

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Bencheikh Reda

Benamrane Ahmed Yacine

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Biotechnologie et valorisation des plantes

THÈME

L'effet antibactérien des huiles essentielles des
citrus (limonum et sinensis) sur différentes
souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas*
aeruginosa et *Staphylococcus aureus*

DEVANT LE JURY

Président	M. Dahmouni Said	MAA	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. Bengharbi Zineb	MCB	U. Mostaganem
Examineur	M. Benabdelmoumene Djilali	MCA	U. Mostaganem

Année Universitaire 2020 - 2021

Remerciements

On remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme Bengharbi Zineb**. On la remercie pour ses compétences professionnelles incontestables ainsi que ses qualités humaines, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité tout au long de la préparation de ce mémoire.

Nous sommes honorés de la présence de **M.Dahmouni Saïd** Comme président du jury et de **M. Benabdelmoumene Djilali** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus de près ou de loin principalement à toutes les personnes du laboratoire de biochimie et microbiologie à l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail comme preuve d'amour :

A mes chers parents par leur soutien, leur patience, leur encouragement durant mon parcours scolaire, leur amour, leur confiance et leur sacrifice.

Qu'ALLAH me le gardes.

A ma petite sœur et mon grand frère ainsi a tout ma famille, a tous mes amis.

*Et a l'ensemble des étudiants de la promotion master 2
LMD/BVP de l'année 2020-2021*

A Yacine, chère ami avant d'être binôme

A vous cher lecteur

Réda

Dédicaces

*Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste
travail*

A l'être le plus cher de ma vie, ma mère

*A celui qui m'a fait de moi un homme, mon père **HADJ***

DJAMEL

A mes chers frères et sœurs et leurs enfants

A Réda, chère ami avant d'être binôme

A tous mes amis

A vous cher lecteur

WELD DJAMEL

Résumé

Dans le but de sélectionner de nouveaux produits végétaux possédant des activités et potentiels pharmacologique, la présente étude porte sur l'évaluation des effets antibactériens des huiles essentielles des citrus vis-à-vis certaines souches pathogènes.

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'effet antibactérien des huiles essentielles extraites des feuilles de deux espèces d'agrumes Citrus. *C. limonum* (citron) et *C. sinensis* (orange) poussant dans la Wilaya de Mostaganem.

Pour se faire, dans un premier temps on a procédé à l'extraction des huiles essentielles des citrus par entraînement à la vapeur d'eau ; qui était de rendement très faible, 0,20% pour le *C. limonum* et 0,12% pour *C. sinensis*.

L'activité antibactérienne a été évaluée par inhibition sur gélose HM sur trois souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). L'huile essentielle de *C. limonum* (citron) a révélé une activité intéressante révélée par des zones d'inhibitions comprises entre 7 et 24 mm comparables à celle dû à *C. sinensis* (orange) avec des zones d'inhibitions qui varient entre 7 et 23 mm. Les dilutions étaient caractérisées par une plus faible zone d'inhibition. Parmi toutes les bactéries testées, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* étaient celles qui ont montré la sensibilité la plus importante.

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des citrus a été déterminée par leurs effets bactéricide ou inhibiteur dans notre étude in vitro, et nous mène à conclure, qu'ils soient pures ou dilués présentent d'excellents alternatifs aux antibiotiques de synthèses pour lutter contre les infestations bactériens causées par *E. coli* et *S. aureus*, nous permettant ainsi de faire face aux problèmes d'antibiorésistance et des effets secondaires dramatiques de la consommation excessive des antibiotiques de synthèse .

Mots clés : Huiles essentielles, *C. limonum*, *C. sinensis*, activité antimicrobienne

Abstract

In order to select new plant products with pharmacological activities and potentials, the present study focuses on the evaluation of the antibacterial effects of citrus essential oils against certain pathogenic strains.

The objective of our work is to evaluate the antibacterial effect of essential oils extracted from the leaves of two Citrus species. *C. limonum* (lemon) and *C. sinensis* (orange) growing in the Wilaya of Mostaganem.

To do this, we first extracted the essential oils from the citrus by steam distillation; the yield was very low, 0.20% for *C. limonum* and 0.12% for *C. sinensis*.

The antibacterial activity was evaluated by inhibition on MH agar on three strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). The essential oil of *C. limonum* (lemon) revealed an interesting activity revealed by inhibition zones between 7 and 24 mm comparable to that due to *C. sinensis* (orange) with inhibition zones varying between 7 and 23 mm. The dilutions were characterised by a lower zone of inhibition. Among all the bacteria tested, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* showed the highest sensitivity. The study of the antimicrobial activity of citrus essential oils was determined by their bactericidal or inhibitory effects in our in vitro study, and leads us to conclude that, whether pure or diluted, they present excellent alternatives to synthetic antibiotics to combat bacterial infestations caused by *E. coli* and *S. aureus*, which will allow us to face the problems of antibiotic resistance and the dramatic side effects of the excessive consumption of synthetic antibiotics.

Keywords: Essential oils, *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, microbiological activity.

ملخص

من أجل اختيار منتجات نباتية جديدة ذات أنشطة وإمكانات دوائية ، تركّز هذه الدراسة على تقييم الآثار المضادة للأجسام الناجمة عن الزيوت الأساسية للحمضيات على سلالات معينة مسببة للأمراض.

الهدف من عملنا هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية المستخرجة من أوراق نوعين من الحمضيات *C.Limonum* (ليمون) *C.sinensis* (برتقال) التي تنمو في ولاية مستغانم.

ولهذا الغرض، تم استخراج الزيوت الأساسية من الحمضيات عن طريق التقطير ببخار الماء، حيث أعطت العملية مردود ضعيف 0.20 بالنسبة للليمون و 0.12 بالنسبة للبرتقال.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا عن طريق تثبيط تأثير علي MH على ثلاث سلالات (*Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). تأثير الزيت الأساسي للليمون كشف عن نشاط مثير للاهتمام مع قطر تثبيط يتراوح بين 7 و 24 ملم مماثلة للزيت الأساسي خاص بالبرتقال مع قطر تثبيط يتراوح بين 7 و 23 ملم و أظهرت الزيوت الأساسية المخففة قطر تثبيط ضعيف. من بين جميع البكتيريا التي تم اختبارها *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* كانوا الأكثر حساسية .

حددت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية للحمضيات بتأثيراتها البكتريولوجية أو المثبطة في دراستنا النيترونية ، ويقودنا إلى الاستنتاج بأنها سواء كانت نقية أو مخففة تمثل بدائل ممتازة للمضادات الحيوية الاصطناعية للسيطرة على الإصابات البكتيرية التي يسببها. مما يسمح لنا بمعالجة مشاكل مقاومة المضادات الحيوية والآثار الجانبية المأساوية للاستهلاك المفرط للمضادات الحيوية الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية مضاد الميكروبات *Citrus limonum*, *Citrus Sinensis*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les caractéristiques de la variété Eureka	5
Tableau 2 : Composition biochimique pour 100g de fruit frais du citron.....	6
Tableau 3 : Les principales caractéristiques de la variété Washington navel.	9
Tableau 4 : Composition biochimique pour 100g de fruit frais du orange douce.....	10
Tableau 5 : Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de Citrus limonum.	17
Tableau 6 : Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de citrus sinensis.	18
Tableau 7 : Rendement en huile essentielle de Citrus.....	39
Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité des souches a l'amoxicilline/acide clavulanique marqué par les zones d'inhibition.....	41
Tableau 9 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité des souches cibles à l'ampicilline marquée par des zones d'inhibitions.....	42
Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Montrant la sensibilité des souches a l'HE <i>C.limonum</i> marquéé par des zones d'inhibition	44
Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm).marquées par la sensibilité des souches à l'HE <i>C.sinensis</i> marquéé par des zones d'inhibition	45
Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant par la sensibilité de <i>E.coli</i> aux HEs pures et diluées à 50% des citrus aux antibiotiques d référence	47
Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marqué par la sensibilité de <i>Ps. Aeruginosa</i> aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de référence.....	48
Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité de <i>S.aureus</i> aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de références.	50
Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marqué par la sensibilité des différentes souches étudiées aux HEs <i>C.limonum</i> et <i>C.sinensis</i> pures et diluées à 50%.....	51

Liste des figures

Figure 1 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit de <i>Citrus limonum</i>	4
Figure 2 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit d'oranger.	7
Figure 3 : Poches sécrétrices des huiles essentielles des Citrus	14
Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.	21
Figure 5 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur d'eau	22
Figure 6 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	26
Figure 7 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de pétri	27
Figure 8 : Illustration de la méthode de micro-atmosphères.	28
Figure 9 : les feuilles de <i>citrus limonum</i> (Eureka)	32
Figure 10 : les feuilles de <i>citrus sinensis</i> (Washington navel)	33
Figure 11 : Les souches bactériennes pures.	35
Figure 12 : Dispositif d'extraction des HEs par hydrodistillation.....	34
Figure 13 : Coloration de Gram observation microscopie (X 100).....	40
Figure 14 : Coloration de Gram observation microscopie (X 100) de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figure 15 : sensibilité des souches à l'amoxicilline\acide clavulanique marquée par les zones d'inhibition.	41
Figure 16 : sensibilité des souches cibles à l'ampicilline marquée par des zones d'inhibitions.	42
Figure 17 : sensibilité des souches à l'HE de <i>C. limonum</i> marquée par des zones d'inhibitions	43
Figure 18 : sensibilité des souches à l'HE de <i>C. sinensis</i> marquée par les zones d'inhibitions.	45
Figure 19 : la sensibilité d' <i>E. Coli</i> aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et.....	46
Figure 20 : la sensibilité de <i>Ps. Aeruginosa</i> aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions.....	48
Figure 21 : la sensibilité de <i>S.aureus</i> aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions.....	50
Figure 22 : Comparaison des effets antibactériens des différents huiles essentielles pures et diluées a l'effet des antibiotiques de référence sur les souches étudiées	52

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de normalisation

ISO : International standard organisation

C.limonum: *citrus limonum*

C.sinensis: *citrus sinensis*

Dm: dilution mère

HE : huile essentielle

MH: Müller Hinton

DMSO: diméthylesulfoxyde

UL : Microlitre

Dm : dilution mère

E.coli: *Escherichia coli*

Ps.aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

Sommaire :

Remerciements.....	i
Dédicace.....	ii
Résumé.....	iv
Liste des tableaux et des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Sommaire.....	x
Introduction générale.....	1

Chapitre I : Généralités sur le *citrus limonum* et le *citrus sinensis*

1.1 Généralités sur les agrumes.....	2
1.2 Généralité sur le citronner : <i>Citrus limonum</i>	3
1.2.1 Historique.....	3
1.2.2 Définition.....	3
1.2.3 Description botanique.....	3
1.2.4 Systématique.....	4
1.2.5 Variété de citron.....	4
1.2.6 Production Algérienne du citron.....	5
1.2.7 Compositions chimique et propriétés de citron.....	5
1.2.8 Usage de citron.....	6
1.3 Généralité sur l'oranger : <i>Citrus sinensis</i> (Orange douce).....	7
1.3.1 Historique.....	7
1.3.2 Description botanique.....	7
1.3.3 Systématique.....	8
1.3.4 Les différentes variétés de <i>Citrus sinensis</i>	8
1.3.5 Principales caractéristiques de l'oranger : <i>Citrus sinensis</i> var. Washington navel.....	9
1.3.6 Compositions chimique et propriétés de <i>citrus sinensis</i>	9
1.3.7 Production Algérienne de l'orange.....	10

Chapitre II : Les huiles essentielles

2.1 Historique.....	11
2.2 Définition.....	11
2.3 Propriétés physico-chimiques des HEs.....	12
2.3.1 Propriétés chimiques.....	12
2.3.2 Propriétés physiques.....	12
2.4 Rôle physiologique.....	12
2.5 Répartition et localisation.....	13
2.5.1 Répartition.....	13
2.5.2 Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de <i>Citrus</i>	13
2.6 Composition chimiques des huiles essentielles.....	14
2.6.1 Les terpènes.....	14
2.6.2 Les composés aromatiques :.....	15
2.6.3 Les composés d'origines diverses.....	15
2.6.4 Notion de chémotype :.....	15
2.7 Biosynthèse aromatique.....	16
2.7.1 Voie des terpènes.....	16

2.7.2	<i>La voie du phénylpropane</i>	16
2.8	Huiles essentielles de citron	17
2.9	Huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	17
2.10	Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles	18
2.11	Toxicité des huiles essentielles	19
2.12	Domaines d'application des huiles essentielles	19
2.13	Conservation des huiles essentielles	19
2.14	Extraction des huiles essentielles	20
2.14.1	<i>Hydrodistillation</i>	20
2.14.2	<i>La distillation par entraînement à la vapeur d'eau</i> :	21
2.14.3	<i>Expression à froid</i>	22
2.15	Méthodes de caractérisation des huiles essentielles	22
2.16	Activités biologiques des huiles essentielles	23
2.16.1	<i>Activité antioxydant des huiles essentielles</i>	23
2.16.2	<i>Activités anti-inflammatoires</i>	23
2.16.3	<i>Activité antiseptique</i>	24
2.16.4	<i>Activité pesticide</i>	24
2.16.5	<i>Activité antifongique</i>	24
2.16.6	<i>Activité antimicrobienne</i>	24
2.17	Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries	25
2.18	Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	26
2.18.1	<i>Aromatogramme (méthode de Vincent)</i>	26
2.18.2	<i>Méthode de micro-atmosphère</i>	27

Chapitre III : Les microorganismes

3	Les micro-organismes commensaux	29
3.1	Les bactéries	29
3.2	<i>Escherichia coli</i>	29
3.2.1	<i>Classification scientifique</i>	29
3.2.2	<i>Pathogénicité</i>	29
3.3	Staphylocoques	30
3.3.1	<i>Classification de Bergey (1994)</i>	30
3.3.2	<i>Pathogénicité</i>	30
3.4	<i>Pseudomonas</i>	30
3.4.1	<i>Pathogénicité</i>	31

Chapitre IV : Matériels et méthodes

4	Matériels et méthodes	32
4.1	Matériels	32
4.1.1	<i>la matière végétale</i>	32
4.1.2	<i>Les souches étudiées</i>	33
4.2	Méthodes	34
4.2.1	<i>Traitement de la matière végétale</i>	34
4.2.1.1	Méthode d'extraction des HEs	34
4.2.1.2	Détermination du rendement d'extraction	35
4.2.1.3	Méthode de dilution	35
4.2.2	<i>Souches bactériennes</i>	36
4.2.2.1	Identification des souches pures	36

4.2.2.2	Vérification de la sensibilité des souches cibles de notre étude aux antibiotiques de références	36
4.2.2.3	Préparation de l'inoculum	36
a-	Préparation de pré-culture	36
b-	Préparation de la suspension bactérienne	37
4.2.2.4	Choix et réalisation de l'antibiogramme	37
a-	Ensemencement	37
b-	Préparation des disques	38
c-	Incubation	38
d-	Lecture des résultats	38
e-	analyses statistique	38

Chapitre V : Résultats et discussions

5.1	Détermination du rendement d'extraction	39
5.2	Identification des souches	39
5.3	Evaluation de la sensibilité des souches bactériennes étudiées	41
5.3.1	<i>Vérification de la sensibilité des souches étudiées aux antibiotiques de références</i>	41
5.3.1.1	La sensibilité à l'amoxicilline /acide clavulanique	41
5.3.1.2	La sensibilité à l'ampicilline :	42
5.3.2	<i>Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de C.limonum et C.sinensis</i>	43
5.3.2.1	Activité antibactérienne des huiles essentielles pures de C.limonum et C.sinensis	43
a-	Effet antibactérien de l'HE pure de <i>C.limonum</i>	43
b-	Effet antibactérien de l'HE pure de <i>C.sinensis</i>	44
5.3.2.2	Comparaison des effets antibactériens des HES pures et diluées aux effets des antibiotiques de références	46
a-	Etude comparatif entre les effets des HES étudiés pures et diluées sur <i>E. Coli</i> et les antibiotiques de références	46
b-	Etude comparatif des effets des HES étudiés pures et diluées sur <i>Ps.aeruginosa</i>	47
c-	Etude comparatif des effets des HSs étudiés pures et diluées sur <i>S.aureus</i>	49
5.4	Discussion générale	51
5.5	Conclusion générale	54
6	Références bibliographiques	55

Introduction générale

Introduction générale

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme. La montée des résistances est due à la prescription immodérée et souvent inappropriée des antibiotiques. Administrés à titre curatif ou préventif, les antibiotiques favorisent l'élimination des bactéries sensibles et la sélection des plus résistantes. Des bactéries résistantes aux diverses classes d'antibiotiques disponibles sur le marché ont, en effet, été identifiées. De nombreuses souches de staphylocoques (*Staphylococcus aureus*) sont devenues résistantes et insensibles à plusieurs antibiotiques, utilisés longtemps comme le médicament du dernier recours. La prolifération de bactéries résistantes est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par les bactéries résistantes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour, finalement, conduire à une impasse thérapeutique. Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, d'une part et les effets secondaires de l'antibiothérapie découverts à la longue, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives. Le but de notre travail a été de tester et d'estimer l'effet antibactérien des huiles essentielles des citrus à activité antibactérienne et de rechercher, dans le réservoir de molécules chimiques qu'elles constituent, des composés susceptibles d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes, afin de les utiliser comme alternatifs aux antibiotiques de référence largement utilisés comme traitement contre différentes infections microbiennes.

Chapitre I :

Généralités sur le *citrus*

limonum et le *citrus sinensis*

1.1. Généralités sur les agrumes

L'origine des agrumes est : Asie du Sud-est, malgré le développement possible de leur culture en Chine [1]. Il est difficile de localiser le centre de provenance des agrumes car il existe une hybridation naturelle interspécifique et intergénérique très répandue dans cette catégorie, créant des variétés que Tanaka nomme des composants secondaires qui se multiplient par graines. Grâce à des civilisations comme celle de la Chine au 1er millénaire avant J.-C., la production d'agrumes a été progressivement importée dans les régions voisines : le sud du Japon et l'archipel malaisien [2].

La zone de la Méditerranée a connu de cette culture seulement au 7ème siècle avant notre ère. Les agrumes de Medina sont les débuts de la mise en culture sous le nom de pomme de Medina. Cependant, ce n'est que vers l'an 1400, longtemps plus tard que le voyage de Marco Polo vers la Chine en 1287, et après que les Portugais ont présenté l'oranger en Méditerranée [1].

Les agrumes sont de petits arbres ou arbustes, dont la hauteur peut atteindre 5 à 15 m, parfois épineux, possédant un feuillage dense et persistant, à part pour quelques variétés hybrides qui possèdent des feuilles à pétales caduques ou semi-persistantes. Les feuilles sont en principe de couleur vert très foncé, les plantules et les jeunes pousses étant d'un vert beaucoup plus clair. Le fruit est constitué de segments et contient les semences [3].

Les grands agrumes cultivés pour la production de fruits sont : l'oranger, le mandarinier, le clémentinier, le citronnier et le pomelo moussé. Le concept de culture générale d'orangerie ne concerne pas uniquement les plantations d'orangers mais également, par extension, toute autre plantation d'agrumes qui constitue le jardin d'agrumes [4].

La position systématique des agrumes est comme suite [5] :

- **Règne** : *Végétal*
- **Embranchement** : *Spermaphytes*
- **Sous-embranchement** : *Angiospermes*
- **Classe** : *Eudicotylédones*
- **Ordre** : *Rutales*
- **Sous-classe** : *Rosidées*
- **Famille** : *Rutaceae*
- **Genres** : *Poncirus, Fortunella, et Citrus*

1.2. Généralité sur le citronner : *Citrus limonum***1.2.1. Historique**

L'origine du citronnier est restée longtemps inconnue, en raison de son polymorphisme et de sa diversité inter-variétale. Les chercheurs ont localisé son ancêtre sauvage dans la région d'Assam, la région d'Indo-Birmanie ou en Chine. Des recherches phylogénétiques réalisées en 2000 ont montré qu'il était originaire de la Méditerranée et qu'il était un hybride entre l'oranger amer et le cédrat vers le 5^e millénaire avant JC [6].

À l'origine, le citronnier était utilisé comme plante ornementale dans les jardins d'agrément au Moyen Âge, surtout dans les jardins islamiques [7]. Le citronnier a progressivement été introduit dans l'alimentation médiévale où il était utilisé comme base acide pour les crudités ou pour assaisonner tout aliment au même titre que le verjus, le vinaigre ou le jus d'orange. Mais il est possible qu'il ait été utilisé comme une technique de conservation de la viande par l'acide depuis l'antiquité [8].

1.2.2. Définition

Le citron est le fruit du citronnier (*Citrus limonum*), c'est un agrume appartenant à la famille de la famille des Rutacées. Ce dernier est un arbuste originaire d'Asie du Sud-est, qui est cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du monde au climat semi-tropical [9]. Cette plante est l'un des agrumes les plus vigoureux, de croissance rapide, elle produit de nombreuses ramifications et des fruits en quantité abondante. La fécondation hivernale est plus importante et représente de 60 à 70 % de la production annuelle de l'arbre [10].

1.2.3. Description botanique

Citrus limonum est un arbuste à feuilles persistantes de 2 à 7 m de haut (Figure 1), aux branches plus ou moins protégées par des épines courtes, épaisses et rigides [11, 12] :

- **Les feuilles** : sont persistantes et alternatives, vert profond et luisantes, de taille très variable de 5 à 10 cm, Le limbe est de couleur verte.
- **Les fleurs** : isolé ou fasciculé, de couleur blanches et odorantes, L'androcée est formé de 20 à 40 étamines.
- **Les fruits** : sont juteuses et très parfumées, de forme ovale (7-12 cm) de long et (5-7 cm) de diamètre.

- **Le système racinaire :** est localisé dans les 100 premiers cm de profondeur. Il fixe solidement l'arbre au sol en se développant jusqu'à 1 ou 2 m de fond.

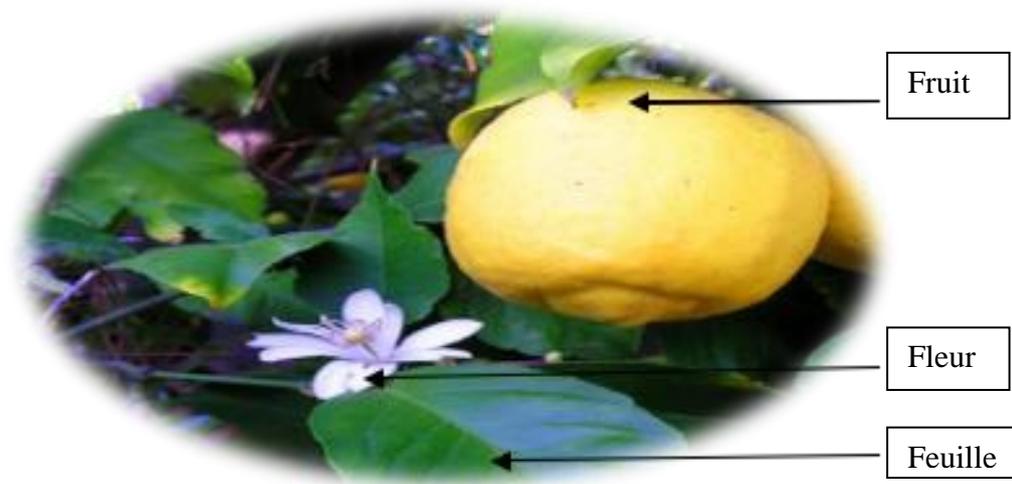


Figure 1 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit de *Citrus limonum* (11).

1.2.4. Systématique

Le citron jaune est classé comme suit [13] :

- **Embranchement :** *Spermaphytes*
- **Sous embranchement :** *Angiospermes*
- **Classe :** *Dicotylédones*
- **Ordre :** *Sapindales*
- **Famille :** *Rutaceae*
- **Genre :** *Citrus*
- **Espèce :** *Citrus limonum* (Variété : *Eureka*)

1.2.5. Variété de citron

Les principales variétés méditerranéennes cultivées du citronnier sont : "*Verna*", "*Eureka*", "*Lisbon*", "*Monachello*", "*Interdonato*" et "*Lunaris*"[14] . Ces variétés sont choisies pour leur intérêt commercial : productivité, teneur en jus, possibilité d'être cueillies toute l'année, en effet le citron est un agrume principalement mûri en hiver mais apprécié en été.

- **variété Eureka (4 saison) :** Cette variété est importée en Algérie dans les années 40 en provenance de Californie (Tableau 1) .C'est la plus cultivée en raison de sa

fructification rapide et de sa floraison très remontante qui permet la production de fruits au printemps et en été [15].

Tableau 1 : Les caractéristiques de la variété Eureka [16].

Espèce	Variété	Caractéristiques
<i>Citrus Limonum</i>	Eureka	<p>Ecorce : un peu rugueuse tournant au jaune vif.</p> <p>Fruits très abondante qui produit au printemps et en été.</p> <p>Pulpe : fournit un jus clair, acide et bien parfumé.</p> <p>Floraison : Fleurs très abondantes, blanc rosé et très odorantes.</p>

1.2.6. Production Algérienne du citron

En Algérie, la culture des agrumes représente un secteur stratégique. Selon les plus récentes statistiques[17], la culture des agrumes occupe aujourd'hui une superficie totale de 64 323 ha, avait une superficie de 4 365 Ha pour la culture du citron, la production réalisée durant la saison 2011-2012 est de 760 823 tonnes [18].

1.2.7. Compositions chimique et propriétés de citron

Le citron est un agrume très juteux et riche en eau (90%), très acide (pH inférieur à 3). Cette acidité est causée principalement par l'acide citrique, associé à de petites quantités d'acides malique, ascorbique, caféique et férulique [19]. Le fruit a une teneur élevée en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et de vitamines du groupe B (Tableau 2) avec des quantités élevées de flavonoïdes, de polyphénols, de caroténoïdes, et d'huiles essentielles [20].

Tableau 2 : Composition biochimique pour 100g de fruit frais du citron [21].

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

1.2.8. Usage de citron

Le citron a un grand usage en raison de sa composition :

- Utilisation culinaire : le citron zesté ou bien râpé fournit sa propre et agréable saveur qui est très utile en cuisine et en pâtisserie. Le jus de citron peut aussi être employé pour faire des cocktails rafraîchissants.
- Dans le domaine cosmétique, le citron est notamment un excellent moyen de resserrer les pores, de rendre la peau plus claire, de faire disparaître les points noirs, et il est très utile en tant que masque contre les rides ou pour rendre les cheveux plus brillants. Il est aussi présent dans la composition de plusieurs types de parfums [22].
- En plus de ça, sa teneur en flavonoïdes, en ce qui concerne notamment la flavanone, lui confère des activités bénéfiques en tant qu'agent qui protège contre les risques de cancer et les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et allergiques [23].
- Le citron est consommé par les femmes enceintes pour réduire les nausées et les vomissements [24].

1.3. Généralité sur l'oranger : *Citrus sinensis* (Orange douce)**1.3.1. Historique**

L'oranger (*Citrus sinensis*) est un arbre qui est originaire de la Chine. Il existe deux voies principales par lesquelles ce fruit a pénétré en Europe. La voie méditerranéenne a été empruntée par l'orange amère ou bigarade à l'époque des croisades (XIe au XVIIIe siècle) : transféré par les Perses aux Arabes, ce fruit a ainsi été planté en Andalousie, en Sicile et dans le Pays valencien, d'où il s'est largement répandu dans le reste de l'Europe. Dans un deuxième temps, à la fin du XVe siècle, les explorateurs du Portugal ont découvert l'orange douce en Chine et à Ceylan et l'ont ramenée en Europe [25].

1.3.2. Description botanique

L'oranger est un petit arbre ou arbuste, qui peut mesurer de 10 à 15 m de haut (Figure 2), L'arbre a de nombreux rameaux, ce qui forme une cime touffue [26] :

- **Feuilles** : sont toujours vert foncé et légèrement ailées.
- **Fleur** : la partie blanche de la fleur est printanière et possède un parfum agréable.
- **Fruit** : il est largement connu, très répandu dans les marchés quasiment toute l'année ; le fruit est de taille et de coloration différentes pour chaque variété, mais globalement de forme sphérique et de couleur orange, et très populaire en frais et en jus.

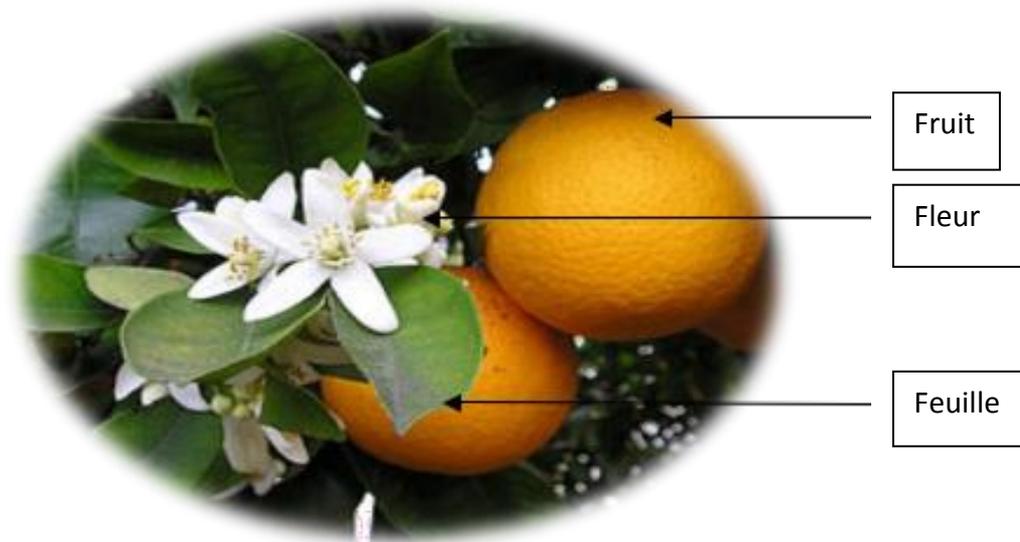


Figure 2 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit d'oranger [11].

1.3.3. Systématique

La classification botanique de l'oranger [27] :

- **Règne** : *plantae*
- **Embranchement** : *Spermaphytes*
- **Sous embranchement** : *Angiospermes*
- **Classe** : *Dicotylédones*
- **Ordre** : *Sapindales*
- **Famille** : *Rutaceae*
- **Genre** : *Citrus*
- **Espèce** : *Citrus sinensis. L (Var. Washington navel)*

1.3.4. Les différentes variétés de *Citrus sinensis* [28]

Les oranges douces pour la consommation sont les plus comestibles et elles sont utilisées "en fruit" et pour la préparation de jus. Il a trois catégories d'oranges :

- **Orange Navel** : un ombilic bien visible, légèrement juteux, pas trop sucré et sans pépins (*Washington Navel, Tompson, Autumn gold*)
- **Orange blonde** : orange juteuse à peau très mince, de taille modérée, sans pépins, très juteuse et très odorante (*Ambersweet, Berna, Cadenera*)
- **Orange sanguine** : orange juteuse, à la peau et à la couleur de la chair plus ou moins rouges et violettes, elle est très juteuse, peu acide avec une flaveur un peu musquée. (*Caracara panachée, Maltaise sanguine*)

1.3.5. Principales caractéristiques de l'oranger : *Citrus sinensis var. Washington navel*

La *Washington navel* est la variété la plus cultivée et la plus en demande par les clients pour sa maturité (Tableau 3). Elle est cueillie de novembre jusqu'à février et bénéficie d'un grand pouvoir d'exportation [26].

Tableau 3 : Les principales caractéristiques de la variété Washington navel [16].

Espèce	Variété	Caractéristiques
<i>Citrus sinensis</i>	Washington Navel	<ul style="list-style-type: none"> - Le port de l'arbre en pépinière est retombant. - La feuille de plus de six mois possède une coloration vert foncé et les nouvelles pousses ont une coloration plus claire. - La feuille a à peu près 10 à 12 cm de long. - La large feuille fait de 3 à 7 cm. - L'extrémité du limbe est douce (un peu arrondie). - A son aisselle, une épine apparaît et disparaît en vieillissant. - Le pétiole fait une longueur d'environ 20 mm et possède une bractée pas très étendue, mais visible.

1.3.6. Compositions chimique et propriétés de *Citrus sinensis*

Citrus sinensis est un agrume très juteux et riche en eau (85%) très acide (pH inférieur à 4) Son acidité légère est liée à la présence d'acides organiques naturels (acide citrique et acide malique notamment) Sa valeur énergétique est moyenne et repose essentiellement sur ses glucides (saccharose, fructose, glucose), Le fruit est riche en glucides, et en acides organiques, acides aminés, minéraux, vitamines et lipides pour 21% (Tableau 4). Les trois cent qui restent sont représentés par un de nombreux composés divers, incluant des flavonoïdes, des composés volatils, des caroténoïdes tels que l'â carotène (précurseur de la vitamine A), qui ont une très forte influence sur les caractéristiques organoleptiques de ce produit [29].

Tableau 4 : Composition biochimique pour 100g de fruit frais du orange douce [30].

Energie (kcal)	39
Eau (g)	87-92
Glucides (g)	10-12
Protéines (g)	0.58-1.29
Lipides (g)	0.0-0.56
Flavonoïdes (mg)	14.7
Vitamine C (mg)	50
B-carotène (mg)	0.04-0.37
Niacine (vitamine B3) (mg)	0.13 - 0.46

1.3.7. Production Algérienne de l'orange

La zone d'agrumes était étalée sur 63.323 ha en 2011, Actuellement, sur 63.323 ha, on ne compte que 55.000 ha de superficie productive. Le fait que le centre du pays a 56% de cette superficie d'agrumes, 30% sont situés à l'est du pays, et 14% à l'ouest assure que les meilleures pratiques employées dans les vergers par les anciens de notre pays dans le passé. En plus, le goût des oranges algériennes est fortement apprécié, souligne-t-il. La production nationale permet aussi une consommation très importante de clémentine en Algérie [31].

Chapitre II :

Les huiles essentielles

2.1. Historique

Les hommes depuis l'antiquité ont cherché le procédé pour dissocier les éléments huileux des substances aromatiques. Ils y sont finalement arrivés en exposant la matière à une chaleur élevée : les substances aromatiques se sont transformées en vapeur et ont été récupérées et rendues à l'état liquide en les refroidissant.

Les Chinois et les Indiens ont utilisé ce procédé depuis 20 siècles avant J.C. Les Égyptiens et les Arabes ont valorisé les caractéristiques médicinales et aromatiques des plantes pour : la conservation des momies, l'aromatisation des bains, la désinfection des plaies avec les onguents, les parfums et la fabrication de boissons aromatiques et la fabrication de boissons aromatiques [32].

L'étape de la civilisation byzantine permet d'établir les bases de la distillation et, avec la civilisation arabe, l'huile essentielle fait partie des principaux produits de la commercialisation internationale. Le médecin et scientifique perse Avicenne a précisément défini, vers l'an 1000, le processus de distillation à la vapeur. L'Iran et la Syrie sont devenus les deux principaux pôles de développement de différents principes d'extraits aromatiques [33].

En 1928, le concept d'aromathérapie est créé par René-Maurice Gattefossé et il effectue de plusieurs recherches dans le domaine des huiles essentielles, particulièrement sur leurs caractéristiques, ces découvertes seront à la base de la réalisation de nombreuses autres recherches [34].

2.2. Définition

Selon la pharmacopée française, une huile essentielle est "un produit odorant, de composition en général complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par distillation à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est en général séparée de la phase aqueuse par un procédé physique qui n'entraîne pas de modification significative de la composition [35].

Le mot "huile" souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le mot "essentiel" désigne la spécificité principale de la plante à travers ses exhalaisons [36].

Les huiles essentielles sont uniquement composées de molécules aromatiques volatiles. Leur poids moléculaire est très faible, sont complètement solubles dans l'alcool et les huiles (végétales ou minérales) mais insolubles dans l'eau, ces substances sont dépourvues de matières grasses : au contraire d'une huile végétale, une goutte déposée sur un papier s'évapore sans aucune trace [37].

Le terme d'huile essentielle a été inventé au 16ème siècle par le réformateur suisse de la

Médecine, Paracelsus von Hohenheim qui a appelé le composant efficace *essentia de Quinta De droga* [38].

2.3. Propriétés physico-chimiques des HEs

2.3.1. Propriétés chimiques

Les huiles essentielles forment des combinaisons compliquées et très variables de substances caractérisés par des origines biogénétiques diverses et qui forment deux groupes : le groupe des terpénoïdes, d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, d'autre part [39].

2.3.2. Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont :

- Liquides à température ambiante.
- volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes
- Très rarement colorées
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (sauf les huiles essentielles de Sassafras, de girofle ou de cannelle qui constituent des exceptions)
- Elles ont un indice de réfraction élevé
- Solubles dans les solvants organiques usuels
- Entraînables à la vapeur d'eau
- très peu solubles dans l'eau
- Sensibles à l'altération, elles ont tendance à se polymériser pour former des produits Résineux [40].

2.4. Rôle physiologique

De nombreuses plantes synthétisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires. Elles ne sont pas nécessaires à la croissance des plantes [41].

Dernièrement, des études ont indiqué que chez les plantes, les huiles essentielles ont pour rôle d'attirer les insectes pollinisateurs ou de repousser les insectes nuisibles. Un certain nombre ont également des vertus antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides [42].

2.5. Répartition et localisation**2.5.1. Répartition**

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées, Poacées. On les trouve dans les sommités fleuries (lavande, menthe...), et dans les racines ou les rhizomes (vétiver, gingembre), dans l'écorce (cannelle), le bois (camphre), les fruits (poivre), les graines (noix de muscade)...[43].

2.5.2. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de Citrus

Les Citrus sont caractérisés par la présence, dans les feuilles, les fleurs, les tiges et les péricarpes des fruits, de poches schizolysogènes qui contiennent de l'essence aromatique. Il s'agit de poches dont la structure initiale est identique à celle des poches schizogénèse, mais en plus des cloisons radicales, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisons tangentielles, ce qui donne lieu à plusieurs couches de cellules sécrétrices [44]. Dans les fleurs des plantes du genre Citrus, les poches sécrétoires sont placées dans le parenchyme des pétales, en dessous de l'épiderme. Le fruit du citronnier est composé de l'épicarpe, de l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier inclut l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée qui contient les poches schizolysogènes qui sont distribuées de façon très irrégulière (Figure 3) [45].

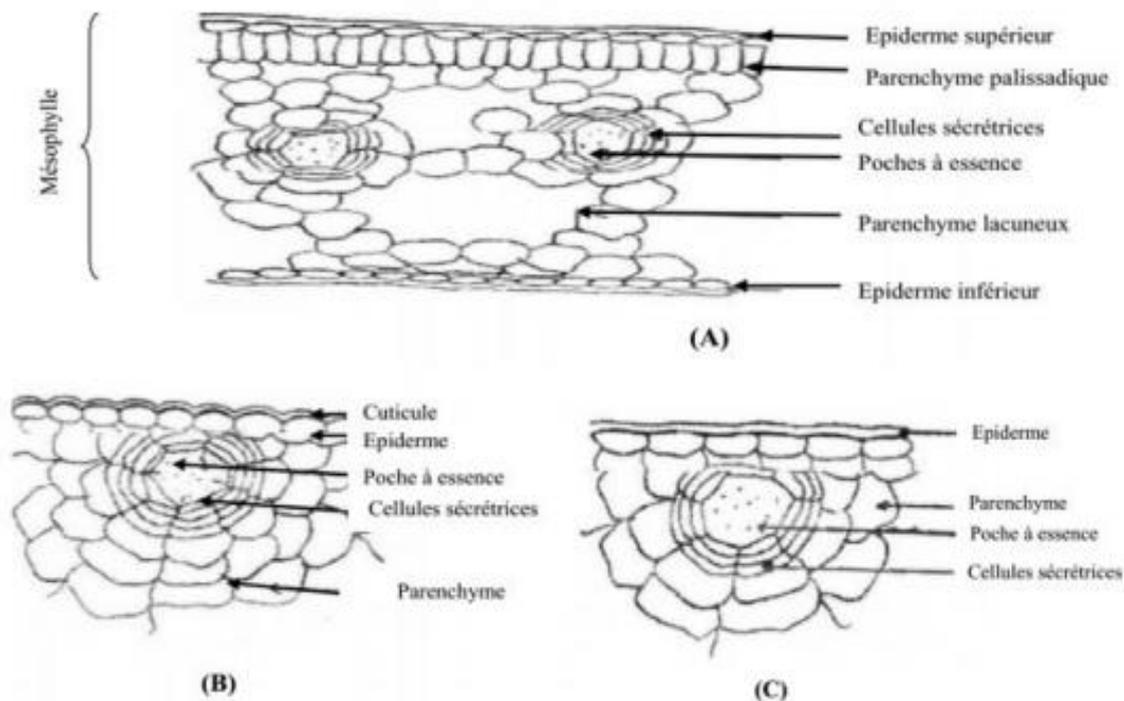


Figure 3 : Poches sécrétrices des huiles essentielles des Citrus: (A) dans feuilles, (B) dans les flavédo, (C) dans les pétales [45].

2.6. Composition chimiques des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles montre qu'elles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : Les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [46].

Les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges de plus de 200 composés qui se regroupent en deux fractions : les non-volatiles (1-15%) et les volatiles (85-99%) [47].

La partie non volatile des huiles d'agrumes est composée de flavonoïdes et qui sont utilisés dans la différenciation des espèces d'agrumes [48].

2.6.1. Les terpènes

Dans le cas des huiles essentielles, seulement les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux de faible poids moléculaire, sont observés. Ils correspondent le plus souvent à la formule générale $(C_5H_8)_n$ [46].

Sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, Ils sont sous-divisés en fonctions du nombre d'entités isopréniques en monoterpènes formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), diterpènes, sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$),

diterpènes, formés de quatre isoprènes (C₂₀H₃₂). Les tétraterpènes sont formés de huit isoprènes qui donnent des caroténoïdes. Les polyterpènes (C₅H₈)_n ou *n* peuvent être 9 à 30 [49].

L'association de terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, etc.) forment Les terpénoïdes, 90% de la totalité des composants des HE sont des monoterpènes, ils pouvant être acycliques (myrcène, oxymène), monocycliques ; un certain nombre de ces substances ont une fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone, β- vétonone) et esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate d'α- terpinyle) [49,50].

2.6.2. Les composés aromatiques :

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle [51].

2.6.3. Les composés d'origines diverses

Du par leur méthode d'extraction, les HEs ont la possibilité de contenir divers composés aliphatiques, présentant en général un faible poids moléculaire, qui sont entraînés en cours de traitement par hydrodistillation. Ces derniers peuvent être azotés ou sulfureux [46].

2.6.4. Notion de chémotype :

Est une référence de précision qui désigne le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'HE. C'est lui qui permet de distinguer les HE extraites d'une même diversité botanique mais dont la composition biochimique est différente. Cette classification permet de sélectionner les HE pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Il est important de noter que les HE de différents chémotype présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables [51].

Chémotype de l'huile essentielle de citrus limonum peuvent être : β-pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, citronellal. Et pour citrus sinensis : D- limonène, géraniol, linalol, citral, citronellal, terpinéol et décanal [52].

2.7. Biosynthèse aromatique

La biosynthèse des huiles essentielles au niveau de la plante démarre par la photosynthèse (métabolite primaire), ce phénomène est un mécanisme de transformation qui permet aux végétaux d'utiliser l'énergie solaire pour la fabrication de sucres et de différentes substances organiques. À ces sucres, les plantes aromatiques valorisent des molécules spécifiques par deux voies principales [53,54].

2.7.1. Voie des terpènes

La Voie des Terpènes conduit à la synthèse des monoterpènes (C₁₀H₁₆), des sesquiterpènes (C₁₅H₂₄), et des diterpènes (C₂₀H₃₂). La synthèse au niveau de ces terpènes est réalisée grâce à l'IPP (isopentényl pyrophosphate en C₅), qui est issu de la voie du mévalonate. Ensuite, les réactions d'oxydoréduction produisent également des autres composés tels que les monoterpénols, les phénols, les aldéhydes, les cétones... etc. fournissant des caractéristiques chimiques spécifiques [54, 55].

2.7.2. La voie du phénylpropane

Cette voie est déterminée par des mécanismes d'oxydation et elle démarre à partir d'un acide aminé : la phénylalanine qui est obtenue par la voie du shikimate. L'acide shikimique est obtenu par la voie de la condensation d'une unité de phosphoénolpyruvate (PEP) (glycolyse) et par une unité érythrose-phosphate, le shikimate est un précurseur fondamental qui permet d'initier la synthèse de multiples métabolites secondaires au niveau des plantes et des microorganismes [53, 54].

La phénylalanine conduit à la production de nombreux composés d'HEs, des phénols, acides ou coumarines. On retrouve plus rarement des molécules telles que des lactones ou des éthers méthyliques de phénols [54].

La phénylalanine conduit à la production de nombreux composés d'HEs, des phénols, acides ou coumarines. On retrouve plus rarement des molécules telles que des lactones ou des éthers méthyliques de phénols. Après leur synthèse, ces métabolites seront libérés par des cellules sécrétrices constituant des structures histologiques spécifiques. Ces structures joueront le rôle de zones de production et de stockage des substances aromatiques sécrétées in vivo par les plantes, Ces substances sont nommées essences.

Ces différentes structures sont différentes selon l'organe qui produit et l'espèce végétale [53].

2.8. Huiles essentielles de citron

Les Spécificités biochimiques et les caractéristiques de l'huile essentielle de *Citrus limonum* sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de *Citrus limonum* [54].

Huile essentielle de <i>Citrus limonum</i>		
Spécificités biochimiques	Limonène	72 à 80%
	β-pinène	7 à 13%
	γ-terpinène	6 à 10%
	Linalol	0, 2%
	Géranol	0, 1%
	Aldéhydes	2 à 3 %
	Sesquiterpènes	2 à 5 %
Caractéristiques	Pouvoir rotatoire à 20°C	+55° à +75°
	Densité à 20°C	0,845 à 0,858
	Indice de réfraction	1,470 à 1,480
	Point éclair	+49° C

2.9. Huile essentielle de *Citrus sinensis*

Les Spécificités biochimiques et les caractéristiques de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* [56].

Huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>		
Spécificités biochimiques	Limonène	83 à 90%
	Myrcène	5%
	Citral	0,5%
	Linalol	1%
	Géranol	0, 1%
	Farnésol	0, 1%
	Monoterpénols	2 à 6%
	Cétones (Carvone)	2 à 3%
	Aldéhydes terpéniques	1 à 3%
Caractéristiques	Pouvoir rotatoire à 20°C	+94° à +99°
	Densité à 20°C	0,842 à 0,850
	Indice de réfraction	1,470 à 1,476
	Point éclair	+49° C

2.10. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au niveau du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut être expliquée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité de la plante concernée, voire au moment de la récolte dans la journée [57]. Les conditions extérieures qu'elles soient géographiques (latitude, altitude), édaphiques (type de sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des espèces [58]. Les conditions de culture telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'utilisation de fertilisants et les techniques de récolte influencent également la composition et le rendement des huiles essentielles [59].

2.11. Toxicité des huiles essentielles

Malgré leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La plupart des huiles essentielles, à très haute dose, ont des effets toxiques [60]. En raison de la richesse de leur composition chimique, les huiles essentielles sont à utiliser avec une extrême prudence, car elles peuvent présenter de très graves dangers si elles sont utilisées seules au hasard, d'autant plus que le consommateur est attiré par la facilité d'utilisation de ces essences pour une absorption interne ou une application externe [61].

Les huiles essentielles d'agrumes sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photosensibilisantes. Elles causent une décoloration de la peau en rouge en application externe avec des expositions au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. En revanche, la consommation d'huiles essentielles de Citrus limon extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique [62].

2.12. Domaines d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont utilisées dans 4 principaux secteurs industriels : la parfumerie cosmétique, la parfumerie technique (savons, détergents), l'alimentation et la médecine (médecine alternative et pharmaceutique) [63]. L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour améliorer le goût, la saveur et la couleur des aliments [63]. L'industrie des boissons gazeuses est un utilisateur principal d'huiles essentielles [63].

Les huiles essentielles ont des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme conservateurs naturels des aliments. Leur usage comme conservateurs est dû à la présence de composés ayant des caractéristiques antimicrobiennes et antioxydants [65, 66]. L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est l'huile d'orange [63].

Les huiles essentielles de *Citrus limonum* sont utilisées dans la production d'arômes alimentaires, d'essences de fruits, de boissons gazeuses, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries [67]. Dernièrement, plusieurs études ont indiqué la possibilité d'incorporer les huiles essentielles de *Citrus limonum* comme antioxydant [68].

2.13. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées et préservées pour plusieurs années. Elles sont même susceptibles de s'améliorer avec le temps (à part des huiles essentielles extraites des écorces d'agrumes qui ne peuvent être conservées plus de 2 ans).

Il est conseillé de les conserver dans des flacons en verre teinté, pour les protéger de la lumière, il faut aussi éviter les fortes variations de température et le contact avec l'air, il faut bien reboucher les flacons après usage car les arômes se volatilisent dans l'atmosphère. Conserver les bouteilles non accessibles aux enfants. Les bouteilles sont à entreposer en position verticale et horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile. Dans ces conditions, les huiles essentielles peuvent être conservées pendant plusieurs [69].

2.14. Extraction des huiles essentielles

Avant que ces substances puissent être utilisées ou analysées, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Différentes méthodes d'extraction ont été développées, telles que les méthodes conventionnelles (distillation et pression à froid) et les méthodes innovantes (extraction assistée par micro-ondes, flash-détente et expansion instantanée contrôlée) [70], Le choix de la technique dépend essentiellement de la matière première : son état et ses caractéristiques d'origine, sa nature même. Le rendement " HE/matière première végétale " peut être extrêmement variable selon les plantes [71].

2.14.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger le matériel végétal dans un bain-marie. Le tout est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odoriférantes contenues dans les cellules de la plante. Ces molécules aromatiques forment un mélange azéotropique (eau + huiles essentielles) avec la vapeur d'eau et l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par différence de densité [72, 73], Par contre, l'hydrodistillation a ses limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant provoque la dégradation de certaines molécules aromatiques [45](Figure 4).

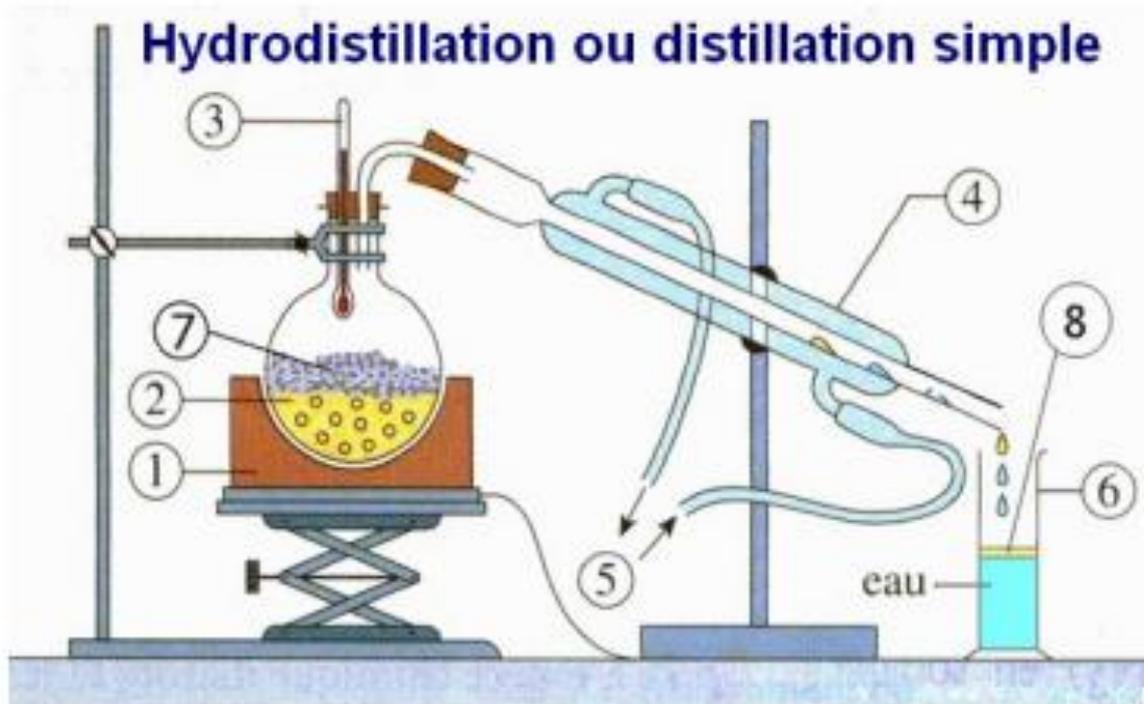


Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation[74].1-Chauffe ballon, 2-Ballon, 3-Thermomètre, 4-Réfrigérant, 5-Entrée sortie d'eau, 6-Erlenmeyer, 7-Matière à extraire l'essence, 8-La couche d'HEs.

2.14.2. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Au cours de ce type de distillation, la matière végétale ne macère pas immédiatement dans l'eau. Elle est déposée sur une grille perforée à travers laquelle passe de la vapeur (figure 5). La vapeur dégrade la structure des cellules de la plante et libère les molécules volatiles, qui sont ensuite transportées vers le refroidisseur. Cette méthode améliore de la qualité de l'huile essentielle en réduisant au minimum les altérations hydrolytiques : le matériel végétal n'est pas directement baigné dans l'eau bouillante [75].

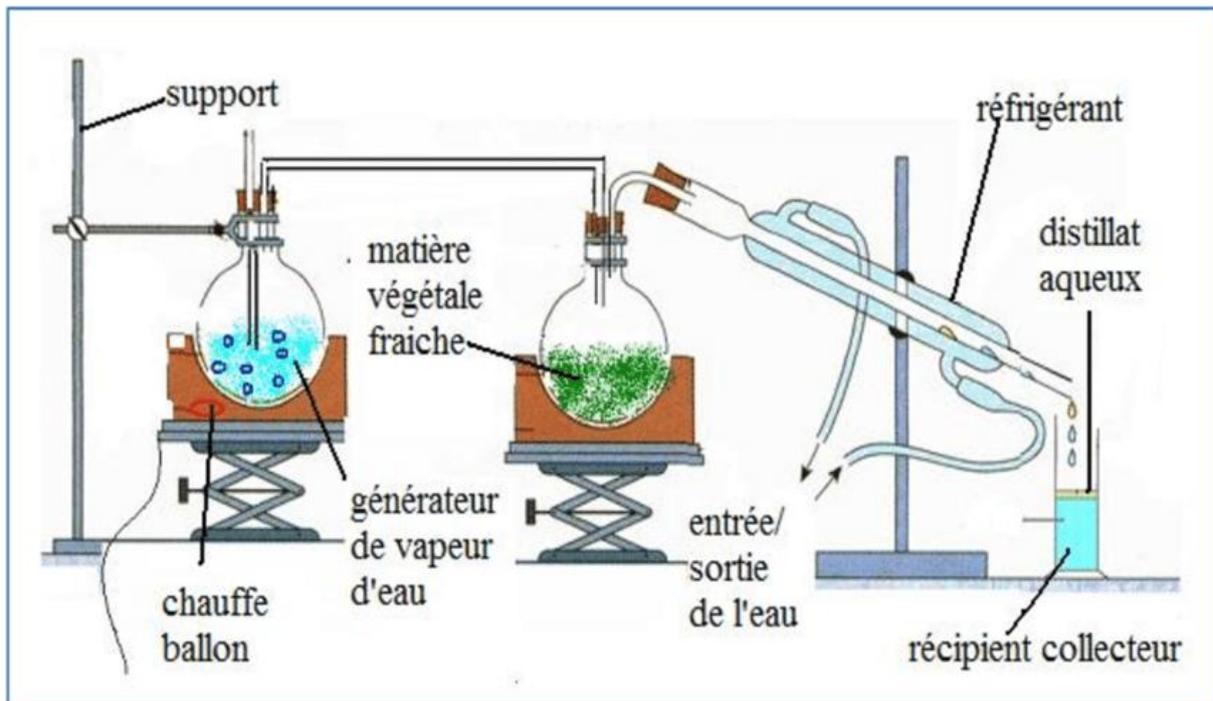


Figure 5 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur d'eau [76]

2.14.3. Expression à froid

C'est un procédé mécanique de transformation qui permet de déchirer le péricarpe enrichi en cellules sécrétrices, ce procédé étant utilisé pour l'extraction des composés volatils du péricarpe [77].

2.15. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont pour obligation de posséder les propriétés demandées par les lois des pays producteurs et exportateurs et par les pays importateurs. Ces différents paramètres sont déterminés par des normes internationales ISO (International Organization for Standardization) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation) (NF ISO 855). Sont ainsi contrôlés les propriétés organoleptiques et physiques telles que la couleur, l'odeur, la réfraction, la solubilité, le point d'éclair mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acide et d'ester [78].

Les huiles essentielles d'agrumes extraites des écorces de fruits sont très répandues dans les secteurs de l'alimentation et de la parfumerie. Bien qu'elles soient commercialisées, elles ont une grande valeur économique. Par contre, la production et la mise sur le marché d'huiles essentielles de moindre qualité et/ou altérées sont malheureusement monnaie courante. Les

analystes des huiles essentielles d'agrumes nécessitent donc le développement et la disponibilité de procédés de haute résolution, rapides, sensibles et sélectifs [79].

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est considérée comme le procédé le plus utilisé pour l'analyse des huiles essentielles, elle permet la séparation et la détermination des différents composants d'une huile, elle réalise une analyse à la fois qualitative et quantitative [80].

2.16. Activités biologiques des huiles essentielles

2.16.1. Activité antioxydant des huiles essentielles

Dans le contexte de la toxicité des antioxydants synthétiques et de la demande des consommateurs pour des produits naturels, l'utilisation du produit végétal en tant que source des antioxydants deviendrait plus nécessaire car ces produits sont moins nocifs.

Les monoterpènes oxygénés, comme : le thymol, le carvacrol et l' α -terpinéol, sont les principaux agents responsables du potentiel antioxydant des huiles végétales qui les contiennent. Le monoterpène β -caryophyllène a également une action de piégeage des radicaux libres. Aussi, les plantes médicinales présentant une activité antioxydante importante seraient une source de thérapie pour les pathologies dans lesquelles les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS) sont concernées [81].

Si elles permettent d'éliminer certains radicaux libres, les huiles essentielles peuvent aussi agir comme anti-inflammatoires, car l'une des réponses inflammatoires est la salve oxydative qui se produit dans diverses cellules (monocytes, neutrophiles, éosinophiles et macrophages). La phagocytose des bactéries, qui se produit pendant l'inflammation, provoque une augmentation marquée de la consommation d'oxygène, ce qui résulte en la création d'un radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est immédiatement transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [82].

2.16.2. Activités anti-inflammatoires

Il a été démontré que les constituants des huiles essentielles, qui comprennent des monoterpènes hydrocarbonés, des sesquiterpènes hydrocarbonés et des alcools sesquiterpéniques, inhibent la 5-lipoxygénase, une enzyme qui participe à la synthèse des leucotriènes et qui est susceptible de favoriser la maladie d'Alzheimer [83].

2.16.3. Activité antiseptique

Plusieurs des HEs possèdent un remarquable potentiel antiseptique. En effet, il est appliqué sur des souches bactériennes variées, y incluant celle généralement résistantes aux antibiotiques (Tétracycline, acide oxolinique) [84]. Ces derniers interviennent en général à partir d'une faible dose. Les huiles essentielles de sarriette, citrus, cannelle, thym, clou de girofle, lavande, eucalyptus sont les plus antiseptiques. Plusieurs de leurs constituants tels que le citral, le géraniol, le linalol et le thymol ont une action antiseptique en général 7 à 10 fois plus importante que le phénol [85].

2.16.4. Activité pesticide

Il existe de différentes molécules de synthétique qui sont applicables, mais pour protéger les végétaux, on peut également utiliser quelques essences naturelles. Les pesticides sont très nombreux et sont regroupés en fonction de leur activité en insecticides, mollucides, nématocides et germicides. , Plusieurs huiles sont identifiées par leur efficacité sur les moisissures phytopathogènes : c'est le cas des huiles de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis* [86].

2.16.5. Activité antifongique

Plusieurs chercheurs ont démontré que l'HEs des plantes aromatiques a une activité fongicide contre les moisissures allergènes [87]. Et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes : *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* [88].

Pour la 1^{re} fois, en 1949 les pouvoirs antimicrobiens de l'HEs des agrumes ont été mentionnés par PIACENTINI. que les huiles essentielles de Citrus en solution sont plus efficaces que celles des phénols comme désinfectants [89].

2.16.6. Activité antimicrobienne

Depuis longtemps, les extraits de plantes aromatiques sont en usage dans des préparations de médicaments et de parfums. Les huiles essentielles ont été reconnues comme les principaux agents antimicrobiens que contiennent ces plantes.

Il existe aujourd'hui environ 3000 huiles, dont environ 300 sont effectivement commercialisées, surtout pour l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a conduit à un regain

d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Les huiles essentielles ont un très grand spectre d'action puisqu'elles empêchent la croissance des bactéries ainsi que des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est essentiellement liée à leur composition chimique, et en particulier à la nature de leurs principaux composés volatils [90].

2.17. Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui cause une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires, Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relègues sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire [91] (Figure 6).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend du type de microorganismes, Les bactéries Gram positives sont plus sensibles à l'effet des huiles essentielles que les bactéries Gram négatives caractérisées par une membrane externe imperméable [92]. Cette imperméabilité est liée à la richesse de cette membrane en lipo-polysaccharides la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes de lui adhérer [93].

D'une façon globale, leur action se déroule en trois phases :

- 1) Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- 2) Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants structurels.
- 3) Destruction du matériel génétique, entraînant la mort de la bactérie.

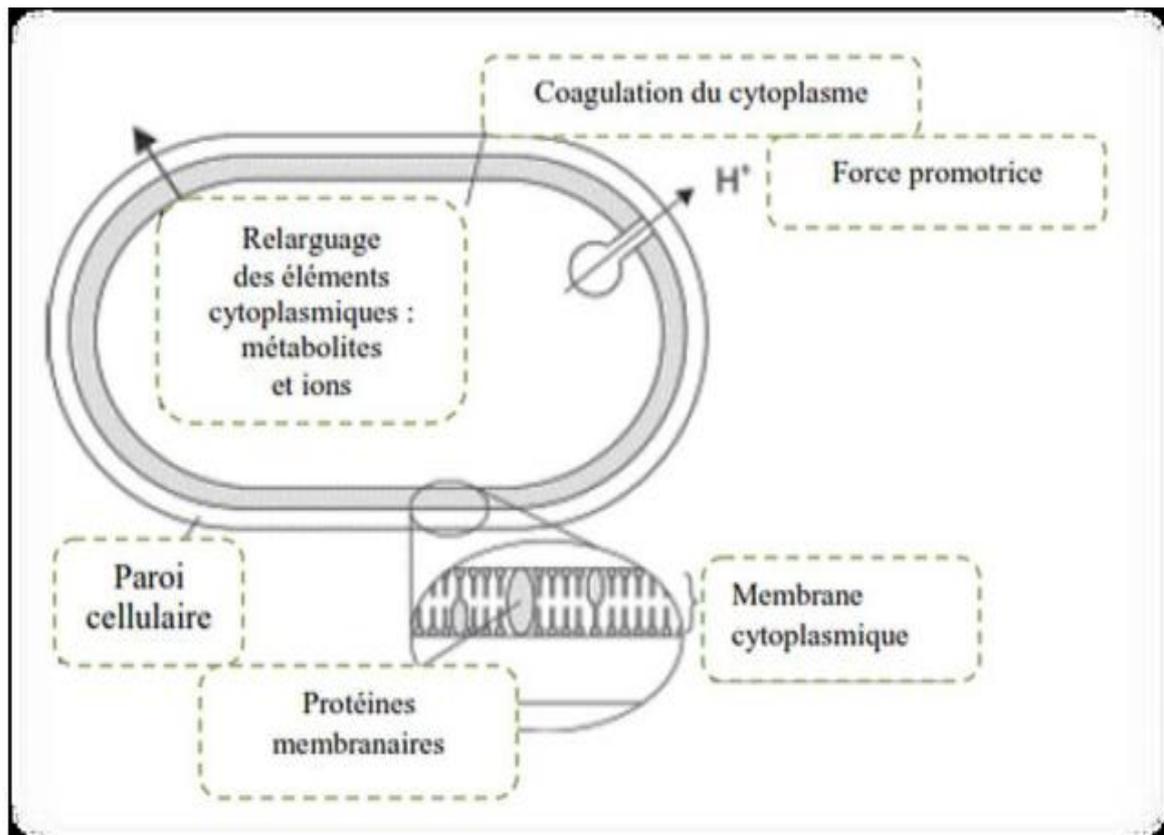


Figure 6 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne [94].

2.18. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

La méthode appliquée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. À l'heure présente, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être déterminée par un grand nombre de techniques classiques, en milieu solide ou liquide [95].

2.18.1. Aromatogramme (méthode de Vincent)

La méthode de diffusion sur disques, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme ou technique de l'antibioaromatogramme [96]. Est développée par Schroeder et Messing en 1949. Cet examen se réalise de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles aromatiques, préalablement choisies et reconnues [97]. Cette technique, inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux huiles essentielles [98].

Elle consiste à utiliser des boîtes de Pétri qui contiennent un milieu gélosé approprié, déjà solidifié etensemencé avec la souche microbienne testée. Un disque stérile de papier filtre de

6 mm de diamètre imprégné d'une quantité connue d'huile essentielle est placé sur le milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne. La dilution de l'HE se fait toujours dans un solvant tel que l'éthylène glycol, l'acétone, l'éthanol à 95% [99]. Le principe de cette méthode est toujours la migration des HE par diffusion dans la gélose (Figure 7).

Après incubation, les résultats sont lus en mesurant les diamètres des zones d'inhibition en millimètres [100, 101].

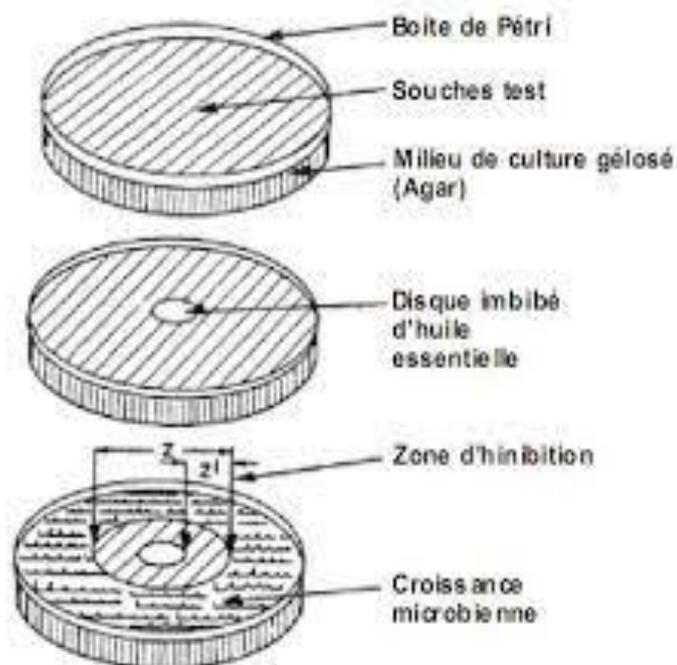


Figure 7 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de pétri [102].

2.18.2. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque (Figure 8). Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélose. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés [103].

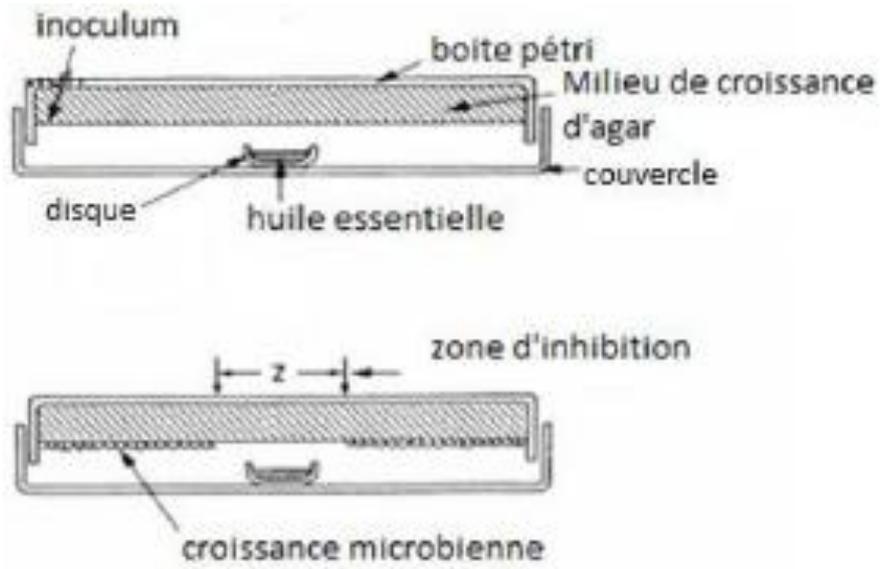


Figure 8 : Illustration de la méthode de micro-atmosphères [104].

Chapitre III :

Les microorganismes

3. Les micro-organismes commensaux

3.1. Les bactéries

Les bactéries sont ubiquitaires on les trouve dans les différents biotopes sur terre. Elles peuvent être localisées dans le sol, l'eau, l'air, la peau et plus particulièrement dans les intestins des animaux comme les *Pseudomonas*, les *staphylocoques*, les *Escherichia coli*.

3.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille aérobic à Gram négatif aussi dénommé (colibacille), Il s'agit d'une bactérie commensale du côlon de l'homme et des animaux. Chez l'homme, les *E. coli* sont la dominance de la flore bactérienne aérobic du côlon et se retrouvent à moindre degré dans l'intestin grêle. Les contaminations sont principalement induites par une consommation de viande de bœuf, contaminée et peu cuite, mais peut être aussi causée par la consommation d'eau, de lait cru, de fruits, de légumes, le bain et le fait qu'il y ait un contact entre les humains [105].

3.2.1. Classification scientifique [106]

- **Règne** *Bacteria*
- **Embranchement** *Proteobacteria*
- **Classe** *Gamma proteobacteria*
- **Ordre** *Enterobacteriales*
- **Famille** *Enterobacteriaceae*
- **Genre** *Escherichia*
- **Espèce** *Coli*

3.2.2. Pathogénicité

E.coli elle peut provoquer des infections intestinales (de gastro-entérites) et donc des diarrhées (diarrhées d'allure, diarrhées sanglantes, diarrhées coliformes) et aussi des infections de méningites ou une septicémie [107].

3.3. *Staphylocoques*

Staphylocoques aureus ou doré grâce à sa teneur en caroténoïdes, Elle est considérée comme l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylocoques*. Se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif [108].

Elles sont ubiquistes et peuvent vivre :

- en bactéries commensales sur la peau et les muqueuses des humains et des animaux
- en bactéries pathogènes qui causent des infections chez l'homme ou l'animal, ce qui peut être très dangereux.

3.3.1. Classification de Bergey (1994)

Embranchement	<i>firmicutes</i>
Groupe 17	<i>cocci gram +</i>
Ex famille des Micrococcaceae	<i>famille des micrococcaceae</i>
Genres <i>Staphylococcus</i>,	<i>micrococcus, ex-micrococcus (kocuria, kytococcus, dermacoccus)</i>

3.3.2. Pathogénicité

Le *Staphylocoques aureus*, une espèce de staphylocoque à coagulation positive, est très souvent présent dans le corps humain et est responsable de plusieurs infections (cutanées, nosocomiales, intoxications alimentaires) [109].

3.4. *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Dépourvue de spores et de capsules, est une bactérie saprophyte de l'air, de l'eau et du sol, commensale de tous les téguments et muqueuses de l'homme et des animaux, elle a un large pouvoir pathogène [110].

L'espèce *Ps.aeruginosa* est très abondante dans notre environnement, on la retrouve notamment dans le sol, l'eau, à la surface des plantes et des animaux. Dans les hôpitaux, *P. aeruginosa* se présente quelquefois dans les solutions aseptiques et sur les instruments du type cathéters, sondes, ou dans les tuyaux et les éviers. Son énorme capacité d'adaptation à divers environnements est certainement liée à la plasticité de son grand génome (environ 6Mpb) [111].

3.4.1. Pathogénicité

Le bacille pyocyanique est en principe une bactérie pyogénique responsable de la formation de suppurations en surface et en profondeur chez les humains et les animaux, à partir des quels il peut être isolé [110].

Chapitre IV :

Matériels et méthodes

4. Matériel et méthodes

- **Présentation du lieu de l'étude expérimentale**

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie et de microbiologie à l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

- **Objectif de travail**

Cette présente étude vise particulièrement à Procéder à l'extraction de l'huiles essentielle des citrus, notamment du *citrus sinensis* et du *citrus limonum* par l'utilisation de l'hydro – distillation, de calculer par la suite le rendement de ces deux plante (leurs feuilles) en l'huile essentielle. Cette technique d'extraction a été suivie par un séchage. Afin d'étudier l'activité antibactérienne de ces deux HEs différents pures et a différentes dilutions sur des germes pathogènes à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et des bactéries à Gram positif, *staphylocoques aureus*.

4.1. Matériels

4.1.1. la matière végétale

Notre étude est portée sur deux plantes choisies: *Citrus limonum* Var. *Eureka* (Figure 9) et *Citrus sinensis* Var. *Washington navel* (Figure 10). Les parties d'intérêt pour notre étude pour les deux plantes étaient les feuilles fraîches, récoltées au niveau de la wilaya de Mostaganem (Sayada), au mois de avril 2021-04-13.



Figure 9 : les feuilles de *citrus limonum* (Eureka)



Figure 10 : les feuilles de *citrus sinensis* (Washington navel)

4.1.2. Les souches étudiées

En a choisir 3 souches pathogènes (Figure 11), qui sont souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et ont développé une antibiorésistance.

On a sélectionné 2 groupes de bactéries :

- Des bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.
- Des bactéries à Gram positif : *staphylocoques aureus*.

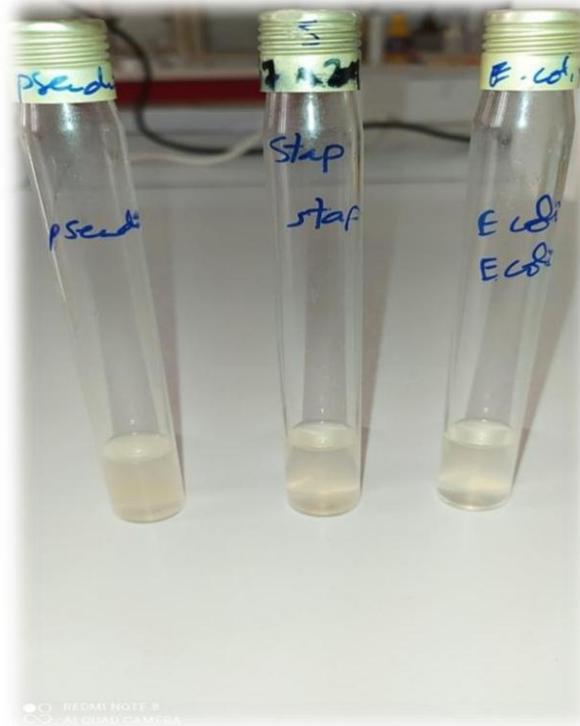


Figure 11 : Les souches bactériennes pures.

4.2. Méthodes

4.2.1. Traitement de la matière végétale

4.2.1.1. Méthode d'extraction des HEs

Le matériel végétal est traité à la vapeur (Figure 12). Le matériel végétal, qui est dans ce cas hors de contact par rapport à l'eau, est maintenu par une grille ou par une plaque à trous située à une distance appropriée du bas de l'alambic, qui est rempli d'eau. Par effet de la température, cette dernière devient de la vapeur et circule à travers les plantes en portant les molécules aromatiques vers un circuit de refroidissement. Le procédé de distillation des huiles essentielles consiste à introduire 500g d'feuilles de citron ou orange dans une plaque à trous, située à une distance suffisante du fond de l'alambic et remplie d'un tiers d'eau distillée. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles traversent le tube vertical et arrivent dans le serpentin de refroidissement où se produit la condensation. Les gouttelettes obtenues sont accumulées dans le tube précédemment rempli d'eau distillée. L'huile essentielle de densité inférieure à celle de l'eau, flotte à la surface de cette dernière. L'huile récupérée est ensuite traitée avec un agent déshydratant, le sulfate de sodium, pour supprimer le peu d'eau qui aurait pu être retenue dans l'huile et finalement conservée dans un tube à essai stérile et teinté à basse température (4 à 5 °C). Le déroulement de l'extraction dure trois heures.



Figure 12 : Dispositif d'extraction des HEs par hydrodistillation.

4.2.1.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle (Rd), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M) dans notre étude 500g [112]. Il est donné par la formule suivante :

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

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

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

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

4.2.1.3. Méthode de dilution

Cette technique met en évidence les effets de l'activité antimicrobienne de l'HE après un certain nombre de dilutions dans le DMSO.

- Préparation des dilutions :

0,5 ml d'HE est introduit de façon aseptique à l'aide d'une pipette graduée stérile dans un Eppendorf stérile contenant 0,5 ml de diluant diméthylesulfoxyde (DMSO). Cette préparation correspond à la dilution mère (Dm) qui consiste en une dilution de 50% Ceci peut nous

permettra de déterminer le CMI. La Dm est mis dans une étuve à 37°C pour 20 min avec des agitations de l'Eppendorf de temps à autre pour bien homogénéiser les 2 phases du milieu.

4.2.2. Souches bactériennes

4.2.2.1. Identification des souches pures

- **Coloration de Gram**

En zone aseptique, préparez 1 frottis d'une culture a gram + et un frottis d'une culture à gram – [113]

- Couler sur le frottis réalisé le violet de Gentiane et laisser réagir 30 secondes
- Égoutter le violet de Gentiane et rincer avec de l'eau distillée
- Ajouter quelques gouttes de Lugol et laisser réagir 1 mn
- Décolorer avec de l'alcool
- Rincer la lame à nouveau avec de l'eau distillée
- Couler la Fuchsine et laisser réagir 20 secondes
- Rincer à l'eau distillée et laisser sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.
- Observer les frottis sous microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion.

Les bactéries qui apparaissent en violet sont à Gram positif, et celles qui apparaissent en rose sont à Gram négatif.

4.2.2.2. Vérification de la sensibilité des souches cibles de notre étude aux antibiotiques de références

Afin de vérifier la possibilité de développement de toute résistance par nos souches pathogènes étudiées, aux différents antibiotiques de références largement utilisés et prescrits à des fins préventives ou comme traitements. Nous avons procédé a un test de sensibilité préliminaire de *E.coli*, *Ps.aeruginosa*, *S.aureus* à ampicilline et à amoxicilline\acide clavulanique

4.2.2.3. Préparation de l'inoculum

a- Préparation de pré-culture

Les tests de la méthode antibactérienne sont effectués avec un échantillon de cultures jeunes (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est réalisée par inoculation de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (bouillon nutritif). Après avoir incubé pendant 24 heures à 37°C

b- Préparation de la suspension bactérienne

A partir des jeunes cultures sur bouillon nutritif. Mettre une suspension bactérienne dans un tube contenant 7 ml de bouillon nutritif stérile, vortexer pendant quelques secondes.

Puis calculer la densité optique de la solution bactérienne contenue dans de l'eau physiologique en sachant que la densité optique bactérienne est comprise entre 0,08 -0,1.

Avant

- il faut régler le spectrophotomètre à une fréquence 620nm.
- Puis calculer la densité optique de l'eau physiologique contenue dans une cuve comme témoin.

Après déposez une autre cuve contenant de la solution bactérienne contenue dans de l'eau physiologique afin de calculer sa densité optique qui sera comprise entre 0,08 -0,1.

Une fois les densités optiques de la solution bactérienne sont ajustées par rapport à l'intervalle de 0,08 -0,1, On commence l'ensemencement des ces solutions bactériennes contenues dans de l'eau physiologique dans le milieu gélosé solide MH.

4.2.3. Choix et réalisation de l'antibiogramme

Afin de tester la sensibilité de différentes souches de bactéries pathogènes choisies dans notre étude aux HEs de *C.limonum* et de *C.sinensis*, ont a adopté l'antibiogramme sur un milieu gélosé MH, qui consiste à déposer des disques imbibés d'un volume de 2ul de nos HEs, pures et diluées à 50 % dans DMSO sur la gélose préalablement ensemencée par une culture dans le bouillon nutritif des souches pures étudiées.

a- Ensemencement

L'ensemencement doit se faire en étalon une goutte de la suspension bactérienne, sur la surface de la gélose MH avec un écouvillon stérile

Pour se faire, frottez l'écouvillon sur la totalité de la surface sèche de la gélose, de haut en bas, en formant des stries serrées.

Répétez la même opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire tourner l'écouvillon sur lui-même.

Terminez l'ensemencement en frottant l'écouvillon à la périphérie de la gélose.

b- Préparation des disques

Les disques sont préparés en utilisant du papier Wattman №40 par une perforation à 2 trous du papier, de 5 mm de diamètre. Puis ces disques sont déposés en un tube à essai, autoclavés, et conservés à température ambiante.

Prélève à l'aide de pince stérile les disques stérilisés, Ce dernier est imbibé avec HEs pendant 30s, Puis déposer dans la boîte de pétrie 04 disques imbibés sur le milieu MH ensemencé.

Laisser reposer ces boîtes de pétrie pendant 30 mn jusqu'à fixation des disques sur le milieu MH solidifié.

c- Incubation

Incubez les boîtes de pétrie dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

d- Lecture des résultats

La lecture des résultats, permettant d'estimer la sensibilité des souches étudiées aux HEs des *C.limonum* et *C.sinensis* est réalisée par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition. Ces derniers sont mesurés à l'aide d'une règle et exprimés en (mm) (en incluant le diamètre du disque de 5 mm).

La sensibilité à l'huile essentielle a été classée en fonction des diamètres des halos d'inhibition selon l'échelle suivante [114] :

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

e- Analyses statistiques

Les données collectées dans ce travail aléatoire ont été soumises à une analyse de variance [115]. Le test des plages multiples de Duncan a été utilisé pour distinguer les moyennes des traitements. Un contraste à un seul degré de Liberté a été adopté pour estimer les impacts significatifs de l'acclimatation thermique et de la supplémentation alimentaire en graines de lin. le niveau de $p < 0,05$ a été considéré pour la signification.

Chapitre V :

Résultats et discussions

5. Résultats et discussions

5.1. Détermination du rendement d'extraction

Les rendements moyens des HE extraites sont représentés en pourcentage dans le tableau 7

Tableau 7 : Rendement en huile essentielle de Citrus.

	HEs de <i>C.limonum</i>	HEs de <i>C.sinensis</i>
Rendement (%)	0.20	0.12

Nos résultats montrent que le rendement moyen en huiles essentielles de *C.limonum* (0,20) est plus important que celui de *C.sinensis* (0,12).

Discussions

D'après les résultats obtenus par des étudiants de l'université de Saad Dahlab, Blida lors d'une étude similaire de fin d'étude d'un Master en biologie ; qui étaient de 0,31 pour *C.limonum* et de 0,22 *C.sinensis*, il semble évident que les agrumes renferment peu d'huiles essentielles. Nos résultats sont très différents de ceux obtenus par [116] qui ont obtenu des rendements compris entre 0.2 et 0.6% pour *C. limonum*, En effet [117] et [118] ont observé des rendements compris entre 0.6 à 0.8 % pour l'HE de *C. sinensis* et 0.7 à 0.9% pour l'HE de *C. limonum*.

La période de récolte, indispensable en termes de rendement et de la qualité de l'HEs, le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisée, le degré de fraîcheur, la méthode d'extraction employée, etc. pourraient expliquer cette différence. [119].

5.2. Identification des souches

L'observation macroscopique des colonies, après la réalisation de la coloration de Gram pour les souches isolées, nous a permis d'identifier des bactéries en rose nous confirmant qu'il s'agit de bactéries Gram négatif. Ces dernières sont de formes Coccobacilles pour *E.coli* et Bacilles pour *Ps.aeruginosa* figure 13, et celles en violet nous confirmant qu'il s'agit bien de bactéries Gram positif de formes de Coccus en grappes de raisins pour les *S. aureus* figure 14.

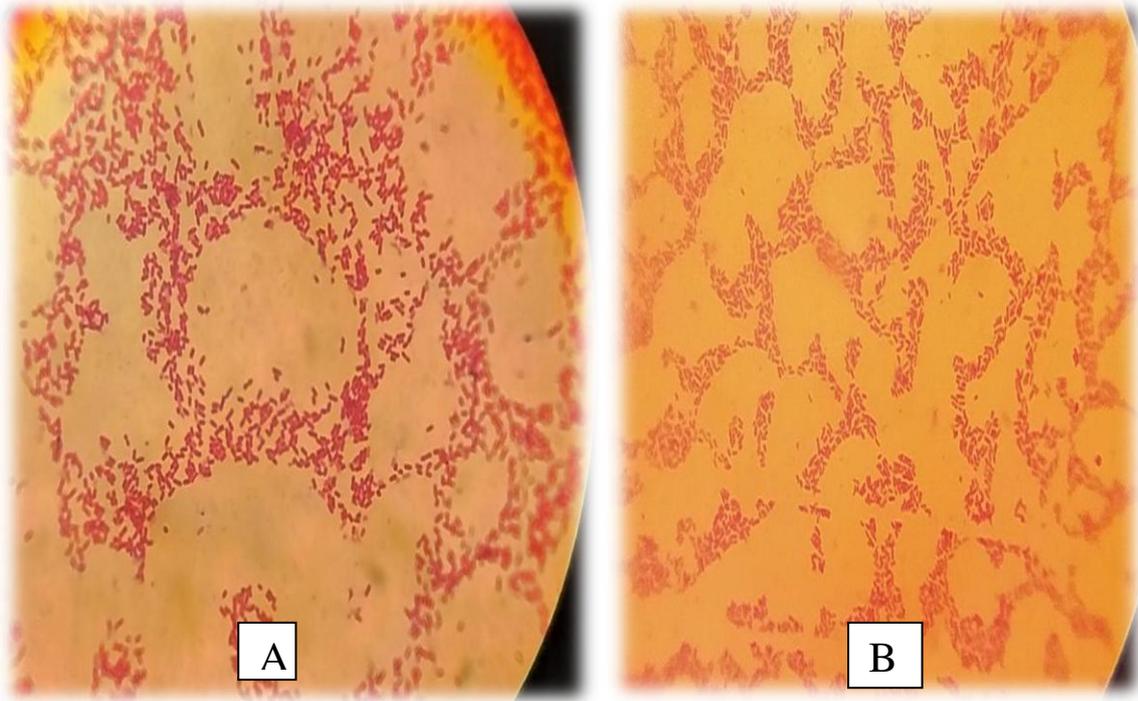


Figure 13 : Coloration de Gram observation microscopie (X 100).A: *Escherichia coli*, B: *Pseudomonas aeruginosa*,

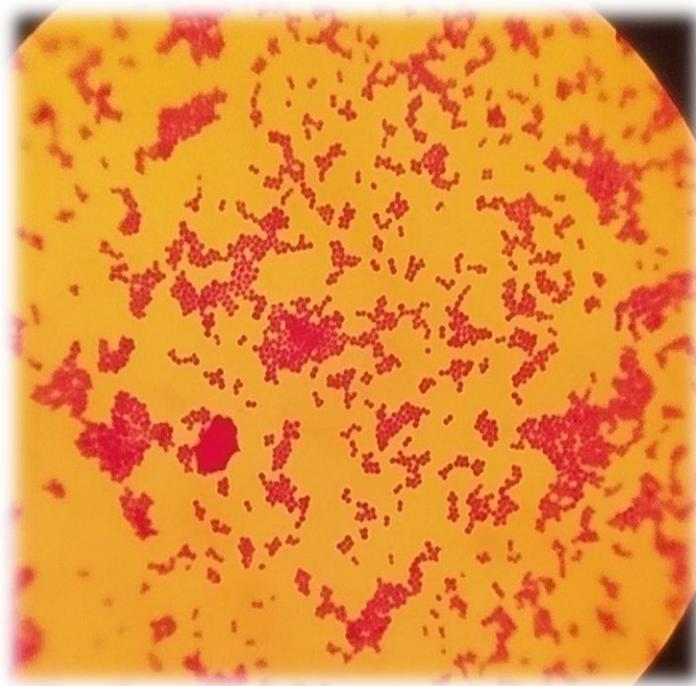


Figure 14 : Coloration de Gram observation microscopie (X 100) de *Staphylococcus aureus*.

5.3. Evaluation de la sensibilité des souches bactériennes étudiées

5.3.1. Vérification de la sensibilité des souches étudiées aux antibiotiques de références

5.3.1.1. La sensibilité à l'amoxicilline /acide clavulanique

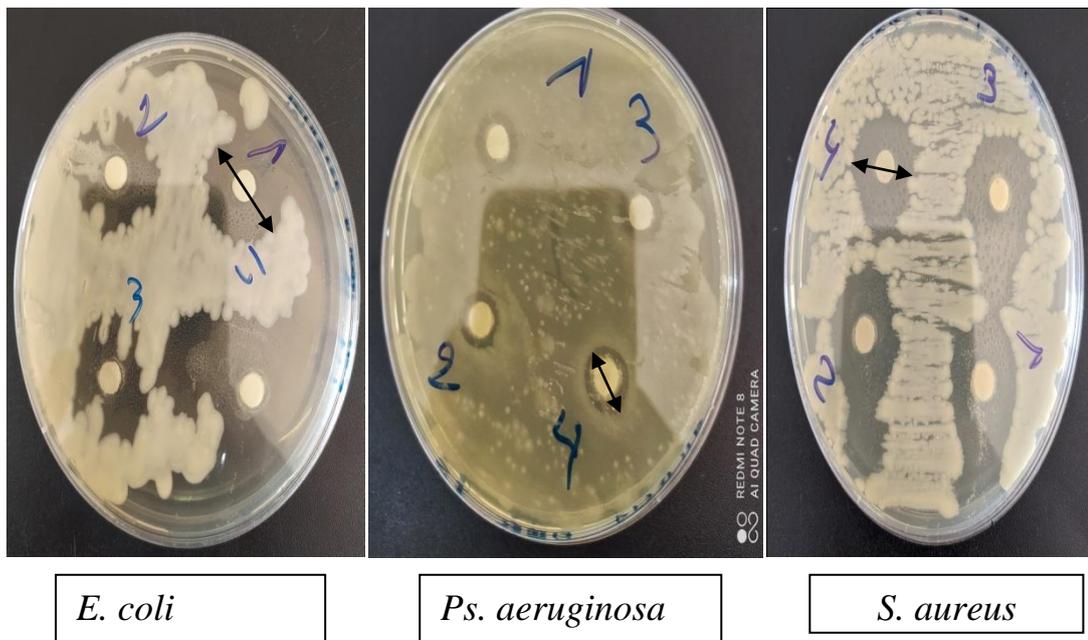


Figure 15 : sensibilité des souches à l'amoxicilline/acide clavulanique marquée par les zones d'inhibition.

Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité des souches à L'amoxicilline/acide clavulanique marquée par les zones d'inhibition

Les Souches	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Diamètre d'inhibition (mm)	18,16±3,97 ^b	11,5±3,17 ^a	17,5±2,71 ^c
Sensibilité	++	+	++

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la Zone d'inhibition

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative(P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres des zones d'inhibitions délimités par l'amoxicilline pour les trois souches se révèlent très importante d'E.coli 18,16±3,97significativement plus importante que celle de S.

aureus $17,5 \pm 2,71$. Celle de *Ps. Aeruginosa* $11,5 \pm 3,17$ significativement moindre que celles des autres souches.

Discussion

Pour un antibiotique de référence et malgré que les diamètres d’inhibition paraissent intéressant du point de vue théorique et en chiffres numériques, mais restent loin des attentes thérapeutiques. On dirait même qu’il y a régression en cours de la sensibilité des trois souches étudiées à l’amoxicilline/acide clavulanique

5.3.1.2. La sensibilité à l’ampicilline :

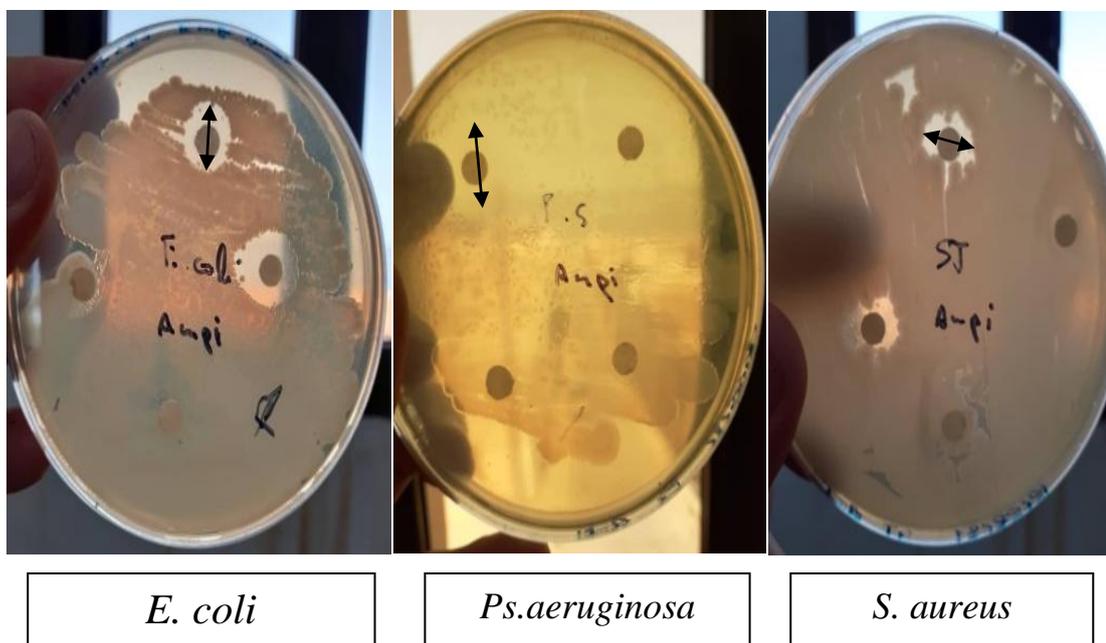


Figure 16 : sensibilité des souches cibles à l’ampicilline marquée par des zones d’inhibitions.

Tableau 9 : Diamètres des zones d’inhibition en (mm). Marquant la sensibilité des souches cibles à l’ampicilline marquée par des zones d’inhibitions.

Les Souches	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Diamètre d’inhibition (mm)	$10,75 \pm 2,49^d$	$9,08 \pm 3,26^a$	$8,5 \pm 2,50^d$
Sensibilité	+	+	-

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la Zone d’inhibition

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative ($P < 0.05$)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres de zones d'inhibition sont enregistrés plus importants pour *E. Coli* $10,75 \pm 2,49$ suivie par celle de *Ps. Aeruginosa* $9,08 \pm 3,26$ avec une différence entre les deux valeurs très significative. Par contre le diamètre d'inhibition marqué par ampicilline pour *S. aureus* qui était de $8,5 \pm 2,50$ significativement inférieur à ceux marqué pour *E. Coli* et *Ps. Aeruginosa*

Discussion

Les résultats des tests préliminaires de la sensibilité des souches pathogènes ciblés de notre étude ; nous montrent bien que ces dernières ont développé une résistance à l'ampicilline qui se révèle très importante chez *S.aureus*. On note que la sensibilité des deux autres souches à l'ampicilline bien diminuée ; annonçant un développement d'une résistance en cours.

5.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *C.limonum* et *C.sinensis*

5.3.2.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles pures de *C.limonum* et *C.sinensis*

L'effet des HEs de *C.limonum* et *C.sinensis*, sur la croissance des souches bactériennes étudiées : *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* dans notre expérimentation, sont estimés par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm. Les valeurs des diamètres sont décrites dans les tableaux et les figures ci-dessous :

a- Effet antibactérien de l'HE pure de *C.limonum*

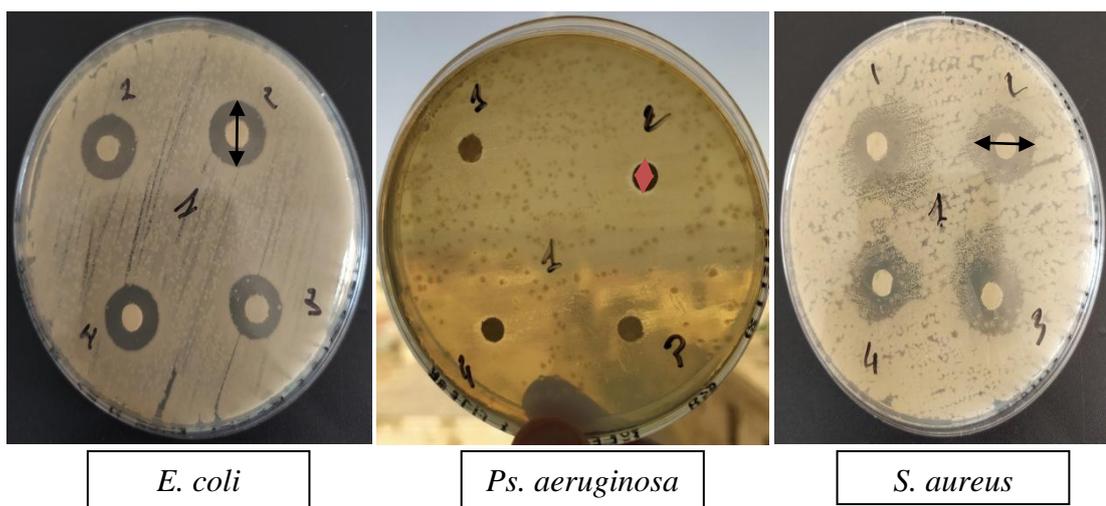


Figure 17 : sensibilité des souches à l'HE de *C. limonum* marquée par des zones d'inhibitions

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Montrant la sensibilité des Souches à l'HE de *C. limonum* marquée par des zones d'inhibitions.

Les Souches	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Diamètre d'inhibition (mm)	15±1 ^c	7,33±1,07 ^b	24,16±3 ^a
Sensibilité	++	-	+++

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++), Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Diamètres de zones d'inhibition extrêmement importants marquées par *S. aureus* qui était de 24,16±3, suivie par celle marquée par *E. coli* 15±1 jugée importante. Ces deux mesures sont significativement différentes entre elles. Par contre le diamètre d'inhibition relevé pour *P. aeruginosa* 7,33±1,07 significativement moindre par rapport aux diamètres précédemment relevés pour les autres souches.

Discussion

On observe une très grande sensibilité des aux l'H.E de *C. limonum*, Il s'est avéré aussi d'après les valeurs des diamètres la zone d'inhibition observée vis-à-vis de *Ps. Aeruginosa*, montre que cette souche s'est montré très résistante au HS de *C. limonum*. Contrairement à *S. aureus* qui s'est montré extrêmement sensible à HS de *C. limonum*, cette sensibilité qui a dépassé de loin celle de la même souche à l'amoxicilline/acide clavulanique et à l'ampicilline sensés être les antibiotiques de référence pour ces même souches. La même sensibilité significativement en moins important s'est annoncée chez *E. Coli*. Cette effets est probablement duaux propriétés physico-chimiques des composants de ces huiles essentielles, leurs permettant de pénétrer la membrane plasmiques Des bactéries, inhibant ainsi le perceuse de leurs croissance et division cellulaires, et ou provoquant leurs lyse des cellules bactériennes [120].

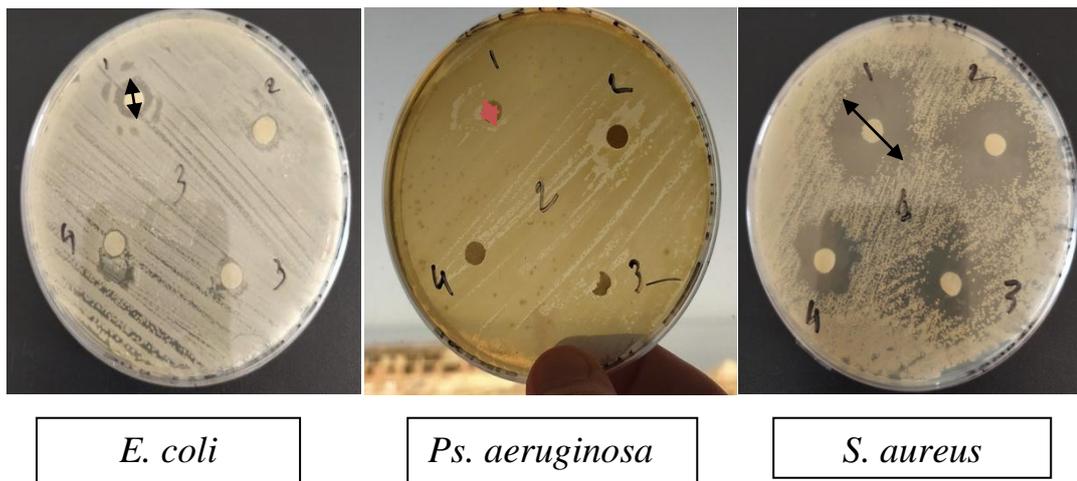
b-Effet antibactérien de l'HE pure de *C.sinensis*

Figure 18 : sensibilité des souches à l'HE de *C. sinensis* marquée par les zones d'inhibitions.

Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition en (mm).marquées par la sensibilité des Souches à l'HE de *C. sinensis* marquée par les zones d'inhibitions.

Les Souches	<i>E. coli</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Diamètre d'inhibition (mm)	9,25±1,86 ^e	9±3,21 ^a	23,25±4 ^a
Sensibilité	+	+	+++

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la Zone d'inhibition

(a,b,c sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Les diamètres de zones d'inhibition tracés par l'effet de *C. sinensis* sur *S. aureus* 23,25±4significativement plus important que ceux marqués par l'effet de la même huile essentielle sur *E. coli* 9,25±1,86et *P. Aeruginosa* 9±3,21qui sont significativement inférieurs aux valeurs déjà enregistrées.

Discussion

Toutes les souches étudiées ont montré une sensibilité vis-à-vis l'HS de *C. sinensis*, révélée extrêmement importante chez *S. aureus* qui dépasse nettement la sensibilité de la même souche à leur antibiotiques de références, suivie par celles de *P. Aeruginosa* et enfin *E. coli*.

5.3.2.2. Comparaison des effets antibactériens des HEs pures et diluées aux effets des antibiotiques de références

a- Etude comparatif entre les effets des HEs étudiés pures et diluées sur *E. Coli* et les antibiotiques de références

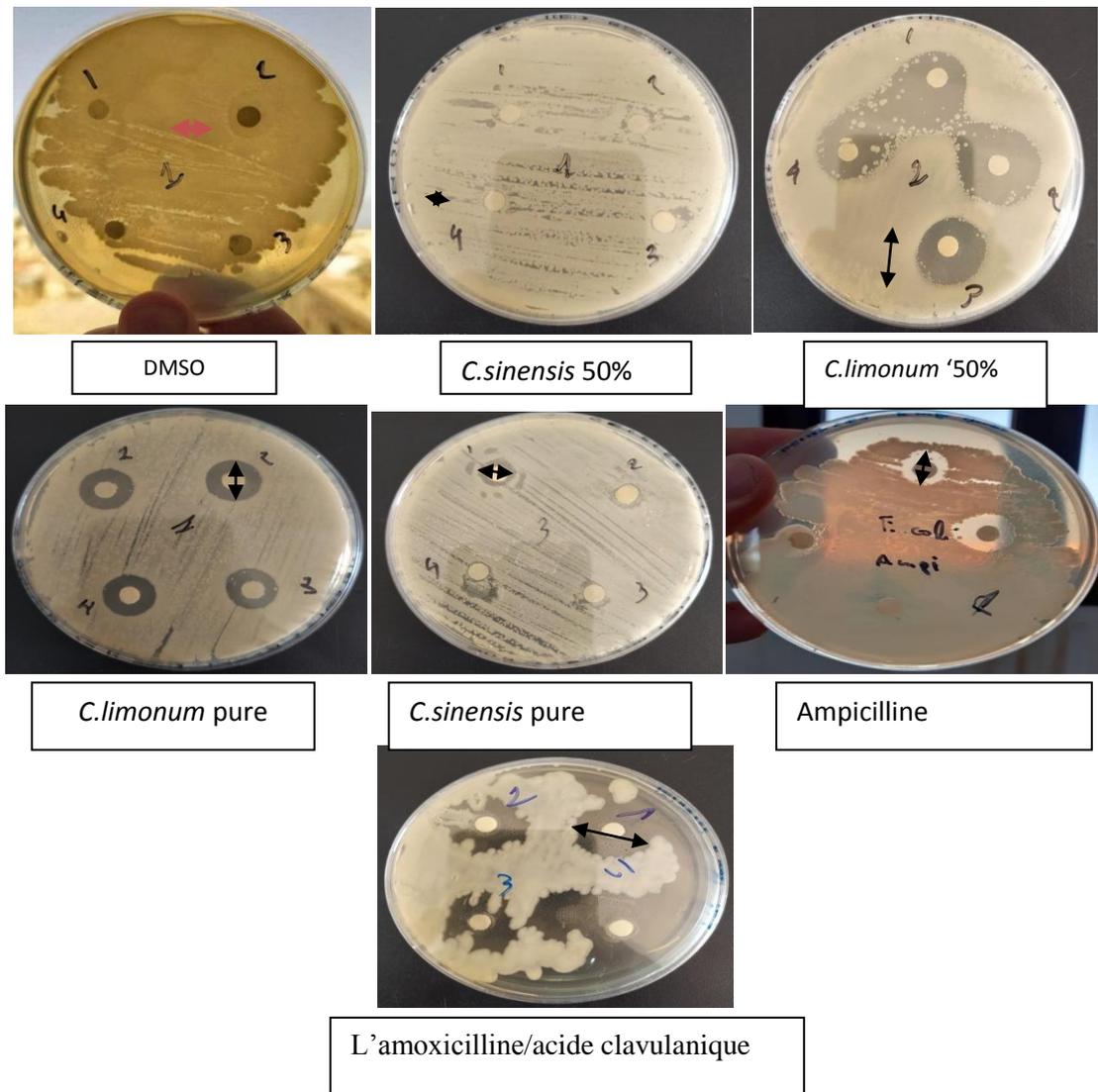


Figure 19 : la sensibilité d'*E. Coli* aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et Aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions

Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant par la sensibilité *D'E. Coli* aux HEs pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de références.

	<i>C.limonum</i> pure	<i>C.limonum</i> 50%	<i>C.sinensis</i> 100%	<i>C.sinensis</i> 50%	l'amoxicilline /acide clavulanique	Ampicilline
<i>E.coli</i>	15±1 ^c	22,971±3,6 ^a	9,25±1,86 ^e	7,25±0,45 ^e	18,167±3,97 ^b	10,75±2,49 ^d
Sensibilité	++	+++	+	-	++	+

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

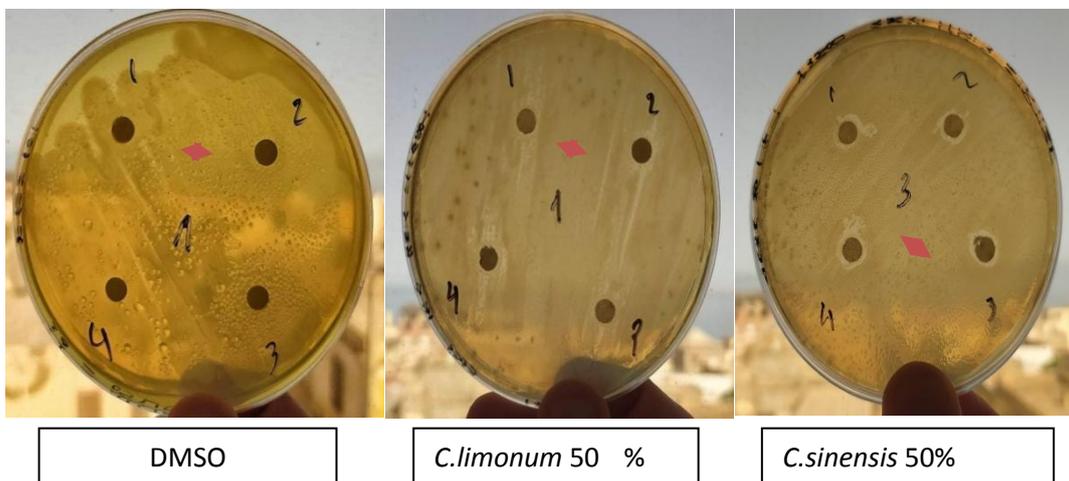
Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Le diamètre de zone d'inhibition marqué par *E. Coli* pour *C.limonum* 50% qui était de 22,971±3,6 extrêmement important et significativement plus élevé que celui remarqué pour l'amoxicilline/acide clavulanique 18,167±3,97 suivi par celui de *C.limonum* pure 15±1 et enfin pour Ampicilline 10,75±2,49 et en dernier la valeur la plus base était celle pour *C.sinensis* 50%, de 7,25±0,45 significativement inférieur à celles enregistrées précédemment.

Discussion

E. Coli a manifesté une très intéressante sensibilité marqué par un diamètre de zone d'inhibition de 9,25±1,86 à l'HE pure de *C.sinensis*, comparable à ce marqué par l'ampicilline 10,75±2,49. Cette dernière a été dépassée par celle à *C.limonum* pure qui était 15±1. La sensibilité extrême d'*E. Coli* était pour *C.limonum* 50% qui dépasse de très loin celle à l'amoxicilline/acide clavulanique.

b- Etude comparatif des effets des HEs étudiés pures et dilués sur *Ps.aeruginosa*



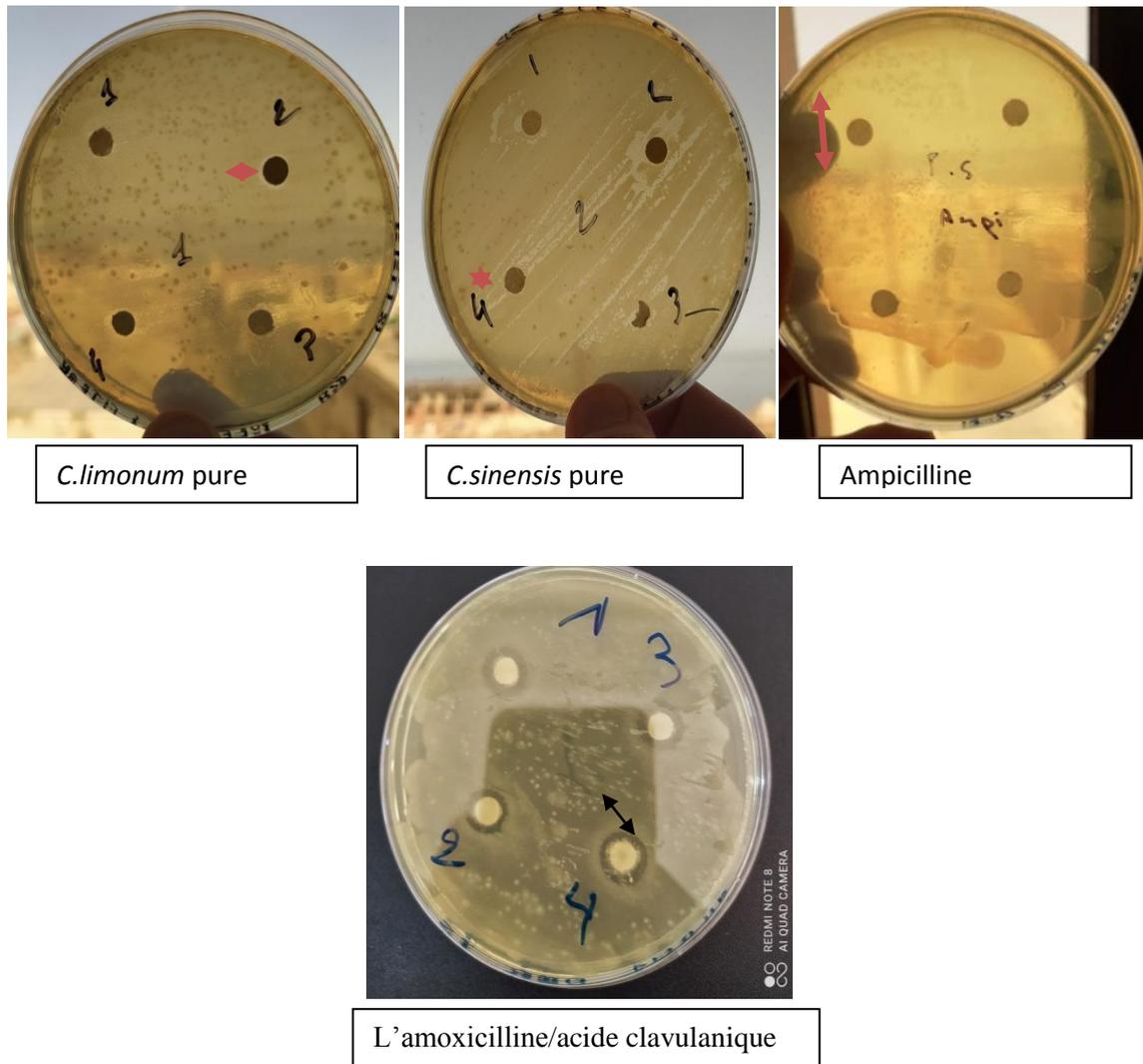


Figure 20 : la sensibilité de *Ps. Aeruginosa* aux HES pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions.

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marqué par la sensibilité de *Ps. Aeruginosa* aux HES pures et diluées à 50% des citrus et aux antibiotiques de référence.

	<i>C.limonum</i> pure	<i>C.limonum</i> 50%	<i>C.sinensis</i> pure	<i>C.sinensis</i> 50%	l'amoxicilline /acide clavulanique	Ampicilline
<i>Ps.aeruginosa</i>	7,33±1,07 ^b	8,16±1,33 _b	9±3,21 ^a	9,5±0,52 ^a	11,5±3,17 ^a	9,083±3,26 ^a
Sensibilité	-	-	+	+	+	+

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la Zone d'inhibition

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart type

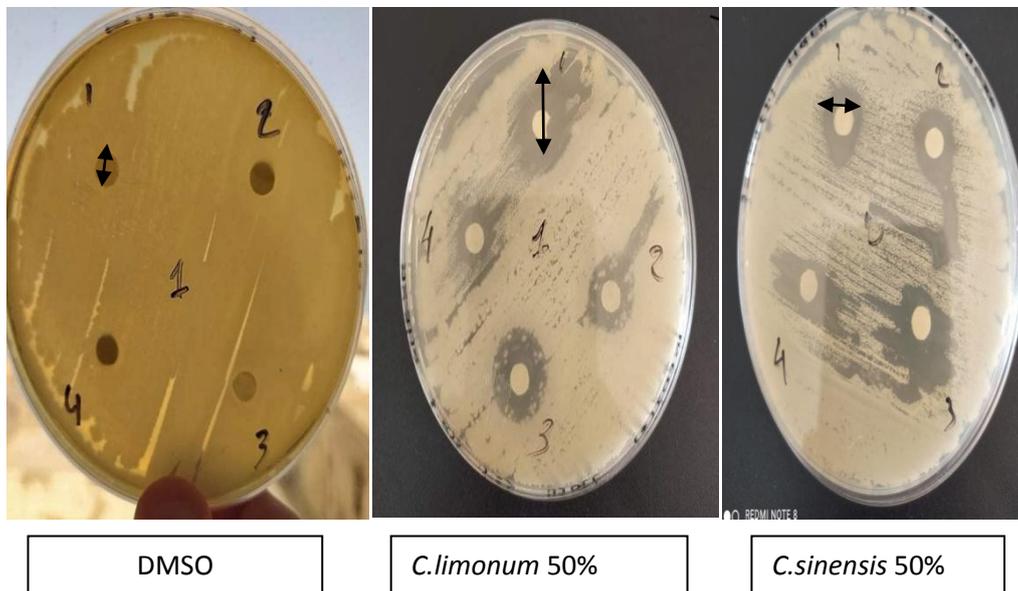
Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Ps. Aeruginosa a marqué des diamètre de zones d'inhibitions sans de grand intérêt marquées par *C.sinensis* pure $9\pm 3,21$,*C.sinensis* 50% $9,5\pm 0,52$, l'amoxicilline/acide clavulanique $11,5\pm 3,17$, et en fin de Ampicilline $9,083\pm 3,26$ Et qui ne révèlent aucune différence significative. Quand aux diamètres marqués par *C.limonum* pure $7,33\pm 1,07$ et par *C.limonum* 50% $8,16\pm 1,33$ pour *E. Coli* significativement inférieurs à ceux enregistrés dans le même cadre d'essaye.

Discussion

La sensibilité d'*E. Coli* pour nous différents principes actifs s'est manifesté sans grand intérêt. Elle paraissait très faible pour celle au *C.sinensis* pure et dilué à 50%, égale a celle des antibiotiques de référence contre lesquels que c'est claire que *E. Coli* a déjà développé une résistance assez importante. La même souche révèle déjà une résistance au *C.limonum* pure et dilué.

c- Etude comparatif des effets des HSs étudiés pures et diluées sur *S.aureus*



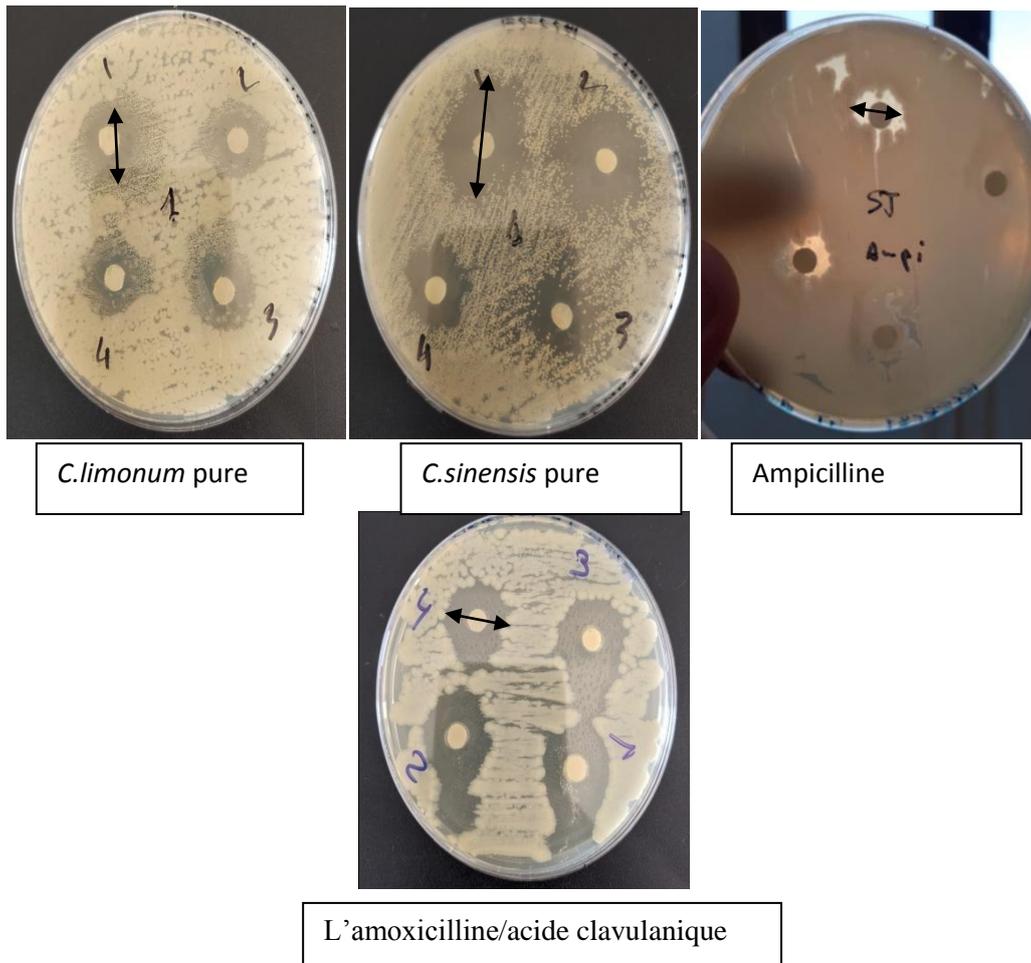


Figure 21 : la sensibilité de *S.aureus* aux HEs pures et diluées à 50% des citruses et aux antibiotiques de références, marquées par des zones d'inhibitions.

Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marquant la sensibilité de *S.aureus* aux HEs pures et diluées à 50% des citruses et aux antibiotiques de références.

	<i>C.limonum</i> pure	<i>C.limonum</i> 50%	<i>C.sinensis</i> pure	<i>C.sinensis</i> 50%	l'amoxicilline/ acide clavulanique	Ampicilline
<i>S.aureus</i>	24,167±3,0 1 ^a	21,417±4.5 2 ^a	23,25±4 ^a	19,25±3,7 9 ^b	17,5±2,71 ^c	8,5±2,5 ^d
Sensibilité	+++	+++	+++	++	++	-

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la Zone d'inhibition.

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative (P<0.05)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes ±écart type

Sensible (+), Très sensible (++) , Résistante (-), Extrêmement Sensible (+++)

Notre études nous a permit de relever les diamètres de zones d'inhibitions extrêmement importants délimités en valeurs numériques descendantes par *C.limonum* pure $24,167\pm 3,01$, *C.sinensis* pure $23,25\pm 4$, *C.limonum* 50% $21,417\pm 4,52$ sans différences significatives entre ces valeurs indiquant une différence de sensibilité de *S.aureus* a ces différents extraits. Les zones d'inhibition marquées par *C.sinensis* 50% $19,25\pm 3,79$ qui dépasse significativement celle de l'amoxicilline $17,5\pm 2,71$ n'est pas aussi négligeable.

Discussion

S.aureus révèle une sensibilité extrême *C.limonum* pure et dilué à 50% et au *C.sinensis* pure. Cette sensibilité diminue légèrement par la dilution de *C.sinensis* à 50%, mais dépasse de loin la sensibilité de la même souche à l'ampicilline qui semble développer une grande résistance a cet antibiotique. L'effet antibactérien de *C.limonum* et de *C.limonum* pures ou dilué dépasse d'une façon hautement significative celui des antibiotiques utilisés jusqu'à présent comme traitement model contre les infestations bactériennes.

5.4. Discussion générale

Tableau 15: Diamètres des zones d'inhibition en (mm). Marqué par la sensibilité des différentes souches étudiées aux HEs *C.limonum* et *C.sinensis* pures et diluées à 50%.

	<i>C.limonum</i> pure	<i>C.limonum</i> 50%	<i>C.sinensis</i> pure	<i>C.sinensis</i> 50%	l'amoxicilline /acide clavulanique	Ampicilline
<i>E-coli</i>	15 ± 1^c	$22,971\pm 3,6^a$	$9,25\pm 1,86^e$	$7,25\pm 0,45^e$	$18,167\pm 3,97^b$	$10,75\pm 2,49^d$
<i>Ps.aeruginosa</i>	$7,33\pm 1,07^b$	$8,16\pm 1,33^b$	$9\pm 3,21^a$	$9,5\pm 0,52^a$	$11,5\pm 3,17^a$	$9,083\pm 3,26^a$
<i>S.aureus</i>	$24,16\pm 3,01^a$	$21,41\pm 4,52^a$	$23,25\pm 4^a$	$19,25\pm 3,79^b$	$17,5\pm 2,71^c$	$8,5\pm 2,5^d$

Les diamètres des disques (5mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

(a,b,c ,d,e) sont des groupes homogènes indiquant une différence significative ($P<0.05$)

N = 3, les résultats sont exprimés en moyennes \pm écart type

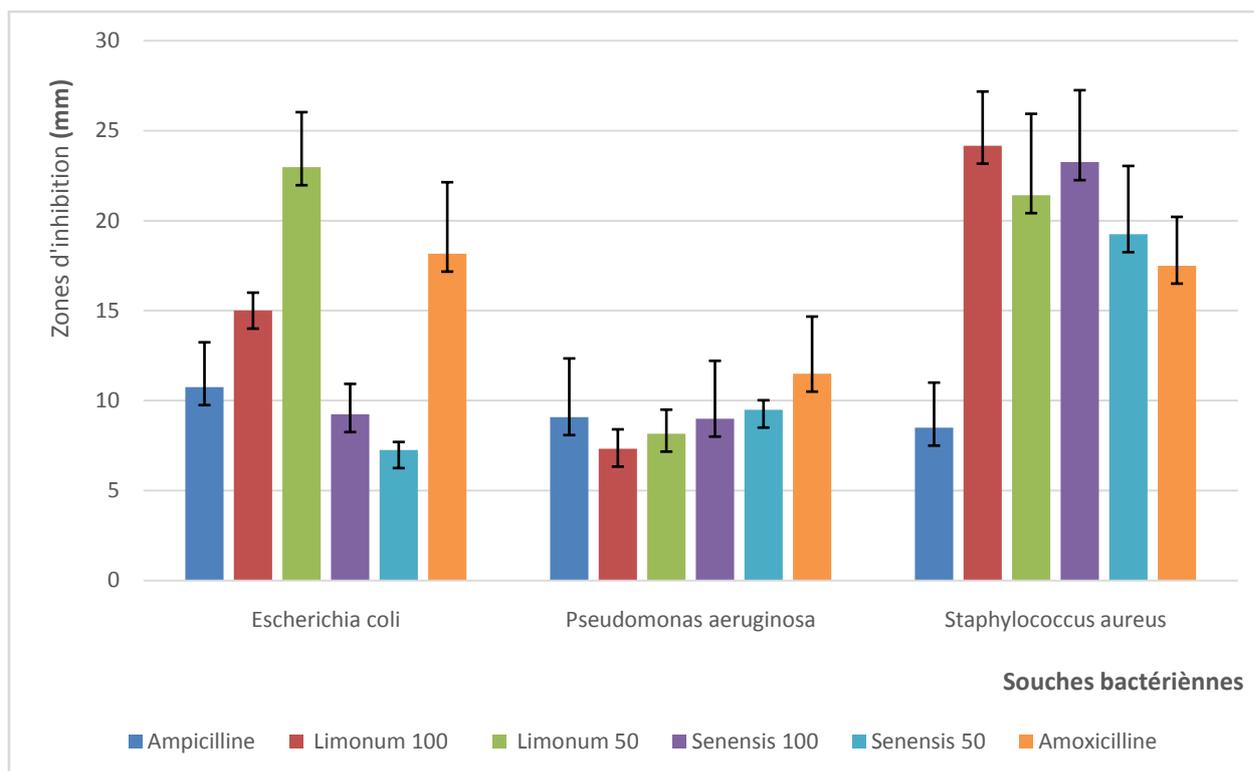


Figure 22 : Comparaison des effets antibactériens de différentes huiles essentielles pures et diluées à l'effet des antibiotiques de référence sur les souches étudiées

L'effet antibactérien de *C.limonum* à 50% s'est révélé très prononcé pour *E. Coli*, dépassant de très loin l'effet bactéricide des antibiotiques de référence, notamment l'amoxicilline/acide clavulanique et l'ampicilline à des degrés inégaux. Par contre l'effet antibactérien du *C.sinensis* pure et dilué à moitié a des effets inhibiteurs à *E. Coli* très intéressants très proches à l'effet de l'ampicilline et très faibles comparés à celui de l'amoxicilline/acide clavulanique.

Pour *Ps. Aeruginosa*, l'effet antibactérien de nos différentes huiles essentielles des citrus, sujet d'intérêt de notre étude pure et diluées s'avère comparable, légèrement inférieur à l'effet bactéricide des antibiotiques de référence longtemps utilisés dans l'antibiothérapie ; ceci est probablement dû à l'antibiorésistance développée par cette souche. Cette résistance qui est déjà mise en évidence par les zones d'inhibitions relevées et faible sensibilité dans les résultats obtenus dans notre étude, présentés plus haut.

La souche *S.aureus* a manifestement développé une très grande résistance à l'ampicilline. Nos huiles essentielles ont marqué un effet antibactérien qui dépasse celui de l'amoxicilline/acide clavulanique et a des degrés inégaux dominés par celui de *C.limonum* et du *C.sinensis* pures

suivi par celui du *C.limonum* et le *C.sinensis* dilués à 50%. L'effet de ces substances naturelles peut être par action libyque ou inhibitrice de cette souche.

D'après les résultats de notre essai, on peut conclure que pour la plus part des souches pathogènes, y compris celle ciblées dans notre étude les huiles essentielles des citrus peuvent être un bon alternatif au antibiotiques de synthèse. Ce dernier peut nous aider à lutter contre les problèmes d'antibiorésistance, qui diminuent la crédibilité et la fiabilité des traitement antibiotique, et nous aide aussi à éviter les effets secondaires de la consommation accrue des antibiotiques de synthèse.

Conclusion et discussion

5.5. Conclusion générale

Les HEs sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes très intéressantes à mettre à profit dans les traitements antibiotiques. Il semble que les HEs de Citrus sont riches en composés monoterpéniques dominés par la présence du limonène (51,355%), β -pinène (17,041%) et γ -terpinène (13,462%) pour l'H.E de *C.limonum*. L'H.E de *C. sinensis* est de limonène (77,370%). Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence les activités antibactériennes des HEs de Citrus étudiées. Ainsi, les HEs de *C. limonum* ont exercé une importante activité antibactérienne à l'encontre de *S.aureus* par rapport à l'H.E de *C.sinensis*. Nous avons constaté que la sensibilité de *S.aureus* est plus accentuée avec l'HE de *C. limonum* qu'avec l'HE de *C.sinensis*. En revanche les bactéries à Gram négatives à savoir *E. coli*, et *Ps. aeruginosa* ont manifesté une résistance à l'égard de ces HEs plus au moins importante. Les résultats des tests de l'application des HEs (*C.sinensis* et *C. limonum*) sur nos souches cibles *E. coli*, *Ps. Aeruginosa*, *S. aureus*.

Se sont révélés très intéressante par son pouvoir antibactérien. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'HEs des citrus semble être plus appropriée d'agent naturel antibactérien dans la prévention et la guérison des infections bactériennes. De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée de l'activité antibactérienne non seulement sur les HEs utilisées seules ou leurs composants majoritaires, mais également en mélange, permettant ainsi une éventuelle synergie. Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité ou non des HEs des Citrus. L'utilisation des huiles essentielles comme alternatif aux antibiotiques de synthèse, dont la majorité des bactéries pathogènes ont développé une résistance, chose qui a réduit leurs efficacités a la lutte contre la propagation des infestations bactériennes. Donc l'utilisation des HEs pourrait être envisagée dans le domaine pharmaceutique et médical.

Références bibliographiques

6. Références bibliographiques

- [1] Peña L., Cervera M., Fagoaga C., Romero J., Juárez N.J., Pina J.A. et Navarro L. (2007). Citrus. Biotechnology in agriculture and forestry. 60 Transgenic crops, Volume 5, ed. T Nagata., H. Lorz and JM widholm.
- [2] Ed., Praloran J.C. (1971). Les agrumes. Techniques Agricoles et productions Tropicales.G.P. Maison neuve et Larose. 565p.
- [3] Praloran C. (1971). Les agrumes. Ed. éditeur 8348, Paris, n° 5, p. 25.
- [4] MEDJEDOU B F.(1996).Biologie de l'aleurode floconneux, Aleurothrixus floccosus Maskell (Homoptera, Aleurodidae) dans un verger d'agrumes de la région de Draâ Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Magistère en Biologie & Ecologie des Populations. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 73.
- [5] GUIGNARD J.L. (2001). Botanique, Systématique moléculaire. Ed. Masson, 290.
- [6] Franck Curk, Frédérique Ollitraul, Andres Garcia-Lor, François Luro, Luis Navarro, Patrick Ollitraul, « Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers », Annals of Botany, vol. 117, no 4, ,(2016) **lirva re1 .583-565 .p**
- [7] Marie-Françoise Valéry, Alain Le Toquin, Jardins du Moyen Age, Dexia,(2001), p. 15.
- [8] Joëlle Bahloul, Le culte de la table dressée, A.-M. Métailié, 1983, p. 131.
- [9] Débuigine G. et Couplan F.,(2008). Petit Larousse des plantes qui guérissent.Ed : Larousse, Paris, 895p.
- [10] Dubois C., (2006). Les arbres fruitiers Ed et Rustica, Paris, 127p.
- [11] Loussert R., (1989). Les agrumes (1 Arboriculture). Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris, France. 177P.
- [12] Bärtels A, (1998) : Guide des plantes du bassin méditerranéen. Ed Eugen Ulmer, 5. Paris. France. 432P.
- [13] Paris M. et Murabielle H., (1981). Abrégés de matière médicale pharmacognosie, Tome I, édition Masson, Paris, pp 181-194.
- [14] BLANCKE, R., (2001). Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed: Eugen. ulmer, paris 288 p
- [15] Rebour H., (1950). Les agrumes en Afrique de NORD, union des syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, pp 498-502.
- [16] Medjdoub J C., 2002. Reconnaissance visuelle de quelques variétés d'agrumes- CNCC juin.
- [17] OMS.,(2002).Organisation mondiale de la Santé.
- [18] results, FAO. (2015).Food Agriculture Organization. Data base et ST:, FAO.
- [19] Nabil BOUSBIA: Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires, Autre. Université d'Avignon, (2011). Français. NNT: 2011AVIG0243
- [20] VALNET, J. (2001). La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot.France.P274
- [21] Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. (1996). Fruit. In "Food composition and nutrition tables". Ed.
- [22] Bousbia, N. (2011).Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires.Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 128p.

- [23] **Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M.T., Porras, I. et Ferreres, F. (2004).** Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon*(L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *J. Agric. Food Chem*, 52: 324–331.
- [24] **Yavari kia, P., Safajou, F., Shahnazi, M. et Nazemiyeh, H. (2014).** The effect of lemon inhalation aromatherapy on nausea and vomiting of pregnancy: a double-blinded, randomized, controlled clinical trial. *Iran Red Crescent Med J*, 16 (3).
- [25] **Alain Blondy, Louis Savoye, Joseph Nicholas Savoye,** *Le commerce des oranges entre Malte et la France au xviiiè siècle*, Éditions Bouchene, (2003), p. 13.
- [26] **Loussert, (1987).** *Les agrumes, l’arboriculture*. Ed. Lavoisier, Vol.1, Paris, 80P.
- [27] **Judd W. S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P. (2002).** *Botanique systématique une perspective phylogénétique*. Edition De Boeck université.sa, Paris, p.333.
- [28] **MABBERLEY D.J., 2008.** *Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications and uses, third edition*. Cambridge University Press. 1040 p.
- [29] **Hendrix C. M., and Redd J. B., (1995).** *Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products*. In: Ashurst, P. R. (Ed.). *Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages*. Blackie Academic et Professional: 53-87.
- [30] **Farnworth E. R., Lagacé M., Couture R., Yaylayan V., and Stewart B., (2001).** Thermal processing, storage conditions and the composition and physical properties of orange juice. *Food Research International*, 34 (1): 25-30.
- [31] **Spren T. H., (2001).** *Projections de la production et de la consommation mondiales d’agrumes en 2010*. Symposium sur les agrumes, Chine/FAO.
- [32] **MÖLLER K., (2008) :** *La distillation à l’alambic, un art à la portée de tous*. Editorial UNICO. 152 P.
- [33] **Baser K.H.C. and Buchbauer G.,(2010).** *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
- [34] **Besombes C. (2008).** *Contribution à l’étude des phénomènes d’extraction hydrothermomécanique d’herbes aromatiques. Applications généralisées*. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle. p :.41-45,
- [35] **Cazau-Beyret, N. (2013).** *Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie*. Thèse pour le diplôme d’état de docteur en pharmacie. Université Toulouse III sabatier. 194p.
- [36] **Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. (1988).** *Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie*. In *Information chimie*, 229 pp. 179-184.
- [37] **Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., (2008).** *Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles*. Atelier santé environnement -IGS- EHESP. Thèse de Génie sanitaire.
- [38] **Guenther E., (1948).** *The Essential Oils -:* D. Van Nostrand Co., New York,.
- [39] **Bruneton J., (1993).** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, Tec &Doc*. Lavoisier, Paris, 2ème édition, 915 p.,465p
- [40] **Charpentier B., Hamon-Lorleach F., Harlay A., Huard A., Ridoux L et Chanselle S., (2008).** *Guide du préparateur en pharmacie*. 3eme édition. Elsevier Masson, 1358.
- [41] **Croteau R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000).** *Natural products (secondary metabolites)*, in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA, pp. 1250–1268.
- [42] **Carson C. F. et Hammer K. A., [2011].** *Chemistry and Bioactivity of Essential Oils*. In Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. United Kingdom : John Wiley et Sons Ltd. pp. 204-238.

- [43] **MANN J. (1987)**, Secondary metabolism. Second edition, Clarendon press, Oxford, p.374.
- [44] **Goris A. (1967)**. Manuel de botanique. Ed. Clin. pp.,265-268
- [45] **Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F.(2010)**. Citrus d'Algérie :les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.
- [46] **Teisseire P J. (1991)**. Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 480p.
- [47] **Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Dugo P., Dugo G. (2005)**. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. Flavour and Fragrance Journal., 20(2), pp.136-140.
- [48] **Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M. & Ohta H., (2006)**. Flavonoid composition of fruit tissue of citrus species. Bioscience biotechnology and biochemistry, 70 (1), 178-192.
- [49] **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.
- [50] **Bruneton, J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3ème Edition Lavoisier, Paris. 1120p.
- [51] **Pibiri M.C., (2006)**. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.
- [52] **Smith D. C., Forland S., Bachanos E., Matejka M. & Brrett V. 2001**. Quantitative analysis of Citrus fruits extracts by GC/MS. An undergraduate experiment. Chemical Educator. 28-31.
- [53] **Gauriat, E. (2015)**. Accompagnement d'une rééducation physique post-traumatique par l'aromathérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges. 150p.
- [54] **Faucon, M. (2015)**. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.
- [55] **Muther, L. (2015)**. Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université d'Auvergne. 156p.
- [56] A critical review on the chemical composition of Citrus oils. Perfum Flavor, 16(2), 17-34.
- [57] **Besombes C. (2008)**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289 p.
- [58] **Olle M. and Bender I., (2010)**. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. Agronomy Research 8 (3), pp.687-696.
- [59] **Aprotosoie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U.(2010)**. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). FARMACIA, 58 (1). pp. 53-54.
- [60] **Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. (1999)**. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86,(6), pp. 985-990.
- [61] **Bernadet M (1983)**. Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles, Eds. Dangles, France. 384 p.
- [62] **Robert A. et Lobstein A., (2005)**. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- [63] **Grysole J. (2005)**. La commercialisation des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139.162.

- [64] **Aprotosoae A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. (2010).** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 53-54.
- [65] **Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86,(6), pp. 985-990.
- [66] **Conner D. E., (1993).** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. et Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.
- [67] **Bisignano G., Cimino F., Saija A. (2011).** Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Groupe. pp 529-548
- [68] **Himed L. (2011).** l'activité antioxydante des HE de Citrus limon : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Ment – Constantin 65p.
- [69] **Yaacoub R., Tlidjane I., (2017).** Caractérisation physico-chimiques et analyses biologique de l'huile essentielle des grains de *Cuminum cyminum* L. et de *Foeniculum vulgare* Mill. Extraite par hydro distillation et CO₂supercritique : étude comparative. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en génie chimique. Université Larbi Ben M'hidi Oum el Bouaghi, 84p.
- [70] **Mengal P. et Mompon B., (1996).** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet Européen, EP 698 076 B1.
- [71] **Desmares, C., Laurent, A., et Delerme C. (2008).** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p
- [72] **Peyron L. et Richard H., (1992).** Extraction des épices et herbes aromatiques et différents types d'extraits. *Epices et aromates*. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris. 108p.
- [73] **Crouzet J., (1996),** Arômes alimentaires. *Techniques de l'ingénieur*, F 4 100, Paris,.
- [74] **Solene, J. (2012).** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. 142p.
- [75] **Franchomme P., Pénoel D., (1990).** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger jallois édition. Limoges, 445p.
- [76] **Dallel, Mohamed. (2010).** Isolement et élucidation structurale d'une flavanone, d'un acide phénolique et d'un hétéroside stéroïdique des fleurs de la plante *Anacyclus cyrtolopidioides* (Pomel). 10.13140/2.1.4260.0320.
- [77] **Basil A, Jimenez-carmonna M.M. & Clifford A.A., (1998),**Extraction of rosemary by superheated water. *Journal of food chemistry*,p:5205-5209.
- [78] **Fillatre Y. Produits phytosanitaires., (2011):**Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat (volume 1), université d'Angers, France. 266 p..
- [79] **Tranchida P. Q., Dugo P., Mondello L., Dugo G. (2011).**Advanced Analytical Techniques for the Analysis of Citrus Oils In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Group. pp. 477- 511.
- [80] **Paris R., Godon M. (1979).** Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- [81] **Bayala, B. (2014).** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et

- de.glioblastomes. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur d'université. Université Blaise Pascal. 141p.
- [82] **Miguel, M.G. (2010)**. Antioxidant and anti-Inflammatory activities of essential oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252 - 9287.
- [83] **Skold M, Karlberg AT, Matura M, Borje A., (2006)**. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem Toxicol* 44: 538–545.
- [84] **Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003)**. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36(3), 162- 167.
- [85] **Ngassapa, O., Runyoro, D. K. B., Harvala, E., & Chinou, I. B. (2003)**. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia javanica* (Burm.F.) Spreng (Verbenaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 18, 221- 224.
- [86] **Cheng, S. S., Liu, J. Y., Tsai, K. H., Chen, W. J., & Chang, S. T. (2004)**. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4395–4400.
- [87] **KOBA K., SANDA K., RAYNAUD C., NENONENE Y.A., MILLET J. & CHAUMONT J.P. (2004)**. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148,202-206.
- [88] **Vokou D., Kokkini S. et Bressiere J.M., (1988)**, *Origanum onites* (Lamiacée) in Grèce Distribution, volatile oil yield, and composition, *Economy botanic*. 42, p. 407-412.
- [89] **FISHER K. & PHILLIPS C. (2008)**. Potentiel antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer ? A review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164.
- [90] **Pauli, Alexander. (2001)**. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*. 11. 126-133. 10.1016/S0962-4562(01)80048-5.
- [91] **E. GUINOISEAU, (2010)**. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse pour l'obtention du grade de Docteur, Mention : Biochimie -Biologie moléculaire, Université De Corse-Pasquale Paoli.
- [92] **Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (2001)**. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.*, 18(4), pp. 463–70.
- [93] **Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. et Micieli D. (2007)**. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 6300-6308.
- [94] **Burt, S., (2004)**. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- [95] **Mehraz, Fès., K, Rhayour. s.l. (2002)** : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar . Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat, Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé
- [96] **Jacob M., Pellecier J., Tomei R. (1979)**. Centre régional d'étude et de 63 développements des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30.
- [97] **Bachiri L., Echchegadda G., Ibijbijen J., Nassiri L. (2016)**. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc : « *Lavandulastoechas* L. et *Lavanduladentata* L. ». *European Scientific Journal*.

- [98]Cornet F. (1981). L'aromatogramme. *Phytomédecine*, 1et 2, 109-117.
- [99]Conner D. E., Beuchat L. R. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49, pp. 429–434.
- [100]Chao S.C., Young D.G., Oberg G.J. (2000). Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res*, 12: 639-649.
- [101]Wilkinson J M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII.pp.157- 165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag Gmb H & Co. KGaA, Weinheim 405p.
- [102] Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Kameli A., Saidi F., Taibi H., Djamel T.(2014). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential application of (*Thymus vulgaris* L.) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]. *International Journal of Innovation and Applied St* 8,1418.
- [103]Lausanne., 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.
- [104] ZAIKA L.L., (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Nutr*. Vol. 9, pp : 97 – 118.
- [105] Barnard J et Alain R.(2002). *Entérobactéries systématiques et méthodes de diagnostic*. paris., P28
- [106]Pillet J., L.Bourdo B., Toma N., Ball.c.(1986). *Bactériologie médicale et vétérinaire*.
- [107]Olin Tudge.(2000). *The variety of live*, oxford university press.
- [108]Françoise Nau ., Catherine Guérin-Dubiard ., Florence Baron ., Jean Louis Thapon. (2010). *Science et technologie de l'œuf*. volume 2 de l'œuf aux ovoproduit. ed TEC&DOC.
- [109]Devriese L.A, Vancnnyat M., Baele M., Vanechoutte M., DE Graf E.,Snauwaert C., Cleenwerck I., Fawynot P., Swincs J., Decostre A et Haesebrouck F. (2005). *Staphylococcus pseudointermedius* sp ; a coagulase positive species from animals. *International Journal of Evolutionary Microbiology*, 55, 1569-1573. .
- [110]Bedoui H et P03, Benhammadi Z et Nacer N (2005-2006) *Projet de résistance de Staphylococcus aureus aux antibiotiques ou secteur sanitaire de Ghardaïa*. Diplôme supérieur en Microbiologie université de KasdiMerbah Ouargla.
- [111]Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, et al. (2003). "Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8484-8489.
- [112]AFNOR, (2000), *Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles*, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris.
- [113]Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.
- [114]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.
- [115]SAS. *Statistical analysis systems user's guide*: version 9.2. 2nd édition, SAS Institute, Inc., Cary, NC, 2008.
- [116]Anton R et Silano V., (2001). *Pants in cosmetics*, Volume II, edition Conseil de l'Europe, Allemagne, pp 41-43.
- [117]Jeannot V., Chahboune J., Russell D. et Baret P. (2005). Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange

blossam water (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium*). International journal of aromatherapy, 15 (2), pp 94-97.

- [118] **Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J.& Rosalia F., (2008).** Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essence on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent American Foulbrood. World journal of microbiology and biotechnology, pp; 2067-2072.
- [119] **Kelen M. & Tepe B., (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. Bioresource technology, 99, pp 4096-4104.
- [120] **Cox S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G.,(2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology. vol 88, p170–175.