

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mouloud Mammeri Tizi-Duzou
Faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques

Département de biochimie et microbiologie

Mémoire en vue d'obtention du diplôme de master

Spécialité : Science alimentaire

Option : Biochimie de la nutrition

Thème :

Caractérisation de l'huile essentielle de l'orange douce variété
« Thomson » et évaluation de son activité antibactérienne et
antioxydante.

Présenté par :

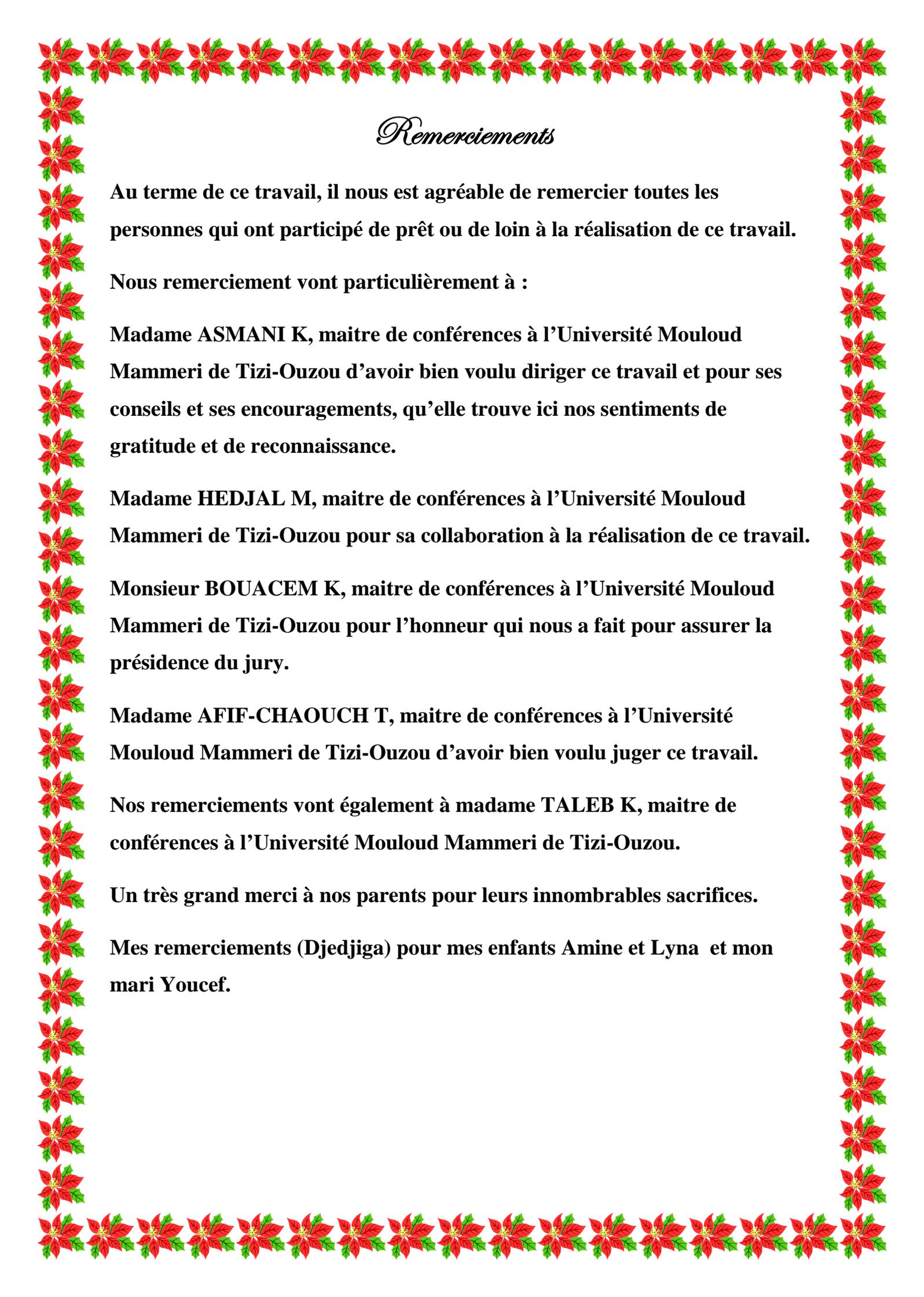
AOUDACHE Karima

ARIB Djedjiga

Soutenu publiquement le 18/09/2019 devant le jury :

BOUACEM K	Maitre de conférences B à l'UMMTO	Président.
ASMANI K	Maitre de conférences B à l'UMMTO	Promotrice.
HEDJAL M	Maitre de conférences A à l'UMMTO	Co-promotrice.
AFIF-CHAOUCH T	Maitre de conférences B à l'UMMTO	Examinatrice.

Année universitaire 2018/2019



Remerciements

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de prêt ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous remercieront particulièrement à :

Madame ASMANI K, maitre de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou d'avoir bien voulu diriger ce travail et pour ses conseils et ses encouragements, qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et de reconnaissance.

Madame HEDJAL M, maitre de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour sa collaboration à la réalisation de ce travail.

Monsieur BOUACEM K, maitre de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour l'honneur qui nous a fait pour assurer la présidence du jury.

Madame AFIF-CHAOUCH T, maitre de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou d'avoir bien voulu juger ce travail.

Nos remerciements vont également à madame TALEB K, maitre de conférences à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Un très grand merci à nos parents pour leurs innombrables sacrifices.

Mes remerciements (Djedjiga) pour mes enfants Amine et Lyna et mon mari Youcef.

Abstract

In this study, we are interested in the valorization of sweet orange peels (Thomson variety) coming from a clayey and a sandy soil of the Tizi Ouzou region.

As a result, an extraction of essential oils (EOs) by hydrodistillation was carried out and a yield of 0.52% and 0.73% was obtained. Gas chromatographic analysis of these oils made it possible to identify 22 compounds for EO from clay soil and 23 compounds for EO from sandy soil of which limonene is the main constituent.

The evaluation of antibacterial activity revealed that EO from clay soil is effective against *S. aureus* (ATCC 25923) strain with EO an inhibition diameter of 11mm, but no antibacterial effects were recorded with EO from sandy soil. The absence of an antibacterial effect on *E. coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) strain was found for both Eos. The evaluation of antioxidant activity by trapping the free radical DPPH, revealed an inhibition percentage of 22.24% for the EO of sandy soil and 10.03% for the EO of the clay soil.

This preliminary work will allow a better valorization of orange peels, which are considerable by-products of the agri-food industry.

Keywords:

Thomson, essential oils, gas chromatography, antibacterial activity, antioxidant activity.

Résumé

Dans la présente étude, nous sommes intéressées à la valorisation des écorces de l'orange douce (variété Thomson), provenant d'une terre argileuse et d'une terre sableuse de la région de Tizi-Ouzou.

De ce fait, une extraction des huiles essentielles (HEs) par hydrodistillation a été réalisée et un rendement de 0.52% et 0.73% a été obtenu. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de ces huiles a permis d'identifier 22 composés pour l'HE issue de la terre argileuse et 23 composés pour l'HE issue de la terre sableuse dont le limonène est le constituant majoritaire.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a révélé, que l'HE issue de la terre argileuse est efficace contre la souche *S. aureus* (ATCC25923) avec un diamètre d'inhibition de 11mm, mais aucun effet antibactérien n'a été enregistré avec l'HE issue de la terre sableuse. L'absence d'un effet antibactérien sur les souches *E. coli* (ATCC25922) et *P. aeruginosa* (ATCC27853) a été constaté pour les deux HEs. L'évaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH, a révélé un pourcentage d'inhibition de 22.24% pour l'HE de la terre sableuse et 10.03 % pour l'HE de la terre argileuse.

Ces travaux préliminaires permettront une meilleure valorisation des écorces de l'orange, qui constituent des sous-produits considérables issus de l'industrie agroalimentaire.

Mots clé :

Thomson, citrus, huile essentielle, chromatographie en phase gazeuse, activité antibactérienne, activité antioxydante.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

HE : huile essentielle.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

CPG: chromatographie en phase gazeuse.

UFC : unité Formant Colonie.

BHA : butylate hydroxyanisol.

BHT : butylate hydroxytoluène.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ATCC : American Type Culture Collection.

Figure 1 : Orange douce (<i>C. sinensis</i>)	3
Figure 1-a : Orange Navelina	3
Figure 1-b : Orange Salustiana.....	4
Figure 1-c : Orange Thomson navel.....	4
Figure 1-d : Orange Washington navel	5
Figure 1-e : Oranges sanguines	5
Figure 2 : Coupe transversale de l'orange.....	6
Figure 3 : Structure chimique de certains monoterpènes	10
Figure 4 : Structure chimique de certains sesquiterpènes	10
Figure 5 : Structure chimique de quelques composés aromatiques.....	11
Figure 6 : Site d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	13
Figure 7 : Diagramme du travail expérimental.....	18
Figure 8 : Localisation de la région d'étude.....	20
Figure 9 : Localisation des sites de prélèvement.....	20
Figure 10 : Dispositif d'hydrodistillation	22
Figure 11 : Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire	27
Figure12 : Coupes anatomiques des sites sécréteurs de l'orange douce avec et sans coloration au grossissement (x40)	28
Figure 13 : Rendement en HE de <i>C. Sinensis</i> obtenu pour : DBK et OF.....	29
Figure14 : Profil chromatographique de l'HE de la station D.B.K (terre sableuse)	30
Figure 15 : Profil chromatographique de l'HE de la région Oued Falli (terre argileuse)	30
Figure 16 : l'effet de l'HE de la région OF sur <i>S. aureus</i>	33
Figure 17 : l'effet de l'HE de OF sur <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>	33

Figure 18: l'effet de l'HE de DBK sur *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* 34

Figure 19 : Piégeage du radical DPPH..... 37

Tableau I : Les différents appareils utilisés pour l'étude expérimentale	19
Tableau II : Produits chimiques et milieux de culture.....	19
Tableau III : Souches bactériennes utilisées	21
Tableau IV : Valeurs des dilutions utilisées pour la détermination de la CMI.....	25
Tableau V : Rendement en HE extraite.....	28
Tableau VI : composition chimique (%) des (HEs) de <i>C. Sinensis</i> analysée par CPG.....	31
Tableau VII : Zone d'inhibition en (mm) de l'HE de la station OF	34
Tableau VIII : Zone d'inhibition en (mm) de l'HE de la station DBK	35
Tableau IX : Pourcentage d'inhibitions des HEs et de l'acide ascorbique	37

Abstract.

Résumé.

Liste des abréviations.

Liste des Figure.

Liste des Tableaux.

Sommaire

Introduction 1

I- Partie bibliographiques

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

1-Historique..... 2

2-Présentation botanique 2

2-1- La famille des rutacées 2

2-2- Le genre Citrus 2

2-2- Le genre Citrus 2

2-3-L'espèce *Citrus sinensis* (orange douce) 2

2-3-1-Orange Navelina 3

2-3-2-Orange Salustiana 3

2-3-3-Orange Thomson navel..... 4

2-3-4-Orange Washington navel 5

2-3-5-Orange sanguine 5

2-4-Etude physicochimique de l'orange 6

2- 4-1 Caractéristiques de l'orange..... 6

2-4-2 Composition chimique de l'orange..... 6

3-Intérêts industriels et économiques 6

Chapitre 2: Généralités sur les huiles essentielles

1-Définition des huiles essentielles 8

2- Historique..... 8

3- Sites de sécrétion des huiles essentielles..... 8

4- Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielle 9

4-1-Caractéristiques physiques..... 9

4-2 Caractéristiques chimiques..... 9

a-Composés terpéniques 9

b- Composés aromatiques..... 11

5-Méthodes d'extraction	11
5-1 Distillation.....	10
5-1-1Hydrodistillation	11
5-1-2 Entrainement à la vapeur d'eau.....	11
5-1-3Hydrodiffusion	11
5-2- Expression à froid	12
5-3- Extraction par fluide à l'état supercritique	12
5-4- Extraction par solvant organique	12
5-5- Extraction assistée par micro-onde	12
6- Propriétés biologiques des huiles essentielles.....	12
6-1-Activités antimicrobiennes	11
6-1-1Activité antibactérienne	12
6-1-2Activité antifongique.....	13
6-1-3Activité antivirale.....	14
6-2 Activité antioxydante	13
6-2-1 Types d'antioxydants	13
6-2-2Activité antioxydante des citrus	14
7-Intérêt des huiles essentielles	14

II-Partie expérimentale

• Cadre de l'étude

Matériel et méthodes

1- Matériel	19
1-1- Le matériel biologique.....	20
1-1-1 Materiel végétal	20
1-1-2 Souches bactériennes	21
2- Méthodes	
2-1 Etude des sites excréteurs des huiles essentielles dans l'orange douce	21
2-2 Extraction.....	22
2-2-1Calcul de rendement	22
2-3 Analyse de la composition chimique des HEs par CPG	23
2-4 Activité antibactérienne	23
2-4-1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	24
2-5 Activité antioxydante	25

-Méthode de DPPH.....	26
Résultats et discussion	
1-Etude des sites excréteurs des huiles essentielles dans l'orange douce	28
2-Le rendement	28
3-Analyse de la composition chimique	29
4-Activité antibactérienne	32
4-1 Station Oued Falli	32
4-2 Station Drâa Ben Khedda.....	34
4-3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	37
5- Activité antioxydante	37
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques	
Annexes	

La prise de conscience croissante des consommateurs sur la relation entre l'alimentation et la santé a révolutionné l'industrie agroalimentaire qui recherche de nouveaux ingrédients améliorant et préservant la santé humaine. La réduction des additifs utilisés dans une grande variété d'aliments est demandée, tandis que les additifs naturels sont perçus comme un avantage pour la qualité et la sécurité.

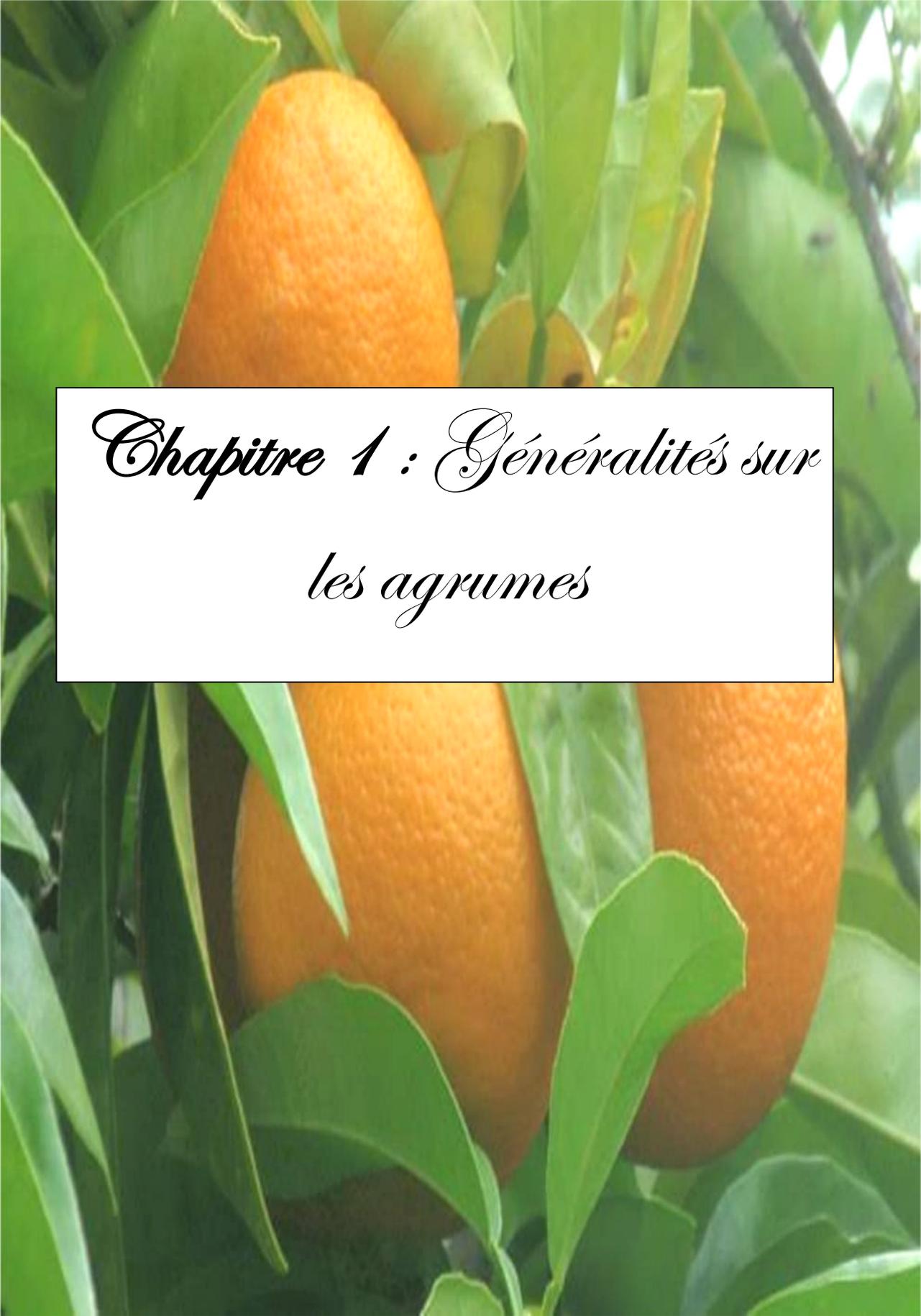
Selon Chutia *et al.* (2006), il a été prouvé que les huiles essentielles (HEs) de certaines usines étaient des agents de biocontrol respectueux de l'environnement. De plus, les HEs de *citrus* sont des mélanges complexes de différents composés qui ont montré un large spectre d'activités biologiques telles que des activités antioxydantes (Misharina et Samusenko, 2008), anti-inflammatoires, anxiolytiques (DeMoaesPultrini *et al.*, 2006), antimicrobiennes (Jafari *et al.*, 2011) et antifongiques (Chutia *et al.*, 2009). Ces activités biologiques peuvent revêtir une grande importance dans plusieurs domaines, de la chimie alimentaire à la pharmacologie en passant par la pharmacie (Cristani *et al.*, 2007).

Le principe général des HEs est qu'elles peuvent être utilisées dans tous les aliments, et sont généralement considérées comme sûres (GRAS, Generally Recognised As Safe). Les zestes d'agrumes représentent environ 45% du poids total des fruits, disponible comme sous produits de la transformation des agrumes, qui créent des problèmes environnementaux (Ferhat *et al.*, 2011). Bien que les agrumes sont principalement utilisés pour le dessert, ses HEs ont une valeur économique significative en raison de ses composés aromatiques (Minh *et al.*, 2002).

Parmi les agrumes, il y a l'orange douce, notamment la variété Thomson, cultivée en Algérie dans toutes les régions, qu'elles soient plates ou montagneuses comme c'est le cas de la région de Tizi-Ouzou. Notre étude a porté sur l'extraction des HEs issues de terres différentes : terre argileuse et sableuse. Une caractérisation biochimique a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). De plus, une évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante de ces HEs a été réalisée afin de valoriser les zestes d'orange.



Partie bibliographique



*Chapitre 1 : Généralités sur
les agrumes*

1-Historique

Le mot agrume provient du latin « acrumen » qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (Benedeste *et al.*, 2002). L'histoire des agrumes, d'après Webber *et al.* (1967), remonte à 4000 ans avant J-C où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour de la montagne de l'Himalaya et du Sud-est Asiatique. Les agrumes appartiennent à la famille des rutacées et correspondent aux espèces exploitées chez les genres : *citrus*, *fortunella* et *pancirus* (Pierre *et al.*, 2001).

2-Présentation botanique

2-1- La famille des rutacées

Les rutacées sont des plantes, ligneuses et rarement herbacées des régions tempérées à tropicales, productrices des huiles essentielles (HEs), simples ou composées, sans stipules, éparses ou opposées. Les feuilles présentent des glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides contenant des HEs. La famille des Rutacées comprend 140 genres et 1300 à 1600 espèces (Virbel-Alonso, 2011).

2-2- Le genre Citrus

Le Citrus est un genre de plantes des pays chauds de la famille des Rutacées, regroupant des arbres et arbustes, dont plusieurs sont cultivées pour leurs fruits. Parmi les espèces du genre *Citrus*, on trouve le citronnier, le lime, l'oranger amer, le mandarinier, le clémentinier, le pamplemoussier, etc (Virbel-Alonso, 2011).

2-3-L'espèce *Citrus sinensis* (orange douce)

L'oranger est un arbre pouvant atteindre 10m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé et la floraison blanche très parfumée. Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés, les plus connues la Sanguilli, Thomson, Navel, Valencia late, Washington Navel Powell, Floride Pineapple, etc. (Lousser, 1989) (Figure 1).

➤ **Position systématique**

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

Règne : végétal

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Géniale (Rutales)

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus sinensis*



Figure 1 : Orange douce (*C. sinensis*).

2-3-1-Orange Navelina

C'est un arbre vigoureux à feuillage dense avec de grandes feuilles de couleur orange-rouge foncé et de calibre moyen (de 100 à 200g). Elle se récolte de novembre à janvier en Corse (Jacquemond *et al.*, 2009) (Figure 1-a).

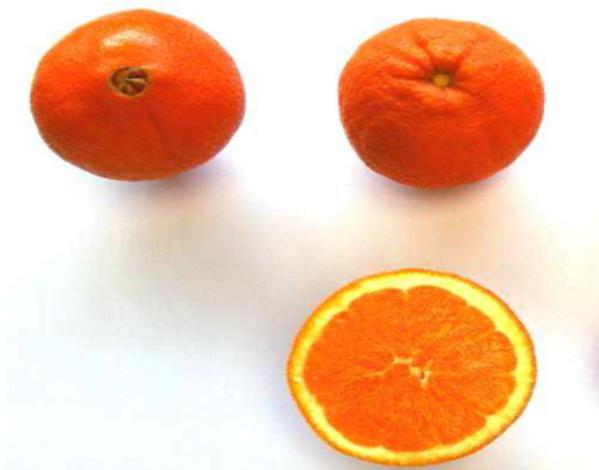


Figure 1-a : Orange Navelina.

2-3-2-Orange Salustiana

Selon Baha (2009) l'orange Salustiana est issue d'une mutation d'orange commune sélectionnée en Espagne dans les années 1950. Variété très productive, très juteuse, aromatisée utilisée aussi bien pour le frais que pour le jus. L'arbre est de forte vigueur, les fruits sont de couleur orange, sphériques, avec une peau plutôt fine mais difficile à éplucher, avec quelques pépins (de 0 à 5). Le calibre est de 80 à 150g (Figure 1-d).

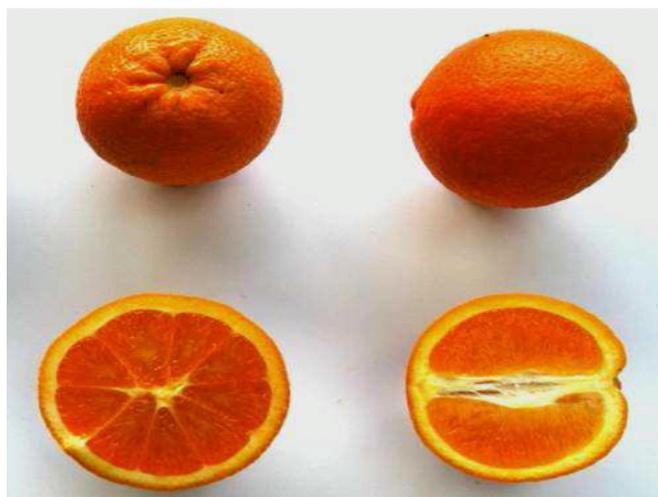


Figure 1-b: Orange Salustiana.

2-3-3-Orange Thomson navel

L'orange Thomson navel est issu d'une mutation précoce de Washington navel introduite en Californie en 1891. L'arbre est moins vigoureux que celui de la Washington

navel, avec une frondaison dense et sphérique. Les fruits se récoltent de novembre à décembre en Corse. Les fruits sont gros (100 à 200 g) et sans pépin (Jacquemond *et al.*, 2009) (Figure 1-c).

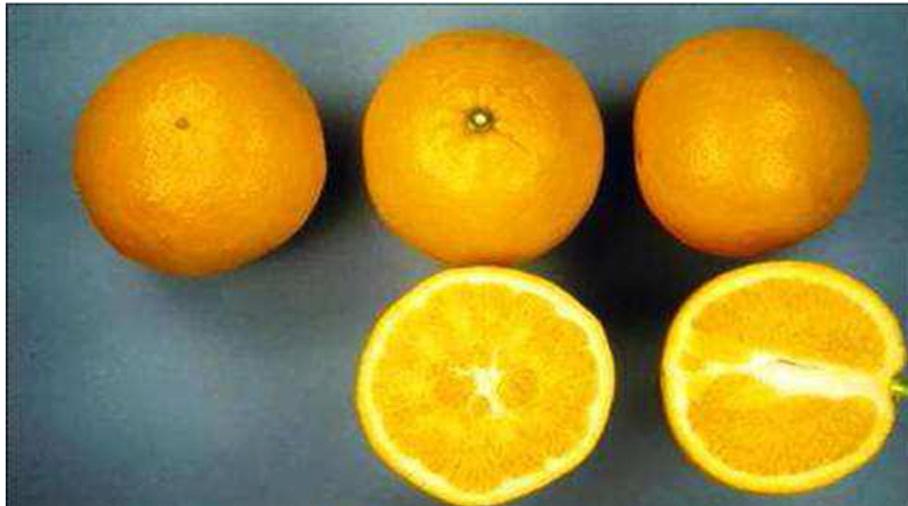


Figure 1-c : Orange Thomson navel.

2-3-4-Orange Washington navel

L'orange Washington navel est caractérisé par une chaire peu croquante, juteuse, parfumée et une quasi absence de pépins. (Jacquemond *et al.*, 2009) (Figure 1-d).

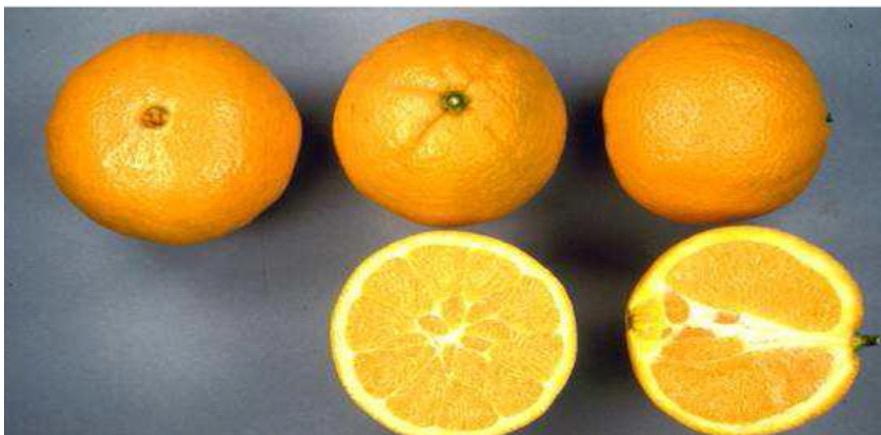


Figure 1-d : Orange Washington navel.

2-3-5-Orange sanguine

Selon Brebion *et al.* (1999) leur pulpe est rouge ou rouge violacée, couleur due à l'abondance des pigments. Très juteuse et acidulée, parfois de saveur légèrement Musquée (Figure 1-e).

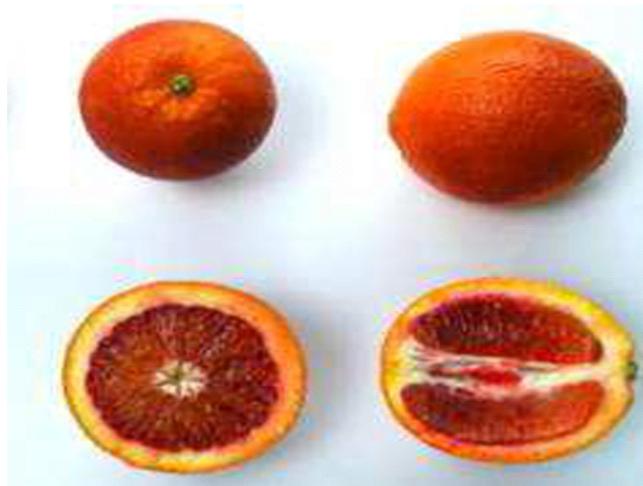


Figure 1-e : Oranges sanguines.

2-4-Etude physicochimique de l'orange

2- 4-1 Caractéristiques de l'orange

L'orange est un agrume qui peut aussi être appelé hesperidium, qui diffère des autres fruits comme la tomate ou le raisin, du fait qu'il possède une peau dure et solide qui protège la partie comestible du fruit. La structure d'une orange est caractérisée par les composants suivants :

- Une couche extérieure colorée, le flavedo, rappelant le mot « flaveur » ou zeste, elle est pourvue de nombreuses glandes sécrétrices d'essence (huile essentielle) qui donnent son odeur particulière à l'orange ;
- Une couche intérieure blanche et spongieuse, l'albédo ou mésocarpe, riche en pectine. Une partie comestible, l'endocarpe ou épiderme interne émaillé de poils succulents qui remplissent l'intérieur des loges capillaires (Bachès, 2011) (Figure 2).

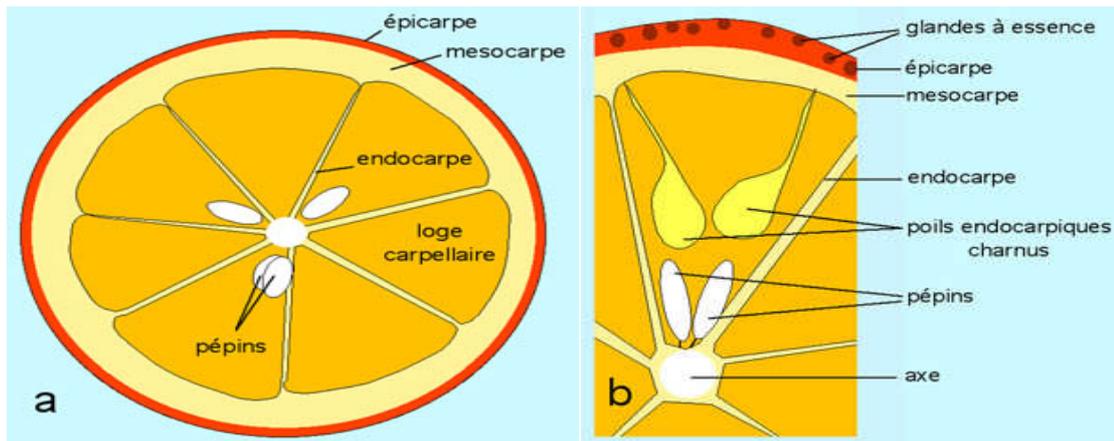


Figure 2: Coupe transversale de l'orange.

2-4-2 Composition chimique de l'orange

L'orange contient en moyenne 40 % de vitamine C, 10 % de glucides simples (40 % de saccharose, 30 % de glucose et fructose) avec un indice glycémique bas. La teneur en fibre est de 1.8 %. Elle est également riche en calcium (40mg / 100g). La teneur en acide organique des agrumes est élevée, mais variable selon les fruits. L'orange en contient 1.1g / 100g, tandis que le citron atteint pratiquement 5g / 100g. Les substances aromatiques, pigments végétaux (caroténoïdes), et polyphénols (hespéridine) confèrent aux agrumes des spécificités nutritionnelles et culinaires (Liégeois, 2014).

3-Intérêts industriels et économiques

Avec une production annuelle de 80 millions de tonnes, les agrumes, les raisins et les bananes représentent les trois principales cultures fruitières de cette fin de XX^e siècle. La place prépondérante qu'elles occupent s'explique par le fait qu'en plus de leur consommation en produit frais, ces fruits sont aussi couramment utilisés dans la transformation alimentaire (Aubert *et al.*, 2004). L'orange peut être consommée telle quelle ou bien sous forme de jus ou pour faire des confitures, et son jus est diurétique et laxatif. L'oranger est utilisé en parfumerie car on produit à partir des fleurs l'essence de Néroli et à partir des feuilles et de jeunes pousses, l'essence de petit grain (Isabelle, 2008).

A close-up photograph of a citrus fruit, likely an orange or grapefruit, being sliced. The vibrant orange and red segments are visible. A glass dropper is positioned above a small, dark-colored container, dispensing a clear liquid. The background is a soft, out-of-focus white.

*Chapitre 2: Généralités sur les
Huiles essentielles.*

1-Définition des huiles essentielles

La norme AFNOR NF T75-006, définit les huiles essentielles comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. Les huiles essentielles sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Une HE peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste. Dans la réalité, une HE est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé de molécules secrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique (Besombes, 2008). Les HEs sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (Bruneton, 1993). Les HEs ont des propriétés et des modes d'utilisation particulières et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (Bruneton, 1999).

2- Historique

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (Amarti *et al.*, 2011).

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des HEs datent de l'an 3000 avant J.C. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les HEs. Ces utilisations concernaient plusieurs domaines : parfumerie, médecine, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation. Vers l'an mille, Avicenne médecin et scientifique persan a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. René-Maurice Gattefosse a créé, en 1928 le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les HEs (Besombes, 2008).

3- Sites de sécrétion des huiles essentielles

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. La synthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Les HEs peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier), feuille (citronnelle), écorces (cannelles), bois (bois de rose), racines (vétiver), rhizomes (curcuma), fruits (toute-épice), graines (muscades) (Bruneton, 2009).

4- Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

4-1- Caractéristiques physiques

Les essences et les HEs ont des propriétés communes, qui peuvent cependant varier en fonction de leur composition chimique (Franchomme, 2001). Liquide à température ambiante, les HEs sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels elles sont liposolubles (Bruneton, 2009).

Très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (Charpentier *et al.*, 2008).

4-2 Caractéristiques chimiques

Une HE contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu'à 300 (Lahlou, 2004). Les HEs sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, et des composés aromatiques (Kurkim, 2003).

a- Composés terpéniques

Se sont les molécules les plus répondues dans les HEs. Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiples de 5 atomes de carbone de formule générale $(C_5H_8)_n$ (Modzelewska *et al.*, 2005).

-Monoterpènes

Se sont les composés les plus abondants dans les HEs, ils sont responsables de la saveur caractéristique et de l'arôme que possède la plante. Ils sont les simples constituants des terpènes et comportent deux unités isoprènes (C_5H_8) . Ils peuvent être acycliques, monocycliques, ou bicycliques. (Chaumont *et al.*, 1989) (Figure 3).

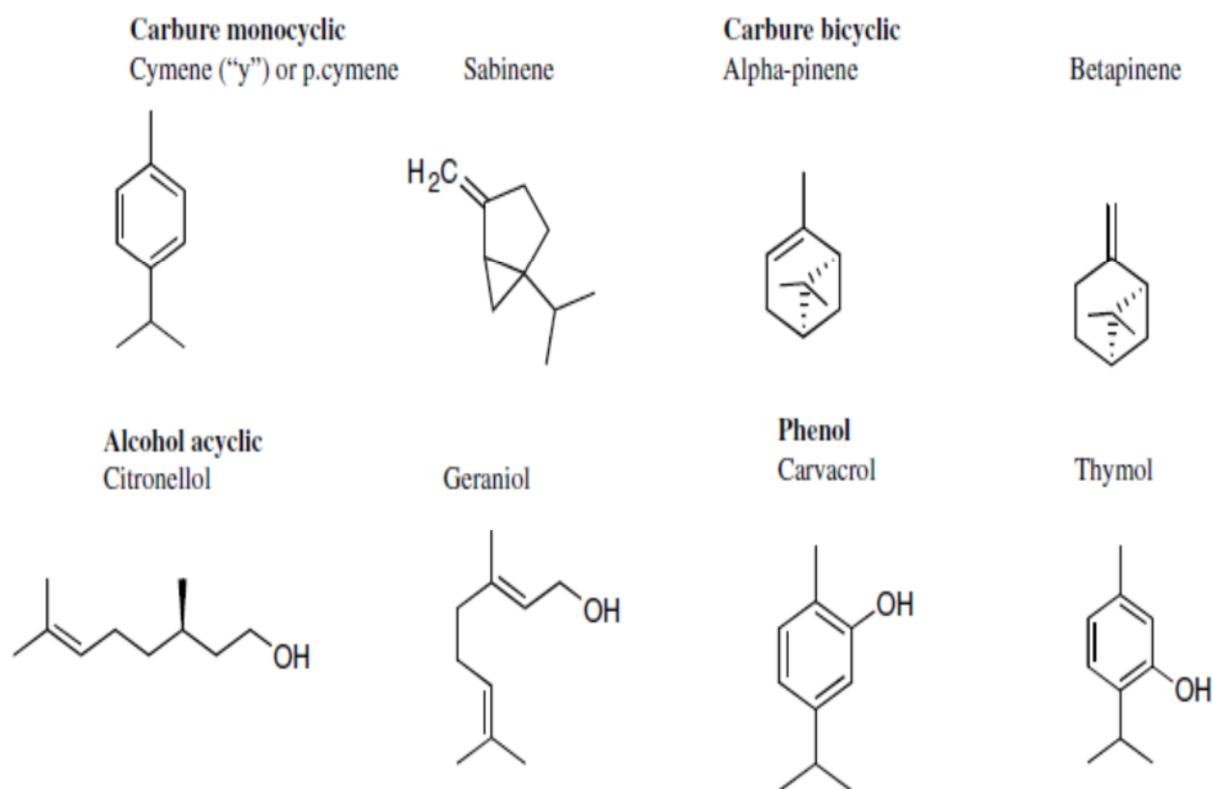


Figure 3: Structure chimique de certains monoterpènes (Bakkali, 2008).

-Sesquiterpènes

Se sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature (Tavera, 1999) (Figure 4).

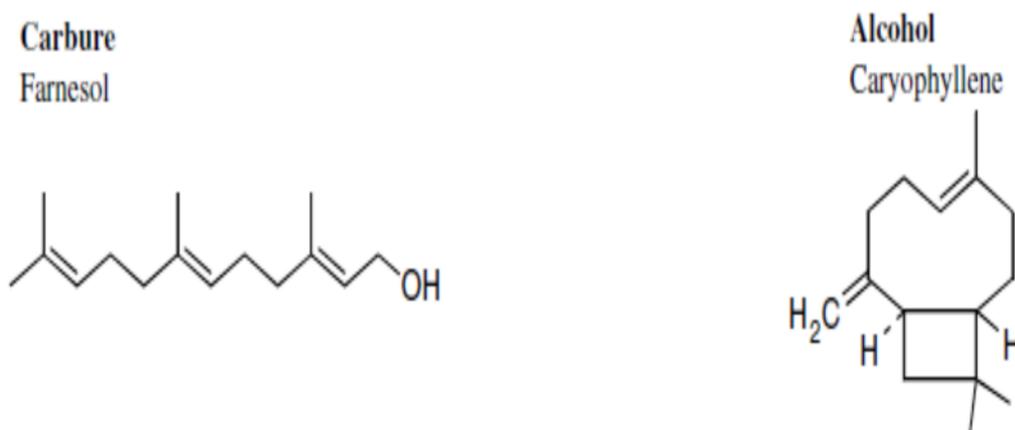


Figure 4: Structure chimique de certains sesquiterpènes (Bakkali, 2008).

b- Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les HEs que les monoterpènes et sesquiterpènes. Ce sont souvent des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes (Bruneton, 2009) (Figure 5).

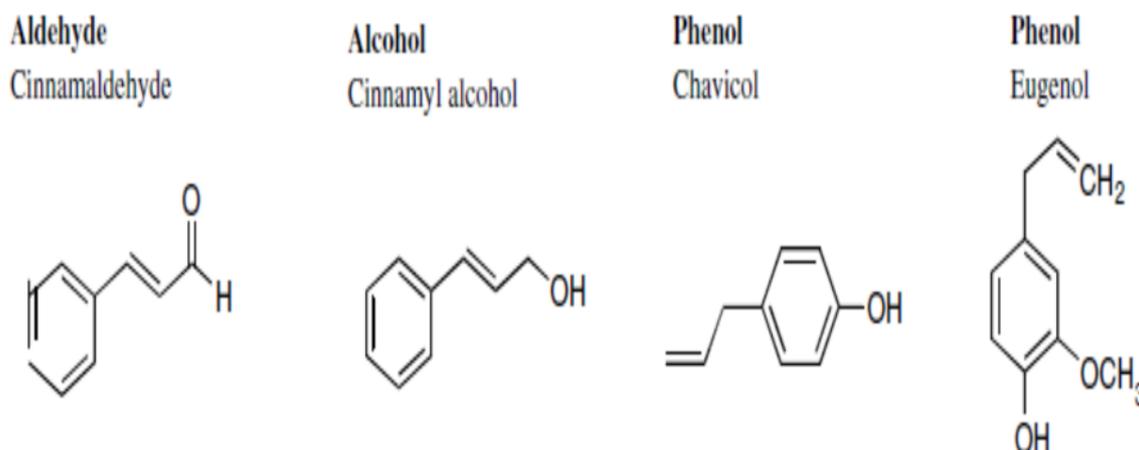


Figure 5: Structure chimique de quelques composés aromatiques (Bakkali, 2008).

5-Méthodes d'extraction

Les HEs sont obtenus à partir des plantes naturelles par plusieurs méthodes d'extraction, telles que la distillation, la presse à froid et la distillation à sec (Li et Chemat, 2014). Toutes ces techniques dépendent du matériel botanique, qui détermine la qualité des huiles essentielles (Tongnuanchan et Benjaku, 2014).

5-1 Distillations

5-1-1 Hydrodistillation

La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysats par simple différence de densité (Lucchesi, 2005).

5-1-2 Entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturés en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (Richard et Peyron, 1992).

5-1-3 Hydrodiffusion

Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide, donc moins dommageable pour les composés volatils (Hellal, 2011). Le procédé permet un gain de temps et d'énergie (Bruneton, 2009).

5-2- Expression à froid

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (Basil *et al.*, 1998). L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau (Anton, 2005).

5-3- Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (Aghel *et al.*, 2004). Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant. L'avantage de cette méthode est la possibilité de recycler le solvant. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles (Martini, 1999).

5-4- Extraction par solvant organique

La technique consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour être distillé à pression atmosphérique. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone (Kim *et al.*, 2002). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau (Hernandez-Ochoa, 2005). Le solvant choisi, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière et l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne doit pas réagir chimiquement avec l'extrait (Hubert, 1992).

5-5- Extraction assistée par micro-onde

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé consiste à irradier par micro-ondes la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction des composés apolaires (Wang *et al.*, 2006).

6- Propriétés biologiques des huiles essentielles

6-1-Activités antimicrobiennes

6-1-1Activité antibactérienne

Les HEs ont une double action contre les microbes, elles peuvent avoir une action bactéricide ou bactériostatique. Plusieurs travaux montrent que les HEs et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Carson et Piley, 1995). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Carson *et al.*, 2002). D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (Djilani et Dick, 2012 ; Goetz et Ghedira, 2012) :

- Attaque la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie (Figure 6).

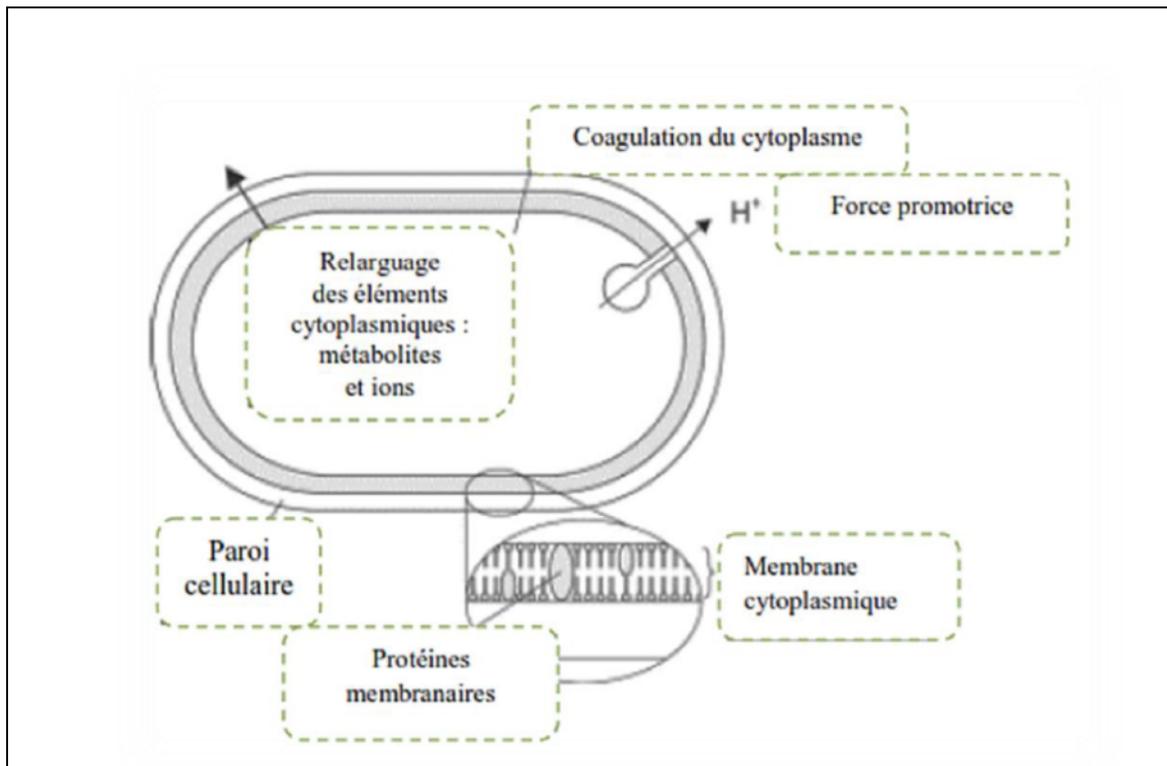


Figure 6: Site d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

En effet, les HEs ont un champ d'activité très large, elles inhibent la croissance des bactéries. De plus elles sont très efficace sur les microorganismes résistants aux antibiotiques (Duarte *et al.*, 2005). Dans des études antérieures, il a été démontré que les HEs des espèces de *thymus* possèdent un large spectre d'activité antibactérienne (Elouali *et al.*, 2013). Lambert *et al.* (2001) ont expliqué le fait que le thymol (composé principal des HEs de *thymus*) se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne. L'étude de Mnayer (2014) sur les HEs de l'ail et oignon a révélé l'effet antibactérien de ces HEs sur *S.aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Listeria monocytogenes*. Les HEs de *C.limonum* ont manifesté un effet antibactérien vis-à-vis de trois souches d'*E.coli* (Moreira *et al.*, 2005).

6-1-2Activité antifongique

Les substances naturelles telles que les HEs peuvent être une source non négligeable d'antifongiques utilisables même dans la conservation des aliments. L'activité antifongique de l'HE peu être due à ses constituants majoritaires, mais aussi à ses constituants minoritaires (Djenane *et al.*, 2011).

6-1-3 Activité antivirale

Les virus sont très sensibles aux molécules présentes dans les HEs ce qui attribue à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales. Les HEs arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination de mucus tout en stimulant le système immunitaire (Moro Buronzo, 2005).

6-2 Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés qui peuvent empêcher l'oxydation des composés oxydables en éliminant les radicaux libres (Kim et Lee, 2004). Les antioxydants sont classés selon leur origine et leur mode d'action.

6-2-1-Types d'antioxydants

a-Origine

Selon leur origine, les antioxydants peuvent être classés en : antioxydants naturels et antioxydants synthétiques.

✓ Antioxydants naturels

D'origine végétale pour la plupart, ils incluent des espèces chimiques différentes (composés phénoliques, vitamines, etc.) (Berger, 2005).

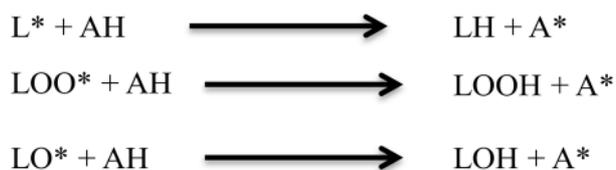
✓ Antioxydants synthétiques

Les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire sont le butylate hydroxyanisole (BHA) et le butylate hydroxytoluène (BHT) (Gulcin *et al.*, 2004).

b-Mode d'action

✓ Les antioxydants primaires

Ils s'oxydent à la place des acides gras, ils ont la propriété de convertir les produits d'oxydation lipidiques (L^* , LOO^* , LO^*) en produits plus stables grâce à leurs propriétés de donneurs de protons. Le radical (A) dérivé de l'antioxydant se convertit en produit stable qui n'évolue pas vers le stade radicalaire. Ces molécules ont toutes dans leurs structures une fonction de type X-H avec un hydrogène H labile (Armelle, 2004).



✓ Les antioxydants secondaires

Se sont des composés qui retardent l'auto-oxydation lipidique selon différents modes d'action :

- Absorption des radiations ultraviolettes ;
- Chélation des métaux ;
- Décomposition des hydroperoxydes ;
- Inactivation de l'oxygène singulier.

6-2-2-Activité antioxydante des citrus

Les polyphénols jouent un rôle important comme système de défense contre les radicaux libres, leurs activités antioxydantes se déroulent selon plusieurs mécanismes :

- Absorption des rayons ultraviolets en empêchant la surproduction des radicaux libres ;
- Renforcement de l'activité des enzymes antioxydants : par l'augmentation de l'activité antioxydante du superoxyde-dismutase et de la catalase et par la modulation de l'expression de gène de superoxyde dismutase, catalase et de glutathion peroxydase (Tripoli *et al.*, 2007) ;
- Neutralisation des radicaux libres et chélation des métaux : des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité des polyphénols d'agrumes à neutraliser les radicaux libres et à chélater les métaux principalement le fer (Del-Rio *et al.*, 2004) ;
- Inhibition de la lipopéoxydation : diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes de citrus et la diminution du taux de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) dans le sang (Gonzalez-Molina *et al.*, 2010).

7-Intérêt des huiles essentielles**7-1 En cosmétologie**

Le secteur d'hygiène et l'industrie des cosmétiques sont également des consommateurs, la majorité des produits cosmétiques contiennent une quantité de l'HE comme élément parfumant et aussi élément assurant une odeur agréable (Bruneton, 1999).

7-2 En industrie agroalimentaire

Actuellement, les HE représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont considérées comme une alternative importante pour résoudre le problème d'altération post-récolte liées aux moisissures et d'éviter la perte en qualité et en quantité des fruits pendant l'entreposage (Serrano, 2008).

7-3 En agriculture

Les pesticides naturels basés, notamment sur les HEs représentent une alternative intéressante pour la protection des cultures contre les insectes (Isman, 2000). Les biopesticides peuvent être utilisés seuls et à répétition sans potentiellement inciter le développement de la résistance chez les ravageurs (Chiason *et al*, 2007).

7-4 En pharmacie

Dans les médicaments le potentiel thérapeutique des composés des HEs montre leur bienfait dans le traitement de cancer, des infections bactériennes et virales, la lutte contre le stress oxydatif. De même, les propriétés lipophiles des composés aromatiques permettent aux HEs de pénétrer dans la peau, ce qui facilite l'administration des médicaments par voie transdermique (Edris, 2007).



Partie expérimentale



Matériel et méthodes

• **Cadre de l'étude**

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires communs I et II d'analyses physico-chimiques, le laboratoire pédagogique de Microbiologie ainsi que le laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) et le laboratoire d'entomologie de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO), durant la période de Mars à Juin 2019.

L'objectif principal de ce travail est la caractérisation et l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de l'orange *C. sinensis* cultivée sur une terre sableuse et argileuse et ce pour une valorisation des écorces.

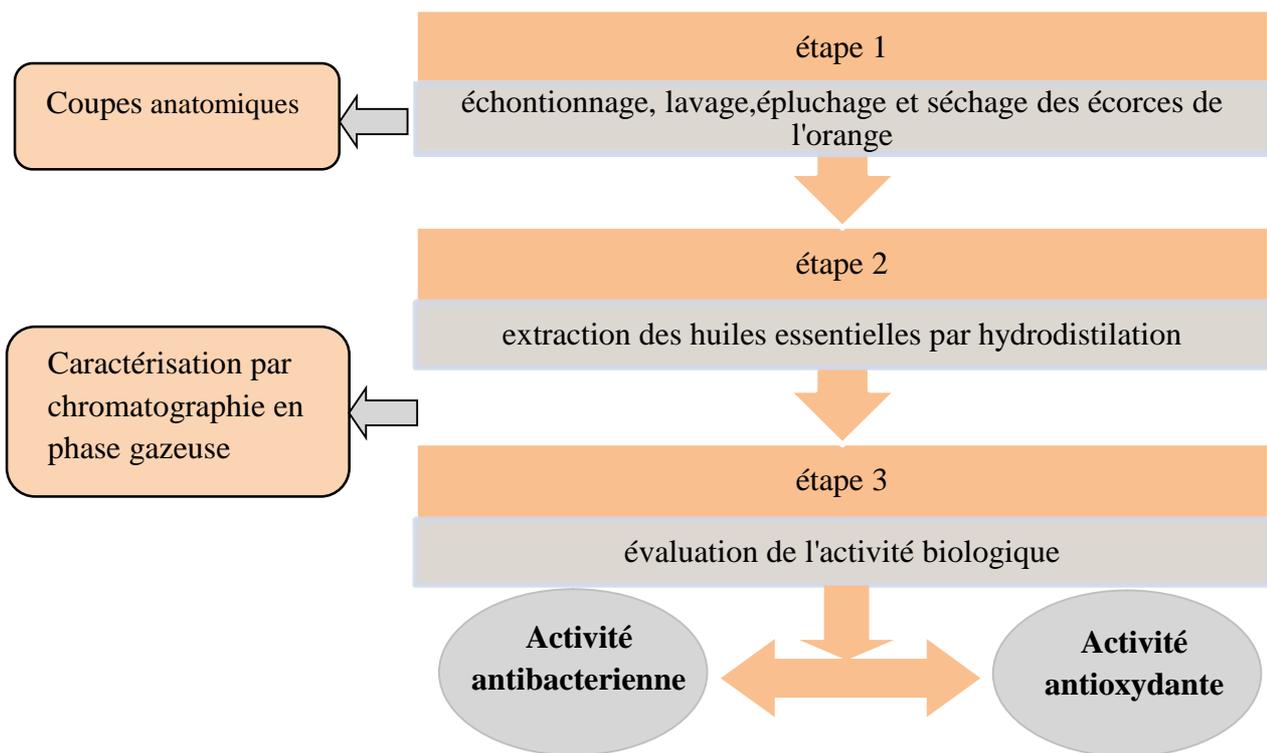


Figure 7: Diagramme du travail expérimental

1-Matériel

a-Appareils

Tableau I : Les différents appareils utilisés pour l'étude expérimentale.

Appareil	Référence	Appareil	Référence
Spectrophotomètre UV-visible	Biothech engineering	Balance de précision	Kern, Sartorius
Hydrodistilateur	Nahita	Balance	Denever Instrument
Bain marie	Wisebathe	Vortex	VELP Scientific
Autoclave	Pbinternational	Agitateur magnétique	Labinco, VELP Scientific
Etuve	Bindere Memmert	Réfrigérateurs	Maxipower

- Consommable

Boîtes de Pétri, micropipettes, papier Wattman, écouvillons, verrerie, disques d'antibiotiques.

b- Produits

Les différents Produits et milieux de culture utilisés sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Les différents produits utilisés.

Produits chimiques	-DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), l'acide ascorbique, vert de méthyl, rouge Congo
Solvant organiques	Ethanol, l'acide acétique, hypochlorite de sodium
Sels	Chlorure de sodium (NaCl)
Milieux de culture	(Brain Heart Infusion Broth)BHIB, Gélose nutritive (GN), Mueller Hinton Agar (MHA).

1-1 Matériel biologiques

1-1-1 Matériel végétal

Les fruits d'agrumes de l'espèce *Citrus sinensis* (orange douce), proviennent de deux régions : Drâa Ben Khedda (terre sableuse) et Oued Falli (terre argileuse) dans la wilaya de Tizi-Ouzou (Figure 8 et 9). Les fruits ont été étiquetés et transportés au laboratoire et ce afin de réaliser une étude comparative de point de vue composés bioactifs, activité antibactérienne et antioxydante.



Figure 8: Localisation de la région d'étude.



Figure 9: Localisation des sites de prélèvement.

Les oranges récoltés sont nettoyés, lavés et séchés. Le zeste est récupéré à l'aide d'un économe et laissé sécher à température ambiante pendant 5 à 6 jour.

1-1-2 Les souches bactériennes

Les tests d'activités antibactériennes des huiles essentielles ont été effectués sur 3 souches bactériennes référencées. Les souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire pédagogique de Microbiologie de l'Université de Tizi-Ouzou (Tableau III).

Tableau III: Souches bactériennes utilisées.

Souches	Types	Références
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie Gram négatif	ATCC25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie Gram négatif	ATCC27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie Gram positif	ATCC25923

2- Méthodes

2-1-Etude des sites excréteurs des huiles essentielles dans l'orange douce

Pour observer les sites sécréteurs des HEs dans l'orange douce, des zestes frais issus d'écorces d'orange ont été utilisés. Les coupes obtenues ont été soumises à la technique de la double coloration au rouge Congo-vert de méthyle, selon le protocole suivant de Dey son (1954) :

- Les coupes ont été placées 10 à 20 min dans l'hypochlorite de sodium ;
- Lavage abondant à l'eau ;
- Lavage rapide dans l'acide acétique dilué ;
- Coloration dans le rouge Congo pendant 5 min puis lavage à l'eau ;
- Coloration dans le vert de méthyle pendant 5 min ;
- Lavage à l'eau puis observation au grossissement (x40).

2-2-Extraction

L'huile essentielle a été extraite par la méthode d'hydrodistillation, 130g de zeste sec de chaque espèce ont été introduits dans un ballon de 500mL d'eau distillée, l'ensemble a été porté à l'ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité (Figure 10). Les HEs ont été récupérées dans des flacons opaques et stockés à 4°C.



Figure 10 : Dispositif d'hydrodistillation

2-2-1Calcul de rendement

Le rendement est le rapport entre le poids de l'HE extraite et le poids de la biomasse à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$$R = (Ph / Pv) \times 100$$

R : rendement

Ph : poids de l'huile essentielle en gramme

Pv : poids de la biomasse végétale en gramme

2-3 Analyse de la composition chimique des HEs par CPG

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse CPG à l'institut national d'agronomie d'El-Harrach. Les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30cm de longueur, 0.25mm de diamètre et 0.25µm d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation à flamme réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et d'un injecteur split réglé à 250°C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite de 1/50, débit de fuite 66mL/mn). La température de la colonne est programmée de 50°C (3min) à 250°C à raison de 2°C/min, puis est maintenue à 250°C pendant 10min.

2-4 Activité antibactérienne

L'étude a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (aromatogramme) en utilisant des disques stériles (Ponce *et al.*, 2003).

➤ Stérilisation du matériel

L'eau physiologique, les milieux de culture, les tubes à essai utilisés pour la préparation de la solution bactérienne et les disques en papier wattman (6mm de diamètre), ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15min.

➤ Le Protocol expérimentale

Une suspension bactérienne correspondant aux normes de Mac Ferland a été préparée à partir de cultures jeunes, préalablement entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leurs croissances pendant 18 h à 37°C. La standardisation de la suspension à 10⁶ UFC/mL, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde 620nm. On admet qu'une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10⁸ germes/mL. La suspension est diluée à 1 : 10 dans de l'eau physiologique stérile deux fois pour avoir une concentration de 10⁶ UFC/mL.

Le milieu de culture gélosé Muller Hinton (MH) a été coulé aseptiquement en surfusion dans les boîtes de pétri à raison de 10mL par boîte. La gélose de MH a étéensemencée par des stries serrées à l'aide d'un écouvillon imbibé de la suspension préparée a partir de chaque souche avec une charge de 10⁶ UFC/mL.

Des disques de papier Wattman stériles d'un diamètre de 6mm, imbibés de 5 μ L de chaque huile, ont été déposés sur la gélose à l'aide d'une micropipette. D'autres disques chargés de 5 μ l d'eau physiologique stérile ont été déposés sur la gélose pour servir de témoin négatif, ainsi que des disques d'antibiotiques pour servir de témoin positif. Les boîtes de Petri ont été d'abord laissées à 4°C durant 15min couvercles renversés, puis incubées à l'étuve pendant 24h à 37°C.

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques à l'aide d'une règle. Les résultats sont exprimés en (mm).

➤ Lecture des résultats

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques. Après mesure des zones d'inhibition, les souches sont classées en:

- Souche résistante (-): diamètre \geq à 8mm;
- Souche sensible (+): diamètre compris entre 9 et 14 mm;
- Souche très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm;
- Souche extrêmement sensible (+++): diamètre \geq à 20 mm (Ponce *et al.*, 2003).

2-3-1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HE où on n'observe aucune croissance bactérienne. La détermination de la CMI a été effectuée selon la méthode des macro-dilutions en milieu liquide décrite par Oussou *et al.* (2004) qui consiste à réaliser une gamme de concentration décroissante en HE dans des tubes contenant du BHIB ainsi qu'une suspension bactérienne standardisée. La méthode s'effectue comme suit : 450 μ L, supplémenté en DMSO (5% V/V), d'HE ont été placées dans un tube stérile contenant 3.55mL de BHIB. Une dilution est effectuée dans le milieu BHIB, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 63.38 et 0.12 μ L/mL. La gamme de dilution a été réalisée selon le tableau IV.

Tableau IV: Valeurs des dilutions utilisées pour la détermination de la CMI.

Rapport de dilution d'HE	Solution mère	1/2 Tube 1	1/4 tube 2	1/8 Tube 3	1/16 Tube 4	1/32 Tube 5	1/64 Tube 6	1/128 Tube 7	1/256 Tube 8	1/512 Tube 9	1/1024 Tube 10
%	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.5	0.78	0.4	0.2	0.1
HE μ L/mL	125.76	63.38	31.69	15.84	7.92	3.96	1.98	0.99	0.49	0.24	0.12

Un inoculum bactérien de 10.5 μ L de densité équivalant au standard 10⁶ UFC/mL a été déposé dans chacun des tubes de la gamme de dilution. Différents témoins ont été également préparés :

- Témoin 1: milieu de culture + DMSO + suspension bactérienne.
- Témoin 2 : milieu de culture + DMSO.

Les tubes ont été ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

3- Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit alimentaire. L'activité antioxydante des HEs a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) DPPH.

➤ Principe

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH. Le piégeage du radical libre s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antiradicalaire (Milardovic *et al.*, 2006).

➤ Méthode de DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des deux huiles, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphénylpicryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole Mansouri *et al.* (2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en composé jaune, l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu. 50 µL de l'HE de chaque station ont été ajoutées à 1000 µL de DPPH (0.004% préparée dans l'éthanol). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µL d'éthanol avec 1000 µL de la solution de DPPH. Le mélange est laissé 30 min à l'obscurité et à température ambiante. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc (éthanol) à 517nm (Figure 11). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test est répété 2 fois. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$(\% \text{ d'inhibition}) = (\text{absorbance contrôle} - \text{absorbance test} / \text{absorbance contrôle}) \times 100$$

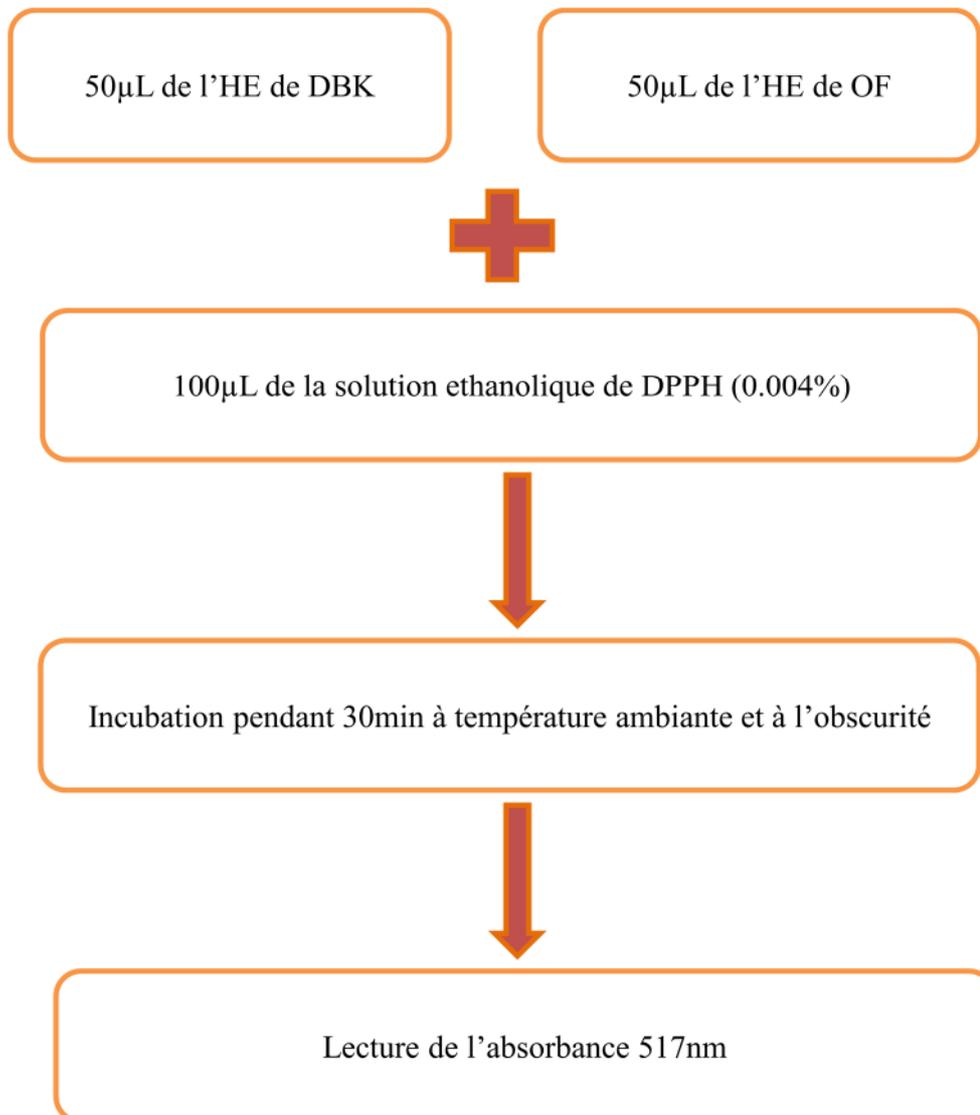
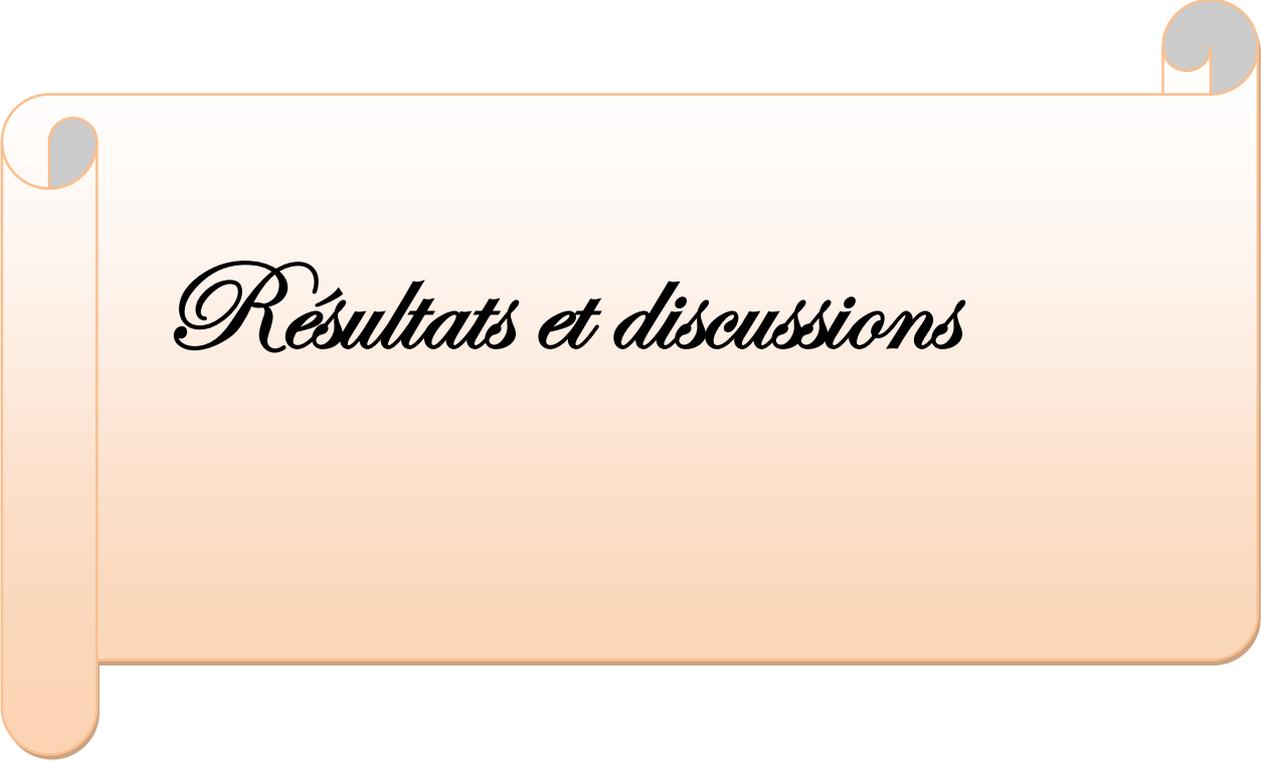


Figure 11: Protocole de l'évaluation de l'activité antiradicalaire.



Résultats et discussions

1-Etude des sites sécréteurs des huiles essentielles dans l'orange douce

Les poches sécrétrices dans le péricarpe des agrumes sont délimitées par des cellules sécrétrices de forme arrondie qui y déversent leurs produits de sécrétion (Figure 12).

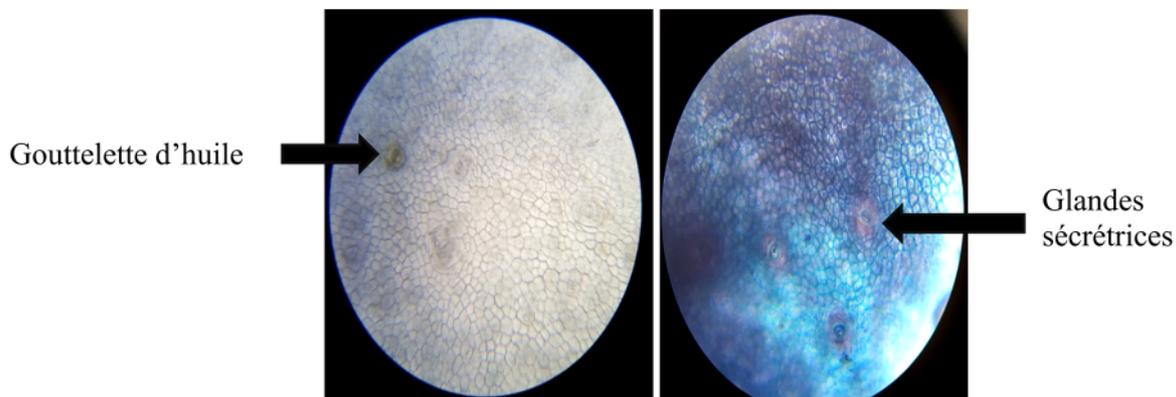


Figure 12: Photographies des coupes anatomiques des sites sécréteurs de l'orange douce avec et sans coloration au grossissement (X40).

2-Le rendement

Les résultats de rendement des HEs de *C. sinensis* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau V : Rendement en HE extraite

Huile essentielle	D.B.K	Oued Falli
Rendement (%)	0.73	0.52

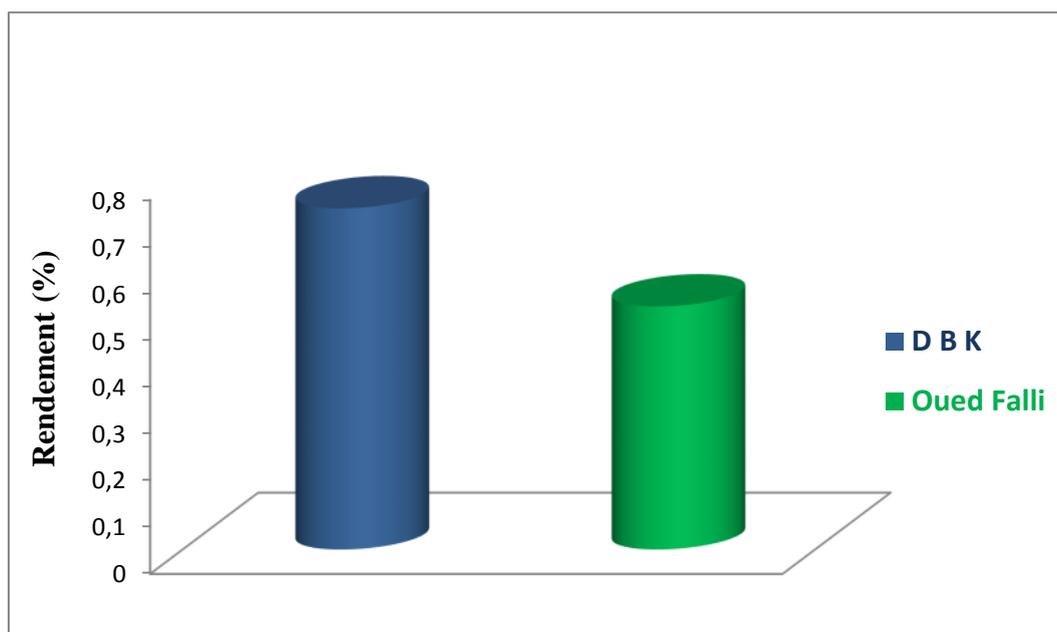


Figure 13: Rendement en HE de *C. sinensis* obtenu pour : DBK et OF.

Les teneurs en HE extraite par hydrodistillation de zestes séchés à température ambiante sont de l'ordre de 0,73% et 0,52% respectivement pour les deux stations : D.B.K et Oued Falli. Cette différence de rendement peut être expliquée par la variation des conditions environnementales (climat, situation géographique et la nature du sol), la période de la récolte, l'organe de la plante utilisé, le degré de la fraîcheur, la durée de séchage et la composition chimique (Lahlou, 2004).

3-Analyse de la composition chimique

Les profils chromatographiques des deux HEs sont représentés ci-dessous (Figure 14 et 15)

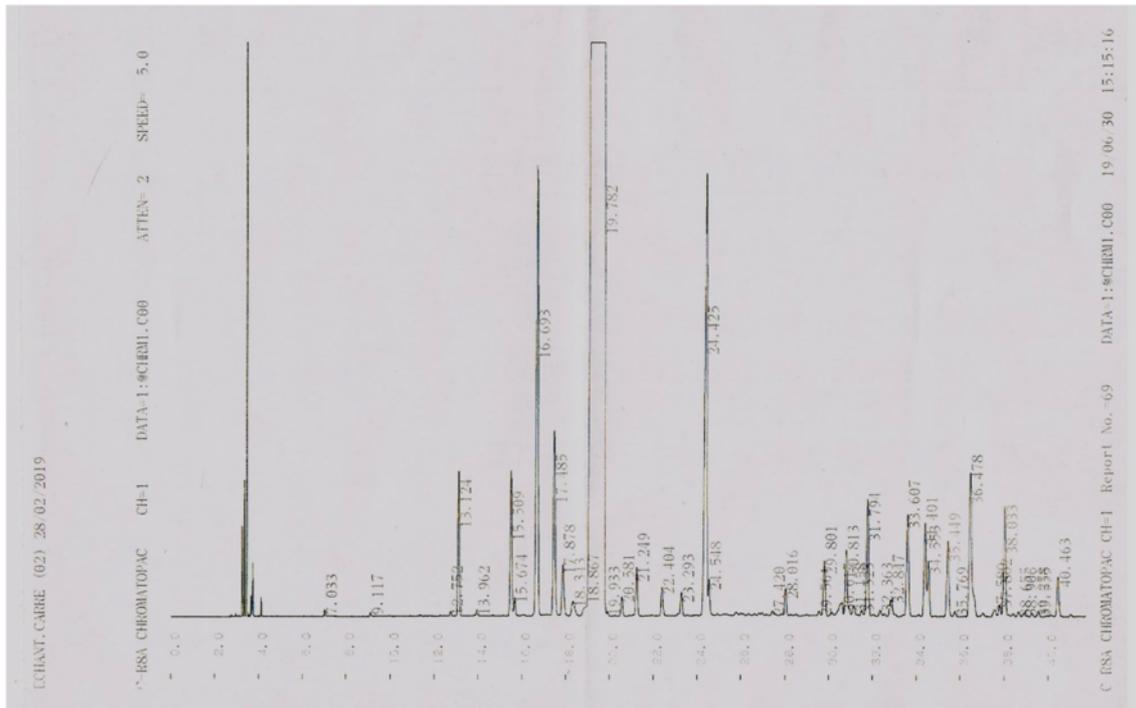


Figure14: Profil chromatographique de l’HE de la station D.B.K (terre sableuse).

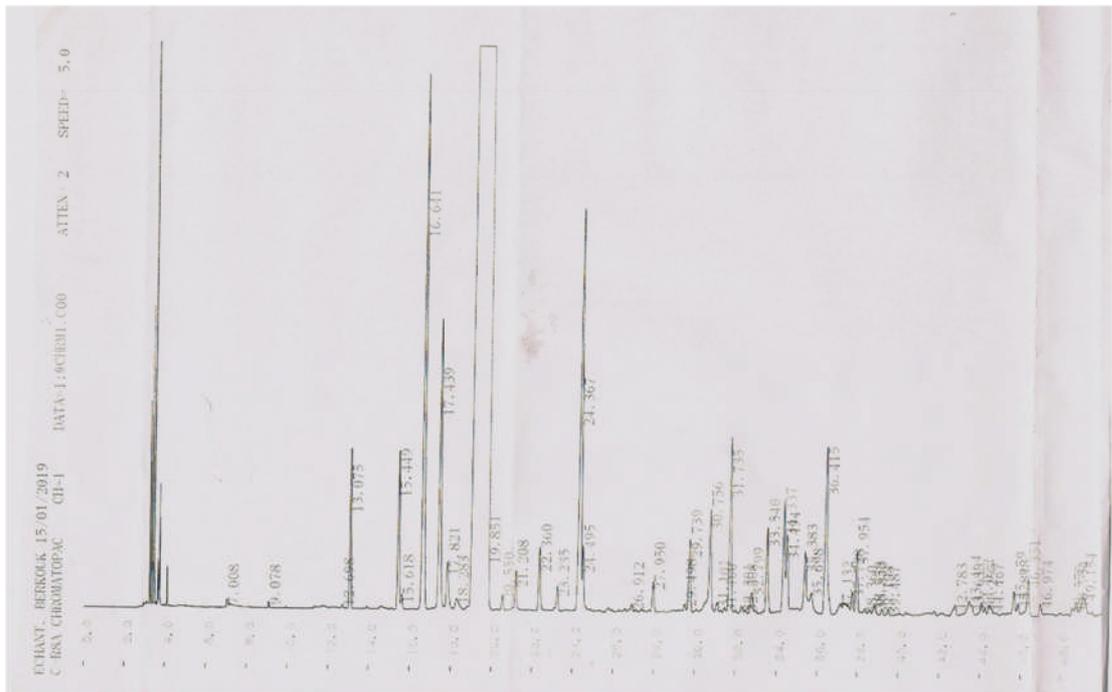


Figure 15: Profil chromatographique de l’HE de la région Oued Falli (terre argileuse).

Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative des composés chimiques des HEs par CPG sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau VI : composition chimique (%) des HEs de *C. Sinensis* analysée par la CPG.

Les composés (%)	Terre argileuse (OF)	Terre sableuse (DBK)
α -pinène	0.31	0.33
saberène	0.39	0.414
β -pinène	0.03	0.03
myrcène	1.56	1.61
α -phellanel	0.86	0.90
carène	0.16	0.25
α -terpène	0.05	0.09
limonène	90.64	90.81
terpène 4-ol	0.01	0.07
δ -terpène	0.09	0.09
otanol	0.16	0.16
terpinolène	0.58	0.08
linalol	1.35	1.88
citranellal	0.21	0.25
α -terpeneol	0.35	0.43
citral	0.26	0.31
néral	0.33	0.36
nérol	0.23	0.17
géraniol	0.61	0.64
acétate de citranellyl	0.16	0.09
acétate de géranyl	0.036	Absent
β -caryophylle	0.11	0.06
α -humulène	0.035	Absent

L'analyse de la composition des HEs de *C. sinensis* par CPG a permis de dénombrer 23 substances pour l'HE de la région d'OF et 21 substances pour l'HE de la région de DBK. L'HE de Oued Falli est constituée essentiellement de limonène (90.61%), de myrcène

(1.56%) et de linalol (1.35%), tandis que l'HE de DBK est constituée essentiellement de limonène (90.81%), de myrcène (1.61%) et de linalol (1.88%). Le terpinolène et l'acétate de citranellyl sont plus importants dans l'HE de la terre argileuse à des taux respectifs de 0.58% et 0.16% tandis que ces deux composés sont de l'ordre de 0.08% et 0.09% dans la terre sableuse.

On constate également la présence des aldéhydes (Néral et Géraniol) à raison de 0.17%, 0.64% pour DBK et 0.23%, 0.61% pour OF. Selon Hellal (2011) et Gancel *et al.* (2005), ces deux composés sont absents chez *C. sinensis*, par contre Bousbia (2011) a constaté leur présence avec des teneurs ne dépassant pas 0.14%. On remarque également l'absence de p-cymène dans les deux huiles. Quinetero *et al.* (2003) ont considéré que le procédé d'extraction était adéquat uniquement lorsque l'HE obtenue ne contient pas de p-cymène, considéré comme un bon indicateur de l'oxydation des monoterpènes dans les HES des agrumes.

En étudiant la composition chimique des HES de *Citrus*, Nogata *et al.* (2006) ont conclu qu'en plus des monoterpènes, ces HES renferment des acides gras en quantité assez faible (0.8%) ; l'acide linoléique est l'acide gras principal de *C. sinensis*. En général on n'a pas noté une différence importante dans la composition des deux HES.

Selon Senatore *et al.* (2000) les variations rencontrées dans la composition chimique des HES du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre d'un ou de la combinaison de plusieurs facteurs : le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et la présence de chemotype. Minh *et al.* (2002) ont signalé que le stade de maturité du fruit a un impact important sur la composition chimique de l'HE. Ainsi les terpènes sont exclusivement présents dans l'HE du fruit non mur ; les concentrations en aldéhydes, les terpènes oxygénés et sesquiterpènes aliphatiques augmentent au fur et à mesure que le fruit mûrit. L'acétate de géranyl (0.11%) et α -humulène (0.035%) ne sont représentés qu'à des taux très faible dans l'HE de la terre argileuse, alors qu'ils sont absents dans l'HE de la terre sableuse. Ces résultats sont relativement différents de ceux obtenus par Hellal (2011) qui a montré que la composition chimique de l'huile de *C. sinensis* était constituée principalement de limonène (77.37%) et de β -pinène (3.45%). Moufida et Marzouk (2003) ont confirmé que l'HE de *C. sinensis* était composée majoritairement de limonène avec des teneurs qui varient de 68% à 98%. Cependant, dans cette même étude le linalol n'est représenté qu'à des taux

faibles (0.2%), ainsi que le néral et le géranjol sont représentés avec des concentrations qui varient de 0.1% à 0.7%.

4-Activité antibactérienne

4-1 Station Oued Falli

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de la station Oued Falli sont représentés dans les figures 16 et 17 et le tableau VII :

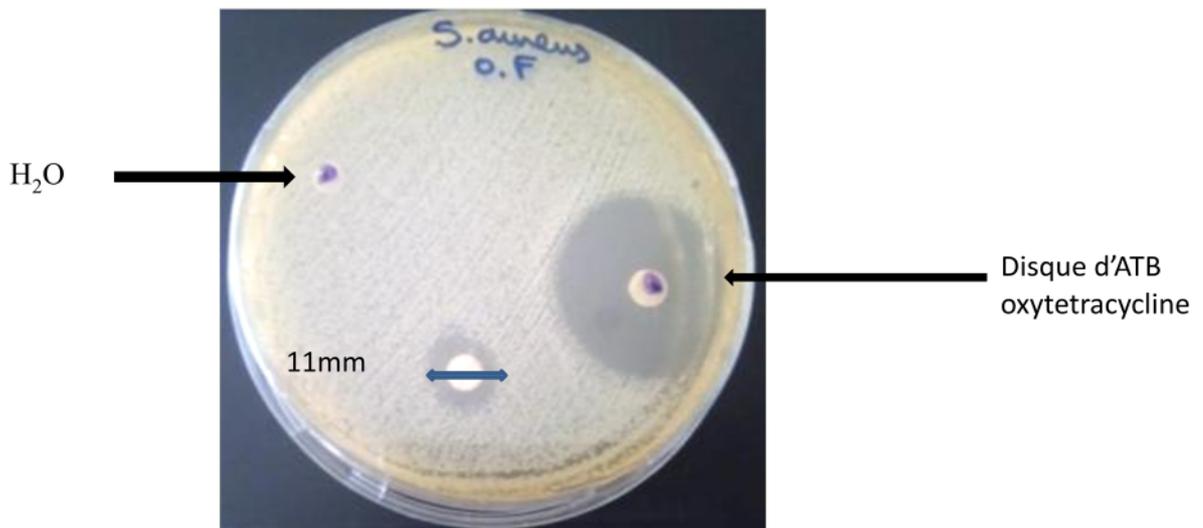


Figure 16: Effet de l'HE de la région OF sur *S. aureus*(ATCC25923).

Le résultat de l'activité antimicrobienne de l'HE de la station OF révèle une sensibilité modérée de *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 11mm.

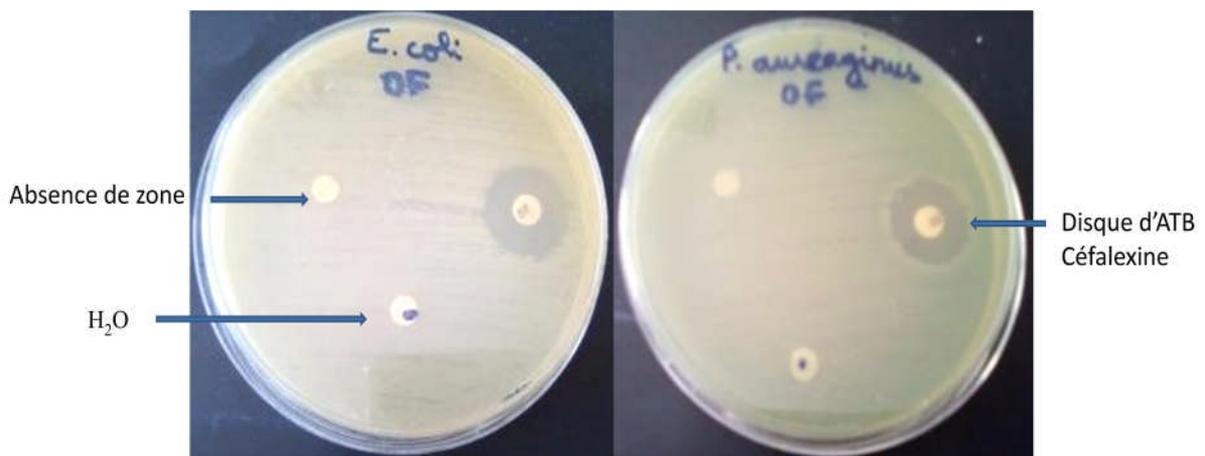


Figure17: Effet de l'HE de OF sur *E. coli* (ATCC25922) et *P. aeruginosa* (ATCC27853).

Le résultat de l'activité antimicrobienne de l'HE de la station OF sur les souches *E.coli* et *P. aeruginosa* ont montré que ces souches sont résistantes. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII : Zone d'inhibition en (mm) de l'HE de la station OF.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Diamètre d'inhibition (Ø = mm)	11	00	00
La sensibilité	Sensible	Résistante	Résistante

On peut déduire que les souches Gram (-) sont résistantes à cette huile, tandis que la souche Gram (+) s'est révélée plus sensible.

4-2 Station Drâa Ben Khedda

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de la station DBK sont représentés dans les figures ci-dessous :

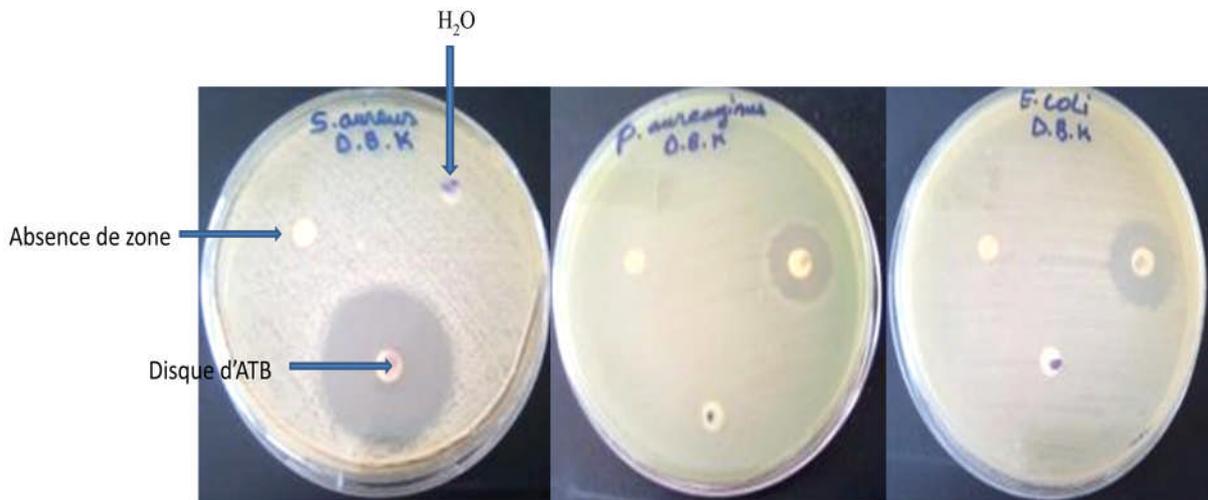


Figure 18: Effet de l'HE de DBK sur *E. coli*(ATCC25922), *S. aureus* (ATCC25923). et *P. aeruginosa* (ATCC27853).

Le résultat de l'activité antimicrobienne de l'HE de la station DBK sur les souches *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* ont montré que les trois souches sont résistantes à cette HE.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VIII: Zone d'inhibition en (mm) de l'HE de la station DBK.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Diamètre d'inhibition (Ø = mm)	00	00	00
La sensibilité	Résistante	Résistante	Résistante

Les deux huiles de la terre argileuse et sableuse n'ont montré aucun effet antibactérien sur *E. coli* et *P. aeruginosa*. Ceci est dû au potentiel de résistance que possèdent ces bactéries contre l'action antibactérienne des HEs de citrus notamment *C. sinensis*. En revanche, *S. aureus* a manifesté une sensibilité modérée vis-à-vis de l'HE de la terre argileuse. Comme dans notre étude, Hellal (2011) a rapporté que *S. aureus* était la seule souche sensible au *C. limonum* (citron) avec un diamètre de 30,33mm, 16mm vis-à-vis de *C. aurantium* (orange amère) et 11,66mm pour *C. sinensis*. Boudries *et al.* (2017) ont rapporté que *S. aureus* a présenté une sensibilité variable envers les HEs de quelques espèces de *citrus* testés. En effet les zones d'inhibition avec *Citrus reticulata* (mandarine) et *Citrus clementina* (clémentine) étaient de 15,06mm et 12,62mm respectivement. Ces deux souches ont été déjà décrites en littérature comme étant résistantes à différentes HEs. En effet Akin et Aktumsek (2009) ont montré que l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis* était inefficace contre *P. aeruginosa* et *E. coli* et efficace contre *S. aureus*. Cette sensibilité plus marquée des bactéries à Gram positif (*S. aureus*) vis-à-vis des HEs a été observée par plusieurs auteurs (Lefsih *et al.*, 2001 et Idir, 2010). Par contre l'HE issue de la terre sableuse n'a montré aucune efficacité contre les 3 souches testées.

D'après Kalemba et Kunicka (2003) la sensibilité d'un microorganisme dépend des propriétés de l'HE et du microorganisme lui-même. Selon plusieurs auteurs (Poole, 2001 ; Burt, 2004 ; Busatt *et al.*, 2008) la grande résistance des bactéries Gram négatif aux HEs est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram positif. Cependant Celikel et Kavas (2008) ont souligné que les HEs volatiles ont peu d'influence sur l'inhibition de la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif. Les

principaux composants actifs des HEs qui ont un effet sur les agents pathogène d'origine alimentaire contiennent généralement 1% des composés phénoliques tels que : le citral, α -terpinéol et le linalol (Cristiani *et al.*, 2007). Les propriétés antibactériennes de ces composés sont liées à leurs caractères lipophiles, ce qui aboutit à leur accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement, la perméabilité de la membrane cellulaire, et la dégradation de la paroi cellulaire (Helander *et al.*, 1998). En effet, les HEs de la Thomson n'ont exercé aucune action antibactérienne sur les souches testées. Ces HEs à chemotype limonène 90,64% (argileuse) et 90,81% (sableuse) ont démontré une efficacité négative vis-à-vis des souches testées.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Dorman et Deans (2000), qui ont démontré que les hydrocarbures monoterpéniques, abondants dans les HEs de *Citrus* contenant le limonène comme constituants principal, sont faiblement inhibiteurs contre plusieurs souches bactériennes. Selon Delaquis *et al.* (2002), l'activité antimicrobienne de certaines HEs pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à faible taux tels que : le nérol, néral, cimmanaldehyde, carvacrol, géraniol, myrténal et eugénol. Ces derniers, agissent en synergie ce qui permet une activité plus importante que celle obtenue par les composés majoritaires.

Inouye *et al.* (2001) ont rapporté que les alcools se sont avérés important dans l'activité antimicrobienne, par exemple le terpinène 4-ol est plus actif contre *P.aeruginosa* que le terpinéol. En plus, les esters peuvent aussi participer à l'effet antimicrobien tels que : l'acétate de géranyl, acétate de néryl et α -terpenyl qui possèdent une grande activité antibactérienne. Dans notre cas la différence de pourcentage en Terpinolène, α -humulène Géraniol, Acétate de géranyl, acétate de citranellyl, entre la terre argileuse et sableuse peut expliquer l'absence d'effet sur *S. aureus* de l'HE issue de la terre sableuse. Cependant la détermination de l'efficacité des HEs sur les agents microbiens reste difficile à réaliser, à cause de certains paramètres externes incontrôlables tels que la composition des HEs, qui varie selon les conditions environnementales et pédologiques au sein d'une même espèce.

4-3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le résultat des macro-dilutions sur milieu liquide de l'HE de la terre argileuse sur *S. aureus* ont montré que l'HE diluée n'a exercé aucun effet antibactérien vis-à-vis de *S. aureus*.

C. sinensis est caractérisée par une faible activité antimicrobienne, en effet Hellal (2011) a calculé les CMI uniquement pour les huiles de *C. aurantium* et *C. limonum* qui ont exercés un effet antibactérien important.

5-Activité antioxydante

Les résultats de l'activité antiradicalaire des deux HEs sont représentés dans la figure ci-dessous :

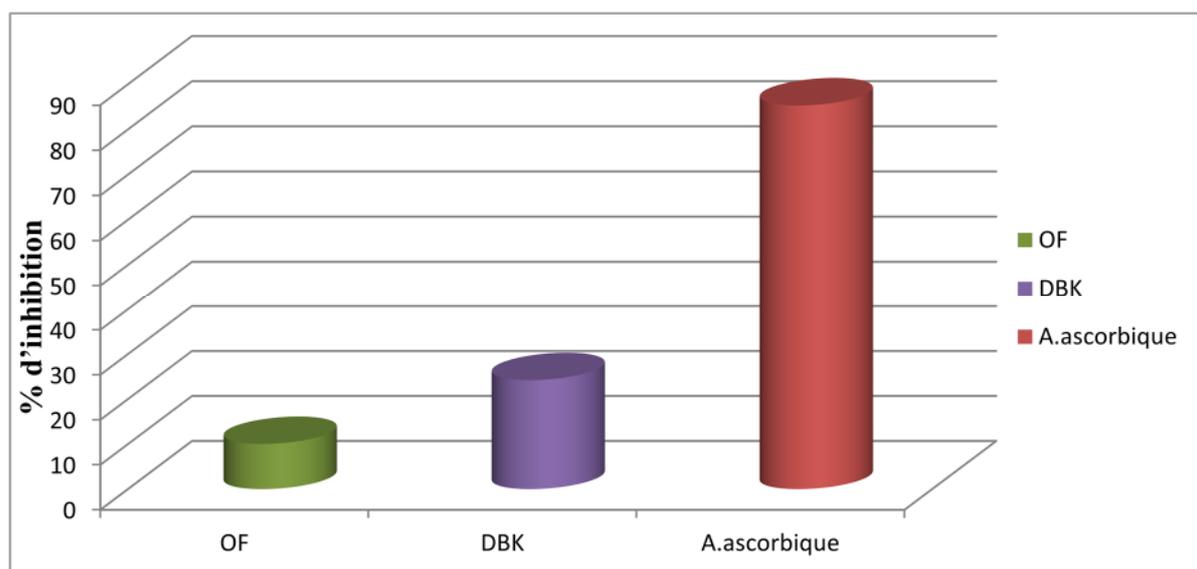


Figure 19 : Piégeage du radical DPPH

Tableau IX : Pourcentage d'inhibitions des HEs et de l'acide ascorbique.

Huile essentielle	OF	DBK	Acide ascorbique
% d'inhibition	10.03	22.24	85.32

L'activité antioxydante des HEs testées a manifesté un potentiel antioxydant modéré avec cette méthode. L'HE de DBK a démontré une activité antiradicalaire à une concentration de 13.34µg/mL avec un taux d'inhibition de 22.24%, tandis que l'HE de OF a exhibé un taux

d'inhibition de 10.03% avec une concentration de 7.79 μ g/mL. Le faible pouvoir antiradicalaire de ces deux huiles est principalement lié au profil chimique, notamment l'absence de thymol et de carvacrol qui ont un effet antioxydant fort.

Doukani et Tabak (2017) ont montré que la concentration la plus faible en composés phénoliques a été enregistrée pour *C. sinensis* par rapport aux différentes espèces de citrus. La variation dans l'activité antioxydante des deux HEs est due à la nature quantitative et qualitative de leur contenu phénolique (Haddadi, 2004). L'activité antioxydante est attribuée à la composition chimique des HEs : caroténoïdes, polyphénols et acides phénoliques (les acides galliques, vanillique, salicylique, caffeique, procatechique). Cependant, elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux (Wang, 2008). Dans une étude antérieure sur les HEs avec une prédominance monoterpénique il a été démontré, que l'activité antioxydante était relativement modérée (Oubrahim, 2015).



Conclusions et perspectives

Les HEs des agrumes sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe. L'extraction par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement en HE de 0.52% pour la terre argileuse et 0.73% pour la terre sableuse. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de ces deux huiles a révélé :

- L'HE des deux terres est de chemotype limonène (90%)
- La présence de certains composés (Acétate de géranyl, humulène) dans l'HE argileuse, et leur absence dans l'HE sableuse.
- L'abondance de terpinolène (0.58%) dans l'HE argileuse, et son faible taux dans l'HE de terre sableuse (0.08%).

Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne et antioxydante des HEs de *C. sinensis*. Ainsi, l'HE issue de la terre sableuse n'a exercé aucune activité antibactérienne sur les souches étudiées ; qu'elles soient Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) ou Gram positif (*S. aureus*). En revanche l'HE de la terre argileuse a exercé une activité antibactérienne uniquement sur une souche Gram positive (*S. aureus*). En ce qui concerne l'activité antiradicalaire, les deux HEs ont présenté une activité modérée.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussées de l'activité antimicrobienne en testant ces deux HEs sur d'autres souches Gram positives et des souches fongiques. Il serait également intéressant d'élargir le panel des tests d'activités antioxydantes (FRAP, ABTS, test β -carotène, etc.). Comme le limonène est le monoterpène hydrocarboné le plus abondant dans les oranges, il constitue un bon exemple d'agrosolvant. Les industries ne pouvant pas perdre ces matières premières, il serait intéressant d'envisager leur application comme solvants industriels naturels dans de nombreux secteurs comme l'agroalimentaire, la pharmacie, la cosmétique et les parfums.



Références bibliographiques

- AGHEL N., YAMINI Y., HADJIAKHOONDI A. et MAHDI POURMORTASAVI S. (2004).** Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium L* essential oil. *Talanta*, 62, 407- 411.
- AKIN M., AKTUMSEK A. (2009).** Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis L.* growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, 9, 531-535.
- AMARTI F., EL AJJOURI M., GHANMI M., SATRANI B., AAFI A., FARAH A et CHAOUCH A. (2011).** Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie*, 9 (3), 149-157.
- ARMELLE J. (2004).** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanisme, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications. *Oilseeds and fats Crops and Lipids*, 414-418.
- BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D et IDAOMAR M. (2008).** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- BACHES B. (2011).** Agrumes : comment les choisir et les cultiver facilement. *Ulmer*, Paris.
- BATARD E., ELKOURI D et POTEL G. (2007).** Infection à staphylocoques aspect clinique bactériologiques. *Maladies infectieuses*, 8 -10.
- BENEDESTE A. et BACHES M. (2002).** Les agrumes. *Urgen Ulmer, Paris*.
- BERGER M. (2005).** Can oxydatif damage be treated nutritionally. *Clinical nutrition*, 24, 172-183.
- BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., SAMOJLIK I., GORAN A et IGIC R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum L., Alliaceae*), *Food Chemistry*, 925–929.
- BOUDRIES H., LOUPASAKI S., LADJAL ETHOUMI Y., SOUAGUI S., BACHI BEY M., NABET N., CHIKHOUNNE A.,MADANI K et CHIBANE M. (2017).** *International Food Resarch Journal*, 24, 1782-1792
- BOUSBIA N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de Doctorat. Option : chimie.

L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique. Paris. France.

BREBION G., CARCOUE T. et MARC RAUPHIE J.C. (1999). L'histoire des agrumes. Service des espaces verts et de l'environnement, 1er Ed., Paris.

BRUNETON J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales Technique et documentation. Lavoisier, 2ème Ed., Paris.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales Technique et documentation. Lavoisier, 3ème Ed., Paris.

BRUNETON J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales Technique et documentation, Lavoisier, 4ème Ed., Paris.

BUHEL J. A. (1989). Flavoring with citrus oil. *Perfumer and Flavorist* 14, 22–26.

BURT S.A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 22–25.

BUSATT A. C., VIDAL R.S., POPIOLSKI A.S., MOSSI A.J., DARIVA C., RODRIGUEZ M.R.A., CORAZZA M.L., VLADIMIR O.J. et CANSIAN R.L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25, 207-211.

CARSON C. F., RILEY T. V. (1995). Activité antimicrobienne des principaux composants de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*. *Journal applied bacteriol* 78 (3), 264-9.

CARSON C.F., RILEY T.V. et BOSQUE F. (2002). Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied Bacteriology*, 78 (3), 264-269.

CELIKEL N. et KAVAS G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, 26, 174-181.

CHAUMONT J.P. et LEGER D. (1998). Plantes Médicinales. *Phytotherapie*, 23, 124.

CHEN C.N., WENG M.S., WU C. L. et LIN J. K. (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by

Taiwanese propolis from different sources. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(2), 175-185.

CHIASSEON H. et BELOIN N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre ». *Journal of Economic Entomology*, 97, 1378-1383.

CHUTIA M., MAHANTA J. J., SAIKIA R. C., BARUAH A. K. S et SARMA T.C. (2006). Influence of leaf blight disease on yield of oil and its constituents of java citronella and in-vitro control of the pathogen using essential oils. *World Journal of Agriculture Science* 2 (3), 319– 321.

CHUTIA M., BHUYAN P. D., PATHAK M. G., SARMA T. et BORUAH, P.(2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology* 42, 777–780

CRISTANI M., D'ARRIGO M., MANDALARI G., CASTELLI, F., SARPIETRO M. G. et MICIELI, D.(2007). Interaction of four monoterpènes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6300–6308.

DJILANI A ET DICK A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition. Well-Being and health* 7, 156-173.

DELAQUIS P.J., STANNICH K., GIRARDS B et MAZZA G. (2002). Antibacterial activity of individual and mixed fraction of dill, *cilantro*, *coriander* and *eucalyptus* essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.

DEYSON G. (1954). Eléments d'anatomie des plantes vasculaires. *Sedes*, 1er Ed., Paris.

DE MORAES P. A., GALINDO L. A. L. et COSTA M. (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. In experimental anxiety models in mice. *Life Sciences* 78, 1720 – 1725.

DEL RIO J.A., FUSTER M.D., GOMEZ P., PORRAS L., GARCIA-LIDON A et ORTUNO A. (2004). *Citrus limon* : a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*, 84, 457- 461.

- DHARMAWAN J., KASAPIS S., CURRAN P. et JOHNSON J. R. (2007).** Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: freshly-squeezed juice. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 228–232.
- DJENANE DJ., BEDDAR K et OUELHADJ A. (2011).** Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit.
- DORMAN H .J.D et DEANS S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), 308-316
- DOUKANI K et TABAK S. (2017).** Profil phytochimique de quelques espèces de *Citrus* (*C. aurantium*, *C. sinensis* et *C. limonum*). *Ecologie-Environnement* 13.
- DUARTE M.C.T., FINGUEIRA G.M., SARTORATTO., REHDER V.L.G et DELARMELINA C. (2005).** Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97 (2), 305-311.
- EDRIS A.E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents. *Phytotherapy Research*, 42 (4), 308–323.
- EL OUALI L. et FOUAD W. (2013).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*. *Thymus vulagris*, 27-33.
- ERKAN N., AYRANCI G et AYRANCI E. (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract blackseed (*Nigella sativa*. L) essential oil, *carnosic acid*, *rosmarinic acid* and *sesamol*. *Food Chemistry*, 110, 76-82.
- FARHAT A., FABIANO–TIXIER A. S., MAATAOUI M., MAINGONNAT J. F., ROMDHANE M. ET CHEMAT F. 2011.** Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, 125, 255–261.
- FUSELLI R., SUSANA B., GARCIA D.L.R., MARTIN J. et ROSALIA F. (2008).** Chemical composition and antimicrobial activity of *citrus* essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2067-2072.

FRANCHOMME P et PENOËL D. (2001). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *Roger Jollois*, 1er Ed., Paris.

FERNANDEZ-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.

GANCEL A. L., OLLITRAUET P., FROELICHER Y., TOMI F., JACQUEMOND C., LURO F. et BRILLOUET J.M. (2005). Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange and grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2224-2230.

GONZALEZ-MOLINA E., DOMINGUEZ-PERLES R., MORENO D.A et GARCIA-VIGUERA. (2010). Natural bioactive compounds of *citrus limonum* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 327-345.

GLIŠIĆ S .B., MIŠIĆ D .R., STAMENIĆ M. D., ZIZOVIC I .T., AŠANIN R .M. et SKALA D E. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 105, 346-352.

GULÇIN I. (2004). Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea L.*). *Turk Journal Agriculture*, 28, 25-33.

GULCIN I., HUYUT Z.B., ELMASTAS M., HASSAN Y et ABOUL-EIN D. (2010). Radical scavenging and antioxydant activity of *tannic acid*. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53.

HADDADI H. (2004). Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits. Mémoire de Magister en Biochimie-Microbiologie. Université Abderrahmane Mira. Béjaia.

HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDHOLM T., POL I., SMID E.J., GORRIS L.G.M. et VONWRIGHT A. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (9), 3590-3595.

HELLAL Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites de *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.

HUBERT R. (1992). Epices et aromates. Lavoisier, 1er Ed., Paris.

IDIR L. (2010). Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des Espèces végétales de la région de la Kabylie. Mémoire de Magister. Option Technologie *Alimentaire*. Université M'Hamed Bougera. Boumerdes.

INOUYE S., TAKIZAWA T. et YAMAGUCHI H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565-573.

ISABELLE E. (2008). Guide des agrumes. Cirad, 1er Ed., Paris.

ISMAN M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19 (8), 603-608.

JACQUEMOND S., AGOSTINI D et CUR K. (2009). Les clémentiniers et autres petites agrumes. Quae, 1er Ed., Paris.

JAFARI S., ESFAHANI S., FAZELI M. R., JAMALIFAR H., SAMADI M et NAJARIAN-TOOSI A. 2011. Antimicrobial activity of lime essential oil against food-borne pathogens isolated from cream-filled cakes and pastries. *International Journal of Biological Chemistry* 5, 258–265.

JEANNOT V., CHAHBOUN J., RUSSELL D. et BARET P. (2005). Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium*). *International Journal of Aromatherapy*, 15 (2), 94-97.

KALEMBA D. & KUNICKA A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.

KAMAL G.M., ANWAR F., HUSSAIN A.I., SARRI N ET ASHRAF M.Y. (2011). Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels *International Food Research Journal* 18, 1275-1282.

KEEFOVER-RING K., THOMPSON B. J. D et LINHART Y. B. (2009). Beyond six scents: defining a seventh thymus vulgaris chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and fragrance journal*, 24, 117-122.

KELEN M. et TEPE B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, 99, 4096-4104

KIM D O., LEE K W., LEE H J ET LEE C Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(13), 3713-3717.

KIM D.K et LEE C.Y.(2004). Comprehensive study on vitamin c equivalent antioxidant capacity of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 253-273.

KURKIN V.A. (2003). Phenylpropanoids as the biologically active compounds of the medicinal plants and phytopharmaceuticals. *Natural Compounds*, 39, 123.

LAHLOU M., (2004). Methods of Study the Photochemistry and Bioactivity of Essential oils. *Phototherapy Research*, 18, 435- 448.

LAMBERT R., SKANDAMIS P.N., COOTE P.J.ET NYCHAS G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 453-462.

LEFSIH K., RONCALES P., YANGUELA J. et DJENANE D. (2010). Biological effects of Algerian essential oils and their application in liquid eggs. *New challenges in Food preservation.*, 1-11.

LOZA-TAVERA H. (1999). Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 464, 49-62.

LOUSSERT R. (1989). Les agrumes-2-Productions. Lavoisier, 1er Ed., Paris.

MANSOURI A., EMBAREK G., KOKKALOU E. ET KEFALAS P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89, 411-420.

MINH TU N.T., THANK L.X., UNE A., UKEDA H. et SAWAMURA M. (2002). Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and limepeel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 169-174.

MODZELEWSKA A., SUR S., KUMAR K.S et KHAN S.R. (2005). Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents*, 5, 477-499.

MORO BURONZO E. (2005). Grand guides des huiles essentielles (santé, beauté, bien-être). Hachette pratique, 1er Ed., Italie.

MOUFIDA S. et MARZOUK B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.

NOGATA Y., SAKAMOTO K., SHIRATSUCHI H., ISHII T., YANO M. et OHTA H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissue of *citrus* species. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70 (1), 178-192.

OUBRAHIM. A., AIT KAKI T., AIT KAKI S., BENNADJA S., MANSOURI R et DJEBAR M. (2015). Activité antioxydante et anticandidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* provenant de la région la région d'El Kala. *Algerian Journal of natural products*, 210-216.

OUKRID A et AOUDIA F. (2007). Evaluation du pouvoir antioxydant de deux variétés d'orange. Mémoire d'ingénieur en sciences Alimentaire. Université Abderrahmane Mira .Bejaia.

OUSSOU K.R., COFFIRK., NATHALIE G., SERIYOLOU., GERARD K., MIREILLED D., YAOT N., GILLES F et JEAN- CLAUDE C.H. (2004). Activité antimicrobienne des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, 7, 1081-1086.

PIERRE M., JACET D., JEAN K., FABRICE FEKAN B., DANIEL D., FRANÇOIS D., PAUL H., CHANTEL M. ET JEAN MARIE B. (2001). Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, 57, 95-104.

PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C et ROURA S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of food science and technology*, 36, 679-684.

POOLE K. (2001). Multidrug resistance in Gram negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 500-508.

PRALORAN C. (1971). Les agrumes. Editeur 8348, 1er Ed., Paris.

QUINTERO A., GONZALEZ C.N., SANCHEZ F., USUBILLAGA A. et ROJAS L., (2003). Constituents and biological activity of Citrus aurantium amara L. essential oil . *Acta Horti*, 597, 115 – 117.

SALVADOR C. (2010). L'aromathérapie spirituelle histoire et bienfaits des huiles essentielles pour les maux du corps et de l'âme. Guy trédaniel, 1er Ed., Paris.

SENATORE F., NAPOLITANO F. et OZCAN M. (2000). Composition and antibacterial activity of essential oil from Crithmum maritimum L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 186-189.

SERRANO M.A., MARTINEZ-ROMERO D., GUILLEN F., VALVERDE J.M., ZAPATA P.J., CASTILLO S et VALERO D. (2008). The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 464-471.

TONGNUANCHAN P et BENJAKUL S. (2014). Essential oils extraction, bioactivities and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79 (7), 1231-1249.

TRIPOLI E., GUARDIA M., GIMMANCO S., DIMAJO D et GIAMMANCO M. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, 104, 466-479.

VIRBEL-ALONSO C. (2011). Citron et autres agrumes. Eyrolles, 1er Ed., Paris.

WANG Z., LI L., DING T., ZHOU X., WANG L., ZHANG H., LIU L., LI Y.A., LIU Z., WANG H., ZENG. et HE H. (2006). Improved solvent-free microwave extraction of

essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography*, 1102 (2), 11-17.

WANG.W., WU N., ZU Y.G et FU Y.J. (2008). Antioxydant activity of *Rosmarinus officinalis* oil compared to its main compound. *Food Chemistry*, 108 (3), 1019-1022.



Annexes

Composition des produits utilisés pour la double coloration

➤ Préparation du rouge Congo aqueux

Rouge Congo	1.5g.
Ammoniaque.....	1mL.
Eau distillée.....	49mL.

➤ Préparation du vert de méthyl

Eau distillée.....	25mL.
Vert de méthyl	0.5g.
Acide acétique	22.5mL.

Composition des principaux milieux de culture utilisés

➤ Milieux liquide :

• Eau physiologique stérile :

Composition en g/L

Chlorure de sodium (Na Cl).....	9g
Eau distillée.....	1000mL

pH=7

Stérilisation à 121 °/15min.

• Bouillon Brain Hearth Infusion (BH) CM 225

Composition en g/L

Protéose peptone.....	10g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5g
Infusion de cœur de bœuf.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate disodique.....	2,5g
Glucose.....	2g
Eau distillée qsp.....	1000mL

Ph=7,4

Stérilisation à 121 °/15min

➤ Milieux solide :

• Milieu Muller Hinton :

Composition en g/L

Extrait de viande.....3g

Hydrolysate acide de caséine.....17,5g

Agar.....18g

pH=7,4

Stérilisation à 121°C/15min

Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique