

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2019

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**

**Domaine : SNV    Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**Présenté par :**

*Benabdi Bouchra & Otmani Ahlam*

*Thème*

**Evaluation des activités antibactérienne et antioxydante  
des huiles essentielles de *Citrus aurantium*  
et *Citrus reticulata***

**Soutenu le :** 07 / 07 / 2019

**Devant le jury composé de :**

*Nom et Prénom*

*Grade*

*BENSMAIL Souhila*

*MAA.*

*Univ. de Bouira*

*Président*

*LIBDIRI Farid*

*MAA.*

*Univ. de Bouira*

*Examineur*

*AIT MIMOUNE Nouara*

*MCB.*

*Univ. de Bouira*

*Promoteur*

*Année Universitaire : 2018/2019*

## *Remerciements*

*Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près de deux mois. En préambule, nous voulons adresser tous nos remerciements aux personnes avec lesquelles nous avons pu échanger nos expériences, et qui nous ont aidé pour la rédaction de ce mémoire.*

*Nous adressons tout d'abord nos remerciements les plus sincères, à Madame Ait Mimoune, qui a très volontiers accepté d'être la promotrice de ce projet. Sa grande connaissance dans le domaine, ainsi que son expérience, ont joué un rôle important dans la conception de ce travail.*

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation. Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

*Un grand et respectueux remerciement à M. LIBDIRI et Mme BENSMAIL, de nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail. Veuillez accepter l'expression de notre profond respect.*

*Nous adressons aussi nos plus sincères remerciements à l'ingénieur de laboratoire d'analyses médicales où on a fait notre stage pratique, Chabane Noura qui nous a accompagné, aidé durant toute la période de stage, avec ses précieux conseils.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail avec grand amour, Sincérité et fierté A mes chers parents  
Sliman et Malika, source de tendresse, De noblesse et d'affection Grâce à  
leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le  
climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.*

*Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes  
profonds sentiments envers eux.*

*Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront  
toujours fiers de moi.*

*A mes sœurs Fatima, Yasmine, Amina, Ilham et Hanane, et mes frères  
mouhamed, Salah et Tarak en témoignages de la fraternité, avec mes souhaits  
de bonheur de santé et de succès. Sans oublier mes chères petits Tassabih et  
Djalal qui font une partie de mon bonheur.*

*A mon cher amis Salahedine et mes chères copines Fatima et Houda.*

*Et à tous les membres de ma famille*

*A tous mes amis, tous mes professeurs*

**Benabdi bouchra**

# *Dédicace*

*Aux êtres les plus chers à mon cœur, mon père Ahmed et ma mère Louiza, qui*

*ont*

*consacré leur noble existence à bâtir la mienne. De ma vie je ne saurai assez*

*leur exprimer*

*mon affection, ma reconnaissance et mon amour.*

*A mes adorables frères qui ont été toujours là à mes côtés, qui m'ont*

*aidé en toute étape de ma vie.*

*A mes chères Nawal et Rebh, et mes chères petits Cerine, Haytham et Ahmed*

*Iyad, qui font une partie de mon bonheur.*

*A mon futur mari Karim, qui a su de loin m'encourager et me soutenir.*

*A ma chère binôme Bouchra mon bras droit, et mes chères copines Fatima et*

*Houda. Et que je partage ce moment si précieux avec toute ma famille, grand*

*père, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception qui,*

*malgré l'éloignement, m'ont toujours soutenu et encouragé de façon*

*indéfectible durant ma scolarité.*

*A toute la promotion Master II Microbiologie appliquée 2019.*

***Ahlam Otmani***

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

## Rappels bibliographiques

### Chapitre I : Les plantes médicinales et leurs substance antimicrobiennes

<b>I. Les plantes médicinales.....</b>	<b>3</b>
I.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	3
I.2. Généralité sur les agrumes .....	3
I.3. Systématique des <i>Citrus</i> .....	5
I.3.1. <i>Citrus reticulata</i> .....	6
I.3.1.1. Généralités .....	6
I.3.1 .2. Activités biologiques.....	6
I.3.2. <i>Citrus aurantium</i> .....	7
I.3.2.1. Généralités .....	7
I.3.2.2. Activités biologiques .....	8
<b>II : Les huiles essentielles.....</b>	<b>9</b>
II.1.Définition.....	9
II.2. Répartition et localisation .....	9
II.3. Méthodes d'extraction .....	10
II.3.1. Extraction par entrainement à la vapeur d'eau .....	11
II.3.2. Extraction par hydrodistillation .....	11
II.4. Caractéristiques physicochimiques .....	12
II.5. Composition chimique .....	12
II.5.1. Les terpènes .....	12
II.5.2. Les composés aromatiques .....	13
II.5.3. Autres composés d'origine diverses .....	13
II.6. Activités biologiques.....	14

II.6.1. Activité antibactérienne .....	15
II.6.2. Activité antifongique .....	16
II.6.3. Activité anti-oxydante .....	18
II.6.4. Activité antivirale .....	18
II.7. Facteurs influençant l'activité des huiles essentielles .....	19
II.8. Toxicité .....	19
<b>III. Les bactéries pathogènes.....</b>	<b>20</b>
III.1. <i>Escherichia coli</i> .....	20
III.1.1. Caractères culturels et biochimique .....	20
III.1.2. Pouvoir pathogène .....	21
III.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
III.2.1. Caractères morphologiques et biochimique .....	22
III.2.2. Pouvoir pathogène .....	23
III.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
III.3.1. Caractères morphologiques et biochimique .....	23
III.3.2. Pouvoir pathogène .....	24
III.4. <i>Proteus vulgaris</i> .....	24
III.4.1. Caractères morphologiques et biochimique .....	24
III.4.2. Pouvoir pathogène .....	25

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre II : matériel et méthodes**

<b>I. Matériel.....</b>	<b>26</b>
I.1. Appareillage et produits chimiques.....	26
I.2. Huiles essentielles.....	26
I.3. Matériel microbiologique.....	26
I.4. Les antibiotiques .....	27
I.5. Milieux de culture.....	28
<b>II. Méthodes.....</b>	<b>28</b>
II.1. Identification des isolats.....	28
II.2. Évaluation de l'activité antibactérienne.....	28
II.2.1. Préparation des suspensions.....	28
II.2.2. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.....	29

II.2.3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	30
II.2.4. Détermination des CMI.....	30
II.3. Etude de l'activité antioxydante.....	32

## **Chapitre III : résultats et discussion**

<b>I. Résultats.....</b>	<b>34</b>
I.1. Analyses des huiles essentielles.....	34
I.1.1. Caractéristiques physico-chimiques .....	34
I.1.2. Densité .....	34
I.2. Identification des souches bactérienne.....	35
I.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) .....	36
I.4. Etude de la sensibilité aux huiles essentielles.....	38
I.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	41
I.6. L'activité antioxydante.....	42
I.6.1. Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH.....	43
I.6.2. Détermination des pourcentages d'inhibition.....	43
I.6.3. Détermination des IC50.....	45
<b>II. Discussion générale.....</b>	<b>49</b>
II.1. Activité antibactérienne.....	49
II.2. Activité antioxydante.....	50
II.3. Test de combinaison des huiles essentielles.....	51
 <b>Conclusion et perspective.....</b>	 <b>53</b>

### **Référence bibliographique**

**Annexe**

**Résumé**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie de fruit du <i>Citrus</i> .....	4
<b>Figure 2</b> : Les fruits et les feuilles de la mandarine.....	6
<b>Figure 3</b> : Fleurs, feuilles et fruit de <i>Citrus aurantium</i> .....	7
<b>Figure 4</b> : Coupe équatoriale d'une orange amère.....	8
<b>Figure 5</b> : Coupe transversale de l'épicarpe d'une orange.....	10
<b>Figure 6</b> : Poche sécrétrice dans le fruit du citronnier, <i>Citrus limon</i> , Famille Rutacées. Coupe transversale x 25. (10) sous le microscope photonique.....	10
<b>Figure 7</b> : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation.....	11
<b>Figure 8</b> : Structure de l'isoprène (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ) .....	13
<b>Figure 9</b> : Exemple de structure de composé de phénylpropane.....	13
<b>Figure 10</b> : Mécanismes d'action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.....	16
<b>Figure 11</b> : Observation au microscope électronique d' <i>E.coli</i> .....	21
<b>Figure 12</b> : Observation au microscope électronique de <i>S. aureus</i> .....	22
<b>Figure 13</b> : Aspect de <i>P.aeruginosa</i> en microscopie électronique (GX 20000).....	23
<b>Figure 14</b> : Observation au microscope électronique de <i>P. vulgaris</i> .....	24
<b>Figure 15</b> : Schéma représentatif des étapes de l'activité antibactérienne et l'antibiogramme.....	31
<b>Figure 16</b> : Schéma représentatifs des étapes de la détermination la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	32
<b>Figure 17</b> : Forme libre et réduite du DPPH.....	33
<b>Figure 18</b> : Aspect et couleur de <i>Citrus aurantium</i> (a) et <i>Citrus reticulata</i> . (b).....	34
<b>Figure 19</b> : Aspect en microscopie optique (GX 40) après coloration de Gram de <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i> .....	35
<b>Figure 20</b> : Résultats de l'antibiogramme.....	37
<b>Figure 21</b> : L'effet de l'H.E de <i>Citrus aurantium</i> sur : <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> et <i>Proteus vulgaris</i> .....	38
<b>Figure 22</b> : L'effet de l'H.E de <i>Citrus reticulata</i> sur : <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>P.aeruginosa</i> et <i>Proteus vulgaris</i> .....	39
<b>Figure 23</b> : L'effet de mélange des huiles de <i>Citrus reticulata</i> et <i>Citrus aurantium</i> sur : <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> et <i>Proteus vulgaris</i> .....	40
<b>Figure 24</b> : Décoloration de milieu réactionnel.....	42

<b>Figure 25</b> : Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH.....	43
<b>Figure 26</b> : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de <i>Citrus reticulata</i> .....	44
<b>Figure 27</b> : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de <i>Citrus aurantium</i> .....	44
<b>Figure 28</b> : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations du mélange des deux extraits de <i>Citrus aurantium et Citrus reticulata</i> .....	45
<b>Figure 29</b> : Détermination de l'IC50 de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> .....	46
<b>Figure 30</b> : Détermination de l'IC50 de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> . .....	46
<b>Figure 31</b> : Détermination de l'IC50 du mélange des deux extraits de <i>Citrus aurantium et Citrus reticulata</i> .....	47
<b>Figure 32</b> : Détermination de l'IC50 de l'acide ascorbique.....	48

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition chimique du fruit de <i>Citrus</i> .....	5
<b>Tableau 2</b> : Composition des huiles essentielles des <i>Citrus</i> en substances volatiles.....	14
<b>Tableau 3</b> : Généralités sur les souches bactériennes utilisées.....	27
<b>Tableau 4</b> : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition .....	29
<b>Tableau 5</b> : Couleur, aspect et odeur des huiles essentielles de genre <i>Citrus</i> .....	34
<b>Tableau 6</b> : Valeurs des densités des H.Es de Citrus à 20° .....	35
<b>Tableau 7</b> : Identification macroscopique et microscopique des souches étudiées.....	36
<b>Tableau 8</b> : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques testés (mm).....	38
<b>Tableau 9</b> : Diamètres des zones d'inhibition en mm des huiles essentielles seules et en combinaison.....	41
<b>Tableau 10</b> : Les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles.....	41
<b>Tableau 11</b> : Activité antioxydante des extraits vis-à-vis du radical DPPH.....	45

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorption

**ADH+** : L'arginine di -hydrolase positive

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**ATB** : Antibiotique

**ATCC** : American type culture collection (collection Américaine de culture type)

**C** : *Citrus*

**°C** : Degré Celsius.

**cm** : Centimètre.

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMF** : Concentration minimale fongicide

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**DPPH** : 1,1-Diphényle-2-picryl-hydrazyl

**DO** : Densité Optique.

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**G+** : Gram positive

**G-** : Gram négative

**G** : gramme.

**H. E** : huile essentielle

**H<sub>2</sub>S** : Di -hydrogène – sulfuré négative

**IC50%** : concentrations inhibitrices de 50%

**L** : litre.

**LDC** : La lysine décarboxylase négative

**mm** : millimètre

**M-H** : Muller Hinton.

**mg** : milligramme

**nm** : nanomètre

**ODC** : Ornithine décarboxylase négative

**ONPG** : Ortho- nitrophenyl- $\beta$ - Galactosidase négative

***P. vulgaris*** : *Proteus vulgaris*

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**PI** : pourcentage d'inhibition

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**TDA** : Tryptophane désaminase négative

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**$\mu$ l** : microlitre.

# Introduction

### Introduction

Les plantes médicinales et aromatiques furent utilisées par l'Homme depuis l'antiquité. De nos jours leur utilisation a pris un essor considérable dans les industries de parfum, produits cosmétiques et pharmaceutiques (**Bruneton, 1999**).

Depuis des milliers d'années, ces plantes ont été utilisées, afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies. Les plantes médicinales représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'avoir un très large éventail d'activités biologiques (**Bruneton, 1999**).

L'évaluation de ces activités biologiques demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. Les antibiotiques ont été considérés comme l'arme absolue dans la lutte perpétuelle contre les infections microbiennes. Mais le phénomène de l'antibiorésistance à travers les différents genres et espèces et les effets secondaires des médicaments de synthèse, sous-estimé ont remis d'actualité la phytothérapie (**Mazari et al, 2010**).

Les plantes sont une source inépuisable principale de substances actives où au moins 35 000 espèces sont utilisées dans le monde. L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3 510 espèces dont 450 espèces sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays (**Quezel et Medail, 1995**).

L'évaluation des activités biologiques des plantes médicinales demeure une tâche très intéressante qui a fait l'objet de nombreuses études (**Mazari et al, 2010**). Dans ce sens, notre recherche vise à étudier les activités antimicrobienne et activité antioxydante de deux huiles essentielles appartenant au genre *Citrus* vis-à-vis de certaines souches bactériennes pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*).

En vue de rendre compte de la démarche scientifique adoptée, ce manuscrit comportera deux parties.

Partie I : une partie bibliographique qui comprend le premier chapitre sur les plantes médicinales et les huiles essentielles et leurs effets antimicrobiens.

Partie II : une partie expérimentale comporte le deuxième chapitre consacré à la présentation du matériel utilisé et des méthodes suivies pour la réalisation de notre travail, aussi le troisième chapitre comprend les résultats obtenus.

## **Introduction**

---

Ce travail se terminera par la présentation d'une conclusion générale qui récapitule notre étude et met en valeur les principaux résultats obtenus avec quelques perspectives.

# Partie Bibliographique

# Chapitre I

**Les plantes médicinales et leurs  
substances antimicrobiennes**

## I. Les plantes médicinales

### I.1. Généralités sur les plantes médicinales

Une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et qu'elle présente des propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Moreau, 2003). Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, leur action provient de leur composition chimique (métabolites primaires ou secondaires) ou des synergies entre les différents composés présents (Sanago, 2006).

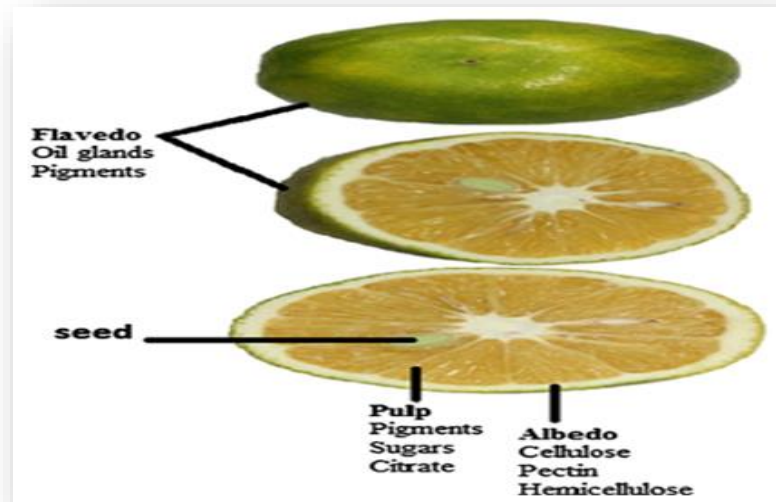
Une plante médicinale est généralisée si elle obéit à plusieurs critères comme la présence ou pas de phénomène de toxicité, son utilisation pour une indication donnée dans plusieurs pays et la posologie précise (Colette, 2014).

### I.2. Généralités sur les agrumes

Le mot « agrume » provient du latin « *acrumen* », qui désignait dans l'Antiquité des arbres à fruit acide. Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées. On ne dénombre pas moins de 900 variétés à ce jour, pouvant mesurer de 2 à 10 m. Leur tronc est assez court, leur feuillage est dense, et persistant sauf pour le genre *Poncirus* où il est caduque (Barboni, 2006 ; Ramful et al ; 2011).

Les agrumes comprennent trois genres principaux : le genre *Citrus*, le genre *Fortunella* et le genre *Poncirus*. Toutefois, la majorité des agrumes appartiennent au genre *Citrus* (Benedicte et Michel, 2011).

Le genre *Citrus* regroupe les cultures fruitières les plus populaires du monde. Leurs fruits sont une source de composés phytochimiques bénéfiques pour la santé. En plus, ils permettent un apport en vitamine C, acide folique, potassium et pectine (Figure 1). Il a été rapporté que les extraits d'agrumes contiennent un large éventail de produits biologiques leur conférant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes comme les flavonoïdes (Rafiq et al, 2018).



**Figure 1** : anatomie de fruit du *Citrus* (Shafiya Rafiq, 2016).

Le genre *Citrus* comprend plusieurs fruits, les plus importants à l'échelle mondiale étant l'orange douce (*C. sinensis*: 67,8% de la production mondiale d'agrumes), la mandarine (*C. reticulata* : 17,9%), citron (*C. limon*: 6,3%) et pamplemousse (*C. paradisi*: 5,0%). Parmi les genres d'agrumes mineurs qui constituent la majeure partie des 3,0% restants, on retrouve l'orange amère (*C. quarantium*), le citron (*C. medica*) et le tilleul (*C. aurantifolia*).

L'huile essentielle d'agrumes son été identifiée dans différentes parties de la plante comme les fruits et les feuilles (particulièrement présente dans les flavedo de fruits). Le limonene, b-myrcene, a-pinene, p-cymene, b-pinene, terpinolene sont les principaux composés aromatiques (**Tableau 1**) (Ammad et al. 2018).

Les huiles essentielles d'agrumes sont utilisées dans de nombreux produits, tels que cosmétiques, préparations médicales, aliments, comme aromatisants ainsi que dans l'aromathérapie. (Boughendjioua et boughendjioua, 2017 ; Dosoky et Setzer, 2018).

## Rappels bibliographiques

**Tableau 1** : composition chimique du fruit de *Citrus* (Sidana et al, 2013).

	<i>Citrus aurantifolia</i> (bigaradier)	<i>Citrus aurantium</i> (Orange amer)	<i>Citrus limon</i> (citronniers)	<i>Citrus paradisi</i> (pamplemousse)	<i>Citrus reticulata</i> (mandarines)	<i>Citrus sinensis</i> (oranges)
Moisture, g	84,6	87,6	85,0	88,5	87,8	88,4
Protéine, g	1,5	0,7	1,0	1,0	0,9	0,8
Matière grasse, g	1,0	0,2	0,9	0,1	0,3	0,3
Fibre, g	1,3	0,3	1,7	-	-	0,5
Carbohydrates, g	10,9	10,9	11,1	10,0	10,6	9,3
Minéraux, g	0,7	0,3	0,3	0,4	0,4	0,7
Calcium, mg	90	26	70	30	50	40
Phosphore, mg	20	20	10	30	20	30
Riboflavine, mg	0,3	0,3	2,3	0,2	0,2	0,17
Thiamine, mg	0,02	-	0,02, jus	0,12	40*	-
Niacine, mg	0,1	-	0, 01, Jus	0,3	-	0
Vitamine C, mg	63	30	39, jus	-	68	50
Carotène, mg	15	1004	0	-	350*	0
Energie, k cl	59	48	57	45	-	43

### I.3. Systématique des *Citrus*

Le genre *Citrus* appartient à la grande famille des Rutaceae. Il contient 130 genres répartis dans sept sous-familles et compte de nombreux genre producteurs de fruits et d'huiles essentielles (Sidana et al, 2013). La position systématique des *Citrus* est comme suite :

**Règne** - Plantae

**Division** - Magnoliophyta

**Classe** - Magnoliopsida

**Sous classe** - Rosidae

**Order** - Sapindales

**Famille** - Rutaceae

**Genres**- *Citrus*

### **I.3.1. *Citrus reticulata***

#### **I.3.1.1. Généralités**

*Citrus reticulata* communément appelé « mandarine » est largement cultivé dans les régions subtropicales. Elle est beaucoup plus résistante au froid que l'orange douce et l'arbre est plus tolérant à la sécheresse (**Lim, 2012**). C'est un petit arbre épineux au sommet dense de fines branches, qui aurait été introduit au cours du huitième siècle (**Apraj et Pandita, 2014**).

Les mandarines sont cultivées dans les pays méditerranéens, le Japon le Brésil, l'Argentine, les Etats Unis et l'Australie. Les cultivars de mandarine sont nombreux et présentent une grande diversité des caractères morphologiques et horticoles (forme, volume, couleur du fruit, adhésion de l'écorce) (**Figure 2**) (**Mukhtar et al ;2005**).



**Figure 2** : Les fruits et les feuilles de la mandarine (**Lim, 2012**)

#### **I.3.1.2. Activités biologiques**

*Citrus reticulata* sont des fruits tropicaux ou subtropicaux très répandus dans le monde. En plus d'être l'un des fruits les plus consommés, il revêt également une grande importance économique. Sa valeur en tant qu'un fruit délicieux, ses valeurs nutritionnelles sont également importantes. Les agrumes son très riches en composés phénoliques et en flavonoïdes, ce qui

leur attribue de nombreuses activités biologiques (**Nakajima, et al, 2014 ; Tripoli, et al ; 2007 ; Benavente-Garcia, et al ; 2008**).

Parmi les différentes espèces de *Citrus reticulata*, plusieurs sont considérées comme compléments alimentaires dotées de propriétés pharmacologiques et médicinales. Des études antérieures ont rapporté diverses propriétés telles l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antiprolifératif, hypoglycémique et insecticides (**Hamdan et al, 2016**).

### **I.3.2. *Citrus aurantium***

#### **I.3.2.1. Généralités**

L'oranger amer appartient à la famille des *Rutaceae*, genre *Citrus*, il est aussi appelé oranger de Séville ou bigaradier, il pousse sous un climat subtropical (**Figure 3**) (**Deterre, 2012**).

Le bigaradier est passé de la chine vers l'Inde, l'Arabie est enfin l'Egypte. Il est arrivé en Europe grâce aux arabes qui l'introduisirent en Sicile au XI siècle. Il est cultivé en Amérique centrale et en Amérique de sud ainsi que dans le bassin méditerranéen (**Farhat et al., 2010**).

L'oranger amère est un grand arbre atteignant 5 à 8 m de haut, avec des feuilles de couleur vertes et brillantes, les fleurs actinomorphes d'un blanc très pur, d'odeur agréable possèdent 5 à 8 pétales (**Ghédira et Goetz, 2015**). Le fruit fait environ 7cm de diamètre avec une écorce dure et une pulpe très acide (**Figure 4**). Il est très résistant au froid, à l'excès d'eau et à quelques maladies (**Deterre, 2012**).



**Figure 3** : Fleurs, feuilles et fruit de *Citrus aurantium* (**Ghédira et Goetz, 2015**).

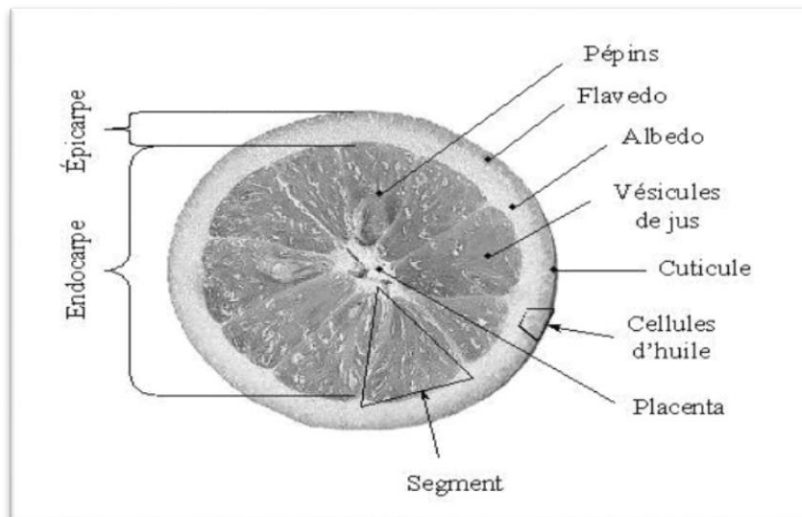


Figure 4 : Coupe équatoriale d'une orange amère (Sousser, 1997)

### I.3.2.2 Activités biologiques

Plusieurs activités biologiques de *Citrus aurantium* ont été rapportées dans des études antérieures. L'orange amère est utilisée comme sédatif léger et hypnotique pour ses vertus apaisante, calmante et motrice. Il est également utilisé pour traiter l'insomnie. L'odeur d'orange amère diminue les symptômes d'anxiété, améliore l'humeur et crée un sentiment de bien-être (Dosoky et Setzer, 2018).

L'huile essentielle est connue pour ses propriétés anti-infectieuses, analgésiques, anesthésiantes, cicatrisantes, bactéricides et antiseptiques (Ghédira et Goetz, 2015). L'HE de l'orange amère a montré une bonne activité de piégeage des radicaux libres, due en grande partie à la teneur élevée en limonène, efficace pour réduire le stress oxydatif.

L'activité antibactérienne de l'orange amère a été rapportée contre plusieurs espèces pathogènes telle que, *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Aeromonas hydrophila* (Dosoky et Setzer, 2018).

En raison de ses effets antimicrobiens, l'orange amère est utilisée pour traiter le rhume, la grippe, les gencives, la bronchite chronique, ainsi qu'en tant que conservateur alimentaire. L'huile diluée est utilisée pour traiter les boutons et l'acné. En outre, son huile essentielle a une activité anti-fongique contre *Penicillium digitatum* et *P. italicum*. L'huile essentielle est par ailleurs utilisée comme traitement topique des infections fongiques de la peau. L'HE d'orange amère a montré un pouvoir insecticide et fumigant puissant (Dosoky et Setzer, 2018)

## II. Les huiles essentielles

### II.1. Définition

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16<sup>ème</sup> siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**Burt, 2004**). Le terme « huiles » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielles » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice (**Bruneton, 1993**).

Les huiles essentielles sont biosynthétisées par des plantes aromatiques comme métabolites secondaires. Selon l'AFNOR, elle désigne un produit obtenu à partir d'une -matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de certaines plantes telles que le *Citrus*, soit par distillation sèche (**Santoyo et al; 2005**).

Les huiles essentielles ne sont pas présentées chez tous les végétaux. Parmi les 1500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essences aromatiques (**Bruneton, 1999; Degryse et al ; 2008**). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent, en particulier les Labiés, les Ombellifères, les Myrtacées et les Lauracées (**Benayad, 2008**).

### II.2. Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont biosynthétisées par des plantes odorantes dites aromatiques comme métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (Lamiaceae), les poches sécrétrices (Myrtaceae) et les canaux sécréteurs (Apiaceae). Ces structures sont impliquées dans le stockage des huiles et sont également dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini, qui diffère selon l'organe végétal en question (**Burt, 2004**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule (**Figure 5**). Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs (**Bruneton, 1999 ; Hazzit, 2002; Boz et al ; 2009**). Elles peuvent être stockées

## Rappels bibliographiques

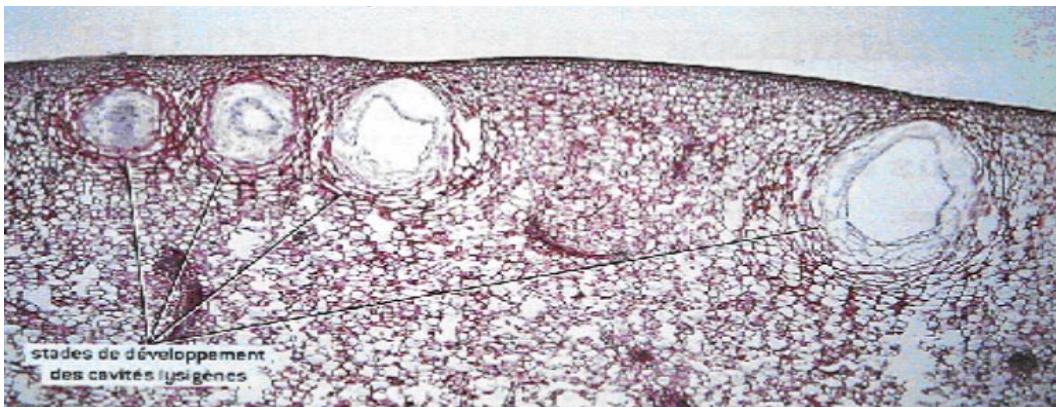
---

dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les écorces, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et les graines (**Bruneton, 1993; Anton et Lobstein, 2005**).



**Figure 5** : Coupe transversale de l'épicerpe d'une orange (**Myriam R., 2005**).

Les huiles essentielles sont élaborées et stockées dans des poches shizolysigènes (**Figure 6**) (**Bruneton, 1993**). Ces poches sécrétrices sont localisées dans tous les organes végétaux des *Citrus* : l'écorce, les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits (le flavedo) et les graines. Les cellules, entourant la poche, se divisent et s'organisent pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne (**Figure 6**) (**Myriam., 2005**).



**Figure 6** : Poche sécrétrice dans le fruit du citronnier, *Citrus limon*, Famille Rutacées. Coupe transversale x 25. Sous le microscope photonique (**Myriam., 2005**).

### II.3. Méthodes d'extraction

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux procédés, basés sur des techniques anciennes à savoir, la distillation, l'expression, l'enflourage ou l'incision. Cependant, d'autres méthodes récentes sont apparues ces dernières années comme l'extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons. Toutefois, la

distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre (**Luque de Castro, M. D, 1999**).

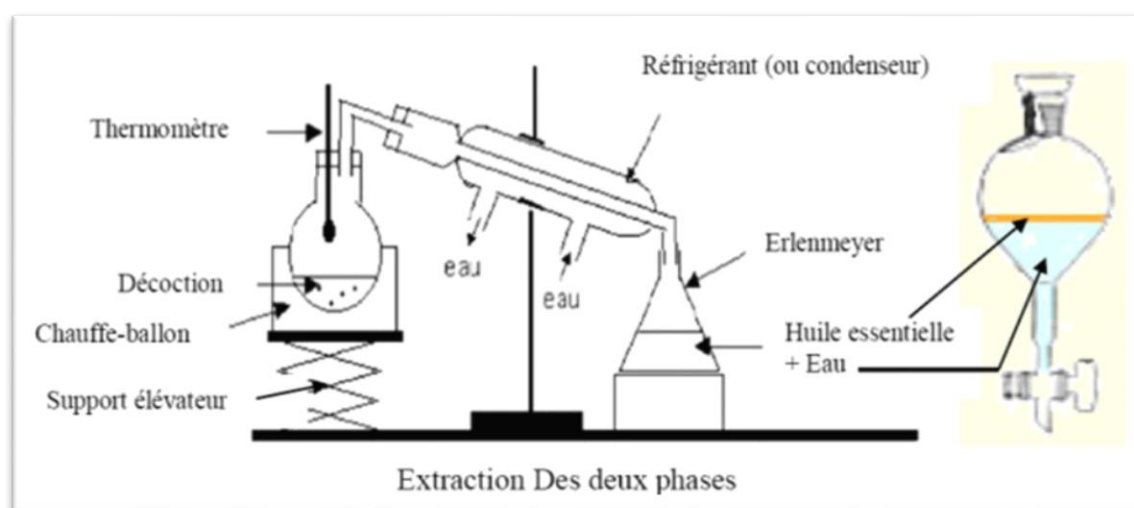
### II.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

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 (**Luque de Castro, M. D, 1999**).

### II.3.2. Extraction par hydrodistillation

Dans le cas de l'hydrodistillation qui est la méthode la plus utilisée, la composition du produit obtenu, le plus souvent, est différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs de la plante. Cela est dû à la labilité des constituants des HE. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters- par exemple mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations...etc. (**Bruneton ; 1993**).

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme le climat, le sol, et les conditions de croissance influence sur la qualité et la concentration des composés dans les huiles essentielles, et par conséquent la concentration des composés dans les huiles essentielles, et leur pouvoirs thérapeutique (**Figure 7**) (**Mirmostafa et Rasooli,2002**).



**Figure 7** : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation (**Lagunez, 2006**)

### II.4. Caractéristiques physicochimiques

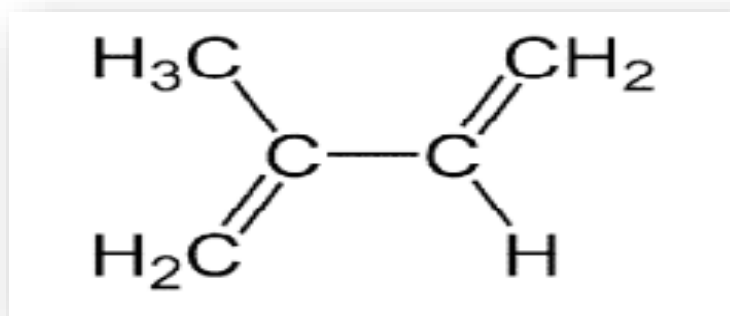
Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires lipophiles constituées de molécules aromatiques, hautement volatiles de très faible masse moléculaire (inférieure à 300). L'odeur typique des HE dépend des organes, des espèces et des origines des plantes (**Degryse et al ; 2008 ; Turek et Stintzing, 2013**). C'est des composés hydrophobes, solubles en grande partie dans l'alcool, l'éther, les huiles fixes et la plupart des solvants organiques mais insolubles dans l'eau. Ces huiles volatiles sont généralement liquides et incolores ou jaune pâle à température ambiante, bien que quelques-unes sont très colorées, comme la camomille bleue et la valériane européenne. C'est des substances ayant un indice de réfraction et une activité optique très élevée. De plus, elles ont une sensibilité à être oxydé pour former des produits résineux par polymérisation (**Dhifi et al ; 2016 ; Moghaddam et al, 2017**).

### II.5. Composition chimique

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature de sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction. Les huiles essentielles sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés terpéniques et aromatiques variés (**Guignard, J.L, 2000**).

#### II.5.1. Les terpènes

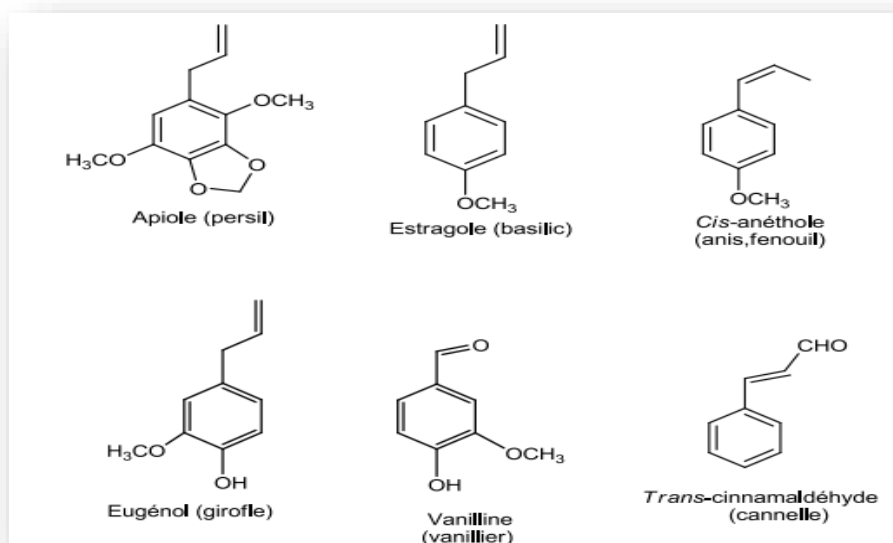
Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5 H_8$ ) dans leur squelette (**Figure 8**). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes ( $C_{10} H_{16}$ ), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ( $C_{15} H_{24}$ ), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ( $C_{20} H_{32}$ ). Les tétraterpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ( $C_5 H_8$ )<sup>n</sup> ou n le nombre d'entité isoprène peut-être de 9 à 30 (**Hernandez-Ochoa, 2005**).



**Figure 8** : Structure de l'isoprène ( $C_5 H_8$ ) (Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M, 2008).

### II.5.2. Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol et bien d'autres (**Figure 9**). Ils sont plus fréquents dans les H.Es des *Apiaceae* (anis, fenouil, cannelle, basilic) (**Piochon, 2008**).



**Figure 9** : Exemple de structure de composés de phénylpropane. (**Piochon, 2008**).

### II.5.3. Autres composés d'origine diverses

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

## Rappels bibliographiques

---

L'huile peut contenir approximativement 300 molécules ; cependant, la plupart des huiles comportent 20 à 60 molécules (**Dung NT, Kim JM, Kang SC (2008)**). Les composés trouvés dans les huiles appartiennent à des classes chimiques variées, Les composés terpéniques sont prédominants, mais les phénylpropanoïdes et les autres composés (composés nitriques et sulfuriques) se retrouvent avec des fréquences plus faibles et en proportion similaire (**Pbiri. 2005**) (**Tableau 2**).

**Tableau 2** : Composition chimique des huiles essentielles des *Citrus* en substances volatiles (**Chutia et al., 2009 ; Majnoui et al.,2012**)

Composés	<i>C. reticulata</i>	<i>C. aurantium</i>
Limonene	46,7	57,57
Geraniol	3,5	0,57
Nenal	14,5	0,22
Myrcene	0,3	2,37
Sabinene	0,1	0,1
$\alpha$ -pinène	0,1	0,5
Linalool	0,7	8,01
Citronillal	1,3	0,89
Trans- $\alpha$ -bergamotene	0,1	1,3
$\alpha$ -Humulene	0,3	0,3
Thymol	-	0,59

### II.6. Activités biologiques

Les huiles essentielles représentent une alternative «verte» dans les domaines de la nutrition, de la santé et de l'agriculture en raison de ses propriétés antimicrobiennes, antivirales, nématocides, antifongiques, insecticides et antioxydants. En raison de leurs

propriétés thérapeutiques, les huiles essentielles ont été largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour soigner certaines maladies chez l'homme (**Omonijo et al. 2018**).

### II.6.1. Activité antibactérienne

Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été très étudiée. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries (**Safaei-Ghomi J, 2010 ; Belletti N et al, 2008**).

On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les bactéries :

- L'effet bactéricide (bactéricidie) exerçant une activité létale.
- L'effet bactériostatique (bactériostase) entraînant une inhibition de la croissance (**Khalil E.A., Afifi F.U. and Al-Hussaini M . (2007)**)

Les HE contenant principalement des aldéhydes ou des phénols, tels que le cinnamaldéhyde, le citral, le carvacrol, l'eugénol ou le thymol, sont caractérisés par une puissante activité antibactérienne, suivis des HES contenant des alcools terpéniques. Cependant, les HES contenant des cétones ou des esters, tels que le  $\beta$ -myrcène, l' $\alpha$ -thujone ou l'acétate de géranyl comme composés majoritaires, ont une activité beaucoup plus faible. Par contre, dans le cas de la présence des hydrocarbures terpéniques, ces huiles sont généralement inactives (**Dhifi et al, 2016**).

En règle générale, les huiles essentielles caractérisées par une teneur élevée en composés phénoliques, tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol, exercent une activité antibactérienne importante (**Dhifi et al, 2016**). Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries comme : *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Helicobacter pylori* (**Pauli, 2001**).

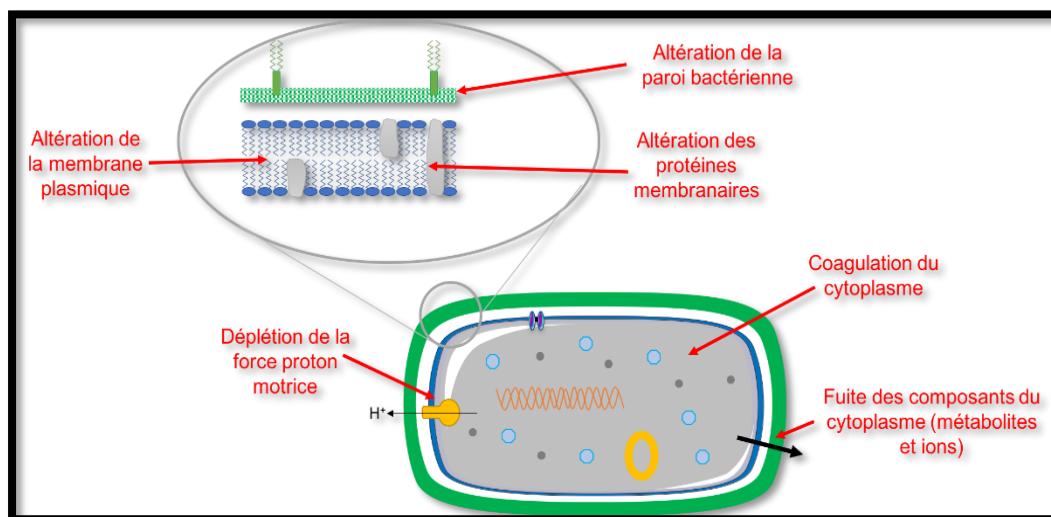
Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs constituants ont été prouvées et le mécanisme d'action a été étudié en détail. Une des caractéristiques importantes des huiles essentielles est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries, de perturber sa structure et de la rendre plus perméable. Ces changements peuvent provoquer une fuite d'ions et d'autres molécules

## Rappels bibliographiques

cellulaires. Cette perte importante du contenu cellulaire ou un débit critique de molécules et d'ions entraîne la mort cellulaire (Dhifi et al, 2016).

Fondamentalement, les bactéries G- sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries G+. En effet, la plupart des parois cellulaires des bactéries G+ (environ 90% à 95%) sont riches en peptidoglycane. Cette caractéristique peut permettre aux composés hydrophobes de pénétrer facilement dans les cellules et d'agir ensuite au niveau de la paroi cellulaire et le cytoplasme. Après leur entrée dans la cellule, ces composés peuvent non seulement affecter plusieurs enzymes impliquées dans la production d'énergie à des concentrations plus faibles, mais également dénaturer des protéines à des concentrations plus élevées (Omonijo et al. 2018).

Par contre Les bactéries G- possèdent une couche fine de peptidoglycane de 2 à 3 nm représentant environ 20% du poids sec de la cellule bactérienne et une membrane externe. Cette dernière est composée d'une double couche de phospholipides fermement liée à la membrane interne. La membrane externe épaisse des bactéries G- réduit la perméabilité et fournit une couche supplémentaire pour protéger les cellules des huiles essentielles (Figure 10) (Omonijo et al. 2018).



**Figure 10 :** Mécanismes d'action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (1)

### II.6.2. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes médicinales a été mis en évidence par de nombreux chercheurs contre les champignons pathogènes et opportunistes

## Rappels bibliographiques

---

comme les *Aspergillus*, *Microsporum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, et *Candida* (**De Bellerbeck, 2002**).

Les infections fongiques sont des maladies causées par des organismes eucaryotes. Les traitements chimiques utilisés de nos jours sont efficaces, mais des souches résistantes et des espèces peuvent se développer suite à ces traitements (**Nazzaro et al, 2017**).

La paroi cellulaire des champignons peut être considérée comme la cible principale des agents antifongiques en raison de sa nature chitineuse. L'activité antifongique des HEs est en grande partie due à la présence des terpènes / terpénoïdes, qui en raison de leur nature hautement lipophile et de leur faible poids moléculaire, sont capables de perturber la membrane cellulaire, et provoquer la mort des cellules ou inhiber la sporulation et la germination des moisissures (**Nazzaro et al, 2017**).

Les propriétés antifongiques des HEs sont liées à la structure chimique des principaux composants. La présence du groupe hydroxyle et sa position dans la molécule, la présence du noyau aromatique, la solubilité dans les graisses et l'orientation spatiale affectent cette activité. De plus, les composés contenant un groupement alkyle dans le noyau benzène des phénols ou du guaïacol, des groupes acétate (par exemple, l'acétate de géranyl a une activité antimicrobienne plus forte que le géraniol et l'acétate de bornyl que le bornéol) renforcent l'activité antifongique de ces composants (**Kocić-Tanackov et Dimić, 2013**).

Selon les travaux de **Prudent et al. (1995)** ; **Sharma-Tripathi, (2006)** et **Viuda Martos et al. (2008)**, les H.Es de *Citrus*: d'orange douce, de citron, de mandarine et, pamplemousse ont une activité antifongique intéressante contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*. Il a été établi d'après **Cox et al. (2000)** que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et de perturber la paroi cellulaire fongique et la membrane cytoplasmique, de les perméabiliser et d'endommager les membranes mitochondriales. Les modifications du flux d'électrons à travers le système de transport d'électrons à l'intérieur de la mitochondrie endommagent les lipides, les protéines et le contenu en acides nucléiques des cellules fongiques (**Akthar et al., 2014**).

Il est généralement admis que les composants des HEs agissent sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire. De faibles concentrations entraînent des modifications de la structure cellulaire, une inhibition de la respiration et une modification de la perméabilité

de la membrane cellulaire, alors que des concentrations élevées entraînent des lésions graves de la membrane, une perte de l'homéostasie et la mort cellulaire (**Kocić-Tanackov et Dimić, 2013**).

### II.6.3. Activité anti-oxydante

Les radicaux libres sont issus du métabolisme cellulaire normal ou pathologique. L'oxydation est essentielle pour les organismes vivants pour la production d'énergie servant à alimenter les processus biologiques. Cependant, la production non contrôlée de radicaux libres conduit au déclenchement de nombreuses maladies comme le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, la cirrhose et l'artériosclérose, ainsi que dans les processus dégénératifs associés au vieillissement (**Saleh et al, 2010**).

Afin de prévenir et de retarder les altérations causées par l'oxydation des lipides dans les aliments, divers antioxydants synthétiques sont utilisés. Cependant, compte tenu des préoccupations croissantes concernant le danger des antioxydants synthétiques, des molécules anti-oxydantes alternatives et naturelles ont été étudiées ces dernières années (**Pincemail et al, 1999**).

Les antioxydants sont des substances qui protègent les cellules contre les effets néfastes des radicaux libres en offrant leurs propres électrons. Il a été rapporté que plusieurs huiles essentielles ont des fonctions antioxydantes capables d'éliminer les radicaux et l'inhibition du cycle d'oxydation des lipides (**Khayyat et Roselin, 2018**).

Les radicaux libres sont convertis en formes non réactives par les défenses enzymatiques et non enzymatiques dans les cellules et par les molécules anti-oxydantes fournies par le régime alimentaire. Parmi celles-ci, les huiles essentielles de plantes ont été largement étudiées. Ces dernières ont la capacité de piéger les radicaux libres, inhiber la peroxydation lipidique et stimuler l'activité des enzymes antioxydantes (**Guo Xu, 2015**).

### II.6.4. Activité antivirale

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

## Rappels bibliographiques

---

L'activité antivirale des huiles essentielles a été prouvée sur de nombreux virus à ARN et à ADN enveloppés, tels que les virus de l'herpès simplex de type 1 et 2 (virus à ADN), le virus de la dengue de type 2 (virus à ARN) et le virus de la grippe (virus à ARN). Les huiles essentielles de *Melissa officinalis* pourraient également inhiber la réplication du HSV-2, en raison de la présence de citral et de citronellal (Akthar et al ; 2014).

### II.7. Facteurs influençant l'activité des huiles essentielles

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure...) d'autre part (Kalemba et Kunicka, 2003).

Dans les plantes médicinales, la dynamique de croissance et de développement et les changements de phase phénologique peuvent provoquer des altérations biochimiques et physiologiques susceptibles de modifier la production de substances biologiquement actives. En modifiant les aspects qualitatifs et quantitatifs de ces substances, ces modifications vont directement influencer le contenu et la qualité des huiles essentielles (Manhães et al. 2012).

Plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement et la composition chimique des HEs, tels que les parties de la plante et leurs stades de développement. Les dommages mécaniques, chimiques ou biotiques peuvent également influencer sur les émissions volatiles dans la plante. L'herbivorie est une lésion biotique qui peut affecter la composition chimique, mais peut avoir un effet sur le rendement en huile essentielle (Silva et al. 2016).

De plus, des facteurs environnementaux tels que la photopériode, la température, l'humidité, les précipitations, les conditions du sol et l'intensité du rayonnement solaire ont des effets importants sur la biosynthèse des huiles essentielles. Ces facteurs peuvent être la cause de la variation de la saisonnalité (Silva et al. 2016).

### II.8. Toxicité

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de molécules dont la structure et les propriétés chimiques permettent de dégager des caractéristiques communes, leur assurant une bonne diffusion dans l'organisme. Malgré le peu d'étude sur la toxicocinétique des huiles essentielles, il faut retenir leurs pouvoirs toxiques sous tous les angles, notamment leurs toxicité aiguë, irritation, absorption percutanée, cancérogénicité, reprotoxicité et tératogénicité hépatotoxique, neurotoxicité et phototoxicité récemment élucidée pour quelques huiles essentielles (Bruneton, 1999 ; Vigan, 2010).

La toxicité des huiles essentielles dépend de leur composition, elle-même variable en fonction de l'espèce végétale, qui peut varier selon la nature du sol où elle se développe (chimotype). D'autres facteurs sont également responsables du degré de toxicité des HEs tels que, la voie d'administration (orale, cutanée ou aérienne) et l'état physiologique de la personne exposée (la pénétration et la toxicité sont maximisées lorsque la peau est endommagée) (Vigan, 2010).

Les huiles essentielles des écorces de *Citrus*, principalement d'orange, citron, pamplemousse, de bergamote et de citron vert sont irritants (brûlures, prurit et autres réactions cutanées fortes) sur la peau après un contact d'une heure. Un eczéma peut apparaître due la présence des terpènes, limonènes, alpha- et bêta-pinènes, géraniol et citral. (Géraut et al., 2010, González-Molina et al., 2010).

### III. Les bactéries pathogènes

#### III.1. *Escherichia coli*

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

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

#### III.1.1. Caractères cultureux et biochimiques

Ces des bacilles mobiles le plus souvent, à Gram -,aéro-anaérobies facultatifs, caractériser par culture facile sur milieux ordinaires, lactosés et Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre(Figure 11), elle pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey, Drygalski (Danielle, 2015).



**Figure 11** : Observation au microscope électronique d'*E. coli* (Agnès, 2013).

Elles fermentent le glucose et sont catalase positive, oxydase négative, Réduisent les nitrates en nitrites, elle est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole, Elle ne fermente pas l'acétoïne et ne possède pas d'urease (Pantel, 2015).

### III.1.2 Pouvoir pathogène

*E. coli* est le principal microorganisme isolé dans les urines. Le pouvoir pathogène d'*E. coli* est lié aux : facteurs de virulence potentiels, et aux facteurs d'adhésion. Elle est responsable de 80 % des infections urinaires primitives (Danielle, 2015).

Les souches pathogènes d'*E. Coli* sont responsables de maladies intestinales qui varient en gravité, des formes bénignes jusqu'à des formes graves même être mortelle (le syndrome est mortel dans 20 à 30% des cas) (Williamson, 2003).

*E. Coli* sont naturellement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram-comme les aminosides et les fluoroquinolones. D'autre part les *E. coli* ont développé une résistance acquise à la pénicilline ; céphalosporine ; et au carbapénème les nouvelles recommandations dans les infections urinaires simples montrent l'intérêt du pivmécillinam par la réévaluation du taux de sensibilité de *E. Coli* (<20%) (Danielle, 2015).

### III.2. *Staphylococcus aureus*

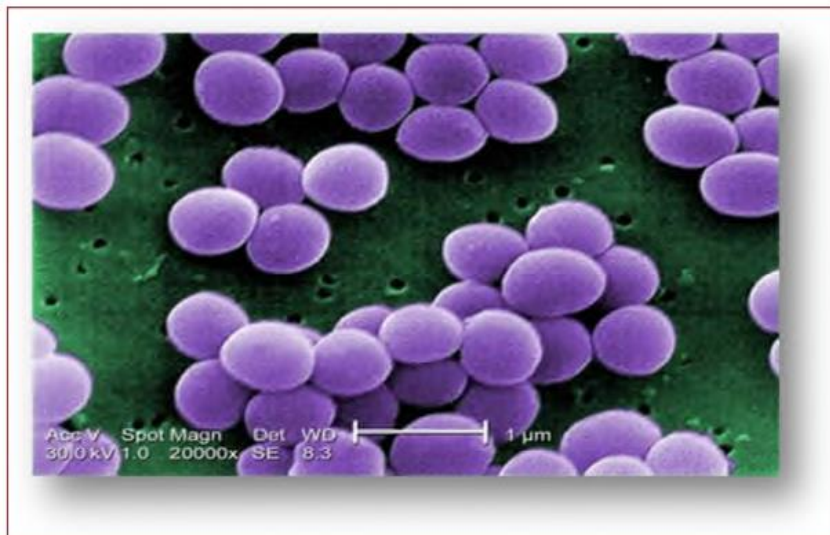
Les staphylocoques font partie de la famille des Micrococcaceae. Ce sont des germes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau, l'air, la poussière, le lait, les sols, les eaux usées etc. Le principal réservoir et habitat est constitué par le nez, la gorge et la peau des animaux/ humain. (Vincenot et al., 2008).

### III.2.1. Caractères morphologiques et biochimiques

En 1881, Alexander Ogston a décrit la première souche de l'espèce *S. aureus* appelée couramment staphylocoque doré en raison de la couleur des colonies bactériennes observées en milieu gélosé (**Oubekka, 2012**).

*S. aureus* est une bactérie Gram positif de 1µm de diamètre, donnant des colonies jaune doré caractéristiques due à la production de pigments caroténoïdes. A l'examen microscopique, elle apparaît sous forme de petites cocci en paires, petites chaînettes ou en amas donnant l'aspect de grappes (**Figure 12**) (**Bhunja, 2008**).

Après 24h d'incubation, *S. aureus* se développe sur géloses trypticase-soja supplémentées ou non en sang. Les colonies observées sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (**Robert, 2013**).



**Figure 12** : Observation au microscope électronique de *S. aureus* (**Agnès, 2013**).

*S. aureus* se distingue des autres staphylocoques dits à coagulase négative (bien que certains de ces staphylocoques puissent également produire une coagulase). D'autres propriétés caractérisent *S. aureus*, comme la production d'un pigment jaune, la production d'une endonucléase thermostable et la fermentation du mannitol (cependant des souches de SARM mannitol-négatives ont été décrites (**Durand, 2009**)).

### III.2.2. Pouvoir pathogène

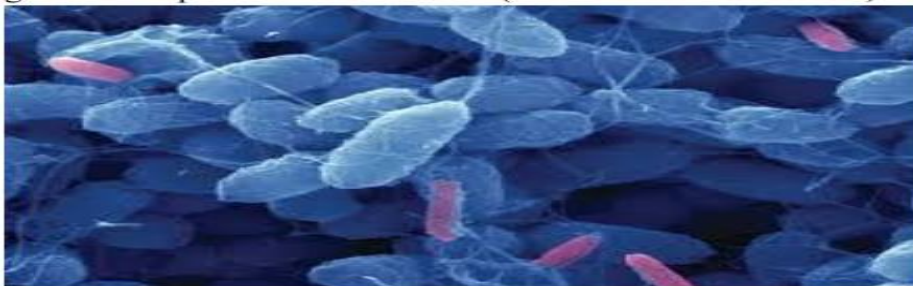
*S. aureus* exprime de nombreux facteurs de virulence : protéines de surface qui initialisent la colonisation des tissus de l'hôte, facteurs inhibant la phagocytose, toxines qui lysent les cellules et provoquent les syndromes pathologiques, 60% de porteurs en bonne santé sont des porteurs avec une moyenne de 25–30% de la population positive à l'égard des souches productrices d'entérotoxines (**Devriese et al ; 2005**). Lorsqu'il se multiplie dans les aliments, *S. aureus* produit un certain nombre d'entérotoxines. Ces toxines sont très résistantes aux enzymes protéolytiques et à la chaleur (la chaleur appliquée à domicile ne suffit pas à détruire la toxine) (**Vincenot et al ; 2008**).

### III.3. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Il s'agit de bactéries d'altération ou pathogènes (parfois même redoutable est mortelle). *P. Aeruginosa* est l'espèce qui revêt d'importance dans la pollution microbienne du milieu marin. Sa présence dans l'eau est associée aux activités humaines. On le trouve dans environ 10% des matières fécales normales et fréquemment dans les eaux usées (**Mann et al, 2000**).

#### III.3.1. Caractères morphologiques et biochimiques

Certaines souches peuvent présenter des caractères différents : leurs colonies sont non pigmentées ou être colorées en brun ou en rouge (dû à la production de pyomélanine ou pyorubrine). Certaines souches se caractérisent par leur aspect mucoïde (souches isolées dans certaines pathologies chroniques : mucoviscidose, dilatation des bronches). D'autres souches peuvent apparaître sous forme de colonies naines et sont plus difficiles à cultiver (**Figure 13**) (**Amazian et al ; 2010**).



**Figure 13** : Aspect de *P.aeruginosa* en microscopie électronique (G X 20000) (2)

---

## Rappels bibliographiques

---

*Pseudomonas aeruginosa* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le Glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Comme la plupart des *Pseudomonas*, elle possède une oxydase. D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce : indole - ; urée - ; H<sub>2</sub>S- ; ONPG- ; TDA- ; LDC- ; ODC- ; ADH+ (Liapid, 2012).

### III.3.2. Pouvoir pathogène

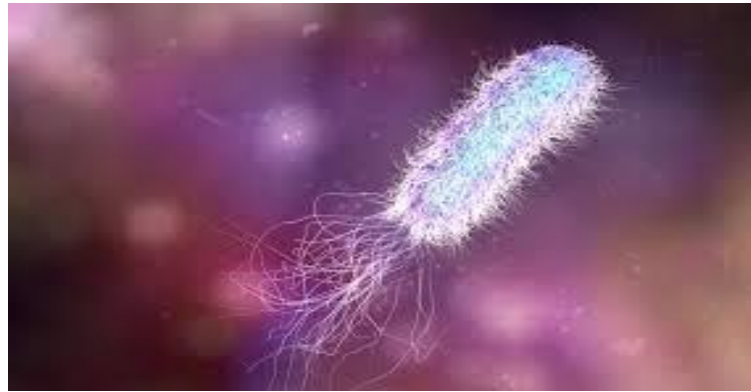
*Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves. Elle joue ainsi un rôle majeur dans les infections broncho-pulmonaires et à un degré moindre dans les infections urinaires ; les infections du site opératoire et les bactériémies. La gravité et la surmortalité observées au cours des infections liées au bacille pyocyanique sont dues à des propriétés intrinsèques ; à ça capacités d'adaptation vis-à-vis de son environnement, ça résistance naturelle à des nombreux antibiotiques et antiseptiques et enfin à sa capacité d'acquérir de nombreux mécanismes de résistance (Khalifa et al, 2011).

### III.4. *Proteus vulgaris*

Le genre *proteus* est classiquement placé dans la tribu des *Proteae* .actuellement, ce genre rassemble cinq espèces. C'est la bactérie la plus souvent isolée des urines et elle est à l'origine d'infections grave et parfois mortelles L'infection à *Proteus* est souvent associée à la présence de calculs dans les reins (Vorkafer, 2011).

#### III.4.1. Caractères cultureux et biochimiques

Les *Proteus sp.* Sont des bacilles à Gram négatif, très généralement mobiles, polymorphes, mesurant de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 10 µm à 80 µm. En milieu gélosé. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* peuvent envahir la surface de milieu en formant des ondes concentriques. Cet essaimage ou swarming, est dû à la grande mobilité de la bactérie (Figure 14) (Avril et al ; 2000).



**Figure 14 :** Observation au microscope électronique de *P. vulgaris* (Agnès, 2013).

*P. vulgaris* cultive facilement sur milieux simples à 37°C. La plupart des souches (85 à 100%) essaient sur gélose nutritive et gélose au sang et envahissent la gélose en formant des vagues concentriques (swarming); cette propriété, liée à la mobilité importante, ne se produit pas sur les milieux dépourvus de NaCl et sur les milieux sélectifs dépourvus de sels biliaries (Catherine Delmas, 2014). C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz (Maryse et al, 2004).

C'est une Entérobactérie : oxydase -, catalase +, glucose +, nitrates +. Genre *Proteus*: lactose -, ONPG -, LDC-, TDA +, uréase +, H<sub>2</sub>S + (excepté *Proteus myxofaciens*, jamais retrouvé dans un prélèvement d'origine humaine), gélatinase + (environ la moitié des souches de *P. vulgaris* et *P. penneri* sont +). Espèce *Proteus vulgaris*: indol +, esculine +, fermentation maltose et salicine, citrate variable (Catherine Delmas, 2014).

### III.4.2. Pouvoir pathogène

Les *Proteus* en général constituent des bactéries uropathogènes majeures : infections non compliquées du tractus urinaire, infections chez des patients prédisposés (altérations structurales du tractus urinaire, diabète, acte chirurgical). Les *Proteus* sont également retrouvés fréquemment dans les septicémies, surtout chez les personnes âgées. Les *Proteus* (surtout *P. mirabilis*) peuvent infecter la peau et les tissus (plaies, abcès divers). Ce genre est souvent impliqué dans des infections nosocomiales, deux tiers des infections à *Proteus* sont d'origine hospitalière, les infections urinaires sont les plus fréquentes (Catherine Delmas, 2014).

# Partie expérimentale

# Chapitre II

## Matériel & Méthodes

## I. Matériel

### I.1. Appareillage et produits chimiques

Une liste des appareils et des produits chimiques utilisés est mentionnée dans l'annexe.

### I.2. Huiles essentielles

Deux huiles essentielles appartenant au genre *Citrus* (*Citrus reticulata* et *Citrus aurantium*) ont été étudiées. Ces extraits ont été achetés au niveau d'un producteur local dans la wilaya de Blida. Le mode d'extraction utilisé était l'hydrodistillation des feuilles. Les huiles essentielles ont été conservées dans leurs flacons d'origine (ambrés) à 4°C pour éviter leur dégradation.





### I.3. Matériel microbiologique

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, quatre souches bactériennes dont trois bactéries Gram négatives et une bactérie Gram positives ont été utilisées. Les souches testées sont impliquées dans les maladies opportunistes ou nosocomiales ainsi que dans toute autre maladie infectieuse (**Tableau 3**).

Les différentes souches purifiées et identifiées ont été fournies par le laboratoire d'analyses médicales du Docteur Sayah, (Bouira). Parmi ces bactéries une (*Proteus vulgaris*) a été isolée à partir d'échantillons de pus et d'urine prélevés sur un patient présentant une infection urinaire. Les autres sont des souches de références (*E.coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853).

## Matériel et méthodes

**Tableau 3** : Généralités sur les souches bactériennes utilisées (Dellaras, 2007 ; Joli et Reynaud, 2002 ; Hart et Shears, 1997).

Souches bactériennes	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p> 	Gram +	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les fosses nasales</li> <li>-La gorge</li> <li>- Le tube digestif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Infection hospitalière.</li> <li>- Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie</li> </ul>
<p><i>Escherichia coli</i></p> 	Gram -	-Le tube digestif	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Infections urinaires</li> <li>-Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro entérites.</li> </ul>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> 	Gram -	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Eau et sols humides</li> <li>-Surface des végétaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Infection nosocomiales fragilisées ou immunodéprimé</li> <li>-Infection urinaire, pulmonaire, oculaire</li> </ul>
<p><i>Proteus vulgaris</i></p> 	Gram -	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Commensale de tube digestif, elles se multiplient rapidement dans les matières en voie de putréfaction et les aliments.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sont souvent en cause dans les infections urinaires, infection de plaie, surinfections divers, tumeurs, voie respiratoire.</li> </ul>

### I.4. Les antibiotiques

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries Gram positives, mais demeurent peu actifs contre les bactéries Gram négatives et les levures.

## Matériel et méthodes

---

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de l'antibiogramme. La classification des souches bactériennes en catégories « sensibles, (S) », « Intermédiaire, (I) » ou « Résistant, (R) » aux antibiotiques est définie par *le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (Claudia Turek and Florian C. Stintzing, 2013)*.

Dans notre travail, trois antibiotiques (gentamycine, ampicilline, amoxicilline) ont été utilisés comme témoins (**Guerin-Fauble V. & Carret G. (1999)**).

### I.5. Milieux de culture

Pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des antibiotiques, le milieu Mueller Hinton a été utilisé. En effet il s'agit d'un milieu non sélectif qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des antibiotiques. La composition de ce milieu est mentionnée dans l'annexe.

## II. Méthodes

### II.1. Identification des isolats

L'identification des souches bactériennes a été effectuée en se basant sur l'observation macroscopique (couleur, aspect, texture...) et microscopique après réalisation de la coloration de Gram.

### II.2. Évaluation de l'activité antibactérienne

#### II.2.1. Préparation des suspensions

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton. Les souches ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après incubation, 1 à 2 colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un vortex dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile.

La concentration des différentes suspensions a été ajustée à  $10^8$  cellule/ml correspondant à 0,5 Mc Farland par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625nm. Les suspensions ainsi réalisées ont été diluées dans de l'eau physiologique stérile pour obtenir les suspensions finales correspondant à  $10^6$  UFC/ml en fonction du type de germes :

- Pour *Pseudomonas*, 10  $\mu$ L de l'*inoculum* est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.

## Matériel et méthodes

---

- Pour les Entérobactéries, 100 µL de *l'inoculum* est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.

- Pour Staphylocoques, 1000 µL de *l'inoculum* est dilué dans 10 ml d'eau physiologique (Daouda Toure, 2015).

### II.2.2 Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été réalisée par méthode de disque ou antibiogramme standard. Son principe consiste à déposer des disques de papiers buvard imprégnés des antibiotiques à tester à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé avec les suspensions bactériennes (**Tableau 4**).

- **Ensemencement**

Dans les boîtes de Pétri, 100µl de chaque suspension bactérienne préalablement préparée sont distribués distinctement sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton puis homogénéisés dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont laissées pendant 15 minutes à la température du laboratoire.

- **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bunsen, les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la boîte gélosée de Mueller-Hinton précédemment ensemencées. La boîte gélosée ainsi préparée est maintenue à 4°C pendant 30 min afin de permettre la pré-diffusion des extraits. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 24 heures pour la lecture (**Figure 15**).

**Tableau 4 :** Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (Ponce et al ; 2003).

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	diamètre < 8mm
Sensible (+)	diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	diamètre > 20 mm

### II.2.3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

- **Méthode de diffusion en puits**

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Cependant, des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes, peuvent avoir une influence sur les résultats.

Dans notre travail le « screening » des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel a été réalisé in vitro par la méthode de diffusion en milieu solide. Cette méthode a été proposée par COOPER & WOODMAN en 1946 et, reprise par SHROEDER et MESSING en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'H.E à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable.

La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'H.E de concentration connue. L'H.E diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (**Figure 15**) (Eymard, 2003).

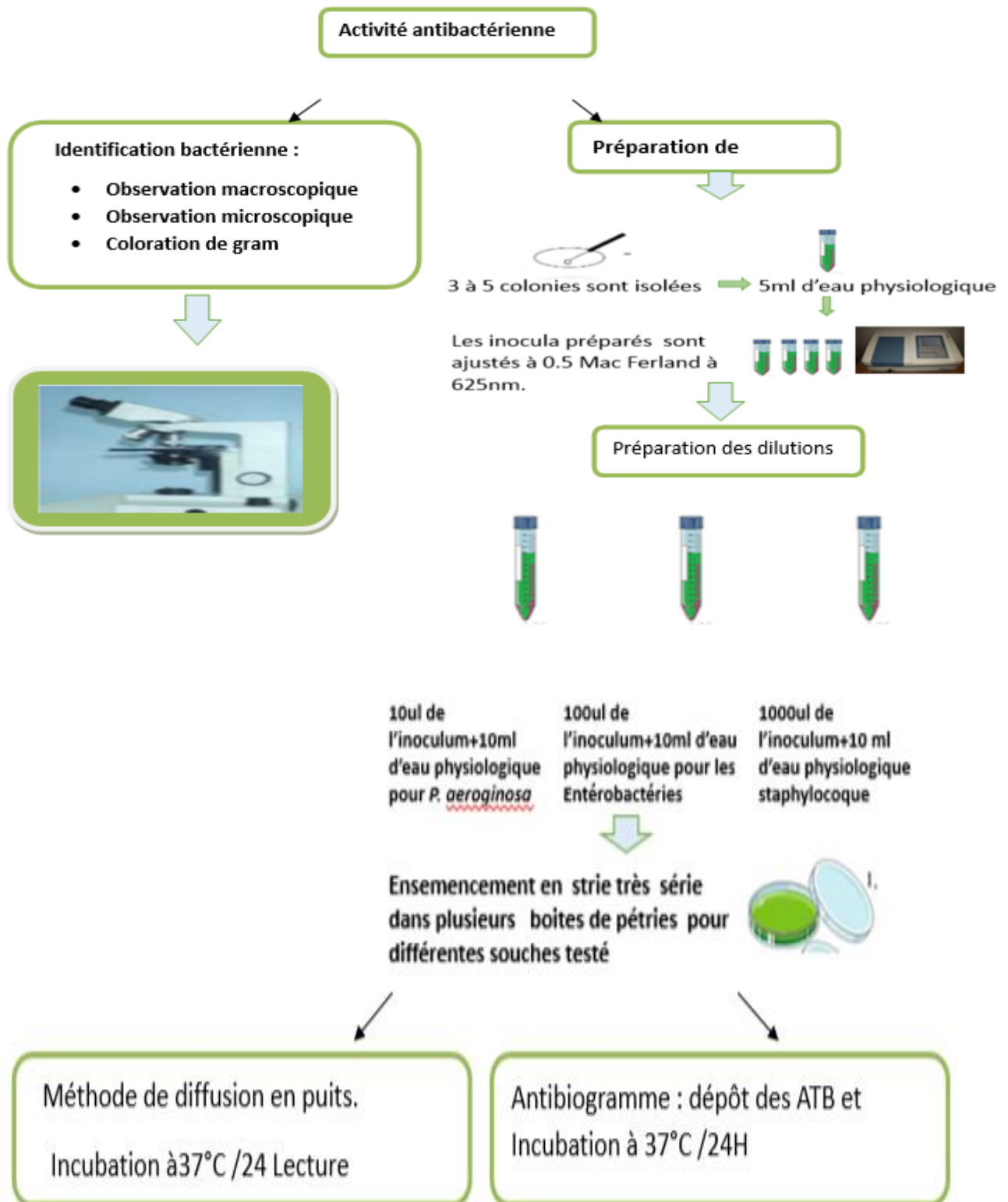
### II.2.4 Détermination des CMI

Une seconde étape consiste à évaluer le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles sélectionnées, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation (**Hammer et al, 1999**).

Nous avons utilisé la méthode par dilution en milieu solide de Mueller Hinton (MH). Les extraits à tester ont été dilués dans le milieu de culture afin d'obtenir différentes concentrations allant de 0,25 à 20µl/ml.

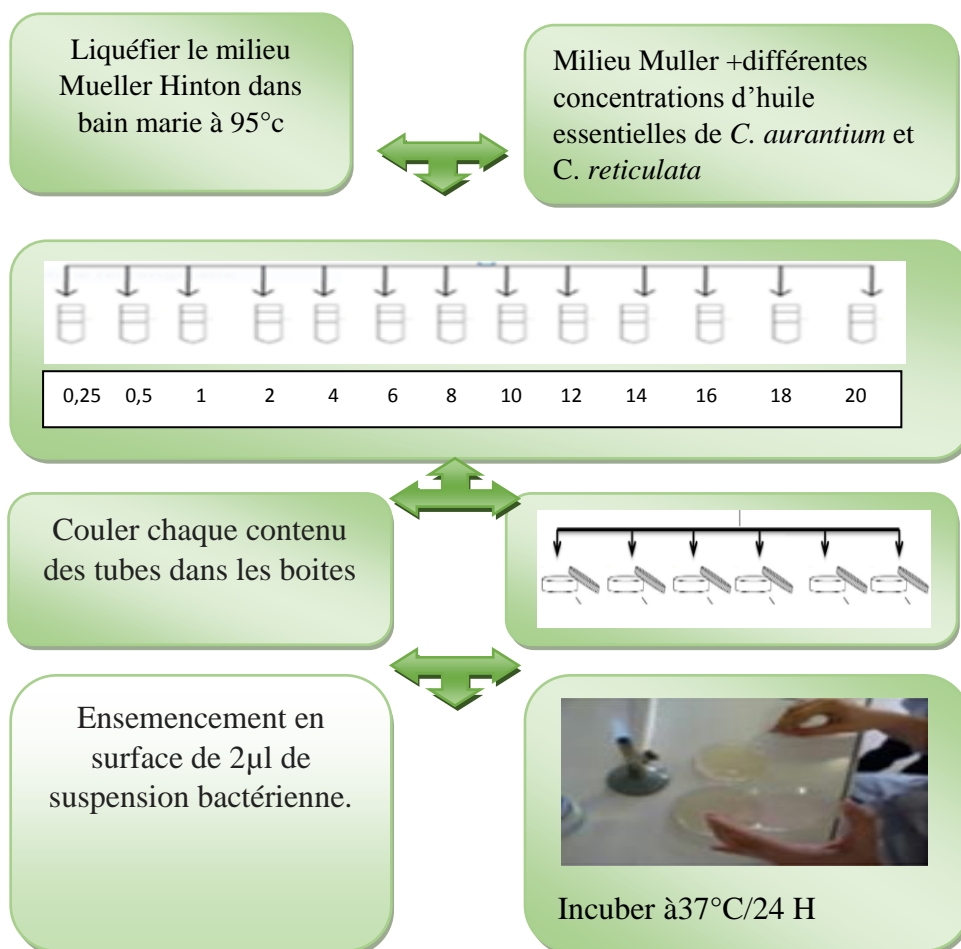
Ces gammes de concentrations ont été préparées dans des tubes à essais par dilution. Les tubes ont été par la suite coulés dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre. Après solidification du milieu, un volume de 2µL de l'inoculum bactérien est appliqué à la surface de la gélose MH contenant les H.E. Un tube sans huiles essentielles a été utilisé comme témoin (**Figure 16**).

## Matériel et méthodes



**Figure 15 :** Schéma représentatif des étapes de l'activité antibactérienne et l'antibiogramme

## Matériel et méthodes



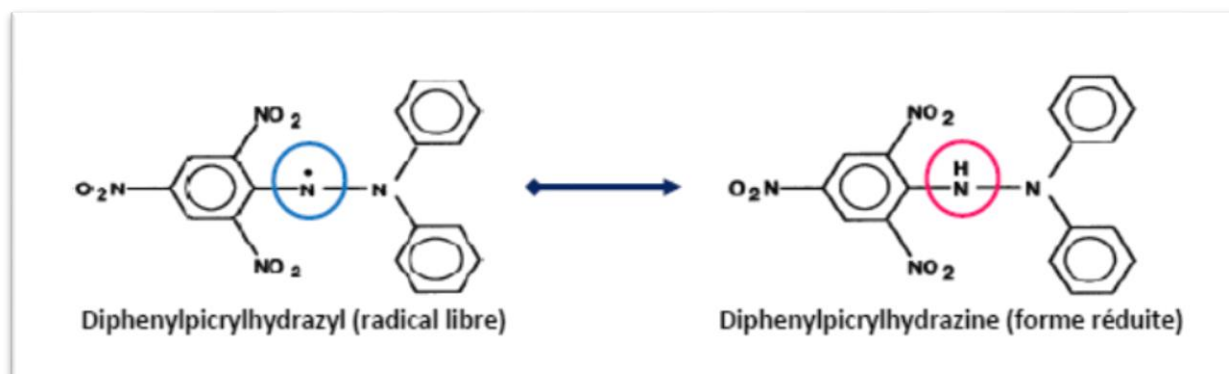
**Figure 16 :** Schéma représentatif des étapes de la détermination la concentration minimale inhibitrice (CMI).

### II.3. Etude de l'activité antioxydante

#### • Principe

Le 1,1-Diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est un radical relativement stable qui se présente sous forme d'un solide cristallisé, paramagnétique (à cause de l'électron libre) qui se dissout dans les solvants organiques (Miguel, 2010).

Le principe de cette méthode est basé sur le changement de couleur de DPPH du violet au jaune, cette modification est la conséquence de la capacité de réduction des antioxydants envers le radical DPPH stable (en présence des piègeurs de radicaux libres). Le DPPH (2,2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette est réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 17) mesurable à 517nm (Hinneburg et al., 2006).



**Figure 17** : Formes libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

Avant de commencer les tests de l'activité antioxydante, une courbe d'étalonnage de la solution de DPPH° a été réalisée afin d'évaluer la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions de DPPH. Les résultats sont présentés sous forme d'un graphe. Six dilutions du DPPH à base d'éthanol ont été testées.

### • Mode opératoire

Une solution de DPPH est préparée dans l'éthanol à une concentration de (0,004%). Par la suite, 2 ml de cette solution est ajouté à 100µL de l'extrait à différentes concentrations de 3,12 à 400µl/ml (dans l'éthanol). La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique a été utilisé. Son absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Toutes les opérations sont réalisées en duplicata.

L'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante : % Inhibition =  $(AC - AE) / AE \times 100$

Où :

**Ac** : Absorbance du contrôle ; c'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH.

**AE** : Absorbance du test ; c'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait.

(Barkat and Laib, 2011).

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la IC50, sachant que l'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

# Chapitre III

## Résultats et discussion

## Résultats et discussion

### I. Résultats

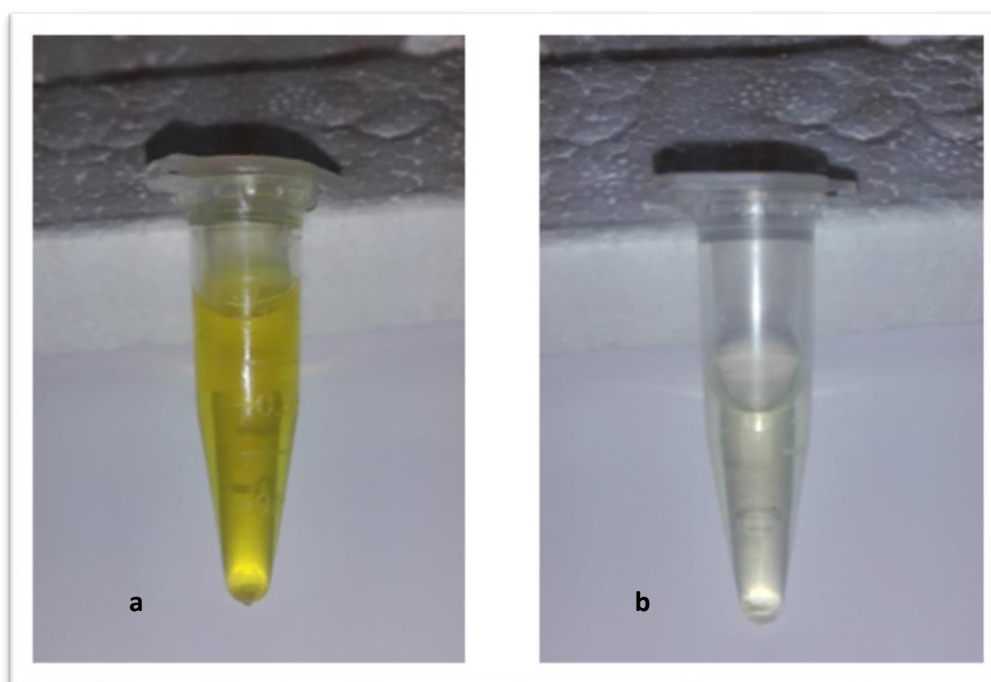
#### I.1. Analyses des huiles essentielles

##### I.1.1. Caractéristiques physico-chimiques

Les H.Es des espèces de *Citrus* présentent un aspect liquide visqueux, limpide et blanc transparent pour le *Citrus reticulata* et jaune pour *Citrus aurantium* (**Figure 18**). Elles sont caractérisées par une odeur fraîche et aromatique (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Couleur, aspect et odeur des huiles essentielles de genre *Citrus*

Caractère	Couleur	aspect	Odeur
<i>Citrus aurantium</i>	Jaune	Liquide visqueux	Odeur caractéristique fraîche, citronnée
<i>Citrus reticulata</i>	Blanc	Liquide visqueux	Odeur caractéristique fraîche, citronnée



**Figure 18** : aspect et couleur de *Citrus aurantium* (a) et *Citrus reticulata* (b)

##### I.1.2. Densité

La densité d'une H.E constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une H.E dans différents domaines (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, chimique...etc.). Elle

## Résultats et discussion

peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'altération (**Tableau 6**).

**Tableau 6** : Valeurs des densités des H.Es de *Citrus* à 20°

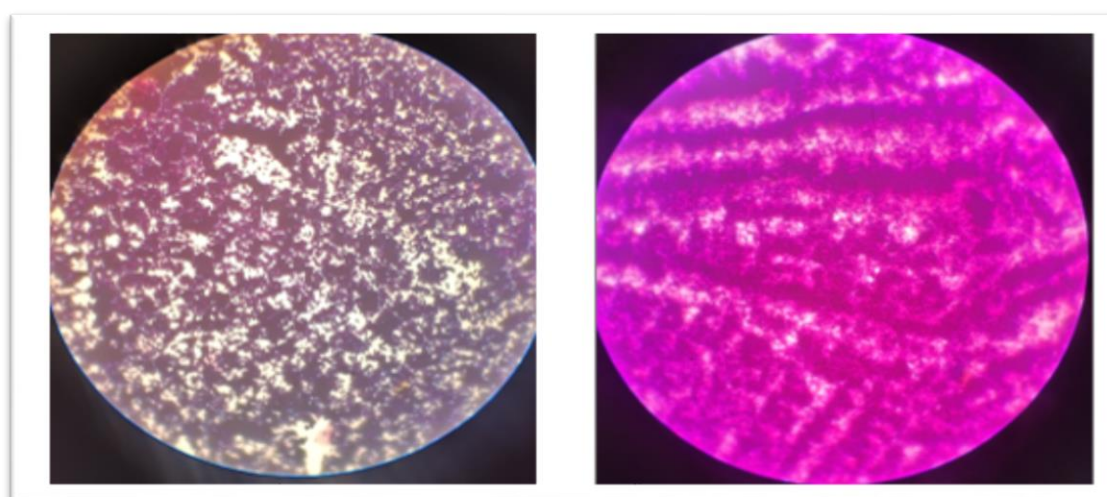
Huile essentielle	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Citrus aurantium</i>
Densité	0,84	0,79

D'après les résultats des densités obtenues, on peut dire que les huiles sont conformes aux normes internationales. Selon l'Association Française de Normalisation, les H.Es appartenant aux espèces *Citrus* doivent avoir une densité maximale de 0,876 (AFNOR NF T. 75-202). En effet, nos résultats indiquent des valeurs inférieures de 0,84 pour *C. reticulata* et de 0,79 pour *C. aurantium*.

### I.2. Identification des souches bactérienne

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram et l'observation microscopique (G x 40) ont mis en évidence des bactéries à Gram négatif colorées en rose et les bactéries à Gram positif colorées en violet (**Figure 19**)



**Figure 19** : Aspect en microscopie optique (Gx40) après coloration de Gram de *S.aureus* et *E.coli*.

## Résultats et discussion

---

L'identification macroscopique et microscopique des souches étudiées est résumée dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Identification macroscopique et microscopique des souches étudiées

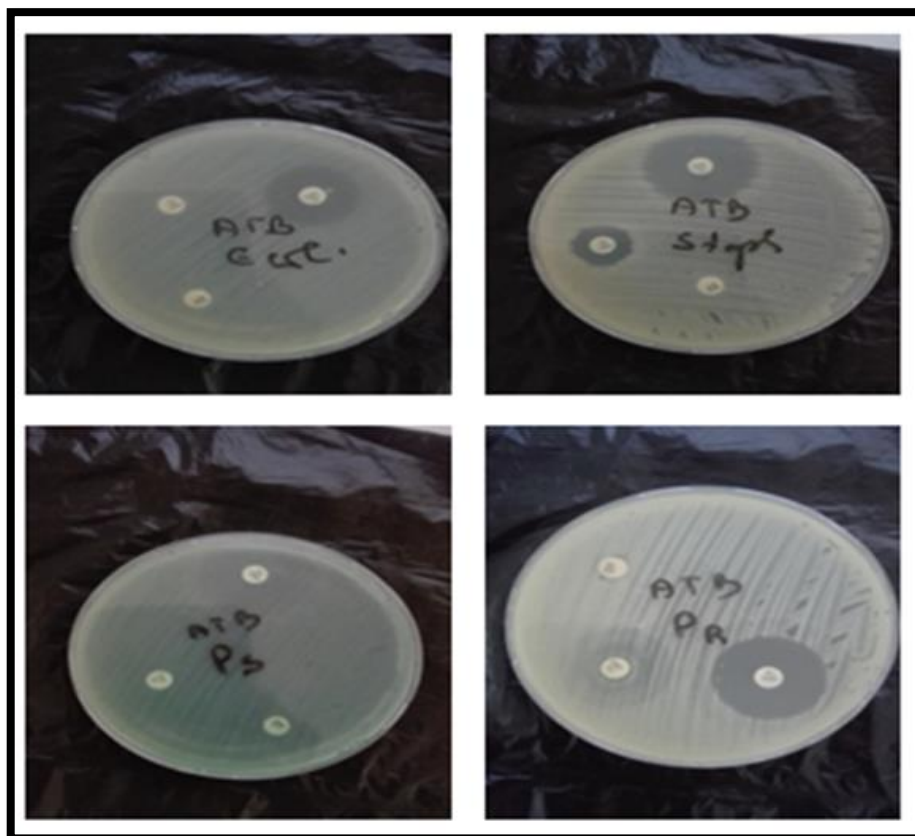
Espèces bactériennes	Gram	Aspect macroscopique		Aspect microscopique
		Couleur	Aspect	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive	jaune	lisses, opaques, convexes	Coque en grappe de raisin
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	crème	Opaque, convexe	Coccobacille
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	vert	visqueux	Bacille
<i>Proteus vulgaris</i>	Gram négatif	crème	envahissante	Bacille

### I.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

Pour les antibiotiques testés la gentamycine a le même effet inhibiteur sur les quatre souches, *Escherichia coli* (22mm), *Staphylococcus aureus* (28mm), *Proteus vulgaris* (26mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (23mm), alors que l'ampicilline a un effet inhibiteur que contre *Staphylococcus aureus* et n'est pas actif contre les autres souches. Pour l'amoxicilline aucun effet inhibiteur sur les 04 souches testées n'a été constaté (**Figure 20**).

## Résultats et discussion

---



**Figure 20** : Résultats de l'antibiogramme.

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée sur 04 souches bactériennes par la méthode de l'antibiogramme. Les zones d'inhibition autour des disques de l'antibiotique sont exprimées en mm. Pour la gentamycine, les quatre souches sont marquées par une sensibilité importante vis-à-vis de cet antibiotique avec des zones d'inhibitions de  $22 \pm 0$ ,  $28 \pm 0$ ,  $26 \pm 0$  et  $23 \pm 0$  pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement.

Pour l'ampicilline, *Staphylococcus aureus* est la seule bactérie qui marque une sensibilité vis-à-vis de cet antibiotique avec un diamètre d'inhibition de  $15 \pm 0$  mm, par contre les autres souches sont résistantes.

Pour l'amoxicilline toutes les souches ont montré une croissance et étaient donc résistantes vis-à-vis de cet antibiotique (**Tableau 8**).

## Résultats et discussion

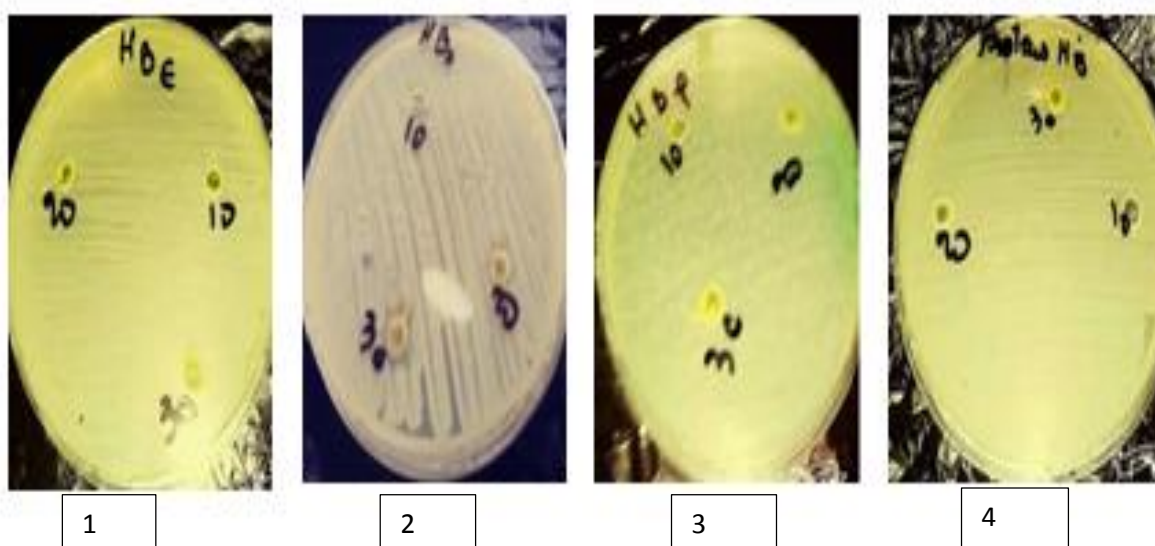
**Tableau 8 :** Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques testés (mm).

Antibiotique / Sensibilité	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b>Gentamycine</b>	22± 0	28± 0	26± 0	23± 0
<b>Ampicilline</b>	résistante	15± 0	Résistante	résistance
<b>Amoxicilline</b>	résistante	Résistante	Résistante	résistance

### I.4. Etude de la sensibilité aux huiles essentielles

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium* a été évaluée sur 04 souches bactériennes par la méthode de l'antibiogramme. L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis des souches bactériennes.

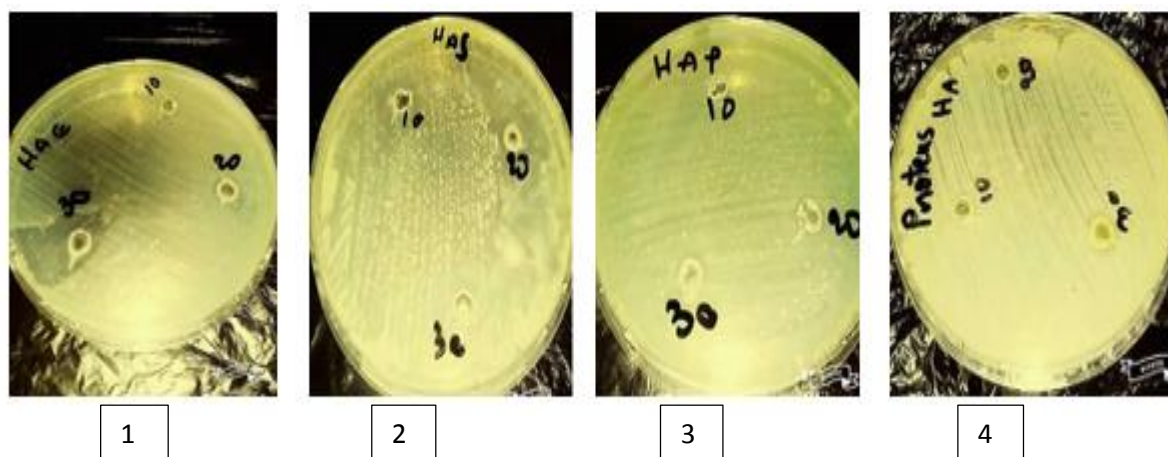
Les observations effectuées sur l'effet des H.Es de *Citrus* sur la croissance des souches bactériennes testées: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Proteus vulgaris*, sont représentées dans les **Figures (21, 22, 23)** et le tableau 9.



**Figure 21 :** L'effet de l'H.E de *Citrus aurantium* sur : 1 : *E. coli*, 2 : *S. aureus*, 3 : *P. aeruginosa* et 4 : *Proteus vulgaris*.

## Résultats et discussion

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. aurantium* a été déterminée avec la méthode des puits en milieu solide, contre les bactéries à Gram positifs et Gram négatif, (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*). Une activité inhibitrice a été observée pour *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 08mm pour 10 $\mu$ l de l'extrait, 10mm pour 20 $\mu$ l et 12mm pour 30 $\mu$ l, on peut dire alors que cette souche est sensible. Alors que *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* et *Escherichia coli* sont marqués par une résistance à l'huile de *C. aurantium*.



**Figure 22** : L'effet de l'H.E de *Citrus reticulata* sur : 1 : *E. coli*, 2 : *S. aureus*, 3 : *P. aeruginosa* et 4 : *Proteus vulgaris*.

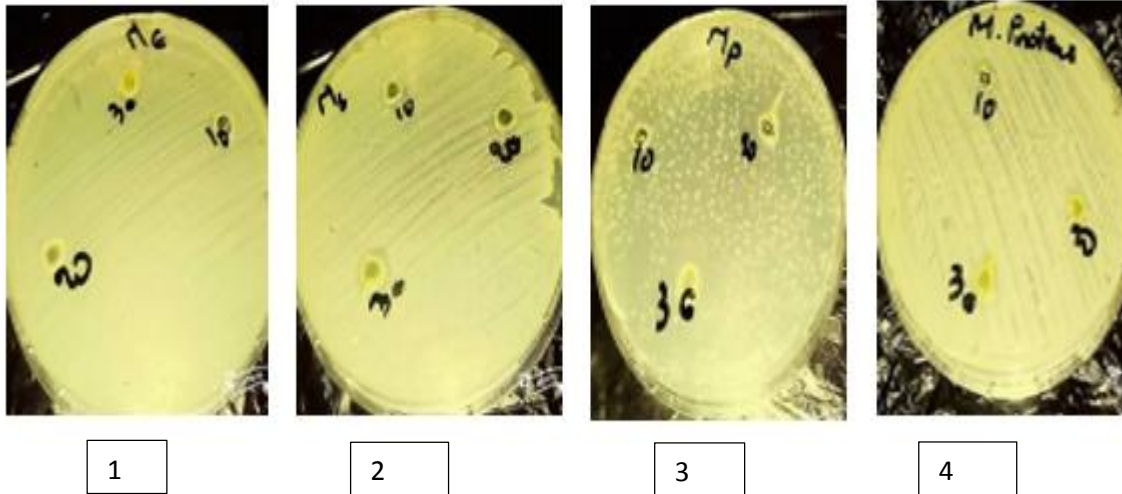
L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. reticulata* a été déterminée avec la méthode de diffusion en puits sur milieu solide, contre les bactéries à Gram positifs et Gram négatif, (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*).

L'huile essentielle de *C. reticulata* a montré une très forte activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 12mm pour 10 $\mu$ l de l'extrait, 13mm pour 20 $\mu$ l et 21mm pour 30 $\mu$ l. Pour *Escherichia coli* les diamètres sont de 9mm pour 10 $\mu$ l de l'extrait, 13mm pour 20 $\mu$ l et 25mm pour 30 $\mu$ l. Ces souches sont extrêmement sensibles à cette huile.

*Pseudomonas aeruginosa* a indiqué des diamètres d'inhibition plus faibles et qui varient de 05mm à 10mm (30 $\mu$ l). *Proteus vulgaris* a montré une résistance vis-à-vis de l'huile testée, en effet les zones d'inhibitions étaient situées entre 3 et 8mm.

## Résultats et discussion

- Essai de test de combinaison de *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium*.



**Figure 23 :** L'effet de mélange des huiles de *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium* sur : 1 : *E. coli*, 2 : *S. aureus*, 3 : *P. aeruginosa* et 4 : *Proteus vulgaris*.

Nous avons combiné les deux huiles afin de déterminer la capacité éventuelle des deux huiles à augmenter leur effet antibactérien. Pour *Escherichia coli* le diamètre enregistré est de 05mm pour 10 $\mu$ l de mélange, 06mm pour 20 $\mu$ l et 10mm pour 30 $\mu$ l. Pour *Staphylococcus aureus* le diamètre est de 07mm pour 10 $\mu$ l, 9mm pour 20 $\mu$ l et 10mm pour 30 $\mu$ l. Donc, ces souches sont sensibles à l'effet des deux extraits. Pour *Proteus vulgaris* le diamètre est de 04mm pour 10 $\mu$ l de l'extrait, 05mm pour 20 $\mu$ l et 08mm pour 30 $\mu$ l. donc cette souche est résistante au mélange. On note pour *Pseudomonas aeruginosa* un diamètre de 10mm pour 10 $\mu$ l de l'extrait, 12mm pour 20 $\mu$ l et 26mm pour 30 $\mu$ l. Donc, cette souche est extrêmement sensible au mélange.

Chez *S. aureus* et *E. coli* on a remarqué que le mélange de deux huiles a diminué l'effet des huiles. Des zones d'inhibition inférieures à celles obtenues avec les huiles essentielles testées séparément ont été enregistrées. Les deux huiles ont un effet antagoniste.

Chez *P. vulgaris* aucune différence significative n'a été observée suite au traitement avec le mélange des deux huiles.

Par contre chez *P. aeruginosa* un effet synergique a été remarqué suite au mélange des deux huiles, se traduit avec des zones d'inhibition supérieures à celles obtenues avec les huiles testées séparément allant de 10 à 26 mm (**Tableau 9**).

## Résultats et discussion

**Tableau 9** : Diamètres des zones d'inhibition en mm des huiles essentielles seules et en combinaison

Huile / Germe	Volume d'HE	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Citrus reticulata</i>	10 µl	09	12	03	05
	20 µl	13	13	04	06
	30 µl	25	21	08	10
<i>Citrus aurantium</i>	10 µl	00	08	00	00
	20 µl	00	10	00	00
	30 µl	00	12	00	00
<i>(Citrus aurantium+ Citrus reticulata)</i>	10 µl	05	07	04	10
	20 µl	06	09	05	12
	30 µl	10	10	08	26

### I.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Le tableau 10 montre les résultats des concentrations minimales inhibitrices des deux extraits des huiles essentielles des *Citrus* étudiés.

**Tableau 10** : les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles

Germe / CMI	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Citrus aurantium</i>	>20ul/ml	>20ul/ml	>20ul/ml	>20ul/ml
<i>Citrus reticulata</i>	18ul /ml	16ul/ml	4ul/ml	10ul/ml

D'après nos résultats, il a été constaté que parmi les deux H.Es testées, l'H.E de *C. aurantium* est caractérisée par une faible activité antimicrobienne par rapport à l'autre huile ; avec des CMI qui sont supérieures à 20µl/ml. En revanche l'H.E de *C. reticulata* a révélé une activité antibactérienne intéressante dont les CMI sont marqués à 10µl/ml pour *Staphylococcus aureus*, 16µl/ml pour *Pseudomonas aeruginosa*, 18µl/ml pour *Escherichia coli* et 4µl/ml pour *Proteus vulgaris*.

### I.6. L'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les activités antioxydantes des extraits volatils des plantes aromatiques. L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *C. reticulata* et *C. aurantium* a été évaluée par la capacité de balayage du radical libre DPPH qui consiste à suivre la réduction du radical libre DPPH (2,2- diphenyl -1- picrylhydrazyl) par un antioxydant à l'aide des spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de l'huile essentielle (Erkan et al.,2008). Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie Cette décoloration est représentative de la capacité des composés de l'huile essentielle à piéger cesradicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique (Figure 24). Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de notre HE (Erkan et al.,2008).



**Figure 24** : Décoloration de milieu réactionnel.

## Résultats et discussion

### I.6.1. Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH

La figure 25 montre les résultats de la courbe d'étalonnage de la solution de DPPH.

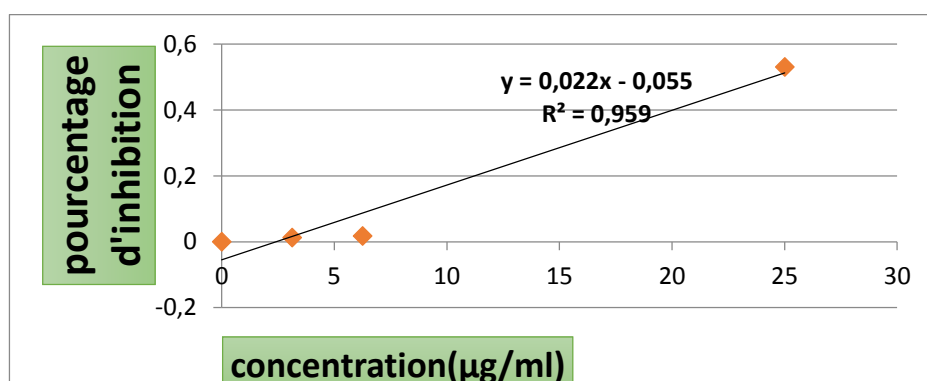


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH.

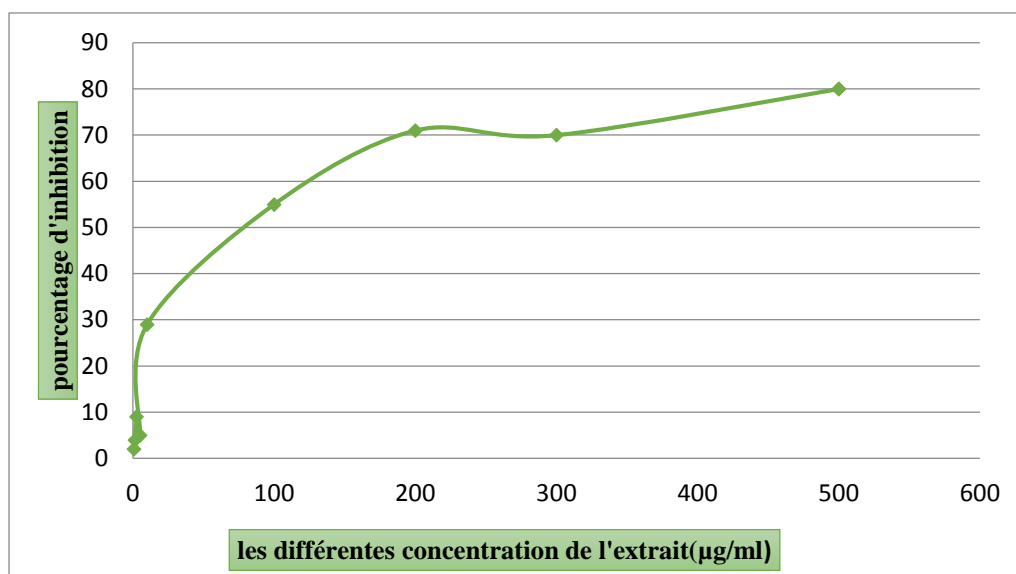
Les absorbances ont été mesurés pour chaque concentration, on observe qu'il n'y a pas de différence significative dans l'absorbance pour les concentrations testées et une très bonne linéarité de l'absorbance en fonction de la concentration.

### I.6.2. Détermination des pourcentages d'inhibition

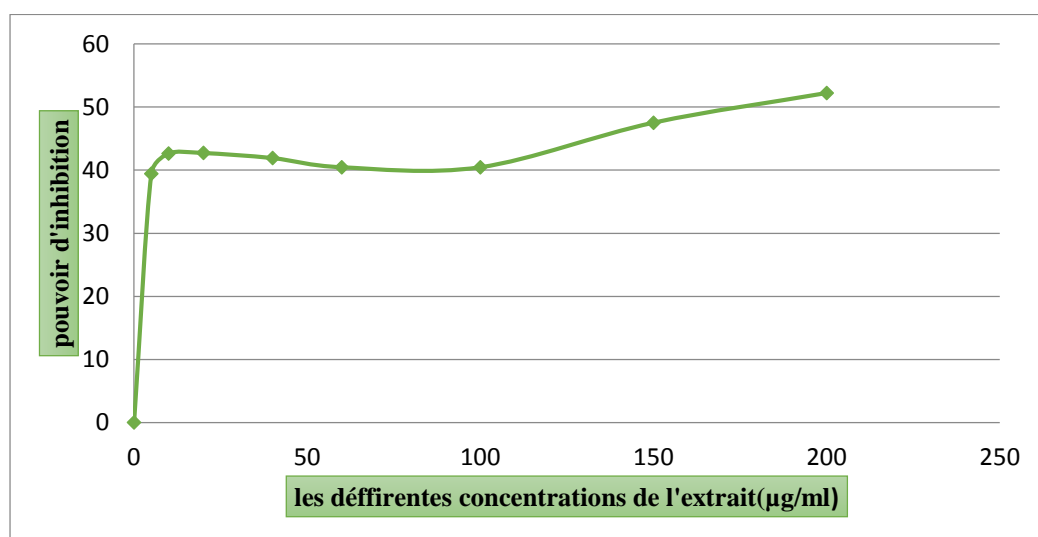
Les mesures de l'inhibition d'absorbance du DPPH provoquée par la présence des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* après 30 minutes ont permis de déterminer le pourcentage d'inhibition (PI) de chaque dilution.

Les résultats sont présentés sous forme de trois courbes, une pour le pouvoir inhibiteur de l'H.E de *Citrus reticulata* seul (Figure 26), l'autre présente le pouvoir inhibiteur de *Citrus aurantium* (Figure 27) et la troisième courbe présente le pouvoir inhibiteur du mélange des deux extraits (1/1) de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* (Figure 28).

## Résultats et discussion

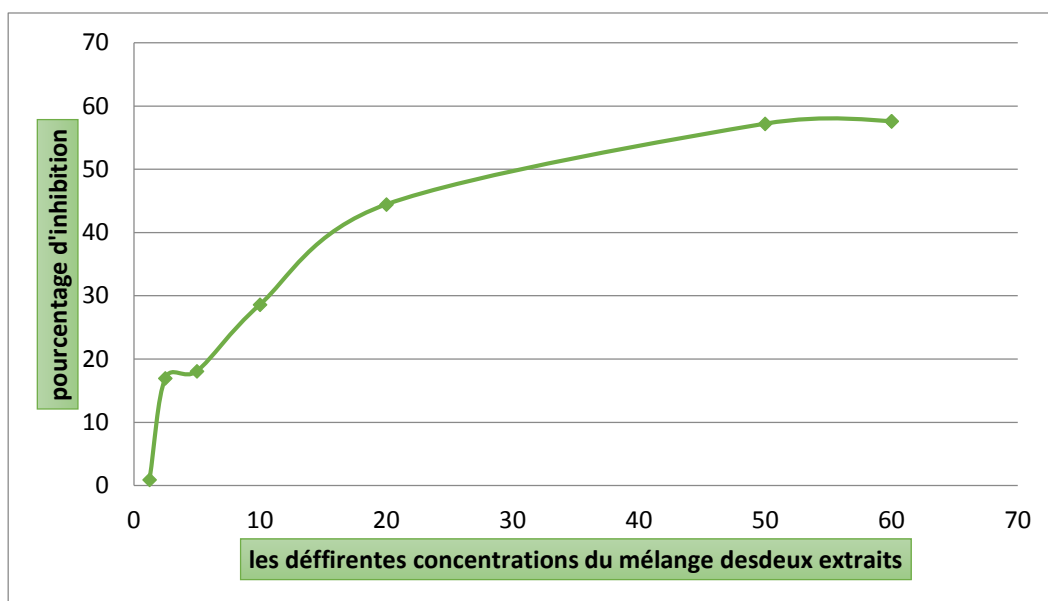


**Figure 26 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de *Citrus reticulata*.



**Figure 27 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de *Citrus aurantium*.

## Résultats et discussion



**Figure 28 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations du mélange des deux extraits de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*.

### I.6.3. Détermination des IC50

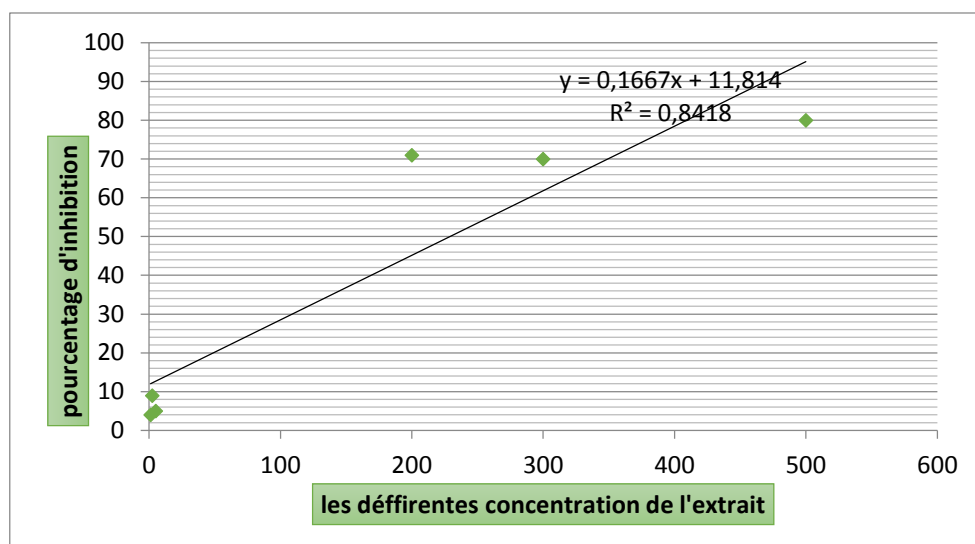
Les résultats figurent (29, 30, 31) et dans le tableau 11 illustrent l'activité antioxydant vis-à-vis du radical libre DPPH aussi que des différents extraits utilisé dans cette étude.

**Tableau 11 :** Activité antioxydante des extraits vis-à-vis du radical DPPH

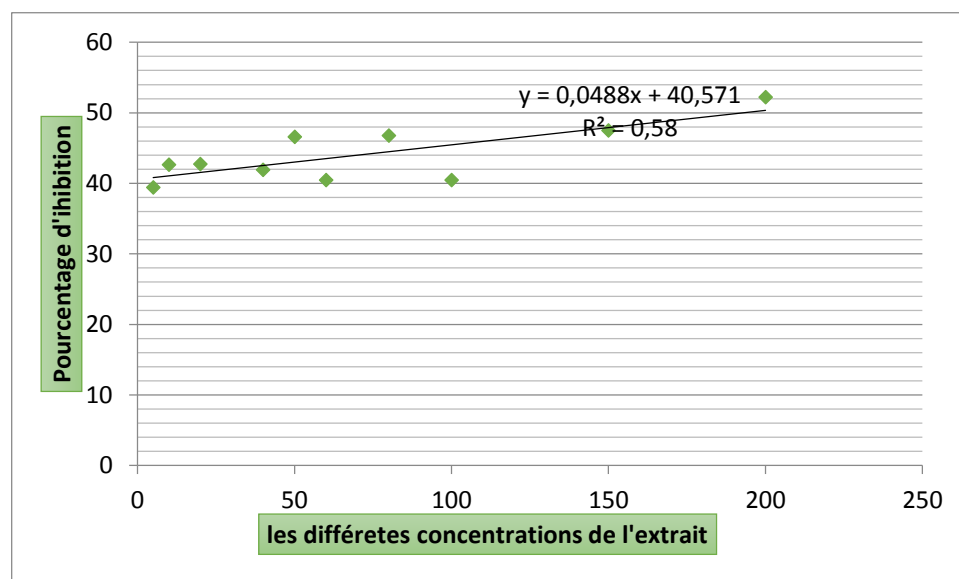
Les concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH (IC50)	
Extrait de <i>Citrus reticulata</i>	177,52 mg/ml
Extrait de <i>Citrus aurantium</i>	155,19 mg/ml
<i>Citrus reticulata</i> + <i>Citrus aurantium</i>	36,74 mg/ml
Acide ascorbique	16,75 µg/ml

La figure suivante résume l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*, elle représente le pourcentage d'inhibition IC50% des radicaux libre DPPH en fonction de la concentration en H.E.

## Résultats et discussion



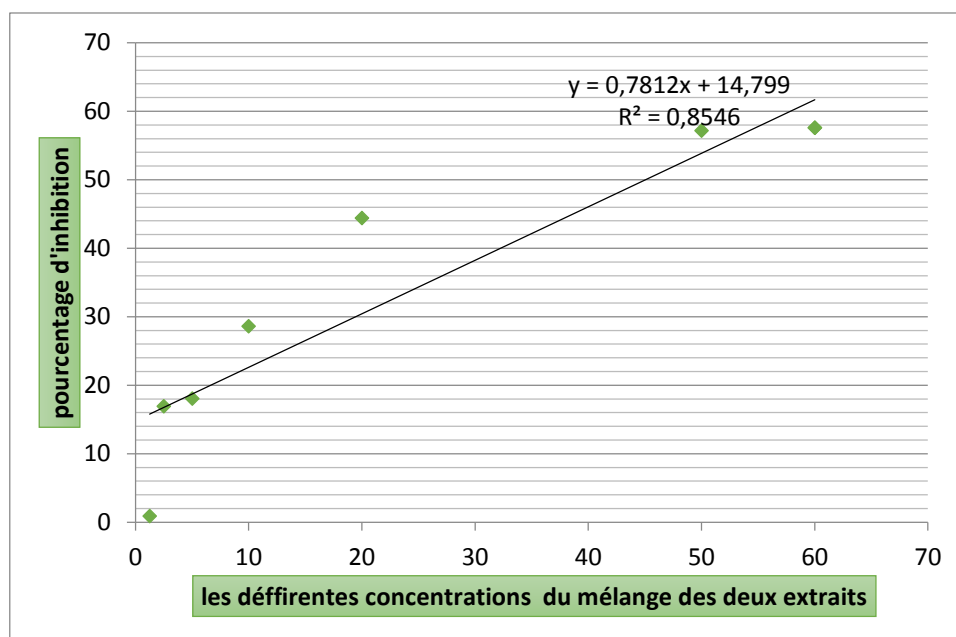
**Figure 29 :** Détermination de l'IC50 de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*.



**Figure 30 :** Détermination de l'IC50 de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*.

La figure suivante résume l'activité antioxydante du mélange des deux extraits de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*, il représente le pourcentage d'inhibition IC50% des radicaux libres de DPPH en fonction des concentrations en H.E.

## Résultats et discussion



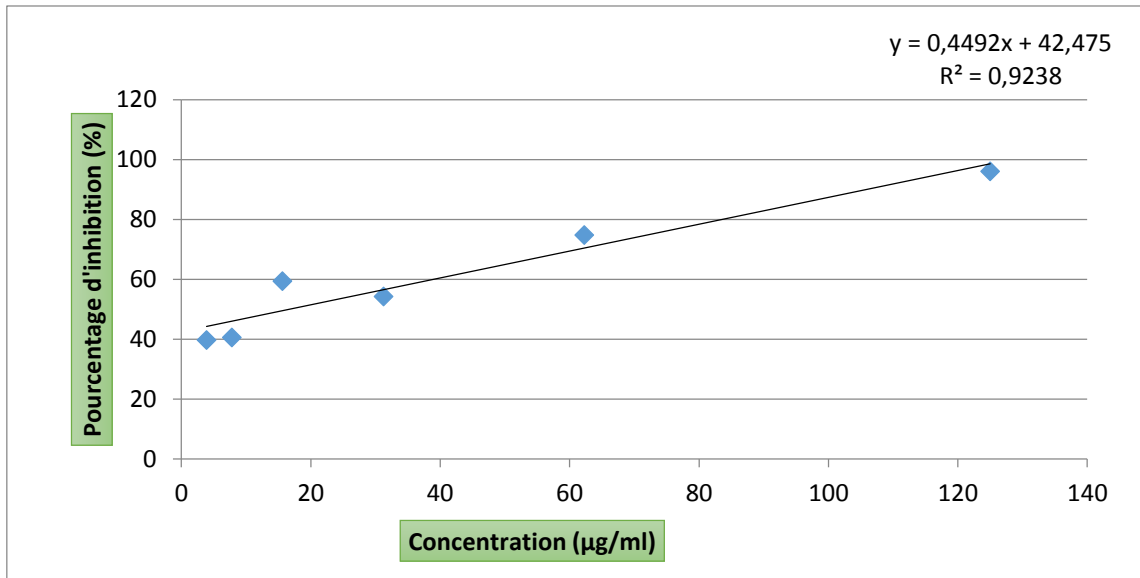
**Figure 31** : Détermination de l'IC<sub>50</sub> du mélange des deux extraits de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC<sub>50</sub>, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Houbairi et al, 2015 ; Blois, 1958 ; Khoudali et al, 2014), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Ces IC<sub>50</sub> sont déterminées graphiquement figures (29, 30, 31). Le mélange des deux extraits *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium* a exhibé une meilleure capacité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH, enregistrant ainsi des IC<sub>50</sub> de 36,74 mg/ml. Une faible capacité antioxydante est enregistrée par l'extrait de *Citrus reticulata* qui présente une valeur de 177,52 mg/ml. L'extrait de *Citrus aurantium* a montré une capacité antioxydante élevée en enregistrant ainsi des IC<sub>50</sub> de 155,19 mg/ml par rapport à *Citrus reticulata*.

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire contre le DPPH. Plus la valeur de IC<sub>50</sub> est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

D'autre part, les deux huiles essentielles de *Citrus* et la vitamine C ont pu réduire le radical libre DPPH. Cependant, ces huiles ont montré une capacité antioxydante très faible en comparant à la vitamine C. On remarque que l'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique est faible (16,75 µg/ml) (Figure 32).

## Résultats et discussion



**Figure 32 :** Détermination de l'IC50 de l'acide ascorbique.

### II. Discussion générale

#### II.1. Activité antibactérienne

Au cours du screening de l'activité antibactérienne par la technique des puits nous avons constaté une activité intéressante de l'HE de *Citrus reticulata*. Nos résultats sont proches à ceux publiés par **Boughendjioua et al, (2017)**, concernant l'activité antibactérienne des HE du zeste de *C.reticulata* cultivée en Algérie. Durant leur travail, le limonène était décrit comme composé majoritaire de l'huile essentielle (67,04%). Sur la base de ces observations, il semble que le limonène contribue à l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle testée.

Cependant, nos résultats sont contradictoires à ceux retrouvés par **Frassinetti et al, (2011)** où les souches à Gram négatif ont montré une plus grande sensibilité aux huiles essentielles extraites de différentes plantes du genre *Citrus*, en particulier la souche de *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI maximale de 75 µg/ml. *E. coli* par contre était plus sensible, affichant des CMI de l'ordre de 45 µg/ml. Les souches à Gram positif *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* et *S. aureus* étaient inhibées à des concentrations d'huiles plus élevées allant de 100 à 250 µg/mL (CMI).

Les mécanismes d'action des HEs contre les micro-organismes sont complexes et incluent l'inhibition séquentielle d'une voie biochimique commune, l'inhibition d'enzymes protectrices et l'utilisation d'agents actifs de la paroi cellulaire pour améliorer l'absorption d'autres agents antimicrobiens. Une synergie entre le carvacrol et certains hydrocarbures monoterpènes (tels que l' $\alpha$ -pinène, le camphène, le myrcène, l' $\alpha$ -terpinène et le p-cymène) présentant généralement de faibles propriétés antimicrobiennes a été observée (**Bassolé et Juliani, 2012**).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencées par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée. Les composés les plus antimicrobiens sont les phénols (carvacrol, thymol, eugénol), viennent ensuite les alcools (cinéole, linalol...) et dans une faible mesure les alcènes (p-cymène, pinène, terpinène...) (**Burt, 2004**). Les HE contenant du phénol ou de l'alcool comme composés majoritaires sont plus actives, que celles contenant le limonène (hydrocarbure monoterpénique) comme composé majoritaire (**Inouye et al., 2001**). Ces observations ont été également partagées par **Dorman et Deans, (2000)**, qui ont montré que les hydrocarbures

## Résultats et discussion

---

monoterpéniques, abondants dans les HE de *Citrus* contenant le limonène comme constituant principal est faiblement inhibiteur contre une panoplie de microorganismes.

Les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques dans des préparations pharmaceutiques (**Inouye et al., 2001**). Très probablement l'absence de ces composés dans nos huiles testées a été le facteur défavorable à son activité antibactérienne. En effet, plusieurs travaux ont démontré que le pouvoir antimicrobien élevé des huiles essentielles de plusieurs espèces de plantes médicinales est attribué à leur richesse en composés phénoliques comme le carvacrol et le thymol (**Friedman et al, 2002; Nevas et al, 2004; Loziene et al, 2007**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**Lemes Raiane et al. 2018**).

En général, le premier site d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires (**Carson et al., 2006**). En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (**Cristani et al., 2007**).

Des études antérieures ont démontré que la majorité des HE testées pour leurs propriétés antibactériennes ont un effet plus prononcé contre les Gram +. La résistance des Gram - est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible (**Wan, 1998**).

### II.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante était significative pour toutes les huiles testées. Ce pouvoir était proportionnel à la concentration des huiles essentielles.

Dans le cas de l'acide ascorbique, on a pu constater un pouvoir antioxydant très élevé, de plus l'équilibre est atteint (virage coloré) en peu de temps par rapport aux les huiles essentielles.

## Résultats et discussion

---

L'activité antioxydante est dépendante de l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle des composants phénoliques des huiles essentielles (donneur d'hydrogène). En leur présence la molécule du DPPH devient stable. Cela induit une diminution de la concentration du radical libre jusqu'à l'affaiblissement de la capacité de l'antioxydant en tant que donneur d'hydrogène **(Boughendjioua et al, 2017)**.

Dans une étude précédente réalisée par **Frassinetti et al, (2011)** sur différentes espèces d'agrumes (orange amère, orange douce, citron et mandarine), les auteurs ont indiqué la présence de propriétés anti-radicalaires intéressantes qui pourraient être corrélées à la présence des monoterpènes, en particulier le g-terpinène et le limonène dans les huiles essentielles. Nos résultats sont contradictoires et indiquent de faibles propriétés antioxydantes.

D'après les travaux de **Sarrou et al, (2013)** qui ont porté sur l'étude de l'activité antioxydante de différentes parties de *Citrus aurantium* (fleurs, feuilles, zeste) cultivé en Grèce, L'HE de cette plante a été caractérisée par une remarquable activité de neutralisation des radicaux libres. Par ailleurs, les HE obtenues de feuilles présentaient une activité antioxydante élevée, suivies des fleurs, des feuilles et du zeste. Il semble que l'effet antioxydant puissant de certaines espèces appartenant au genre *Citrus* pourrait être attribué à la teneur élevée en d-limonène **(Roberto et al, 2010)**.

Dans notre cas, aucune conclusion ne peut être émise quant à l'origine de l'huile essentielle puisqu'on a travaillé uniquement avec des HE issus des feuilles. Cependant, on a remarqué que le pouvoir anti-radicalaire était puissant chez *Citrus aurantium* en comparaison avec *C. reticulata*.

### II.3. Test de combinaison des huiles essentielles

Les études de combinaison de substances médicinales en général ont déjà été décrites dans la littérature. Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications clinique, car elle permet de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé **(Rosato et al., 2007)**.

De façon générale, nos résultats ont permis de mettre en évidence Un effet potentialisateur (synergique) entre les deux huiles essentielles testées. Avec cette combinaison, les concentrations nécessaires en huiles essentielles pour atteindre la valeur de l'IC50 sont nettement réduites. Les deux HEs étaient que très légèrement active lorsqu'elles ont été utilisées seules.

## Résultats et discussion

---

Les huiles essentielles présentent une activité antioxydante qui dépend en grande partie de leur composition. L'activité antioxydante des huiles essentielles, leur stabilité pendant le stockage, sont liées de manière complexe à la composition de huiles essentielles ainsi qu'à la proportion des composants les plus actifs (**Misharina et Samusenko, 2008**).

La potentialisation de l'activité des HEs a déjà été rapportée. En effet, **Benyoucef et al, (2018)** ont mis en évidence des phénomènes de synergie se traduisant par une augmentation du pouvoir antioxydant par la combinaison des huiles de *Thymus fontanesii*, *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia herba-alba*. Leurs activités ont augmenté considérablement en comparaison avec l'effet obtenu lorsqu'elles étaient utilisées seules. Dans leur travail, ils ont montré que l'action des phénols monoterpénoïdes (le thymol et p-cymène) associés à des monoterpènes oxygénés (le camphre, le bornéol et la verbénone) joue un rôle central dans cette activité et produit effet synergique plus fort.

Ces résultats représentent donc un intérêt qui pourrait conduire au développement d'un traitement basé sur la combinaison des huiles essentielles en tant qu'agents antioxydants naturels, tant dans les aliments que dans les domaines pharmaceutiques.

# Conclusion & perspectives

## Conclusion et perspectives

---

### Conclusion et perspectives

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

Les travaux réalisés dans notre étude ont permis de mettre en évidence les activités antibactérienne et antioxydante des H.Es de *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium*.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion des puits. Une activité intéressante a été obtenue avec l'huile essentielle de *C. reticulata* pour les concentrations (10µl, 20µl, 30µl) dont les zones d'inhibitions varient entre 09et 25mm pour *E. coli* ATCC25922, 12et 21mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923et 03mm et 08mmpour *Proteus vulgaris*, 05mm et 10mm pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.Par contre l'huile essentielle de *C. aurantium* s'est montrée inactive vis-à-vis *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853et *Proteus vulgaris*. Par contre une activité sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 avec un diamètre d'inhibition pas plus de 12mm a été observée.

Une évaluation de l'activité antimicrobienne du mélange des deux HE a été réalisée. Chez *S.aureus* et *E.coli* on a remarqué que ce mélange a diminué l'effet des huiles. Des zones d'inhibition inférieure à celle obtenu avec les huiles essentielles testées séparément ont été enregistrées. Chez *P.vulgaris* aucune différence significative n'a été observée suite au traitement avec le mélange des deux huiles. Par contre chez *P.aeruginosa*, un effet synergique a été remarqué, se traduit avec des zones d'inhibition supérieures à celle obtenues avec les huiles testées séparément allant de 10 à 26 mm.

Les CMI ont été déterminées pour les deux huiles essentielles par la méthode de dilution en milieu solide. *Citrus reticulata* a montré une excellente activité antibactérienne en comparaison à *Citrus aurantium*. *Proteus vulgaris* était la bactérie la plus sensible indiquant une CMI de 4µl/ml suivie de *staphylococcus aureus* (10µl/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (16µl/m) et *Escherichia coli* (18µl/ml). Par contre, *Citrus aurantium* était caractérisé par une faible activité bactérienne se traduisant par des valeurs de CMI supérieures à 20µl/ml pour les bactéries étudiées.

L'activité antioxydante des deux huiles de *Citrus* a été également étudiée par le test du radical libre DPPH. D'après nos résultats, nous avons constaté que toutes les huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir antioxydant dont le plus important est celui de *C.*

## Conclusion et perspectives

---

*aurantium*. Par ailleurs, on a montré que le mélange des deux huiles essentielles a augmenté le pouvoir antioxydant qui reste cependant inférieur à celui de l'acide ascorbique (16,75 µg/ml). Une faible capacité antioxydante est enregistrée par extrait de *Citrus reticulata* qui présente une valeur de 177,52 mg/ml. *Citrus aurantium* a exhibé une capacité antioxydante élevé en enregistrant ainsi des IC50 de 155,19 mg/ml par rapport à *Citrus reticulata*.

En perspectives il serait intéressant de poursuivre ce travail par :

- Des études *in vivo* et chercher les stratégies à adapter pour une application potentielle des H.E pour la lutte antimicrobienne et antifongique.
- La détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) et la réalisation des tests complémentaires avec d'autres souches bactériennes et fongiques.
- Une analyse chromatographique par CPG (chromatographie en phase gazeuse) afin d'identifier les constituants responsables de l'activité de ces huiles.

# Références Bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### A

- **Agnès R. (2013).** Des nanoéponges luttent contre le staphylocoque doré. Futura Science, juin 2013 Issue. <http://www.futura-sciences.com/fr/sante/>.
- **Akthar Mohd Sayeed.,Birhanu Degaga1and., TanweerAzam, 2014.** Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms:A review .Available online at <http://www.journalissues.org/IBSPR>. Vol.2 (1), pp. 001-007(consulté le 19 juin 2019).
- **Amazian,K., Rossello,J., Castella,A., Sekkat,S., Terzaki,S., Dhidah,L. et al. (2010)** [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region]. EastMediterr Health J 16: 1070-1078.
- **Ammad F, Moumen O, Gasem A, Othmane S, Hisashi KN, Zebib B, Merah O. 2018.** The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. Comptes Rendus Biologies, 341, 97-101
- **Anton et Lobstein. (2005) -Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from Juniperusnavicularis.**Biochemical Systematic and Ecology, 31:193-201.
- **Apraj VD, Pandita NS, 2014.** Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of Citrus Reticulatablanco peel. In : School of Science, SVKM's NMIMS, Vile-Parle (W), Mumbai 400 056, India. 6(2); 328-33
- **Avril, J., Dabernat, H.,et Denis, F. (2000).** Bactériologie Clinique (3ème Editi). Ellipses.

### B

- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils- A review. Food Chem Toxicol. 2008; 46: 446-475.**
  - **Barboni T. (2006).** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie ;Thèse doctorat ; Spécialité : Chimie théorique, physique et analytique ; Università de Corsica –Pasquale Paoli ; pp 287
-

## Références bibliographiques

---

- **Barkat, M., Laib, L., 2011.** La composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèche de *Lavandulaofficinalis*. *Revue de génieindustrielle* 6, 46-54.
  - **Bassolé Imaël Henri Nestor, H. Rodolfo Juliani (2012).** Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.
  - **Bhunia AK. (2008).** *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne Microbial Pathogens**. Edition: Springer Science, Bsiness Media LLC. Springer. New York. 276p.
  - **Boz ,Bekhechi , Atik-Bekkara F et Abdel Ouahid D.E. (2009).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanumglandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153-159.
  - **Belletti N., Nidagijimana, M., Siso C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R.& Gardini F. (2004).** Evaluation of the antimicrobial *activity of Citrus essences onSaccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural*
  - **Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.** Update on uses and properties of Citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6185–6205.[[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  - **Benayad N., 2008.** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.
  - **Benedicte ; Michel B. (2011).** Agrumes (comment les choisir et les cultiver facilement),édition Eugen Ulmer, Paris; 6-11, 68-70.
  - **Benyoucef Fatima, Mohammed El Amine Dib, Zoheir Arrar, Jean Costa, Alain Muselli. 2018.** Synergistic Antioxidant Activity and Chemical Composition of Essential Oils From *Thymus fontanesii*, *Artemisia herbaalba* and *Rosmarinus officinalis*. *J Appl Biotechnol Rep.*;5(4):151-156
  - **Boughendjioua Hicham, Zahra boughendjioua. 2017.** Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oil of Mandarin (*Citrus reticulata*) Cultivated in Algeria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 44: 179-184.
  - **Bruneton J (1993).** « *Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales* » 2ème édition, Tech et doc, Lavoisier, Paris.
-

## Références bibliographiques

---

- **Bruneton J (1999).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 3eme Edition, TEC et DOC Lavoisier, Paris. P : 483-574.
- **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International Journal of Food Microbiology **94**, pp.223-253.
- **Blois, M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, **181**: 1199-1200.

### C

- **Catherine DELMAS.FICHE TECHNIQUE : Proteus vulgaris.**Enregistrée sous le n° W313002633. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique : 06 JUIN 2014, 3p.
- **Chutia M., DekaBhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C. et Boruah P ( 2009).** Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India, LWT - Food Science and Technology **42** :777–780.
- **Claudia Turek and Florian C. Stintzing. 2013.** Stability of Essential Oils: A Review.Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety In: Institute of Food Technologists®, Vol. 12.
- **Colette (2014).** Les plantes médicinales. ALS (séance du 25 Avril 2004). P58.
- **Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D (2007)** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. J. Agric. Food Chem. **55**: 6300-6308
- **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., & Wyllie S.G. (2000).** The mode of antimicrobialaction of theessential oil of Melaleuca alternifolia(tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, **88**, 170– 175.

### D

- **Danielle, C. (2015).** Fiche technique bacteriologie153 ;Escherichia coli (No. n° W313002633). Toulouse.
-

## Références bibliographiques

---

- **Daovy A (2009).** L'oranger amer ou bigaradier .actualités pharmaceutique volume 48, page 47- 49.
  - **Daouda Toure, 2015.** ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE. UNIVERSITE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY : UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE SCIENCES MEDICALES ABIDJAN, **153**.
  - **De Billerbeck V.G., Roques C., Vaniere P. & Marquier P. (2002).** Activitéantibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. Hygiène (Revueofficielle de la société française d'hygiène hospitalière), **10**, 248-251.
  - **Degryse A.C., Delpla I. &Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huilesessentielles.** Atelier santé environnement -IGS- EHESP, **87p**
  - **Dellaras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation.Lavoisier, Paris. 654 p.
  - **Dettere, S., 2012.** Influence des étapes de production du parfum issu des écorces d'orange amère (*Citrus aurantium L sspamara*) sur la qualité aromatique. L'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement AgroParisTrch, p. 211.
  - **Devriese L.A, Vancnnayt M., Baele M., Vaneechoutte M., DE Graf E ., Snauwaert C., Cleenwerck I., Dawynot P., Swincs J., Decostre A. & Haesebrouck F. (2005).** *Staphylococcus pseudodintemedius*sp; a coagulase positivespecies from animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **55**,1569-1573.
  - **Dhifi Wissal., Sana Bellili., SabrineJazi., Nada Bahloul. Wissem Mnif, 2016.**Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. [www.mdpi.com/journal/medicines](http://www.mdpi.com/journal/medicines). vol 42(3),16 p (consulté le 19 juin 2019)
  - **Dorman H.J., Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, **88**: 308–316.
  - **Dosoky N & Setzer, W. 2018.** Biological Activities and Safety of *Citrus* spp. essential Oils. International Journal of Molecular Sciences. **19**. 10.3390/ijms19071966.
  - **Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., 2008.** Chemical composition, antimicrobial andantioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of
-

## Références bibliographiques

---

Cleistocalyxoperculatus(Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology **46**: pp.3632-3639.

- **Durand, G. (2009).** Caractérisation, épidémiologie et pathogénie d'un clone de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline portant le gène de la toxine du choctoxique staphylococcique (TSST-1). Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard Lyon I. 219

### Ε

- **Erkan, N., Ayranci, G. & Ayranci, E. (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry. **110**: 76-82.
- **Eymard S. (2003).** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés: Spécialité Biochimie. Nante. France.

### ف

- **F. Ammad et al. / C. R. Biologies 341 (2018) 97–101**
- **Farhat., M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2010.** Citrus D'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions Office des publications universitaires ed.
- **Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002.** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection 65 (10), 1545 – 1560.

### Г

- **Géraut, C., Cleenewerk M.B., Jelen G., Géraut L., Tripodi D (2010).** Dermatitis eczématiformes et métiers de bouche. Revue Française d'allergologie. volume: 50, Pages 109–123.
  - **Ghédira, K, Goetz, P., 2015.** Citrus aurantium L var. amara Link. Phytothérapie 13, 320-327.
  - **González-Molina E., Domínguez-Perles R., Moreno D.A., GarcíaViguera C (2010).** Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. Journal of pharmaceutical and biomedical, volume 51, 327-345.
  - **Guignard, J.L. <Biochimie végétale>, Masson, Paris, 2000, 166.**
-

## Références bibliographiques

---

- **Guo, J.-j., Gao, Z.-p., Xia, J.-l., Ritenour, M.A., Li, G.-y., Shan, Y., Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China, LWT Food Science and Technology (2018), doi:10.1016/j.lwt.2018.07.060.**
- **Guerin-Faublee V. & Carret G. (1999).** L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.

### 5

- **Hammer K.A., Carson C.F. & Rilley T.V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985-990.
- **Hamdan, Dalia & Mohamed, Maged & El Sahzly, Assem. (2016).** Citrus reticulata Blanco cv. Santra leaf and fruit peel: A common waste products, volatile oils composition and biological activities. *Journal of Medicinal Plants Research*. 10. 457-467. 10.5897/JMPR2016.6139.
- **Hart T. et Shears P. (1997).** Atlas de poche de microbiologie. *Medicine sciences. Lavoisier*, 314p.
- **Hazzit. (2002) - Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from Cistus monspeliensis L. leaves. Biochemical Systematic and Ecology, 30:189-203.**
- **Hernandez-Ochoa L.R. (2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
- **Hinneburg, I., Damier-Dorman, H.J & Hiltunen, R. (2006).** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs et épices. *Food Chemistry*, **97**: 122-129.
- **Houbairi, S., Elmiziani, I., Lamiri, A., & Essahli, M. (2015).** Comparison of the Antioxidant Activity of Aromatic Medicinal Plants of Moroccan Origin. *European Journal of Medicinal Plants*, **10** (4): 1-10.

### 7

---

## Références bibliographiques

---

- **Inouye H, Yamaguchi H, Takizawa T. 2001.** Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7, 251-254.



- **Joli B. et Reynaud A. (2002).** Entérobactéries : Systématique et méthode de diagnostic. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. 392 p.



- **Kalemba D et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- **Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V., et Khedher, M. (2011).** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulation. *Biologie Clinique*, 393-403.
- **Khalil E.A., Afifi F.U. and Al-Hussaini M. (2007) – Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (Mus musculus).** *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 104-112.
- **Khayyat S A, Roselin LS. 2018.** Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *Journal of Saudi Chemical Society*, 22, 855-875.
- **Khoudali, S., Benmessaoud, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., & Azzi, M. (2014).** Etude de l'activité antioxydante et de l'action anticorrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis L.*) du Maroc. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(3): 887-898.
- **Kosié-Tanackov et Dimié. (2013).** Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oils from Citrus spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1), 27-31.



- **Lagunez –Rivera L. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique
-

## Références bibliographiques

---

directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; p. 31-42

- **Lemes Raiane S., Alves Cassia C.F., Estevam Elisângela B.B., Santiago Mariana B., Martins Carlos H.G., Santos Tainá C.L. 2018.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90( 2 ): 1285-1292.
- **Liazid, A. (2012).** Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du C.H.U de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.24-26.
- **Lim. T.K. (2012).** *Citrus reticulata* Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer sciences et Business Media B.V; 4: 695-715.
- **Loziene K., Venskutonis P.R., Sipailiene A., Labokas J-Radical. 2007.** Scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry.* 103; 546-559.
- **Luque de Castro, M. D. ; Jiménez-carmona,M ,M.etFerandez-pérez,V.**Trends Anal.Chem.1999,18,708.



- **Manhães, Madeira S.V.F., Rabelo M., Soares P.M.G., Souza E.P., Meineles A.V.P., Montenegro C., Lima R.F., Assreuy A.M.S and Criddle D.N. (2012) -** Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L.(labiateae) on Guinea-pigileum. *Phytomedicine*, 12:506-509.
  - **Majnooni M-B., Mansouri K., Gholivand M-B., Mostafaie A., Mohammadi-Motlagh H. R., Afanzade N. S., Abolghasemib M. M et Piriyaie, M. (2012).** La composition chimique, la cytotoxicité et activités antioxydant de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus Aurantium* L. *Revue africaine de la biotechnologie.* 11 (2) : 498-503.
  - **Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L. (2000).** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749, contribue to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30, 294-297.
  - **Manil J. (2004).** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'E.coli: IV) souches necrotoxiques. *Annales de Medecine Vétérinaire*, 148, 121-132.
-

## Références bibliographiques

---

- **Maryse, A., et Danielle, clave.** (2004). Fiche technique : Bactériologie 051 en ftbac, Laboratoire de Bactériologie, Hygiène CHU (No. 51). Toulouse Rangueil.4.
  - **Mazari K., Bendinerad N., BenkhechiCh et Fernandez X.** (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L and *cupressus sempervirens*. *Medicinal Plant Research*. 4(10) : 959-964
  - **Miguel, M.G,** 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 291-312.
  - **Mirmostafa SA, Rasooli I.**2002; Antibacterial properties of thymus pubscens and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*.73, 244-250.
  - **Misharina TA, Samusenko Al.** 2008. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 44: 482-486.
  - **Moghaddam, Mohammad & Mehdizadeh, Leila.** (2017). Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. 10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8.
  - **Molyneux, P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Original article. 26(2): 211-219.
  - **Moufida S. & Marzouk B.** (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.
  - **Moreau, 2003.** « Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». *American Perfumer & Essential Oil Review*, 1928, 467-503.
  - **MukhtAR. R; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A.** (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulate (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.
  - **Myriam Raymond, 2005.** L'AROMATHERAPIE CHEZ LE NOURISSON ET LE PETIT ENFANT (thèse). Docteur en pharmacie. NANTES : faculté de pharmacie, 101.
- ℵ*
- **Nakajima, V.M.; Macedo, G.A.; Macedo, J.A.** Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT Food Sci. Technol.* 2014, 59, 1205–1212. [[CrossRef](#)]
-

## Références bibliographiques

---

- **Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo V.** Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2017;10(4):86. Published 2017 Nov 2. doi:10.3390/ph10040086
- **Nevas M, Korhonen A, Lindstrom M, Turkki P, Korkeala H. 2004.** Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot* 67: 199–202.



- **Omonijo Faith A., Liju Ni, Joshua Gong, Qi Wang, Ludovic Lahaye, Chengbo Yang, 2018.** Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4, 126-136.
- **Oubekka, S. D. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotiques au sein des biofilms de *Staphylococcus aureus* Apport de la microscopie de fluorescence multimodale. Thèse de Doctorat L'Université Paris Sud XI.190.



- **Pantel, A. (2015).** Multirésistance des entérobactéries aux antibiotiques, Modulation de l'influx et de l'efflux membranaires chez *Escherichia coli* ST131 Soutenu. l'université de montpellier .Préparée au sein de l'Ecole Doctorale 168 : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2) et de l'Unité de Recherche INSERM 1047 Spécialité : Microbiologie.
  - **Pauli, 2001.** Evaluation of scavenging activity assessed by col (II) EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of pharmacology and toxicological methods*, 44:507-512.
  - **Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. & Roura S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.
  - **Pibiri M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctoral. Polytechniques Fédérale de Lausanne.
-

## Références bibliographiques

---

- **Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- **Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O. 1999.** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Cancérologie*, 95, 1-4.
- **Prudent D., Perineau F., Bessiere J.M., Michel G.M. & Baccou J.C. (1995).** Analysis of the essential oil of *Origanum vulgare* L. evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 165-173.



- **Quezel P. et Medail F. (1995).** La région méditerranéenne, Centre mondial majeur de biodiversité végétale. Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie, France, 152-55.



- **Rafiq S, Kaul R, Sofi S.A., Bashir N, Nazir F, Ahmad Nayik G. 2018.** *Citrus* peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17, 351-358
  - **Ramful D., Tarnus E., Aruoma O. I., Bourdon E., Bahorun T. (2011).** Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps; *Food Research International*; 44: 2088-2099.
  - **Robert, D. (2013).** *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive. Thèse de Doctorat. Université Angers. 126.
  - **Roberto D., Micucci P., Sebastian T., Graciela F., Anesini C.** Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulation and cell proliferation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010;106:38-44.
  - **Rosato Antonio, Cesare Vitali, Nicolino De Laurentis, Domenico Armenise, Maria Antonietta Milillo, 2007.** Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14, 727-732
-

## Références bibliographiques

---



- **Safaei-Ghomi J, 2010.** Composition chimique et activités: antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. Journal de la Société Chimique de Tunisie, 10, 119-125.
  - **Saleh, Mahmoud & Clark, Shavon & Woodard, Brooke & Ayomide Deolu-Sobogun, Suziat. (2010).** Antioxidant and free radical scavenging activity of essential oils. Ethnicity & disease. 20. S1-78.
  - **Sanago R. (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali): 53.
  - **Santoyo et al S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J. & Reglero G., 2005.-** Chemical composition activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. Journal of Food Protection. 68: 790-795.
  - **Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Therious K., Therios I. 2013.** Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. Molecules. ;18:10639–10647.
  - **Shafiya Rafiq , Rajkumari Kaul , S.A. Sofi , Nadia Bashir , Fiza Nazir , Gulzar Ahmad Nayik. 2016.** Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. King Saud University In : Department of Food Science and Technology, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology, Chatha, Jammu, J&K 180009, India. 2018) 17, 351–358, 8.
  - **Sharma N. & Tripathi A. (2006).** Fungitoxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. World Journal of Microbiological and Biotechnology, 22, 587-593.
  - **Schumacher A. & Reichling P. (2003).** Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped viruses Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 in vitro. Phytomedicine, 10(6-7), 504-510.
  - **Sidana J, Saini V, Dahiya S, Nain P, Bala S (2013).** A review on citrus 'the boon of nature. Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 18: 20–27.
  - **Silva J.S., 2016.-** Synopsis des espèces de *Croton* L. (Euphorbiaceae) dans l'état de PERNAMBUCO, au Brésil. Acta botanica Brasilica. 2: 441-453.
  - **Sousser A. 1997.** The Great Citrus Book: A Guide with Recipes. Ed. Ten Speed Press, 1-160.
-

## Références bibliographiques

---

### T

- **Tripoli, E.; La Guardia, M.; Giammanco, S.; Di Majo, D.; Giammanco, M.** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **2007**, 104, 466–479. [[CrossRef](#)]
- **Turek et Stintzing, 2013.** **Activité antioxydante des extraits des graines de Nigella sativa L** Étude in vitro et in vivo, mémoire de magister en boichimie appliquée, **Option: Molécules Bioactives, Université El-Hajlakhdar Batna, pp 71.**

### V

- **Vigan, Martine.** **Essential oils: renewal of interest and toxicity.** (2010). *Eur J Dermatol.* 20(6):685-92.
- **Vincenot F., Saleh M. & Prevost G.** (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, **407**, 61-69.
- **Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. & Perezalvarez J.** (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*), essential oils. *Food Control*, **19**, 1130-1138.
- **Vorkaufe, S.** (2011). Les infections urinaires communautaires bactériennes de l'adulte : Prise en charge diagnostique et thérapeutique. université henri poincaré.104.

### W

- **Wan, 1., Wilcock, A, Coventry, M. J.** (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. 1. *Appl. Microbiol.* 84, 152-158.
- **Williamson, D.** (2003). Les infections urinaires : une approche clinique. *Pharmacothérapie*.547-550.

(1) <http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine>. Consulté le 01/06/2019

(2) <https://laboratoireumani.fr/le-mode-daction-des-huiles-essentielles-sur-les-bacteries>. Consulté le 05/06/2019

---

## Annexes

### Annexe I: Composition de milieu de culture

#### Muller-Hinton :

- Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300g
- Hydrolysat de caséine.....	17.5g
- Amidon de maïs .....	5g
- Agar-agar.....	13g
- Eau distillée.....	1l

## Annexe II: matériels et produits utilisé en laboratoire

Matériels		Produits	
<b>Spectrophotomètre</b>		<b>Violet de gentiane</b>	
<b>Etuve</b>		<b>Lugol</b>	
<b>Balance (Scout™ SE)</b>		<b>Fushine de ziehl</b>	
<b>Microscope optique(OPTIKA)</b>		<b>alcool</b>	
<b>Bec benzène (NATURAL)</b>		<b>Solution DPPH et éthanol</b>	

**Annexe III: la classification des bactéries utilisées :**

<b>GRAM</b>	<b>bactérie</b>	<b>Systématique bactérienne</b>
Gram négative	<i>Escherichia coli</i>	-Domaine : Eubacteria -Phylum : proteobacteria -Classe : Gammaproteobacteria -Ordre : Entrobactriales -Famille : Enterobacteriaceae -Genre : <i>Escherichia</i> -Espèce : <i>Escherichia coli</i>
Gram négative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Domaine : Bacteria -Phylum : proteobacteria -Classe : Gammaproteobacteria -Ordre : Pseudomonadales -Famille : Pseudomonadaceae -Genre : <i>Pseudomonas</i> -Espèce : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram négative	<i>Proteus vulgaris</i>	-Domaine : bactéria -Phylum : Proteobactéria -Classe : gammaprotéobacteria -Ordre : Enterobactériales -Famille : Enterobacteriaceae -Genre : <i>Proteus</i> -Espèce : <i>Proteus vulgaris</i>
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	-Domaine : Bacteria -Embranchement: Firmicutes -Classe : Bacilli -Ordre : Bacillales -Famille : Staphylococcaceae -Genre : <i>Staphylococcus</i> -Espèce : <i>Staphylococcus aureus</i>

### **Annexe III: les étapes de coloration de Gram**

#### **1-Coloration par le violet de gentiane :**

- ❖ Placer le frottis fixé dans le flacon de violet de gentiane.
- ❖ Laisser agir 1min.

#### **2-Mordantage par lugol :**

- ❖ Recouvrir le frottis (placé sur la porte-lame, au dessus de la cuve à coloration) de lugol.
- ❖ Laisser agir 1 min(ou un temps au moins égal à celui de l'action du violet de gentiane).
- ❖ Eliminer l'exés de lugol et rincer la lame à l'eau distillée.

#### **3- Décoloration par l'alcool :**

- ❖ Recouvrir le frottis d'alcool (éthanol) et laisser agir 10s.
- ❖ Laver le frottis à l'eau distillée (les 2cotés de la lame).

#### **4- Recoloration par la fushine :**

- ❖ Placer le frottis dans le flacon de fushine.
- ❖ Laisser agir 10s.
- ❖ Sortir la lame et la rincer à l'eau distillée (des 2 cotés).

#### **5- Séchage :**

- ❖ Sécher la lame entre 2 feuilles de papier essuie-tout.

## Résumé

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'effet antibactérien et antioxydant des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*. L'activité antibactérienne a été évaluée par la technique de diffusion en puits sur milieu Muller Hinton sur quatre souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*). L'huile essentielle de *Citrus reticulata* a révélé une activité intéressante par rapport à *Citrus aurantium* avec des zones d'inhibitions qui varient entre 3 et 25mm. *Citrus aurantium* était caractérisée par une faible zone d'inhibition avec un maximum de 12mm. Parmi toutes les bactéries testées, *S. aureus* était celle qui a montré la sensibilité la plus importante. Les CMI ont été déterminées pour les deux huiles essentielles par la méthode de dilution en milieu solide. *Citrus reticulata* a montré une excellente activité antibactérienne en comparaison à *Citrus aurantium*. *Proteus vulgaris* était la bactérie la plus sensible indiquant une CMI de 4µl/ml suivie de *staphylococcus aureus* (10µl/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (16µl/m) et *Escherichia coli* (18µl/ml). Par contre, *Citrus aurantium* était caractérisée par une faible activité antibactérienne se traduisant par des valeurs de CMI supérieur à 20µl/ml.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC50. Une faible capacité antioxydante a été enregistrée pour *Citrus reticulata* 177,52 mg/ml. *Citrus aurantium* a exhibé une meilleure capacité antioxydante avec un IC50 de 155,19 mg/ml. Le mélange de deux extraits a permis d'avoir une meilleure capacité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH, enregistrant des IC50 de 36,74 mg/ml.

**Mots clés :** huiles essentielles, *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata*, activité antibactérienne, activité antioxydante.

## Abstrat

The objective of our work is to evaluate the antibacterial and antioxidant effect of the essential oils of *Citrus aurantium* and *Citrus reticulata*. The antibacterial activity was evaluated by the well diffusion technique on Muller Hinton medium on four strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris*). The essential oil of *Citrus reticulata* revealed an interesting activity compared to *Citrus aurantium* with zones of inhibitions which vary between 3 and 25mm. *Citrus aurantium* was characterized by a weak zone of inhibition with a maximum of 12mm. Of all the bacteria tested, *S. aureus* was the one that showed the highest sensitivity. MICs were determined for both essential oils by the solid-state dilution method. *Citrus reticulata* showed excellent antibacterial activity compared to *Citrus aurantium*. *Proteus vulgaris* was the most sensitive bacterium with a MIC of 4µl / ml followed by *Staphylococcus aureus* (10µl / ml), *Pseudomonas aeruginosa* (16µl / ml) and *Escherichia coli* (18µl / ml). In contrast, *Citrus aurantium* was characterized by low antibacterial activity resulting in MIC values greater than 20µl / ml.

The antioxidant activity of the extracts is expressed in IC50. A low antioxidant capacity was recorded for *Citrus reticulata* 177.52 mg / ml. *Citrus aurantium* exhibited better antioxidant capacity with an IC50 of 155.19 mg / ml. The mixture of two extracts gave a better antioxidant capacity vis-à-vis the DPPH radical, recording IC50 of 36.74 mg / ml.

**Key words:** essential oils, *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata*, antibacterial activity, antioxidant activity.

## ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم تأثير مضاد للجراثيم ومضادات الأكسدة للزيوت الأساسية للحمضيات أورانتيوم و الحمضيات الشبكية. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة تقنية انتشار البئر على وسط مولر هينتون على أربع سلالات (الإشريكية القولونية ، المكورات العنقودية الذهبية ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus vulgaris*. كشفت الزيوت العطرية للحمضيات الشبكية نشاطاً مثيراً للاهتمام مقارنةً بحمضيات الأورانتيوم مع مناطق تثبيط تتراوح بين 3 و 25 ملم. تتميز الحمضيات أورانتيوم بمنطقة تثبيط ضعيفة بحد أقصى 12 ملم. من بين جميع البكتيريا التي تم اختبارها ، كانت *S. aureus* هي التي أظهرت أعلى حساسية. تم تحديد CMI لكل الزيوت الأساسية من خلال طريقة التخفيف الحالة الصلبة. أظهرت الحمضيات الشبكية نشاطاً ممتازاً مضاداً للبكتيريا مقارنةً بحمضيات الأورانتيوم. كان البروتيويس الشائع أكثر أنواع البكتيريا حساسية مع CMI من 4 ميكرو لتر / مل ، يليه المكورات العنقودية الذهبية (10 µل / مل) ، *Pseudomonas aeruginosa* (16µل / m) و الإشريكية القولونية 18 ميكرو لتر / مل. في المقابل ، تميزت الحمضيات أورانتيوم بالنشاط المضاد للبكتيريا منخفض مما أدى إلى قيم MIC أكبر من 20 ميكرو لتر / مل.

يتم التعبير عن نشاط مضادات الأكسدة في المستخلصات ب IC50. تم تسجيل قدرة منخفضة على مضادات الأكسدة للحمضيات شبكية 177.52 ملغ / مل. أظهرت الحمضيات أورانتيوم قدرة أفضل للأكسدة مع IC50 من 155.19 ملغ / مل. أعطى مزيج من اثنين من المستخلصات قدرة أفضل على مضادات الأكسدة مقابل DPPH الراديكالية ، وسجل IC50 من 36.74 ملغ / مل.

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت الأساسية ، الحمضيات الشبكية ، الحمضيات الأورانتيوم ، النشاط المضاد للبكتيريا ، نشاط مضادات الأكسدة.