les limes, les mandarines, les pamplemousses, ces fruits sont les plus consommés (**Olabinjoet al., 2017**).

### **I.1.2 Taxonomie et systématique**

Les agrumes comportent une grande diversité d'espèces. En effet, les agrumes appartiennent principalement à trois genres botaniques sexuellement compatibles : *Fortunella*, *Poncirus* et *Citrus*. Ces trois genres avec huit autres genres appartiennent à la sous-tribu des Citrinae, tribu des Citreae, sous famille des Aurantioideae, famille des Rutaceae et l'ordre des Géraniales. Les espèces appartenant au genre *Fortunella* donnent des fruits dont la peau est comestible. Le *Poncirus* est monospécifique. Il est utilisé surtout comme porte-greffe du fait des tolérances qu'il porte à plusieurs contraintes biotiques (Gommose à *Phytophthora*, Tristeza, nématodes...) et aux basses températures.

Le genre *Citrus* est celui qui regroupe un très grand nombre d'espèces, y compris la plupart des espèces cultivées et comestibles. Le nombre d'espèces appartenant à ce genre varie en fonction des classifications des taxonomistes. En effet, tandis que Swingle (1967) y répertorie seize espèces, Tanaka (1961) y décrit cent cinquante- six espèces. La classification de Tanaka (1961) reste la plus utilisée, même si tout le monde s'accorde à dire que celle de Swingle se rapproche le plus de la définition d'une espèce.

En 1997, Mabberley a proposé une autre classification qui regroupe les six genres interfertiles des agrumes : *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus*, *Eromocitrus*, *Microcitrus* et *Clymenia* en un seul genre nommé *Citrus*.

D'après **Praloran (1971)**, la position taxonomique des agrumes, est celle indiquée comme suit :

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Magnoliophyta (ou Angiospermes)

**Classe :** Magnoliopsida (ou Dicotylédones)

**Sous classe :** Archichlomydeae

**Ordre :** Sapindales

**Famille :** Rutaceae **Sous-famille :** Aurantioideae **Tribus :** Citreae **Sous-tribu :** Citrinae

**Genre :** *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus*.

### I.1.3 Description botanique des agrumes

Les agrumes sont des arbustes toujours verts, à tronc droit, à rameaux nombreux, formant une cime assez dense plus ou moins arrondie. Elles sont composées de deux parties : une partie souterraine formée par le porte greffe et une partie aérienne constituée par la variété. Le système racinaire formé par le porte greffe (ou sujet), c'est la partie qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol, son alimentation en eau et en sels minéraux.

Le système aérien Essentiellement constitué par la variété (ou cultivar) de l'espèce cultivée (oranger, mandarinier, etc...). C'est la partie productive de l'arbre, c'est-à-dire celle qui portera le fruit (**Boukabacheet al., 2016**).

### I.1.4 Production mondiale des agrumes

Les agrumes sont l'une des principales cultures cultivées dans le monde avec une totale production de 135,9 millions tonnes (**Yang et al., 2021**). Les trois plus grands pays producteurs d'agrumes sont la Chine (22 millions de tonnes /ans), le Brésil (21 millions) et les États-Unis (environ 12 millions) et ils totalisent près de la moitié du tonnage mondial. Ils sont suivis en rang par le Mexique et l'Inde avec un peu plus de 7 millions de tonnes chacun. Dans le bassin Méditerranéen, l'Espagne est le premier producteur avec 6 millions de tonnes /an, suivie de l'Italie (4 millions). En Afrique, l'Égypte est en tête suivie de l'Afrique du Sud (2,2 millions de tonnes / an) et du Maroc (1,3 million) (**El-Otmaniet al., 2011**).

### I.1.5 Culture des agrumes en Algérie

Les agrumes sont parmi les fruits les plus cultivées en Algérie. Ils sont d'excellente qualité et sont très appréciés pour leur valeur nutritionnelle et rafraîchissante (INRAA, 2006). En plus la production d'agrumes présente une importance économique considérable pour de nombreux pays, cette importance est justifiée par leur :

- Consommation comme des produit frais ou après leur transformation (jus ; sirop.).
- Grande qualité nutritive riche, en vitamine C, B6, et constituent une source de fibres d'acide ascorbique et folique, du potassium et du calcium
- Effet bénéfique sur la santé en contribuant dans la diminution des risques de maladies cardio-vasculaires et d'autres maladies (ITAFV, 2014 ;Bounab et Chabbi, 2018).

### I.1.6 Composition chimique globale des écorces d'agrumes

Les écorces d'agrumes forment environ 40 à 50% de la masse totale des fruits, mais sont généralement considérées comme un déchet. Cependant, c'est une source substantielle de composés biologiquement actifs, Elles sont riches en vitamine. C et en métabolites secondaires tels que les caroténoïdes et les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes et les huiles essentielles. Il a également été noté que les écorces d'agrumes contiennent plus de quantités de ces composés que les parties comestibles correspondantes des fruits.

Les polyphénols sont le principal groupe de composés bioactifs dans écorces d'agrumes, une grande partie des activités biologiques des écorces d'agrumes ont été attribués à des composés phénoliques tels que les flavonoïdes (Ademosunet *al.*, 2018), sont représentés par deux classes de composés appelés flavanone glycosides et flavones polyméthoxylées que se trouvent à des concentrations relativement plus faibles mais présentent une activité biologique plus élevée que les acides phénoliques et les flavanone glycosides, qui sont les principaux groupes primaires de composés phénoliques dans les écorces d'agrumes (Barraleset *al.*, 2018 ).

### I.1.7 Intérêt biologiques des écorces d'agrumes

Les agrumes sont utilisés comme plantes médicinales dans les médecines traditionnelles depuis des milliers d'années. Écorce d'agrumes, connue sous le nom de Chen pi ou ju pi, est un médicament à base de plantes comestible non toxique, et a été utilisé pour améliorer la digestion, soulager les gaz intestinaux et ballonnements et résoudre les mucosités dans la médecine traditionnelle chinoise.

Au cours des dernières décennies, un nombre croissant de et des études cliniques ont démontré que la consommation d'agrumes est associée à la réduction des risques des maladies liées au mode de vie, telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose. Le rôle des agrumes dans la santé humaine peut être attribué à l'accumulation de composés bioactifs, car ils sont riches en ces produits, tels que les fibres alimentaires, qui aident à réduire le taux de cholestérol. De plus, les agrumes sont riches en micronutriments, le potassium, l'acide folique, la vitamine B6, la riboflavine et le calcium, qui sont tous nécessaires au maintien de la santé humaine (González *et al.*, 2020).

### I.2 Espèces étudiées

#### I.2.1 L'oranger *Citrus sinensis*

##### a. Description botanique

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé (Fig.1). La floraison blanche très parfumée, les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés les plus connues la Sanguine, Thomson navel, valencia latté, Washington navel Powell, Florida pineapple, orange portugaise etc. (Loussert, 1989).

L'oranger est d'une durée de vie de 300 à 400 ans, les orangeraias prospèrent dans les régions tempérées disposant d'un hiver doux. Ils ont besoin de beaucoup de soleil, de chaleur et d'eau. La différence de température entre l'été et l'hiver et entre le jour et la nuit est importante pour le développement correct de la saveur et de la couleur.



**Figure 1. Rameaux de l'oranger *Citrus sinensis* (Image Google 2023) b.**

**Systématique**

Taxonomiquement, les oranges douces appartiennent à :

**Classe** : des dicotyledoneae

**Ordre** : Sapindales

**Sous-ordre** : des geraniineae,

**Famille** : Rutaceae

**Genre** : *Citrus*

**Espèce** : *Citrus sinensis*

**c. Variétés de *Citrus sinensis***

*Citrus sinensis* souvent appelées « orange douce », appartient à la famille des Rutacées c'est l'un des types d'agrumes les plus courants et les plus cultivés. On pense que les oranges sont originaires et cultivées en Chine et ont été apportées dans l'hémisphère occidental par Columbus au 15ème siècle. Les fruits orange sont sphériques à oblongs, avec un faible nombre de graines et une bonne teneur en sucre. Les variétés d'oranges sont classées en quatre groupes : oranges rondes, oranges nombril, oranges sanguines et oranges sans acide. (**Vashisth et Kadyampakeni, 2020**).

**d. Composition chimique et valeur nutritive**

L'orange contient de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C, vitamines P, B1, B9, E, provitamine A. riche en calcium, et en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion (**Bousbia, 2009**).

La composition chimique globale des écorces d'orange est regroupée dans le tableau 1 qui suit :

**Tableau n° 01. Composition chimique globale des écorces d'orange (g/100g bs) ;**

Constituant	Quantité	Référence
Eau	2,97	Kammounet <i>al.</i> , 2011)
	3,14	(Ghanemet <i>al.</i> , 2012)
Lipides	0,95	(Kammounet <i>al.</i> , 2011)
	1,66	(Ghanemet <i>al.</i> , 2012) (Marin
	4,00	<i>et al.</i> , 2007)

Protéines	1,79 2,67 7,90 8,01 9,06	Ghanemet <i>al.</i> , 2012) (Magda et al., 2008) (GrigelmoMinguel et al., 1999) (Kammoun et al., 2011) (Marin et al., 2007)
Glucides	15,01 46,60 47,81	(Ghanem et al., 2012) (Kammoun et al., 2011) (Marin et al., 2007)
Minéraux	2,56 3,31 3,45 4,24	(Marin et al., 2007) (Kammoun et al., 2011) (Ghanem et al., 2012) (Magda et al., 2008)
Fibres	6,30 13,38 13,90 41,64 42,13	(Marin et al., 2007) (Magda et al., 2008) (Gorinstein et al., 2001) (Kammoun et al., 2011) (Ghanem et al., 2012)
Caroténoïdes totaux	0,67 0,96 1,13 1,89 2,51 3,94 7,30 16,03 19,62	(Magda et al., 2008) (Lagha-Bernamrouche et al., 2013) (Kammoun et al., 2011) (Ghanem et al., 2012) (Lagha-Bernamrouche et al., 2013) (Chen et al., 2011) (Cheynier et al., 2006) (Ghasemi et al., 2009) (Goulas et al., 2012)
Huiles essentielles	0,6-1	(Lagha-Bernamrouche et al., 2013) (Espiard, 2002)
Vitamine C	0,145 1 1,15	(Barros et al., 2012) (Goulas et al., 2012)

### I.2.2 Le Citron *Citrus limon*

#### a. Description botanique

*Citrus limon* est un arbuste de taille moyenne qui atteindra, en pleine terre, entre 3 et 6 m de haut. En culture, il est souvent taillé, d'une part pour limiter son encombrement, d'autre part optimiser son branchage. Ses feuilles sont persistantes, vert profond et luisantes, plus pâles sur leur revers. Elles ont une forme en fuseau, de 6 à 11 cm de long. Les feuilles sont alternes,

dentelées et leur pétiole est parfois ailée. Les feuilles sont odorantes. Les fleurs sont plutôt de petites tailles et blanc violacé, à 5 pétales blancs. Légèrement cireuse d'aspect, elle dégage un parfum très agréable. Leurs fruits, les citrons jaunes sont plus ou moins acides en fonction de la variété. Les racines sont relativement superficielles et supportent mal la concurrence de plantes voisines. Il peut vivre environ 80 ans (Blanche, 2001).

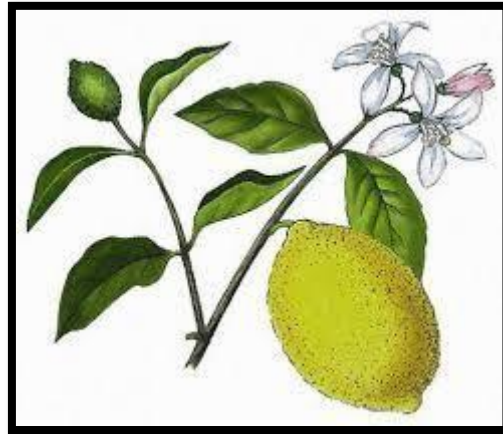


Figure 2. Rameaux du Citron *Citrus limon*(Image Google 2023)

### b. Systématique

Taxonomiquement les citrons appartiennent à :

**Classe :** Eudicotylédones

**Ordre :** Sapindales

**Famille :** Rutaceae **Genre :** *Citrus*

**Espèce :** *Citrus limon*

### c. Valeur nutritive du citron

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90 % d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est 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 (Valnet, 2001).

L'arôme du citron provient en grande partie de ses essences et huiles essentielles, abondantes dans les vacuoles de l'écorce. Il s'agit de mélange de limonènes, de citral, de citronellal, de coumarines, substances très aromatiques et pour certaines fortement amères (**Leclerc, 1984**).

### **d. Composition phytochimique**

Le limonène C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> est un hydrocarbure liquide appartenant à la famille des terpènes. Il est produit naturellement par divers végétaux, notamment les agrumes et représente le constituant majoritaire de toutes les huiles issues des peaux de ces fruits, environ 95 % (**Alioune, 2015**).

Le limonène est largement répandu dans la nature. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) rapporte que le limonène a été décelé dans plus de 300 huiles essentielles. Le limonène est un sous-produit de l'industrie des jus d'oranges, de citrons et de pamplemousses. Il est obtenu à partir de l'huile des pelures de ces agrumes dans laquelle sa concentration peut atteindre 95 % en poids (**Alioune, 2015**).

## **I.3 Les huiles essentielles**

### **I.3.1 Généralités sur les huiles essentielles**

Selon la définition de la norme française NF T 75-006 (**AFNOR, 1980**), l'huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premières modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

Les essences se différencient des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leur composition, du fait qu'elles se volatilisent à la chaleur et que leurs tâches sur le papier sont passagères. Elles se caractérisent par leurs propriétés organoleptiques (odeur, couleur et goût). A la température ambiante, elles sont généralement liquides de densité souvent inférieure à celle de l'eau. Elles sont incolores ou jaune pâle, sauf quelques exceptions comme les HEs de la cannelle (orange), de l'absinthe (vert) ou de la camomille (bleu) (**Salle, 1991 ; Budavari, 1996**).

### **I.3.2 Répartition botanique, localisation des huiles essentielles**

#### **a. Répartition botanique**

Les huiles essentielles sont largement réparties dans le règne végétal. Certaines familles en sont particulièrement riches : *Conifères*, *Myrtacées*, *Ombellifères*, *Labiées*, *Composées*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae*. Les huiles essentielles de la famille des Rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction (**Bousbia, 2011**).

### **b. Localisation des huiles essentielles et sécrétion végétale**

Les huiles essentielles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries, écorce, racines, rhizomes, fruit, bois, ...etc. Dans une même plante, elles peuvent être présentes dans différents organes. La composition des huiles essentielles peut alors varier d'un organe à l'autre.

Donc les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose, origan...), sommités fleuries (tagète, lavande...), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (gingembre, curcuma), fruits (badiane) ou graines (carvi) (**Richter, 1993 ; Boukhatemet al, 2019**). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante.

On distingue sous le nom d'appareil sécréteur l'ensemble des éléments anatomiques qui en principe, ne sont plus utilisés dans les processus métaboliques et qui n'interviennent pas dans les plantes en tant qu'agent physiologique. Les sécrétions végétales comprennent des mucilages, des huiles essentielles, des tanins, des alcaloïdes, des latex, des résines,...

Les divers éléments sécréteurs (poiles, cellules, poches, canaux,) ont souvent une structure très différenciée, chaque type se rencontre dans un petit nombre de familles ou d'espèces (**Bernard et al, 1988**).

### **I.3.3 Propriétés des huiles essentielles**

#### **a. Propriétés thérapeutiques des composés chimiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont employées depuis les temps les plus reculés pour leurs effets thérapeutiques les plus diversifiés. Les pouvoirs offerts par les HEs sont innombrables et variés. Il serait impossible de les mentionner tout. La mise en évidence de leur activité

biologique a fait l'objet de nombreuses études (Bakkaliet *al*, 2008). Il existe huit familles chimiques dans lesquelles on peut classer les huiles essentielles et de ces familles dépend leur activité (Tab. 2) qui suit :

**Tableau n° 02.** Familles chimiques et activités correspondantes  
(Valnet, 1984 ; Amor, 2006)

Famille chimique	Activités
<b>Alcools</b>	Immunostimulante, rééquilibrant du système nerveux
<b>Aldehydes</b>	Anti-infectieuse, anti-inflammatoire
<b>Cetones</b>	Immunostimulante, antimycosique, vermifuge, sédative
<b>Phénols</b>	Bactéricide puissante mais irritante
<b>Esters oxydes</b>	Antispasmodique, mucolytique, expectorante
<b>Terpènes</b>	Antiseptique des voies respiratoire (en aérosols)
<b>Coumarines</b>	Anticoagulantes, hepatostimulantes, hypnotiques
<b>Phtalides</b>	Stimulantes du foie, du rein et du pancréas

### b. Propriétés ou caractéristique organoleptique

- **Volatilité** : la volatilité des essences les oppose aux « huiles fixes ». Cette volatilité est liée à leur caractère odorant et la possibilité de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau.
- **Couleur** : elles sont généralement incolores ou jaune pâle. Il en existe cependant des exceptions : Exemple : Huiles essentielles à azulène, de coloration bleue ; ou colorées en vert c'est le cas de l'essence d'absinthe.
- **Densité** : leur densité est inférieure à 1 ; cependant il en existe trois dont la densité est supérieure à celle de l'eau : Ce sont les huiles essentielles de cannelle, de giroflier et de sassafras.
- **Solubilité** : elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools de titres élevés, dans les huiles fixes, et dans la plupart des solvants organiques.

### I.3.4 Composition chimique des huiles essentielles d'agrumes

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et

sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques (Alioune, 2015) ;

- **Terpènes** ; sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone  $C_5H_8$ . Ils sont subdivisés selon le nombre d'entité isoprènes en mono terpènes formé de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ), en sesquiterpènes formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), en di terpènes formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ) et en tétra terpènes formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes.
- **Composés aromatiques** : une autre classe de composés volatiles fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol et bien d'autres.
- **Composés phénoliques** : sont classés parmi les produits du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Ils correspondent à un vaste ensemble de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces composés, d'intérêt biologique, sont principalement présents dans les végétaux (fruits, légumes, céréales...) et dans les produits qui en dérivent (thé, jus de fruits, etc.).

### I.3.5 Localisation de la biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus limon*

Les essences des plantes sont sécrétées par des cellules spéciales, localisées au niveau de l'épiderme, souvent à la base d'un poil. 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 schézo-lisigènes réparties de façon très irrégulière (**Bruneton, 1999**).

### **I.3.6 Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

#### **a. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (**Bruneton, 1999**).

#### **b. Extraction par hydro distillation d'huile essentielle**

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Padrini et Lucheroni, 1996 ; Bruneton, 1999**).

#### **c. Expression à froid**

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes notamment chez les agrumes (citron, orange, bigarade...etc.). L'extraction se fait sans chauffage, l'écorce ou les fruits ses plantes sont pressées à froid. On utilise des presses hydrauliques. La pulpe et l'HE sont séparés à la centrifugeuse. Les zestes d'agrumes, sont séparées des fruits, les croûtes sont broyées ou hachées puis pressées pour extraire l'huile qui séparée de la phase aqueuse par différence de densité et libérer le contenu des poches sécrétrices. Le résultat est un mélange aqueux où l'huile essentielle finira par remonter à la surface (**Brunteton, 1999 ; Werner, 2002**).

#### **d. Extraction par solvants organiques**

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone.

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (AFNOR, 2000) :

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué
- Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés.

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement.

### e. Extraction par micro-onde

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-onde dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : l'huile essentielle est entraînée dans le mélange iso tropique qui se forme avec la vapeur d'eau propre à la plante traité.

## I.3.6 Activités biologiques des huiles essentielles

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

**a. Activité antioxydante :** 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.

### b. Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HES, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004**).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES 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.

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkemaet al., 1994**). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires

(**Carson et al., 2002 ; Ulteeet al., 2002**). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

### **c. Activité antifongique**

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, 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.

### **I.3.6 La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques est un phénomène biologique que la médecine aura du mal à faire disparaître. L'évolution permettra toujours aux bactéries de s'adapter. Une meilleure utilisation des antibiotiques ne pourra que ralentir l'extension des résistances et la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité. Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

Le synergisme entre les huiles essentielles et les antibiotiques a été rapporté dans plusieurs études. C'est une interaction positive créée quand l'association des deux agents, provoquent un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuels. En effet les huiles

essentielles peuvent sensibiliser le microbe pathogène à un antibiotique précédemment inefficace (**Aiyegoro et Okoh, 2009**).

Il a été démontré que certains composés de plantes peuvent inhiber efficacement les pompes à efflux impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cela pourrait conduire à la restauration de la sensibilité aux antibiotiques et de réduire leurs doses (**Fadliet al., 2012**).

L'association des huiles essentielles aux antibiotiques peut être employée pour augmenter le spectre antimicrobien (**Fadliet al., 2012**), empêcher l'apparition des mutants résistants, réduire au minimum la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique (**Lvet al., 2011**), ce qui pourrait être une alternative à la monothérapie pour des patients présentant des infections envahissantes difficile à traiter, comme ceux dues aux espèces multirésistantes(**Aiyegoro et Okoh, 2009**).



### Chapitre II. Matériel et méthodes

Le travail a été réalisé au niveau des laboratoires pédagogiques de **Biotechnologie Microbienne (Labo.15)**, **Biotechnologie Végétale (Labo.2.53)** ainsi que le laboratoire de **Biochimie Appliquée (2.32)** tous sis à la Faculté des sciences de l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes(UMBB).

Le but consiste à réaliser des opérations d'extraction des HEs de deux espèces d'agrumes, afin de tester leurs pouvoir antioxydant et antimicrobien (fongique et bactérien).

#### II.1 Matériel.

##### II.1.1. Matériel non biologiques

Le matériel non biologique utilisé pour réaliser cette étude est composé de verrerie, d'équipements, d'appareils. Il comprend aussi un ensemble de réactifs et produits chimiques (voir annexe 1).

##### II.1.2. Matériel biologique

###### II.1.2.1 Matériel végétal

Les organes végétaux choisis pour la présente étude sont les écorces de deux espèces ; l'oranger *Citrus sinensis* et le Citron *Citrus limon*.

###### II.1.2.2 Microorganismes

Les souches microbiennes(Tab.3) utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne proviennent de la collection du laboratoire de recherche **Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques** de la Faculté des Sciences, UMBB.

Les souches sont entretenues par repiquage sur milieux nutritif favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C(Bactéries) et 48h à 27°C (champignon).

**Tableau n° 03.** Souches microbienne utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Souches	Type de Gram	Références	Familles
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	ATCC25922	Enterobacteriaceae
<i>Streptocoquesp.</i>	Gram +	ATCC25923	Streptococcaceae
<i>Peniciliumsp.</i>	/	/	Trichocomaceae
<i>Aspergillus sp.</i>	/	/	Trichocomaceae

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Préparation du matériel végétale

#### a. Echantillonnage

Une quantité approximative de 4 kg d'oranges et de citron ont été sélectionnée pour l'objet de notre travail. La récolte a été faite d'une manière aléatoire en fonction de la période de maturation de chaque espèce.

**Tableau n° 04.** Présentation des deux variétés d'agrumes étudiées

Espèces	Variétés	Dénomination usuelle du fruit
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Washington Navel	Orange douce
	ValenciaLate	
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Citronnier	Citron

### b. Préparation des écorces d'orange

Les fruits (orange et citron) sont lavés avec de l'eau de robinet. L'écorce récupérée a été découpée en petits morceaux d'environ 1cm de largeur, puis déposées dans un grand récipient pour séchage à l'air libre et à une température ambiante.

### II.2.2 Extraction des huiles essentielles

#### ○ Principe

Le principe est simple on introduit une quantité suffisante de matériel végétal (tiges, feuilles, fleurs...etc.) dans un ballon en verre pyrex contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition.

On chauffe le mélange à l'aide d'un chauffe ballon. La chaleur qui s'applique sur la matière première végétale permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules contenues. Les vapeurs chargés d'huile essentielles passent à travers le tube vertical de l'essencier à huile légère, puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée. En raison de la différence de densité, l'huile essentielle surnage à la surface de l'eau. L'huile essentielle ainsi obtenu est récupérée à l'état pur ou à l'aide d'un solvant (**Azmiret *al.*, 2013**).

#### ○ Mode opératoire

100g d'écorces ont été introduits dans un ballon de 1litre contenant 500ml d'eau distillée(Photo n°1).L'ensemble est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon, l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau et passe à travers le tube vertical puis dans la colonne de refroidissement où aura lieu la condensation.

Le distillat (H+E) est récupéré dans une ampoule à décanter pour la séparation du mélange par différence de densité. Le temps d'extraction est mesuré à partir de la chute de la première goutte de distillat dans l'ampoule.

Une petite quantité d'huile essentielle a été extraite des écorces des agrumes par l'hydrodistillation. Cette quantité est en partie dissoute dans l'eau ou surnage à sa surface.



**Photo n°1.**Dispositif d'hydro distillation du type Clevenger contenant les écorces d'orange  
(Photo original 2023- Labo.2.32)

### ○ Conservation des huiles essentielles

L'huile essentielle récupérée est conservée dans des flacons recouverts en papier aluminium fermés hermétiquement au réfrigérateur à une température voisine de 4°C, pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température.

### ○ Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (MHE) et la masse de la matière végétale sèche utilisée (MVS)(Azmir *et al.*, 2013).

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huiles essentielles (R%), est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE} = \frac{\text{M.HE}}{\text{MVS}} * 100$$

- RHE: Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).
- M.HE: Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).
- MVS: Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

### II.2.3 Etude analytique des huiles essentielles extraite

#### II.2.3.1 Propriétés organoleptiques

L'analyse sensorielle des huiles essentielles extraite est extrêmement importante dans l'identification et l'évaluation de celles-ci. Elle se fait en inhalant l'H.E pour en reconnaître l'odeur et en observant à l'œil nu la couleur l'apparence et l'aspect de l'huile.

#### II.2.3.2 Propriétés physico-chimique

##### a. Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111

Elle est effectuée à l'aide d'un pycnomètre d'un millilitre de volume, à la température de 20°C.

##### b. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112

L'indice de réfraction d'une matière, est un nombre qui caractérise le pouvoir qu'a cette matière, à ralentir et à dévier la lumière. C'est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide ( $C = 299\,792\,458 \text{ km/s}$ ) et la vitesse de la lumière dans le corps transparent ( $V$ ).  $n = C/V$ .

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus-la lumière est ralenti, plus la matière à un indice de réfraction élevé. Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre à la température de laboratoire (**AFNOR, 2000**).

##### ○ Mode opératoire :

Grace a une pipette quelques gouttes de l'huile essentielle à mesurer ont été déposé sur l'ensemble de la surface du prisme inférieur du refractomètre, après avoir rabattu le prisme

supérieur, et ajustement de l'alignement sur séparation des plages claire et sombre les résultats ont été lu à travers l'observateur.

### II.2.4 Activités des huiles essentielles

#### II.2.4.1 Activités antioxydant

Le DPPH est un radical libre stable utilisé expérimentalement pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse à des stress internes ou externes. Le composé chimique DPPH est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydants des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur l'atome du pont formé par les deux azotes (Popoviciet *al.*, 2009).

##### ○ Principe

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode DPPH (1,1-diphényl-2picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno (2002).

50 µl d'extrait de fruits immatures et mûrs à différentes concentrations sont ajoutés à 1950 µl de solution méthanolique de DPPH (0,0025g/ml). Après homogénéisation, le mélange est préservé à l'obscurité pendant 30 minutes et la densité optique lue à 515 nm. Le témoin négatif ne contient que la solution de DPPH et le témoin positif est représenté par des solutions antioxydants standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé(Fig. 3).

##### ○ Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon Sanchez-Moreno (2002), l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (A %) est calculée de la manière suivante :

$$A\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

- **A blanc** : absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol)
- **A échantillon** : absorbance du composé d'essai.

La concentration en extrait d'huiles essentielle et en vitamine C, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracée à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre

est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initial de 50%.

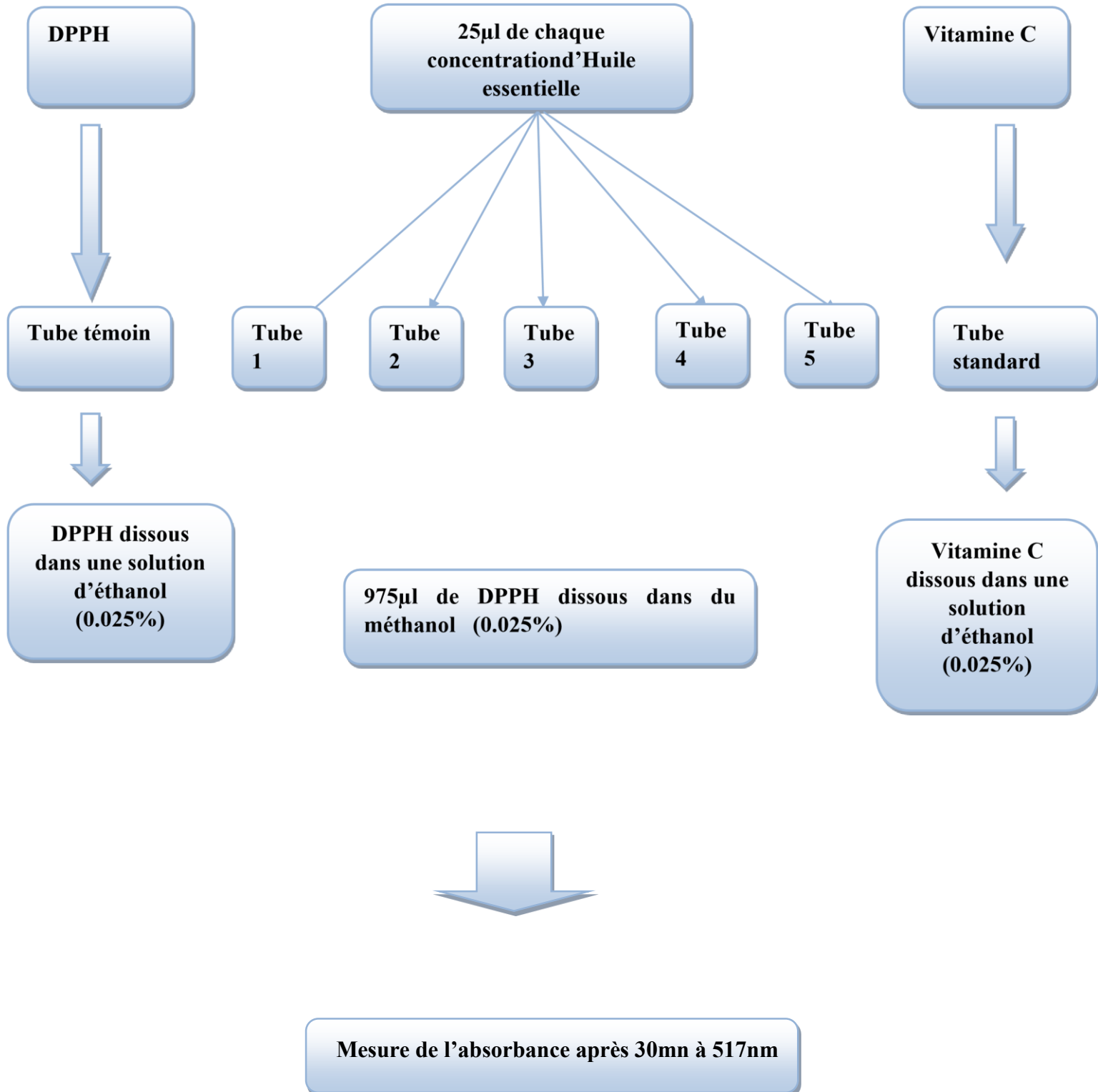


Figure n°3. Schéma récapitulatif de protocole expérimental de l'activité antioxydants.

### II.2.4.2 Activités antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* de nos H.Es, nous avons utilisé la méthode de la diffusion sur milieu gélosé ou aromatoگرامme standardisée par NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standards) citée par **Celiktaset al., (2007)**. Et qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance des agents microbiens par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque imprégné de l'extrait.

#### ○ Principe

L'activité antimicrobienne est testée *in vitro* par la méthode de diffusion des disques en milieu solide (**Liaoet al., 2010**). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme (**Duva et Soussy, 1990**). C'est-à-dire, l'application de disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. La présence de l'activité antimicrobienne, se manifeste par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour du disque qui correspond à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible.

#### ○ Préparation des dilutions des huiles essentielles

Une solution mère de l'extrait d'HE des écorces d'orange et de citron est diluée dans une quantité bien déterminée de diméthylsulfoxyde (DMSO) (**Kossonouet al., 2019**). Ainsi des concertations sont effectuées selon la méthode de test de l'activité antifongique utilisée, et la dilution de l'HE est effectuée comme suite :

- Première dilution 5% 50 µl HE + 950 µl DMSO
- Deuxième dilution 10% 100 µl HE + 900 µl DMSO
- Troisième dilution 50% 500 µl HE + 500 µl DMSO
- Quatrième dilution (HE pure) 100% 1000 µl HE + 0 µl DMSO

#### II.2.4.2.1 Evaluation de l'activité antifongique

##### a. Préparation des souches fongique

L'inoculum est fait à partir des suspensions des colonies jeunes de champignons dans une solution saline à 0,9 % stérile. Les colonies isolées ont été prélevées à l'aide d'une anse de

platine ensuite homogénéisées dans de l'eau physiologique. Il faut noter que pour obtenir une suspension de  $10^8$  germes/ml, l'absorbance doit être de l'ordre 2 à 3 à une longueur d'onde de 620 nm.

### **b. Préparation du milieu et inoculation**

Dans chaque boîte de Pétri, on étale de manière uniforme sur le milieu de culture PDA une quantité de 50µl de la suspension sporale préparée déjà au même jour. Les boîtes sont séchées pendant quelques minutes à l'étuve à 24°C.

Les disques de 6 mm de diamètre et imprégnés d'huile essentielle (selon la dose) sont déposés aseptiquement sur la gélose inoculée.

### **c. Incubation et lecture**

Les boîtes sont incubées à une température de 24 °C pendant cinq jours. Ensuite une lecture des résultats se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de la souche fongique au voisinage des disques chargés par les différentes concentrations de l'huiles testée (**Boudjehem, 2019**).

## **II.2.4.2.2 Evaluation de l'activité antibactérienne**

### **a. Préparation des souches microbiennes.**

La revivification des souches, est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur l'activité biologique est nulle à l'état conservé. Elle a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure, et se fait en réalisant un repiquage sur gélose nutritive favorable à la croissance.

En premier, les souches bactériennes de référence ont été sorties du réfrigérateur et laissées sur la paillasse pour revenir à température ambiante, puis, nous avonsensemencé par stries les boîtes de Gélose nutritif pour les bactéries. L'incubation des boîtes se fait dans l'étuve à 37°C pendant 24h (**Torres et al., 2016**).

### **b. Préparation du milieu**

Faire fondre le milieu Muller Hinton (MH) au Bain-Marie à 65°C, ensuite verser aseptiquement une couche de 10 ml dans les boîtes de pétri, laisser refroidir sur la paillasse.

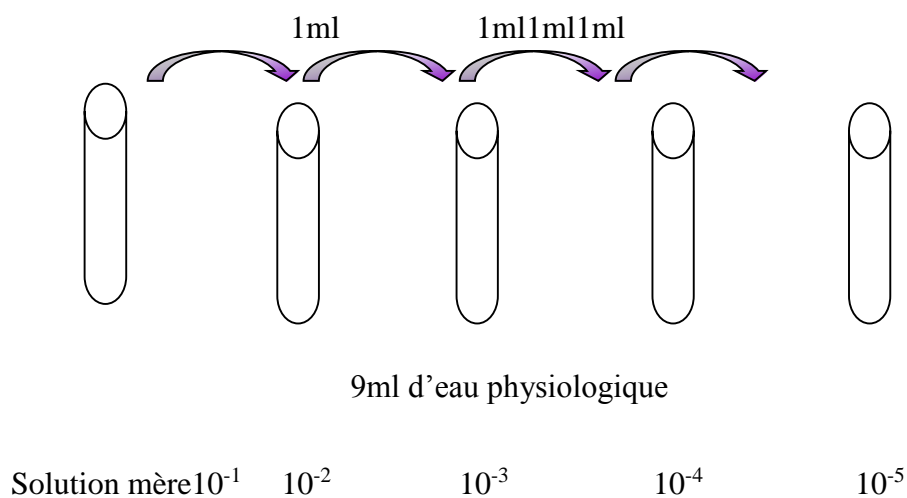
### **c. Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune, en prélevant 3 à 5 colonies qui sont diluées dans 9 ml à 10 ml d'eau physiologique stérile.

Réaliser une lecture de la densité de chacune des suspensions préparées, à l'aide d'un spectrophotomètre une longueur d'onde de 620nm.

L'absorbance doit être comprise entre 0.22 et 0.32 pour les bactéries ce que correspondons à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes /ml (la concentration minimale qui assure la croissance microbienne).

A partir de la solution mère (Fig. 4) on prépare les dilutions  $10^{-2}$  à  $10^{-5}$



**Figure n°4. Schéma de préparation des dilutions décimales.**

#### d. Préparation des disques

Des disques (patches) de 6mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1 puis autoclavé à  $120^{\circ}\text{C}$  pendant 15min. À l'aide d'une pince stérile, les disques ont été déposés sur la surface du milieu ensemencé, et rapidement à l'aide d'une micropipette les disques sont chargés par  $10\mu\text{l}$  de chaque concentration préparée précédemment.

L'incubation se fait à  $37^{\circ}\text{C}$  à l'étuve pendant, 24 heures (Duva et Soussy, 1990). e.

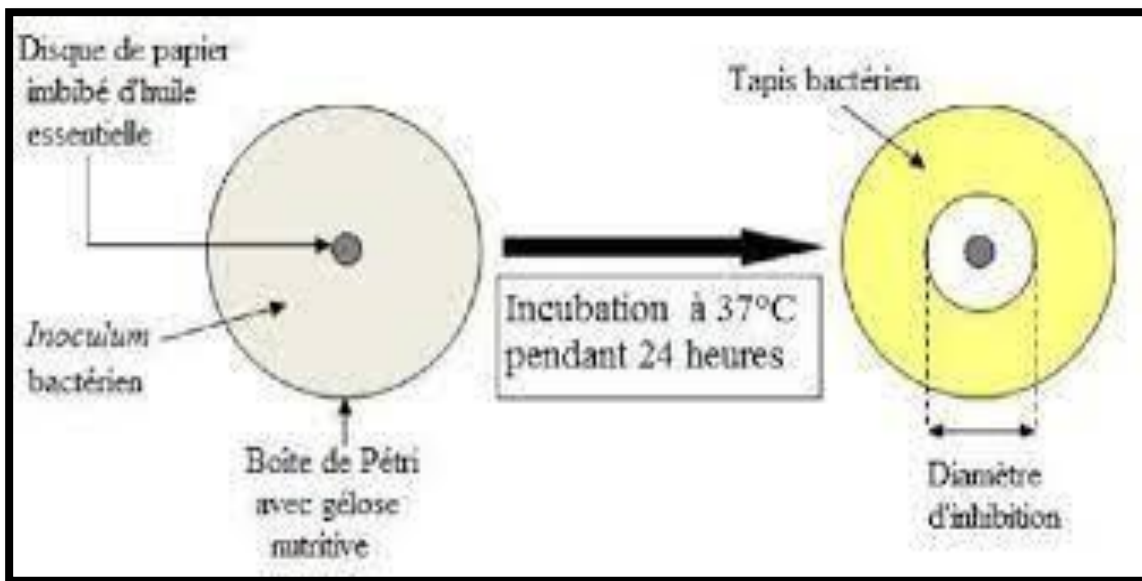
#### Lecture

La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour du disque.

L'interprétation des résultats se fait selon l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donné par Meene et Sethi (1994) et AboulEla *et al.*, (1996) mentionnant que ces diamètres

des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont divisés en quatre classe(pour les disques 6mm)(Fig. 5).

- Non inhibitrice : diamètre de la zone d'inhibition <7mm.
- Légèrement inhibitrice:7mm< diamètre de la zone d'inhibition <13mm
- Modérément inhibitrice:13< diamètre de la zone d'inhibition <25 □ Diamètre de la zone d'inhibition >25mm fortement inhibitrice.



**Figure n°5. Principe de la méthode de diffusion sur disques des huiles essentielles (Ouaaral., 2018)**



### Chapitre III. Résultats et discussions

#### III.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles que nous avons réalisée représente un créneau de recherches utiles dans la mesure où elle permet la valorisation des ressources phytogénétiques locales.

##### III.1.1. Résultats des rendements d'extraction

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau permet d'extraire les composés organiques des plantes aromatiques.

A l'issue de la distillation, on obtient par différence de densité l'huile essentielle (ou distillat) et l'hydrolat aromatique. Les composés obtenus après entraînement à la vapeur d'eau, à partir de la plante étudiée, se distinguent par une durée de distillation qui est plus ou moins croissante selon la quantité de végétale mise en expérimentation. Cette différence est peut-être liée au temps de séchage mis par nos échantillons, ou également à la quantité de la matière sèche utilisée.

Nous avons réalisé 03 distillations de 1h30 à 2h pour chacun des deux échantillons d'écorces (citron et écorce), les résultats du mode opératoire sont présentés dans le tableau 04 qui suit :

**Tableau n° 05. Résultats du rendement en huile essentielle de *Citrus sinensis* et *Citrus limon***

Ech.	Masse de matière végétale utilisée (g)	Masse d'huile essentielle obtenue (g)	Quantité d'eau (L)	Temps d'hydrodistillation (heure)	RDT HE (%)	Moyenne RDT (%)
Ec.C	120 g	1,574 g	500 ml	2 h	1.311	1.237
	100 g	0,996 g		2 h	0.996	
	80 g	0,562 g		1h45	0.702	
Ec.O	100 g	2,200 g		2 h	2,200	2.16
	80 g	1.734 g		2 h	2.167	
	80 g	1.691g			1h45	2.113

**Ec.C** Echantillon écorce Citron – **Ec.O** Echantillon écorce Orange. RDT. Rendement – HE. Huile Essentielle

Le rendement en huile essentielle de *Citrus limon*, extraite par hydrodistillation est de 1.237%. **Rega et al. (2003)** ont rapporté que les rendements en huile essentielle chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%.

Cependant, **Jeannot *et al.* (2005)** et **Fuselli *et al.* (2008)** ont observé des rendements faibles allant de 0,7 à 0,9 % pour l'huile essentielle de *Citrus limon*.

Aussi, **Himed, (2011)** a obtenu chez le citronnier une quantité d'huile essentielle de 2,18%, alors que **Sayah *et al.* (2014)** et **El-Khal *et al.*, (2014)** ont mentionné les deux un rendement moyen de 1,2 chez le *Citrus aurantiun* une autres espèces du genre *Citrus*.

Cette différence de rendement chez les *Citrus* pourrait être expliqué par les conditions de culture, le choix de la période de la récolte, l'organe utilisé, la durée de séchage, les stress

La comparaison entre les huiles essentielles des deux échantillons *Citrus sinensis* et *Citrus limon* a montré que le rendement de *C. limon* est légèrement plus élevé que celui de *C.sinensis*.

### III.1.2 Résultats des caractéristiques organoleptiques

Selon **AFNOR (2000)**, les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus au moins colorées et leur densité est inférieur à celle de l'eau.

Après avoir recueilli l'huile essentielle, celles-ci nous ont permis de définir les caractères organoleptiques et qui sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau n° 06. Résultats des caractères organoleptiques des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus limon***

Echantillon	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur	Solubilité
<b>HE de <i>Citrus sinensis</i></b>	Liquide limpide	Transparente	Fraîche, aromatique caractéristique de l'orange	Légèrement piquant	Liposoluble
<b>HE de <i>Citrus limon</i></b>	Liquide limpide	Jaune pâle	Fraîche, aromatique caractéristique du citron	Aromatique Amer	Liposoluble

L'évaluation correcte des propriétés organoleptiques des huiles essentielles revêt une très grande importance commerciale dans l'industrie pharmaceutique. Les critères organoleptiques, les plus importants concernant beaucoup plus l'odeur, la couleur et la saveur, qui participent à la détermination de la qualité de nos H.E, et sont souvent liées à la maturité de notre végétal, aussi à la présence d'impureté à cause d'une mauvaise extraction ou d'un mauvais séchage (présence de microorganismes, de champignons,). Aussi les propriétés

organoleptiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. A partir de ces valeurs, il en ressort que toutes ces constantes sont influencées par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturelles (**Dermane, 1985 ; Gilly, 1997 ; Lis-Blachin, 2002**).

### III.1.3. Propriétés physico-chimiques

#### III.1.3.1 Indice de réfraction

L'indice de réfraction est déterminé selon un protocole précis et obéit à des normes édictées par l'association française de normalisation (**AFNOR, 1986**).

L'indice de réfraction est utilisé :

- Pour identifier une HE
- Comme critère de pureté des huiles essentielles

Les résultats obtenus dans notre étude, sont comparés à la norme (**AFNOR, 2000**) et regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau n° 07.** Valeurs des indices de réfraction des huiles essentielles obtenues.

Huile essentielle	Indice de réfraction	Norme AFNOR
HE de <i>Citrus sinensis</i>	1.469	1.460-1.476
HE de <i>Citrus limon</i>	1.470	1.460-1.476

Les valeurs des indices de réfraction pour les huiles essentielles obtenues dans notre étude sont conformes à la norme **AFNOR (2000)**.

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides et de la température, le faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques.

Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Plus l'indice de réfraction est faible, plus le composé est pur, donc plus il est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande (**Kara et Saidi, 2016**).

### III.1.3.2 Résultat de la mesure de la densité

La mesure de la densité se fait selon la norme NF T 75-111. Les résultats de ce paramètre physique, sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau n° 08.** Valeurs de la mesure de la densité des huiles essentielles obtenues.

Huile essentielle	Densité
HE de <i>Citrus sinensis</i>	0.801
HE de <i>Citrus limon</i>	0.842

Ce paramètre répond aux critères de qualité des huiles essentielles fixées par les organismes internationaux qui doit être inférieurs à 0.925 selon les normes d'AFNOR. Les propriétés physicochimiques des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation pour les deux espèces d'agrumes utilisées suggèrent une huile essentielle de très bonne qualité.

## III.2. Résultats de l'activité des huiles essentielles

### III.2.1. Activité antioxydante

Le DPPH est un radical libre qui accepte un électron ou un proton pour devenir stable (Gulçin *et al.*, 2010). Le maximum d'absorption du DPPH est de 517nm. La diminution de l'absorbance, causée par les antioxydants, est due à une réaction entre les molécules antioxydantes et le radical. Ceci est visible par le changement de couleur du pourpre au jaune.

C'est pourquoi le DPPH est usuellement utilisé comme substrat pour évaluer l'activité antioxydante (Elmastas *et al.*, 2006).

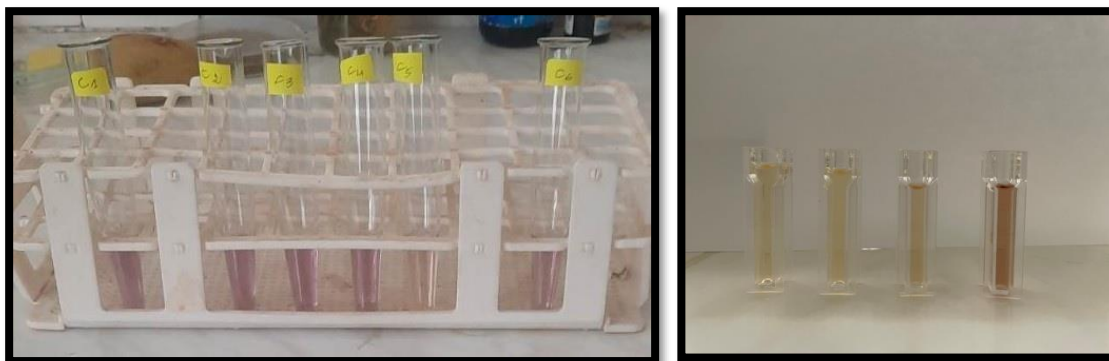
L'activité antioxydant est estimée en pourcentage d'inhibition ou en pourcentage de l'activité antioxydant, selon la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante} = (\text{contrôle Abs} - \text{test Abs}) / (\text{contrôle Abs} \times 100)$$

Où, Abs est l'absorbance lue à 515 nm.

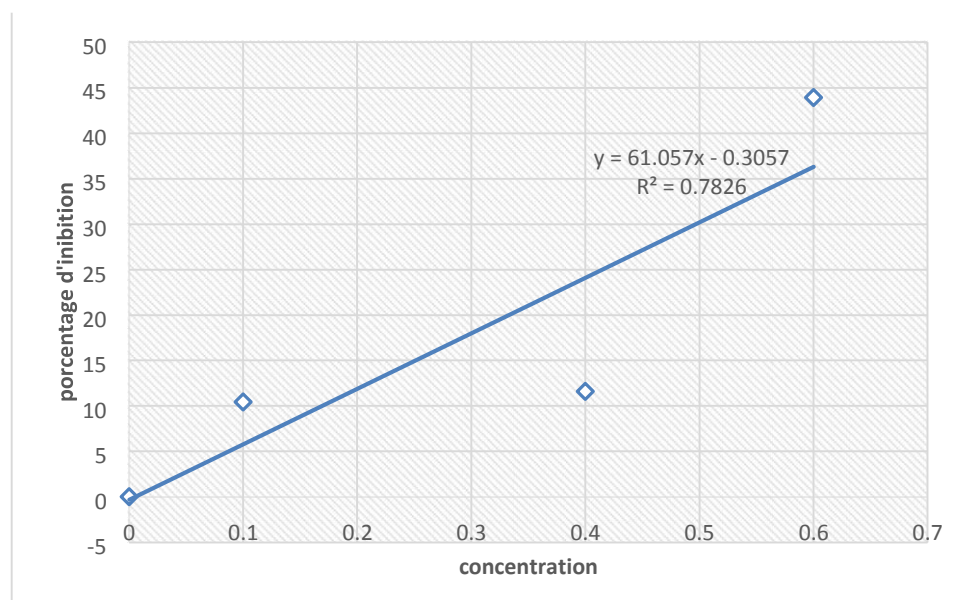
La concentration en milligramme d'extrait sec par millilitre de solvant (mg/ml) qui inhibe la formation de 50 % de radicaux libres DPPH est définie par la valeur IC<sub>50</sub>.

Après 30 min d'incubation à l'obscurité de la solution DPPH-extrait (HE) (à différentes concentrations), la coloration violette vire vers une coloration plus claire du rosé au jaune avec la dilution C<sub>5</sub> (**photo n°2**). Ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH, ce qui montre que l'échantillon a un effet Scavenger de radical DPPH (**Ghasmi *et al.*, 2009**).



**Photo n°2.** Virement de couleur la solution DPPH-extrait des huiles essentielles de *Citrus limon*(Originale. 2023)

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *C. limon* a été faite en comparaison avec celle de l'acide ascorbique. Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe nous permettant de déterminer pourcentage d'inhibition (I%) du DPPH en fonction de différentes concentrations utiliser (Fig. 6).



**Figure n° 6.** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique

### **Détermination de l'IC50**

L'activité antioxydante évaluée pour l'HE de Citrus limon ainsi que les standards (contrôle positif) utilisés est exprimée en IC50 (concentration inhibitrice 50) ; c'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% de radical libre (DPPH), plus l'IC50 est faible plus l'extrait est avec un potentiel antioxydant puissant. L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC.

D'après nos résultats l'huile essentielle de *C. limon* a transformé le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (coloré en violet) au diphenylpicrylhydrazine (coloré en jaune) avec un IC50 de **38.691mg/ml**.

Cependant, l'acide ascorbique ayant l'IC<sub>50</sub> le plus faible, de **0.083 mg/ml**, possède alors la plus grande activité anti-radicalaire comparativement à notre extraits d'HE.

**Ghasemi et al. (2009)** ont signalé que l'activité anti-radicalaire des écorces de citron et d'orange représentait des valeurs d'IC50 de l'ordre de 1,4 mg/ml et 1,1 mg/ml respectivement, qui sont significativement inférieures comparés à nos résultats.

### **III.2.2. Activité antimicrobienne**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* à était testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose. Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme avec l'application des disques imprégnés des échantillons (extraits, huiles...etc.) sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antimicrobienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques. Le diamètre mesuré donne une donnée qualitative de l'inhibition, avec comme règle plus le diamètre d'inhibition est important, plus l'échantillon testé présente une activité antibactérienne importante (**Ouaaral., 2018**).

Les souches testées toutes ATCC sélectionné pour déceler l'activité antibactérienne des échantillons d'huiles essentielles de l'écorce d'orange et de citron sont : *Escherichia coli* (Gram-) et *Streptocoque sp.* (Gram +). Ce choix est guidé par la différence au niveau caractère gram – ou +.




Les résultats qualitatifs de l'effet inhibiteur des huiles essentielles sur les souches bactériennes étudiées sont représentés dans les tableaux 8 et 9, et sont exprimés suivant la sensibilité des germes testés à travers les diamètres obtenus.

### Chapitre III. Résultats et discussions

**Tableau n° 09.** Les diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes testées des HE de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*

Extraits	N <sup>b</sup> d'essais	Les zones d'inhibition (mm) autour des disques imprégnés d'extrait de plante (la concentration de l'extrait 10µl /disque).			
		Les souches bactériennes		Moyennes (mm)	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus sp.</i>		
Témoins	Eau	06	06	06	06
	DMSO	06	06		
<b>HE</b> <i>Citrus sinensis</i>	1	11	09	10	08.33
	2	09	09		
	3	10	07		
<b>HE</b> <i>Citrus limon</i>	1	15	12	12	10.33
	2	11	10		
	3	10	09		

**Tableau n° 10.** Photos des zones d'inhibition des souches bactériennes testées des HE de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*

Extraits	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	Transcription	Sensibilité
Témoins 1 Eau distillé			-	Résistant
Témoins 2 DMSO			-	Résistant

<b>HE</b> <i>Citrus sinensis</i>			±	Peu Sensible
<b>HE</b> <i>Citrus limon</i>		/	+	Sensible

Il ressort que les extraits d'huile essentielle des écores de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* ont exercé une activité inhibitrice sur les bactéries : *Escherichia coli* et *Streptococcus sp.*

Les témoins n'ont affiché aucune activité ce qui nous permet de mieux apprécier l'action de nos huiles essentielles.

Les zones d'inhibition les plus élevés sont obtenus par HE de *Citrus limon* pour *Escherichia coli* (Gram-) avec un diamètre de **12 mm** suivie toujours du même extrait pour *Streptococcus sp.* (Gram+) avec un diamètre de **10,33mm**.

Les différences de diamètres d'inhibition entre les Gram+ et les Gram- sont peut-être expliquer par la différence et la variété structurale et la nature de leurs membranes externes qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharide, ce qui rend cette membrane imperméable à la plupart des agents biocides, ce qui concorde avec les résultats des effets des extraits de plante les plus efficace sur les Gram négatifs. Cette différence peut être due également aux mécanismes de défense des bactéries contre les molécules antimicrobiennes (Fisher et Philips, 2006).

*Il ressort de nos résultats ;*

- **Des extraits à fort effet antimicrobien :** le diamètre de la zone d'inhibition est à l'intervalle de 11 à 13 mm. Et donc, la souche test est sensible aux extraits. Il s'agit HE de *Citrus limon* avec un diamètre de 12 mm sur *Escherichia coli*.
- **Des extraits à effet moyen :** le diamètre de la zone d'inhibition est à l'intervalle de 10 à 11 mm. Il s'agit de l'HE de *Citrus sinensis* avec un diamètre de 10mm sur *Escherichia coli*.

### Chapitre III. Résultats et discussions

Et de l'HE de *Citrus limon* avec un diamètre de 10.33 mm sur *Streptococcus sp.*

- **Des extraits à effet nulle** : le diamètre de la zone d'inhibition est égal ou inférieur à 6 mm. Obtenu uniquement avec les témoins (eau distillé et DMSO).

D'après **Cakir *et al*, (2004)** les résultats de plusieurs travaux sont montrés que l'huile essentielle de *Citrus limon* avait une certaine activité antibactérienne sur tous les agents pathogènes testés. Cette activité est associée aux composants phytochimiques des huiles essentielles ou à l'hydrocarbure mono terpénique ou sesquiterpénique et leurs dérivés oxygénés qui sont les principaux composants des huiles essentielles présentant des activités antimicrobiennes.

Les résultats qualitatifs de l'effet inhibiteur des huiles essentielles sur les souches fongiques étudiées sont représentés dans le tableau 9, et sont exprimés suivant la sensibilité des germes testés à travers les diamètres obtenus.

**Tableau n° 11.** Les diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques testées des HE de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*

Extraits	N <sup>b</sup> d'essais	Les zones d'inhibition (mm) autour des disques imprégnés d'extrait de plante (la concentration de l'extrait 10µl /disque).			
		Les souches bactériennes		Moyennes (mm)	
		<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>		
Témoins	Eau	06	06	06	06
	DMSO	06	06		
<b>HE</b>	1	08	06		
<i>Citrus sinensis</i>	2	09	06	07.66	06.33
	3	06	07		
<b>HE</b> <i>Citrus limon</i>	1	10	08	09.33	07.33
	2	09	06		
	3	09	08		

### Chapitre III. Résultats et discussions

---

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles des écores de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* (tableau 9), montrent une faible activité inhibitrice sur toutes les souches mycéliennes testées. Le DMSO et l'eau distillée ont été testés comme contrôle négatif, les résultats montrent que le solvant (DMSO) ne présente aucun effet sur la croissance des souches fongiques. La majorité de zones obtenues sont inférieures à 10 mm et varie de 6mm à 9.33 mm obtenu avec l'huile essentielle de *Citrus Limon* sur *Aspergillus sp.*



### Conclusion et perspectives

Les HEs sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés biologiques très intéressantes à mettre à profit dans divers domaines : industrie pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, etc. Les agrumes occupent aujourd'hui la seconde place dans les échanges mondiaux des produits végétaux. Dans l'industrie agroalimentaire, les oranges et les citrons sont largement exploitées pour en extraire leur jus, vitamine C, voire des pectines. Mais, les déchets de ces transformations, principalement les écorces, sont souvent jetées (**Praloran, 1971 ; Padrini et Lucheroni, 1996 ; Hellal, 2011 ; Himed, 2011**). Or, ces dernières peuvent nous fournir des composés à propriétés biologiques importantes notamment les huiles essentielles. Dans ce travail, nous avons procédé à une étude comparative entre les huiles essentielles extraites des écorces de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

L'extraction des HEs montre que le rendement le plus élevé est obtenu chez l'écorce de l'orange avec **2.16 %** contre **1.237%** pour les écorces du citron. Concernant les caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques, les huiles essentielles étudiées demeurent conformes aux normes internationales.

D'une façon générale, les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles sont variables selon beaucoup de facteurs (lieu de provenance, climat et ses diverses modifications, période de grandes pluies ou de sécheresses prolongées, époque et moyens de récolte, procédés d'extraction, etc.). Ceci explique la marge, souvent assez grande, laissée dans les constantes et pourcentage des composantes (**Valnet, 1984**).

Aussi le rendement en huiles essentielles varie suivant divers facteurs : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes la partie utilisée de la plante, méthode d'extraction (**Bruneton, 1999 ; Svoboda et Hampson, 1999**).

Les résultats d'activité antioxydant de l'huiles essentielle de *Citrus limon* a été réalisé par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH en déterminant leur efficace (IC50) suivant ce paramètre, l'extrait de l'écorce de citron à donner des résultats très intéressant avec un IC50 de 38.691 µg/ml.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des écores de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* ont fait ressortir une activité inhibitrice sur les bactéries : *Escherichia coli* et *Streptococcus sp.*

Les témoins n'ont affiché aucune activité ce qui nous permet de mieux apprécier l'action de nos huiles essentiels. Et les zones d'inhibition les plus élevés sont obtenus par HE de *Citrus limon* pour *Escherichia coli* (Gram-) avec un diamètre de **12 mm** suivie toujours du même extrait pour *Streptococcus sp.* (Gram+) avec un diamètre de **10,33 mm**.

Par ailleurs, l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielle a révélé une faible inhibition. La majorité de zones obtenues sont inférieurs à 10 mm et varie de **6mm** à **9.33 mm** obtenu avec l'huile essentielle de *Citrus limon* sur *Aspergillus sp.*

En perspectives de ce travail il serait intéressant de :

- Faire plus d'analyses sur la composition chimique des HEs (HPLC, CGMS). ○  
Tester nos huiles sur une plus large gamme de souches résistantes.
- Elargir la recherche de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et polyphénols.
- Travailler sur d'autres espèces du genre *Citrus*.

## Références bibliographiques

- **Ademosun A. O., Oboh G., Olasehinde T. A., et Adeoyo O. O. (2018).** From folk medicine to functional food: A review on the bioactive components and pharmacological properties of citrus peels. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(1), 9- 20. <https://doi.org/10.1007/s13596-017-0292-8>.
- **AFNOR, (2000).** Huiles essentielles. Association Française de Normalisation. *Ed. : Paris-La Défense*, 465p.
- **Aiyegoro OA et Okoh AI. (2009).** Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(13), 1147-1152.
- **Alioune F., (2015).** Etude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange. Mémoire Univ. Tizi Ouzou.
- **Amor M.(2006).** « Les Huiles essentielles », *Phyton Pathos*.
- **Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M., Ghafoor K., Norulaini N. et Omar A., (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117 : 426-436.
- **Bakkali, F. Averbeck, S. Averbeck, D. Idaomar, M. (2008).** Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.
- **Barrales, F. M., Silveira, P., Barbosa, P. de P. M., Ruviano, A. R., Paulino, B. N., Pastore, G. M., Macedo, G. A., et Martinez, J. (2018).** Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids—An application to orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 112, 9- 21. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.006>
- **Bekhechi C., Abdelouahid D. (2010).** Les huiles essentielles. Office des publications Universitaires. P 14, 31 et 32.
- **Belaïche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine SA., tome1. 9-128.
- **Benedicte, B., Baches, M., (2011).** Livre des agrumes. Ed : Eugen Ulmer, 08 rue Blanche, 75009, Paris, 440-01. Adresse URL : [www.editins-ulmer.fr](http://www.editins-ulmer.fr).
- **Benediste A. et Baches M., (2002).** Agrumes. Ed. UgenUlmer, PARIS, n° 132, 96 p.
- **Bernard, T. Perineau, F. Bravo P. Delmas, M. et Gaset, A. (1988).** « Informations chimie », Oct, n° 298, 179.
- **Blancke, R., (2001).** Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
- **Boudjehem, W. (2019).** Etude de l'activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles pour le contrôle des agents phytopathogènes. Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de

Master : Phytopharmacie et protection des végétaux. Guelma : Université 8 Mai 1945 Guelma, 84 p.

- **Boughendjioua H. (2015).** Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomumzeylanicum* et *Thymus numidicus* UNIVERSITEBADJIMOKTAR. ANNABA.
- **Boukabache M., et Boudjefdjouf F., (2016).** Extraction, identification de l'huile essentielle par CPG-SM de l'espèce Citrus limon et mise en évidence de son activité antibactérienne. Fabrication du parfum. Univ. Constantine, P62.
- **Boukhatem, M. N., Ferhat, A., Kameli, A. (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature.
- **Bounab D. et Chaabi Y. (2018).** Étude de la variabilité morphologique au sein d'une collection d'agrumes cultivée dans l'Est Algérien w Skikda p 05- 09.
- **Bousbia N., (2011).** Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduit agroalimentaire. Univ. D'Avignon et des Pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger,
- **Bousbia, N., (2009).** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris. P 488.
- **Bruneton, J., (1987).** Mono et sesquiterpènes In elements de photochimie et de pharmacognosie. Ed : Tec & Doc., Lavoisier, Paris, 223-234
- **Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie- phytochimie- Plantes médicinales. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1220 p.
- **Budavari, S. O'Neil, M. J. Smith, A. Heckelman, P.E.; Kinneary, J.F. (1996).** The Merk Index-Twelfth edition, Whitehouse Station: Merk and Co, INC. 2350.
- **Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253.
- **Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S., HiratA T. (2004).** Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericumhyssopifolium* and *Hypericumheterophyllum*. FlavFrag J, 19-62–8.
- **Carson CF, Mee BJ et Riley TV., (2002).** Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1914-1920

- **Celiktas, OY., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. (2007).** In vitro antioxidant activities of *Rosmarinusbinus* L. Seed oil : a potential solvent-free and high antioxydative edible oil. Food chemistry, 6 : 1291-1296.
- **Douat, R. (2004).** Oranges et citrons. Edition de Vecchisa. Paris. p8-13.
- **Duval J, Soussy CJ. (1990).** Antibiothérapie, bases bactériologiques pour l'utilisation. Ed. Piccin. 288- 436.
- **Dupuy, A., (2010).** Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire: Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huile essentielle d'agrumes. AgroParisTech
- **El Otmani (2005).** Les agrumes le marechage et le froid hivernale agadir. Maroc N°127.
- **EL-Akhal F., Guemmouh R., Greche H. et EL OualiLalami A., (2014).** Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc. J. Mater. Environ. Sci. 5 (S1), pp. 2319-2324.
- **Elmastaş M., Gülçin İ., IşildakÖKüfrevioğlu., Ö.İ., İbaogluK.andAboul-Enein H.Y. (2006).** Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts Journal of the Iranian Chemical Society. 3: 258-266.
- **El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., et Zacarías, L. (2011).** *Citrus spp* .: Orange, mandarin, tangerine, clémentine, grapefruit, pomelo, limon and lime. In Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits (p. 437-516e). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092762.437>.
- **Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui N, Pagès J.M et Hassani L., (2012).** Antibacterial Activity of *Thymus Maroccanus* and *Thymus Broussonetii* essential oils against nosocomial infection bacteria and their synergistic potential with antibiotics. Phytomedicine. 19, 464–471.
- **Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010).** Citrus d'Algérie, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. Office des Publications Universitaires. P 38, 42, 52-57.
- **Fisher K., Philips C., (2006).** The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology. 101, 1232-1240.
- **Fuselli S.R. Garcia De la Rosa S. B., Euguarus, M.J. Fritz R. (2008).** Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essence on Honebee bacterial pathogen *Pacnibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood., Word J. Microbial. Biothechnol., 24. 2067-2072.

- 
- **Ghasemi, K., Ghasmi, Y., et Ebrahimzadeh, M. A. (2009).** Antioxydant activity, phenol and flavonoid contents of 13 *Citrus* species peels and tissues. *Pak J PharmSci*, 22(3), 277-281.
- Gang Ma, Zhang, L., Sugiura, M., et Kato, M. (2020).** Citrus and health. In *The Genus Citrus* (p. 495- 511). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00024-3>
- **Gogny, M, Puyt, J.D et Pellerin. J.L.,(2001).** Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire. Edition le point vétérinaire. pp. 165-168.
- **González- Sarrías, A., Tomás- Barberán, F. A., et García- Villalba, R. (2020).** Structural Diversity of Polyphenols and Distribution in Foods. In F. A. Tomás- Barberán, A. González- Sarrías, et R. García- Villalba (Éds.), *Dietary Polyphenols* (1re éd., p. 1- 29). **Wiley.** <https://doi.org/10.1002/9781119563754.ch1>
- **Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker LJ., Cars O., Davey PG., (2006).** National campaigns to improve antibiotic use. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62: 373-379
- **Goris, A. (1967).** Manuel de botanique. Ed. Clin. pp. 265-268.
- **Gulçin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y. ET Aboul-Eein, d. (2010).** Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*. 3: 43-53.
- **Hellal Z., (2011),** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pulchardus*), *Mém. Mag., univ. Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou*, p. 120.
- **Himed L., (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine, *Th. Mag. Univ. Mentouri, Constantine, Algérie*, p.65.
- **Jagveer Singh, Vishal Sharma, Kuldeep Pandey, Shahnawaz Ahmed, Manveen Kaur and Gurupkar Singh Sidhu (2021).** Classification of Citrus-Cultivars March 9th.
- **Jeannot V. Chahboun J. Russel D. Baret P. (2005).** Quantification and determination of chemical composition of essential oils extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium* L. ssp.aurantium), *Int. J. Aromather.*, 15 (2) (94-97).
- **Kalemba D et Kunicka A., (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10, 813-829.
- **Karou D., Dicko M., Simpore J. and Traore A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4: 823-828.
- **Kossonou, Yk., Kouakou-Kouame, A. Koffi, A. C. Koffi, Y. M. Tra, B.F.H. Tano, K. (2019).** Activité Antifongique in vitro des extraits de cinq plantes locales sur *ColletotrichumHigginsianum*, *FusariumOxysporum* et *RhizopusStolonifer*, Agents Pathogènes

- de la Papaye (*Caricapapaya* L.) et de la Tomate (*SolanumLycopersicum* L). European Scientific Journal March, Vol 15. N°9, 304-321.
- **Leclerc (1984)**. Culture fruitière dans l'Archipel des Comore ; une évaluation phytosanitaire.
- **Loussert., (1989)**. Les agrumes. 2. Production Edition Lavoisier, Paris, 157.
- **Lv F, Liang H, Yuan Q et Li C., (2011)**. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International. 44, 3057–3064
- **Matrose, N. A., Obikeze, K., Belay, Z. A., et Caleb, O. J. (2021)**. Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens : A review. Food Bioscience, 41, 100840. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100840>
- **Meyer. A, Deliana. J et Bernard. A. (2004)**. Coure de microbiologie générale, Doin Éditeurs, 2° édition, France. P257
- **Morcia, C., Tumino, G., et Terzi, V. (2013)**. Plant Bioactive Metabolites for Cereal Protection Against Fungal Pathogens. In M. Razzaghi-Abyanehet M. Rai (Éds.), Antifungal Metabolites from Plants (p.401-427). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-64238076-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-64238076-1_14)
- **Newman DJ, Cragg GM, et SnaderKM., (2003)**. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 66: 1022-1037
- **Normak HB., et Normak S., (2002)**. Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of Internal Medicine 252: 91-106
- **Ogawara, H., (1981)**. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. Microbial. Rev.45(4), 591-619
- **Olabinjo, O. O., Ogunlowo, A. S., Ajayi, O. O., et Olalusi, A. P. (2017)**. Analysis of physical and chemical composition of sweet orange (*Citrus sinensis*) peels. International journal of environment, Agriculture and Biotechnology, 2(4), 238892
- **Padrini, P. et Lucheroni, M.T., (1996)**. Le grand livre des huiles essentielles- guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences. Ed : De Vecchi, Paris □ **Praloran C. (1971)**. Les agrumes. Ed Editeur 8348. Paris n° 5 p25.
- **Rapilly, F. (2001)**. Champignons des plantes : Les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III Sciences de la Vie, 324(10), 893-898.
- **Raynaud S. (2019)**. « Citron: qu'est-ce que c'est ». 15 JUIN.
- **Rega B., Fournier N., Guichard E. et Russell R. (2003)**. Citrus flavor Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51.117-133.

- 
- **Richter G. (1993).** « Métabolisme des végétaux », Physiologie et Biochimie. Presses polytechniques et universitaires, Romandes. 292.
- **Salle, J. L. (1991).** « Les huiles essentielles ; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Edition Frison – Roche, Paris. 21.
- **Sanchez-Moreno, C. (2002).** Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Food and Biological Systems. International Journal of Food Science and Technology, 3, 121137. <https://doi.org/10.1177/1082013202008003770>.
- Sayah M. Y., EL-OualiLalami A., Greech H., Errachidi F., RodiElkandri Y. et OuazzaniChahdi F., (2014).** Activité Larvicide des Extraits de Plantes Aromatiques sur les Larves de Moustiques Vecteurs de Maladies Parasitaires, International Journal of Innovation and Applied Studies. Vol. 7 N°. 3, pp. 832-842
- **Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B., (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem. 269: 8022-8028
- **Singh S.B et Barrett J.F, (2006).** Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. Biochemical Pharmacology. 71: 1006-1015.
- **Svoboda, K.P.; and Hampson, J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- **Tanaka T. (1961).** Citrologia : semi centennial commemoration papers on *Citrus* studies. Citrologia supporting Fondation, Osaka, Japan, 114 p.
- **Teigiserova, D. A., Tiruta-Barna, L., Ahmadi, A., Hamelin, L., et Thomsen, M. (2021).** A step closer to circular bioeconomy for citrus peel waste : A review of yields and technologies for sustainable management of essential oils. Journal of Environmental Management, 280, 111832. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111832>.
- **Torres-Alvarez, C., and al. (2016).** Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. CyTA - Journal of Food, 1–7. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1220021>
- **Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R., (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1561-1568
- **Valnet J. (2001).** La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. France, 411.
- **Valnet J. (1984).** Aromathérapie. Ed. Maloine. France.
- **Vashisth, T., et Kadyampakeni, D. (2020).** Diagnosis and management of nutrient constraints in Citrus. In Fruit Crops (p. 723- 737). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818732-6.00049-6>

- 
- **Webber H.J. (1967).** History and development of the citrus industry .In «The Citrus Industry». vol. I, 1-39.
- **Werner, M., (2002).** Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit. Editions Vigot, collection Santé Bien-être, 95 p.
- **Zeghouane, H. (2014).** Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrional Est- Algérien. Mémoire Master, Université KasdiMerbah, Ouargla.

**Tableau 1. Verreries, matériels et appareillage utilisés**

<b>Verreries et matériels</b>	<b>Equipements et appareils</b>
Anse de platine	Agitateur magnétique – incubateur
Barreaux magnétique	Bain-Marie
Béchers	Bec benzène
Boite de Pétri + parafilm	Balance
Cuve de spectrophotomètre	Règle
Disques d'antibiogrammes	Etuve
Ecouvillons	Spectrophotomètre
Entonnoirs	Réfrigérateur
Eprouvettes graduées	Vortex
Erlenmeyers	Micropipette
Fiole	/
Flacon en verre	/
Papier aluminium	/
Papier filtre	/
Pince + ciseau	/
Pipettes gradués	/
Pipettes pasteur	/
Tubes à essai + portoir tube	/


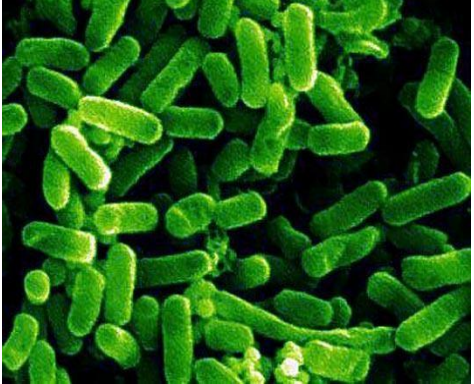
Tableau 2. Produits chimique utilisés.

Produits chimiques	Formule chimique
Acétate d'éthyle	$C_4H_8O_2$
DMSO	$C_2H_6OS$
Alcool	$CH_3CH_2OH$
Eau distillé	/
Eau physiologique	$NaCl$
DPPH	/
Acide ascorbique	/
Ethanol	/

Tableau 3. Composition des milieux de cultures

Milieu de culture	Gélose nutritive	Gélose Muller-Hinton	Gélose Sabouraud
<b>Composition</b>	-1g d'extrait de viande -2g d'extrait de levure -5g de chlorure de sodium. -10g d'Agar -Eau distillée (1litre pour 28g du mélange) -pH=7.4 (Sodium Igor, 2002)	-300ml d'infusé de bœuf -17.5g peptone de caséine -17g Agar -Eau distillée (1 litre pour 38g du mélange) -pH=7.4 (Sodium Igor, 2002)	-10g peptone -10g de glucose -15g Agar -10.5 chloramphénicol -Eau distillée (1litre) -pH=6.2 (Sodium Igor, 2002)

**Tableau 4. Taxonomie et caractères généraux de différentes souches bactériennes utilisées.**

Souche	Taxonomie	Caractères généraux
	<p>Règne: Bacteria            Division: Proteobacteria            Classe:            Gammaproteobacteria            Ordre: Pseudomonadales            Famille: Pseudomonadaceae            Genre: <i>Pseudomonas</i>            Espèce: <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>Bacille à Gram négatif, droit, fin, non sporulé Très mobile (ciliature polaire), Appartient au groupe des bactéries non fermentantes, elle est Ubiquitaire, origine principalement environnementale <b>(DoléansJordheimet al, 2015)</b>. Naturellement résistante aux antibiotiques, qui peut devenir un pathogène opportuniste, responsable d'infections graves lorsque les circonstances favorables sont réunies <b>(Elmeskini, 2011)</b></p>
	<p>Règne: Bacteria            Division: Proteobacteria            Classe:            Gammaproteobacteria            Ordre: Enterobacteriales            Famille: Enterobacteriaceae            Genre: <i>Escherichia</i>            Espèce: <i>Escherichia coli</i></p>	<p><i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle fut découverte en 1885 par Théodore Escherich. On trouve <i>E. coli</i> de façon commensale dans la flore intestinale et fécale, tant chez les humains que chez certains animaux. La flore intestinale est colonisée peu après la naissance. La bactérie et l'hôte coexistent sans impact sur leur santé respective. Cette coexistence entraîne des bénéfices mutuels <i>E. coli</i> peut non seulement être une bactérie commensale, mais aussi un pathogène <b>(Nataroet al. 2004)</b>.</p> <p>Certains peuvent acquérir des facteurs de virulence particuliers et donner soit des pathologies extraintestinales (infections urinaires) soit des pathologies intestinales <b>(Nataroet al,1998)</b>.</p>

**Résumé :**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des agrumes en Algérie et de la connaissance de leurs propriétés thérapeutiques. Nous nous sommes intéressés à étudier les écorces deux espèces d'agrumes *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. Les huiles essentielles ont été extraites à partir des écorces par hydrodistillation et ont été caractérisées par la mesure de leurs paramètres physico-chimiques (indice de réfraction, densité et caractéristiques organoleptiques). Les indices physiques tels que la densité (0.801 et 0.842) et l'indice de réfraction (1.469 et 1.470) des huiles essentielles des écorces *C. sinensis* et *C. lemon* respectivement, ont été conformes à la norme. L'extraction a révélé un rendement en huiles essentielles plus élevé pour les écorces de l'orange 2.16 % contre 1.237% pour les écorces du citron. L'appréciation de l'activité antioxydant a été faite par utilisation du test de piégeage du DPPH. Suivie d'une évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles vis-à-vis de certains germes pathogènes.

**Mots clés.** *Citrus limon* - *Citrus sinensis* – Huiles essentielles – RDT- DPPH – Activité antimicrobienne

**Abstract :**

This work is part of the valorization of citrus fruits in Algeria and the knowledge of their therapeutic properties. We were interested in studying the peels of two citrus species *Citrus lemon* and *Citrus sinensis*. The essential oils were extracted from the bark by hydro distillation and were characterized by measuring their physico-chemical parameters (refractive index, density and organoleptic characteristics). Physical indices such as density (0.801 and 0.842) and refractive index (1.469 and 1.470) of essential oils from *C. sinensis* and *C. lemon* bark respectively, complied with the standard. The extraction revealed a higher yield of essential oils for orange peel 2.16% against 1.237% for lemon peel. The assessment of the antioxidant activity was made using the DPPH trapping test. Followed by an evaluation of the antimicrobial activity of essential oils against certain pathogenic germs.

**Key words** *Citrus lemon* - *Citrus sinensis* – Essential oils – RDT- DPPH – Antimicrobial activity

## الملخص :

هذا العمل هو جزء من تثمين الحمضيات في الجزائر ومعرفة خصائصها العلاجية. كنا مهتمين بدراسة قشور نوعين من الحمضيات من الحمضيات والليمون والحمضيات الصينية. تم استخلاص الزيوت العطرية من اللحاء عن طريق التقطير المائي وتم تمييزها بقياس معاملات الفيزيائية والكيميائية) معامل الانكسار والكثافة والخصائص الحسية). تتوافق المؤشرات الفيزيائية مثل الكثافة (801.0 و 842.0) ومعامل الانكسار (469.1 و 470.1) للزيوت الأساسية من C. sinensis و C.

lemon bark على التوالي ، مع المعيار. أظهر الاستخلاص عائداً أعلى من الزيوت الأساسية لقشر البرتقال بنسبة 16.2% مقابل 237.1% لقشر الليمون. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة باستخدام اختبار محاصرة DPPH. يتبعه تقييم للنشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية ضد بعض الجراثيم المسببة للأمراض .

الحمضيات الصينية - الزيوت الأساسية نشاط المضاد للميكروبات بالحمضيات والليمون . الكلمات الدالة