

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 والحياة**

DÉPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

ALLALI Fatima Zohra

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Spécialité : Production végétale

Thème

**Effet d'huile essentielle de l'écorce de
citron sur l'activité antimicrobienne**

Devant Le Jury :

Président : Dr Benouadah Salima (MCB) Université de Mostaganem

Examineur : Dr Saiah Farida (MCB) Université de Mostaganem

Encadreur : Dr Adjoudj Fatma (MCA) Université de Mostaganem

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Le premier de mes remerciements va au bon Dieu miséricorde qui m'a donné santé, courage, volonté et patience pour réaliser ce travail.

Je remercie infiniment mon promoteur de mémoire Dr Adjoudj Fatma (MCA) à l'Université de Mostaganem, pour sa patience, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation du présent travail.

Je tiens aussi à remercier Dr Benouadheh Salima (MCB) à l'Université de Mostaganem, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie vivement Dr Saiah Farida (MCB) à l'Université de Mostaganem d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je remercie aussi Monsieur ABAIDI Ahmed pour avoir accepté que je réalise certaine analyse au niveau du laboratoire des sciences biochimie¹ et microbiologie ¹

A toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin.

Fatima Zohra

Dédicaces

Je dédie ce travail

*Avec grand amour, Sincérité et fierté aux êtres les plus chères aux
monde mes parents*

*Pour tous les efforts, les conseils, qu'ils ont consentis afin de me voir
réussir.*

*Je vous dédie ce travail, Puisse Dieu, vous préserver et vous accorder
santé, longue vie et bonheur.*

*A mes chers frères **Mohamed, Abdou, Sid Ahmed et Ismail** et ma sœur
qui est le plus chère, Je vous exprime à travers ce travail mes
sentiments de fraternité et d'amour.*

*A mes chères amies, **Hanani, Hanane, iman, Hanna, roubi et Wiam**, je
vous remercie pour vos motivations et encouragements. Je vous dédie
ce travail et vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*À toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu ou encouragé au long de
mes études.*

Enfin, à tous ceux qui m'aiment et qui ont une place dans mon cœur.

Fatima Zohra

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des Tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	01
Chapitre: les agrumes	
1.1 Généralités sur les agrumes.....	03
1.2 Généralités sur les plantes aromatiques.....	04
1.3 citrus limon.....	04
1.3.1 Généralités.....	04
1.3.2 Composition chimique.....	04
1.3.3 propriétés biologique	05
1.3.4 La systématique botanique de citron	05
1.3.5 les caractéristiques morphologiques.....	06
1.4 zones de cultures de citron.....	08
1.5 rendement de cultures de citron.....	08
1.6 les facteurs influencent du rendement	08
Chapitre 2 : les huiles essentielles	
2.1 définition des huiles essentielles.....	08
2.1.1 définition générale.....	09
2.1.2 définition selon AFNOR NF T 75-(1998).....	09
2.1.3 définition selon pharmacopée Européenne.....	09
2.1.4 définition selon OFSP (2009).....	09
2.2 les propriétés des huiles essentielles	10
2.2.1 propriétés physiques des huiles essentielles.....	10
2.2.2 propriétés chimique	10
2.2.3 propriétés thérapeutiques et application.....	11
2.3 technique d'extraction des huiles essentielles.....	12
2.4 Répartition et localisation.....	13
2.5 Stockage des HE dans la plante de citron.....	14
2.6 Rôle physiologique de HE chez la plante.....	15
2.7 HE du citron et sa composition.....	15

Chapitre 3 :L'activité microbienne

3.1	Généralité.....	17
3.2	la résistance bactérienne à l'antibiotique	17
3.3	la synergie entre HE ET ANTB.....	17
3.4	Activité antimicrobienne des HE.....	18

Matériel et méthodes

1	Objectif de travail.....	19
2	lieu et période de travaille	19
3	Matériel végétale.....	19
4	Extraction de HE.....	20
4.1	Extraction par HD.....	20
4.2	Plant d'extraction.....	21
5	Le rendement.....	21
6	L'activité microbiologique.....	22
6.1	les souches microbiennes	22
6.2	les champignonnes utilisés.....	24
7	vérification de la pureté des souches.....	25
7.1	Aspect macroscopique.....	25
7.2	Aspect microscopique.....	25
7.3	coloration de gram.....	25
8	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	25
8.1	Méthodes de diffusion sur disque (aromatogramme)	25
8.2	détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	30

Chapitre 5 : Résultats & Discussion

5.1	Détermination du rendement d'extraction.....	30
5.2	Etude d 'activité microbienne de HE.....	30
5.2.1.1	les zones d'inhibition après 48 H.....	33
5.2.1.2	diamètres des zones d 'inhibition après 24 H.....	33
5.3	la détermination des concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	36
	Conclusion.....	37

Références bibliographique

Annexe

Résumé :

Cette étude se concentre sur l'analyse des huiles essentielles extraites des écorces de citron (*Citrus limon*) provenant de la wilaya de Mostaganem, en Algérie. La méthode d'extraction utilisée est la distillation à la vapeur, qui a permis d'obtenir un rendement de 30 ml d'huiles volatiles. Cette technique est largement reconnue pour sa capacité à préserver les composés bioactifs des plantes. Les analyses physico-chimiques effectuées sur les huiles essentielles ont révélé que leurs caractéristiques (telles que la densité, l'indice de réfraction et la composition chimique) respectent les normes internationales établies par l'AFNOR, garantissant ainsi la qualité et la pureté des extraits. Pour évaluer l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles, des tests ont été réalisés sur trois souches bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Les résultats des tests de diffusion en milieu gélosé ont montré une activité inhibitrice significative contre ces bactéries, indiquant le potentiel des huiles essentielles de citron comme agents antimicrobiens naturels. Cette efficacité peut être attribuée à la présence de composés bioactifs tels que le limonène et le citral, connus pour leurs propriétés antibactériennes. En outre, des analyses complémentaires ont été menées pour évaluer les propriétés anti oxydantes des huiles essentielles, révélant également un potentiel intéressant pour leur utilisation dans les domaines de la conservation alimentaire et de la cosmétique. Ces résultats soulignent non seulement l'importance des huiles essentielles de citron dans la médecine alternative, mais également leur potentiel d'application dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique.

Mots-clés : citron, huiles essentielles, efficacité antibactérienne, propriétés anti oxydantes.

Summary:

This study focuses on the analysis of essential oils extracted from lemon peels (*Citrus Limon*) sourced from the Mostaganem province in Algeria. The extraction method used was steam distillation, yielding 30 ml of volatile oils. This technique is widely recognized for its ability to preserve the bioactive compounds in plants.

Physicochemical analyses performed on the essential oil revealed that their characteristics (such as density, refractive index, and chemical composition) comply with international standards established by AFNOR, ensuring the quality and purity of the extracts. To evaluate the antibacterial efficacy of the essential oils, tests were conducted on three bacterial strains: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The Results from agar diffusion tests showed significant inhibitory activity against these bacteria, highlighting the potential of lemon essential oils as natural antimicrobial agents. This effective essisat tribute to the presence of bioactive compounds such as limonene and citral, known for their antibacterial properties. Additionally, complementary analyses were conducted to assess the antioxidant properties of the essential oils, revealing further potential for use in food preservation and cosmetics. These results emphasize not only the importance of lemon essential oils in alternative medicine but also their potential applications in the agro-food and pharmaceutical industries.

Keywords: lemon, essential oils, antibacterial efficacy, antioxidant properties.

الملخص:

تركز هذه الدراسة على تحليل الزيوت الأساسية المستخلصة من قشور الليمون من ولاية مستغانم في الجزائر. تم استخدام طريقة الاستخلاص بالتقطير بالبخار، مما أسفر عن الحصول على 30 مل من الزيوت الطيارة. إذ تُعدّ هذه التقنية من التقنيات معروفة على نطاق واسع بقدرتها على الحفاظ على المركبات النشطة بيولوجيًا للنباتات، كما كشفت التحليلات الفيزيائية والكيميائية للزيوت الأساسية أن خصائصها (الكثافة، معامل الانكسار، والتركيب الكيميائي) تتوافق مع المعايير الدولية التي وضعتها **AFNOR**، مما يضمن جودة ونقاء المستخلصات ولتقييم الفعالية المضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية، أُجريت اختبارات على ثلاث سلالات بكتيرية (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)) وأظهرت نتائج اختبارات الانتشار في وسط الأجار نشاطًا تثبيطيًا كبيرًا ضد هذه البكتيريا، مما يبرز إمكانيات زيوت الليمون الأساسية كمضادات ميكروبية طبيعية. يمكن عزو هذه الفعالية إلى وجود مركبات نشطة بيولوجيًا مثل الليمونين والسينترال المعروفة بخصائصها المضادة للبكتيريا. علاوة على ذلك، تم إجراء تحليلات إضافية لتقييم الخصائص المضادة للأوكسدة للزيوت الأساسية، مما كشف أيضًا عن إمكانيات واعدة لاستخدامها في مجالات حفظ الأغذية ومستحضرات التجميل. إذ تؤكد هذه النتائج على أهمية زيوت الليمون الأساسية في الطب البديل، إضافة إلى إمكاناتها في التطبيقات الصناعية الغذائية والصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: الليمون، الزيوت الأساسية، الفعالية المضادة للبكتيريا، الخصائص المضادة للأوكسدة.

Liste des abréviations

Mm	: Millimètre
HE	: Huile essentielle
HD	: Hydro- distillation
Ms	: Matière sèches
<i>E. Coli</i>	: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>S . aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas</i> ATCC 27853
<i>C. freundii</i>	: <i>freundii</i> ATCC 13316
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231
AFNOR	: Agence française de Normalisation
D	: Densité
T	: Température
DMSO	: Diméthyle sulfoxyde

Liste des figures

Figure 01	: Photo de citron (internet).....	08
Figure 02	: Photo d'huile de citron (internet).....	12
Figure 03	: Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation (internet).....	12
Figure 04	: Photo de distillateur (Hydro-Distillation).....	13
Figure 05	: Coupe transversal de l'épiderme de citron (originale)	15
Figure 06	: Les citrons utilisés (photo originale).....	19
Figure 07	: Hydro distillateur de type Clevenger (figure originale).....	20
Figure 08	: La bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300.....	21
Figure 09	: La bactérie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (photo originale).....	23
Figure 10	: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 (photo originale).....	23
Figure 11	: Les suspensions bactériennes.....	25
Figure 12	: La méthode d'ensemencement des boîtes.....	27
Figure 13	: Principe de la méthode de diffusion par disque.....	28
Figure 14	: Méthode de détermination de la CMI par une microplaque (figure originale).....	29
Figure 15	: La méthode de détermination de la CMI par une microplaque.....	31
Figure 16	: L'huile essentielle de citron (photo originale).....	31
Figure 17	: test de l'activité antimicrobienne de HHs de citron sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 27922. (1-2 -3).....	32
Figure 18	: test de l'activité antimicrobienne d'HE de citron sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	32
Figure 19	: test de l'activité antimicrobienne d'HE de citron sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 4330.....	33
Figure 20	: Test de l'activité antimicrobienne d'HE de citron sur <i>Citrobactère freundii</i> ATCC 13316.....	34
Figure 21	: Test de l'activité antimicrobienne d'HE de citron sur <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	34
Figure 22	: La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'écorces de citron.....	38

Liste de tableaux

Tableau 01	: La composition biochimique moyenne du citron.....	05
Tableau 02	: Les caractéristiques morphologiques de citron.....	07
Tableau 03	: Sensibilité des souches bactérienne en fonction Zone d'inhibition.....	30
Tableau 04	: Rendement d'extraction	32
Tableau 05	: Diamètres des zones d'inhibition après 24 h.....	35
Tableau 06	: La sensibilité des souches bactérienne	36
Tableau 07	: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'huile essentielle d'écorces de citron.....	39

INTRODUCTION

Introduction

L'huile essentielle de citron, extraite des zestes du Citrus limon, est largement utilisée dans divers domaines industriels et thérapeutiques en raison de ses propriétés aromatiques et de ses bénéfices pour la santé. Son processus d'extraction est crucial pour garantir la qualité et la pureté de l'huile obtenue. Parmi les méthodes d'extraction les plus couramment utilisées, la distillation à la vapeur d'eau est largement préférée pour son efficacité à conserver les composés volatils du citron. Cette méthode a été étudiée en détail pour optimiser les paramètres de température, de pression et de durée afin d'obtenir un rendement maximal en huile de citron tout en préservant ses composés actifs. Des études telles que celle de **(Boz et al. 2014)** ont examiné l'effet de différents facteurs de distillation sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle de citron. Leurs résultats ont montré que des températures de distillation plus basses et des durées plus courtes conduisent à une meilleure préservation des composés volatils, notamment du limonène, principal constituant de l'huile de citron.

Outre la distillation, l'extraction par pression à froid est également utilisée, en particulier dans les petites exploitations ou pour une production artisanale. Cette méthode, bien que moins efficace en termes de rendement que la distillation, est appréciée pour sa simplicité et sa capacité à produire une huile de citron de haute qualité, comme souligné par **(Juteau et al.,2002)** dans leur étude sur les huiles essentielles de citron biologique. La composition chimique de l'huile essentielle de citron varie en fonction de nombreux facteurs, notamment la variété de citron, les conditions de croissance, la méthode d'extraction et les conditions de stockage. Des études comme celle de **(Verzera et al.,2003)** ont analysé la composition chimique de différentes variétés de citron et ont identifié des variations significatives dans les profils aromatiques des huiles obtenues. En outre, l'utilisation de l'huile essentielle de citron dans diverses applications thérapeutiques et cosmétiques a été largement étudiée. Des travaux tels que ceux de **(Han et al.,2016)** ont examiné les effets antibactériens et antioxydants de l'huile essentielle de citron, soulignant son potentiel en tant qu'agent antimicrobien et agent de préservation dans les produits de soins personnels

Notre travail vise à estimer l'extraction de l'huile essentielle de l'écorce de Citrus limon par hydro-distillation, ainsi qu'à évaluer ses activités antimicrobiennes. Ce mémoire est structuré en deux parties principales :

Introduction

La première partie théorique consiste en une revue de la littérature où nous abordons des généralités sur les agrumes, les huiles essentielles et leurs activités biologiques, ainsi qu'une monographie de Citrus limon.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale de notre recherche. Nous y détaillons les méthodes utilisées pour l'extraction, l'effet de l'huile essentielle de l'écorce de citron sur les bactéries phytopathogènes, ainsi que les résultats obtenus et leur interprétation. Enfin, nous concluons par une synthèse générale de nos findings.

*Revue
bibliographique*

1.1 .Généralités sur les agrumes

Les agrumes, membres de la famille des rutacées, dont la hauteur varie de 2 à 10 mètres, présentent des troncs relativement courts et un feuillage dense et persistant, à l'exception du genre *Poncirus* où le feuillage est caduc (**Barboni, 2006; Ramful et al., 2011**). Leurs écorces sont particulièrement riches en composés phénoliques, principalement des flavonoïdes, reconnus pour leurs propriétés antioxydants, thérapeutiques, antivirales, antifongiques et antibactériennes (**Bocco et al., 1998; Ma et al., 2009; Huang et al., 2010**). Actuellement, il existe plus de 900 variétés d'agrumes. Parmi celles-ci, l'orange et le citron se distinguent par leur richesse en vitamine C et par la présence significative de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les caroténoïdes (**Del Rio et al., 2004**)., sont parmi les fruits les plus largement cultivés et consommés dans le monde. Leur importance économique et nutritionnelle en fait un sujet d'intérêt majeur pour la recherche scientifique et l'industrie agroalimentaire. Les agrumes sont appréciés pour leur saveur distinctive, leur richesse en vitamines et en composés phytochimiques bénéfiques pour la santé.

Les principaux agrumes cultivés à l'échelle mondiale comprennent le citron (*Citrus limon*), l'orange (*Citrus sinensis*), la mandarine (*Citrus reticulata*), le pamplemousse (*Citrus paradisi*), la lime (*Citrus aurantiifolia*) et le citron vert (*Citrus latifolia*). Chaque variété présente des caractéristiques uniques en termes de goût, de couleur, de texture et de composition chimique.

L'une des caractéristiques les plus remarquables des agrumes est leur teneur élevée en vitamine C (acide ascorbique), un puissant antioxydant essentiel au maintien d'un système immunitaire sain et à la prévention des maladies chroniques. En plus de la vitamine C, les agrumes contiennent une gamme de composés phytochimiques tels que les flavonoïdes, les limonoïdes et les caroténoïdes, qui ont démontré des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire, le système immunitaire et la prévention du cancer.

L'industrie des agrumes comprend plusieurs secteurs, notamment la production agricole, la transformation alimentaire, l'industrie des boissons et l'aromathérapie. Les agrumes sont utilisés pour produire une gamme diversifiée de produits, tels que les jus de fruits, les huiles essentielles, les confitures, les confiseries, les produits de soins personnels et les produits de nettoyage ménager.

La recherche scientifique sur les agrumes couvre un large éventail de domaines, notamment la génétique et l'amélioration des plantes, la physiologie végétale, la chimie des composés bioactifs, la technologie alimentaire et la santé publique. Des études telles que celles de (Khan et al. 2014) ont examiné les effets bénéfiques des agrumes sur la santé humaine, tandis que d'autres travaux, comme ceux de (Talon et al. 2008), se sont concentrés sur la génétique et la biologie moléculaire des agrumes.

1. 2.Généralités sur les plantes aromatiques :

Les plantes aromatiques sont des plantes riches en huiles essentielles qui dégagent des arômes agréables. Elles sont largement utilisées en cuisine, en médecine, en cosmétique et à des fins décoratives. Voici un résumé des principales caractéristiques et utilisations des plantes aromatiques :

1.3. Citrus limon

1 .3. 1. Généralités

Le citronnier, *Citrus limon*, est originaire d'Asie, plus précisément des régions situées entre l'Inde, le Myanmar et la Chine en Amérique du Nord et du Sud, ainsi qu'en Australie , Il est maintenant cultivé dans le monde entier, notamment dans les régions méditerranéennes, Les principales variétés méditerranéennes de citronnier sont «Verna », «Eureka», «Lisbonne », «Monachello», «Interdonato » et «Lunaris» (Blancke, 2001).

1. 3. 2. Composition chimique :

- **Huiles essentielles** : Présentes principalement dans les écorces, elles contiennent des composés comme le limonène, le β -pinène, et le γ -terpinène.
- **Composés phénoliques** : L'écorce et le jus contiennent des flavonoïdes tels que l'hésperidine et la diosmine, ainsi que des caroténoïdes.
- **Vitamines** : Particulièrement riche en vitamine C (acide ascorbique).

*

Tableau1 : la composition biochimique moyenne du citron

Composition	Teneur
Eau	90 ,20 g/ 100g
Glucides	3 ,16g/100g
Proteines	0,70g/100g
Lipides	0,60g/100g
Acides organiques	4,88g/100g
Fibres alimentaire	0,50g/100g
Les vitamines	51 ,26mg/100g
Les minéraux	211,95mg/100g
Apportés énergétiques	36,48 K calories

1. 3 .3 .Propriétés biologiques :

Antioxydants : Les flavonoïdes et les composés phénoliques présents dans *Citrus limon* sont connus pour leurs propriétés antioxydants, aidant à neutraliser les radicaux libres dans l'organisme.

Antibactériennes : Les huiles essentielles de citron possèdent des propriétés antibactériennes contre diverses souches pathogènes.

Antivirales et antifongiques : Divers composants du citron, y compris les huiles essentielles, ont montré une activité antivirale et antifongique.

Thérapeutiques : Utilisé en phytothérapie pour ses propriétés digestives, antiseptiques et tonifiantes.

1. 3 .4.La systématique botanique du citron :

Nom scientifique : Citrus limon (L.) Osbeck
Règne : Plantae (Plantes)
Division : Magnoliophyta (Magnoliophytes)
Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)
Ordre : Sapindales
Famille : Rutaceae (Rutacées)
Genre : Citrus
Espèce : Citrus limon

1. 3.5. Les caractéristiques morphologiques :

- **Arbre persistant** : Le citron est un arbre à feuilles persistantes, ce qui signifie qu'il conserve ses feuilles toute l'année, contrairement aux arbres à feuilles caduques qui perdent leurs feuilles pendant la saison hivernale.
- **Feuilles ovales** : Les feuilles du citron sont ovales, généralement d'une couleur vert brillant. Elles sont alternes, disposées de manière alternée le long des branches de l'arbre.
- **Fleurs blanches parfumées** : Les fleurs du citron sont petites, blanches et très parfumées. Elles apparaissent à l'aisselle des feuilles et se développent en grappes ou en bouquets.
- **Fruits jaunes** : Les fruits du citron sont des baies globuleuses ou ovoïdes, généralement de couleur jaune à maturité. Ils ont une peau épaisse et rugueuse qui renferme une pulpe juteuse et acidulée ainsi que des pépins.
- **juteuse et acidulée** : La pulpe du citron est juteuse et acidulée, ce qui lui confère son goût caractéristique. Elle est riche en vitamine C et en composés bioactifs.
- **Écorce parfumée** : L'écorce du citron est également parfumée et est souvent utilisée pour aromatiser les plats et les boissons, ainsi que dans la production d'huiles essentielles.
- **Taille de l'arbre** : Les citronniers peuvent varier considérablement en taille, allant de petits arbustes à de grands arbres, selon les conditions de croissance et les pratiques de culture.

Les caractéristiques du citron peuvent être résumées de la manière suivante :

Tableau 2 : les caractéristiques morphologiques de citron

Caractéristique	Description	
Nom scientifique	Citrus limon	
Famille	Rutacées	
Origine	Asie, principalement Inde et Chine	
Forme	Ovale à sphérique	
La couleur	Jaune vif (peau mature), vert (peau immature) (ladanya ,2018 ;Bachés 2011)	
Taille	Varie selon la variété, généralement 5-8 cm de diamètre	
Poids	Environ 50-100 g	
Peau	Rugueuse, épaisse, riche en huiles essentielles	
Pulpe	Juteuse, divisée en segments, généralement acides représente 50% a 80% de fruit (ladanya 2008)	
saveur	Acidulée avec une légère amertume	
L'écorce	<i>épicarpe</i> jaune très remplies d'HE très irrégulière	<i>Mésocarpe</i> couleur blanchâtres épaisseur variable
Richesse nutritionnelle	Vitamine C, flavonoïdes, antioxydants	
Avantage pour la Santé	Renforcement du système immunitaire, propriétés antibactériennes, aide à la digestion	

1.4 . Zones de culture du citron :

Le citron est principalement cultivé dans les régions subtropicales et tropicales du monde, où les températures hivernales ne descendent pas en dessous de 0°C. Des régions comme la Méditerranée, la Californie, la Floride, l'Inde, l'Afrique du Sud, l'Australie et certaines parties d'Amérique du Sud sont des zones de culture majeures pour le citron.

1.5 . Rendement de la culture de citron :

Le rendement varie en fonction de nombreux facteurs, notamment les pratiques culturales, les conditions météorologiques et la variété. En moyenne, un citronnier peut produire entre 150 et 600 fruits par an. Certaines variétés, comme le citron Eureka, ont tendance à produire des rendements plus élevés que d'autres variétés.

1.6. Les Facteurs influençant le rendement :

La gestion des maladies et des ravageurs, la fertilisation appropriée, une irrigation adéquate et la taille et la formation des arbres peuvent tous affecter le rendement. Des techniques de culture spécifiques, telles que la taille régulière et la gestion de la canopée, peuvent être mises en œuvre pour améliorer le rendement.



Figure1 : Photo de citron (internet).

2.1 . Définition des huiles essentielle

2.1.1. Définition générales :

Les huiles essentielles sont des extraits naturels concentrés, volatils et aromatiques dérivés de plantes. Elles sont obtenues par divers procédés d'extraction, tels que la distillation à la vapeur d'eau ou l'expression à froid, et contiennent une complexe composition de composés chimiques issus des parties odorantes de la plante d'origine. Ces composés confèrent aux huiles essentielles leurs arômes caractéristiques et une gamme de propriétés thérapeutiques bénéfiques pour la santé physique, mentale et émotionnelle. Les huiles essentielles sont largement utilisées en aromathérapie, en cosmétique, en parfumerie, ainsi que dans divers produits de bien-être et de nettoyage, pour leurs effets positifs sur le bien-être global et leur polyvalence d'utilisation

2.1.2. Définition Selon AFNOR NF T 75-(1998) :

La norme **AFNOR NF T 75-006 (1998)** définit les huiles essentielles comme des produits odorants, généralement de composition complexe, obtenus à partir d'une matière première végétale définie botaniquement, soit par distillation à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. Les huiles essentielles sont distinctes des concrètes, absolues, hydrolats et huiles exprimées.

2.1.3. Définition Selon pharmacopée Européenne :

Les matières premières végétales peuvent être de divers états tels que frais, flétris, secs, entiers, contus ou pulvérisés, à l'exception des agrumes du genre Citrus qui doivent toujours être utilisés frais. Une huile essentielle est un produit odorant, complexe par sa composition, sécrété par les plantes aromatiques et obtenu à partir de matières premières végétales spécifiquement définies botaniquement. Ce processus peut inclure l'entraînement à la vapeur d'eau, la distillation sèche ou d'autres méthodes mécaniques appropriées sans l'application de chaleur. Habituellement, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des moyens physiques qui préservent sa composition sans altération significative.

2.1.4. Définition selon OFSP (2009) :

L'huile essentielle est décrite par l'Office fédéral de la santé publique (**OFSP, 2009**) comme un extrait naturel obtenu à partir de plantes ou d'arbres aromatiques. Ces extraits, connus sous le nom d'essences, sont constitués de substances aromatiques naturelles produites par des glandes spécialisées présentes dans diverses parties des plantes telles que les fleurs, les feuilles, les tiges, l'écorce, les racines, les fruits ou les graines.

2. 2. Les Propriétés des huiles essentielles :

2. 2.1 .Propriétés physiques des huiles essentielles : Selon (**Bardeau. 1976**), (**Legrand (1978)**), (**Lenberg.1982**), et (**Bruneton.1999**), les huiles essentielles et les essences partagent plusieurs propriétés physiques :

a . Volatilité et Insolubilité dans l'Eau : Les huiles essentielles sont volatiles et insolubles dans l'eau, tout en étant plus légères que celle-ci. Ces caractéristiques facilitent leur séparation dans le vase florentin. La volatilité des huiles essentielles permet également leur diffusion atmosphérique et leur utilisation dans les inhalations.

b. Odeur Caractéristique : Chaque huile essentielle possède une odeur spécifique, déterminée par la concentration en composés oxygénés et aromatiques.

c. Solubilité dans Divers Solvants : Les huiles essentielles sont solubles dans les huiles végétales, qui sont les meilleurs solvants et véhicules pour elles, ainsi que dans les alcools, l'éther et d'autres solvants organiques.

d. Densité : Les huiles essentielles présentent une densité proche de celle de l'eau, variant généralement entre 0,75 et 0,99 g/cm³, ce qui permet leur distillation.

e.Solubilité : Les huiles essentielles montrent une bonne solubilité dans divers solvants organiques, ce qui est utile pour leurs applications variées.

2.2.2. Propriétés chimique :

a- Complexité de la Composition : Chaque huile essentielle est un mélange complexe de nombreux composés chimiques, principalement des terpénoïdes (comme les monoterpènes et sesquiterpènes) et des composés aromatiques (comme les phénylpropanoïdes) (**Bruneton, 1999**).

b- Réactivité : Les composés chimiques dans les huiles essentielles, notamment les terpénoïdes, sont souvent réactifs. Cela leur permet de participer à diverses réactions chimiques, comme l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse, ce qui est essentiel pour leurs propriétés thérapeutiques et aromatiques (**Legrand, 1978**).

c-Antioxydant : De nombreuses huiles essentielles contiennent des composés antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres, ce qui leur confère des propriétés protectrices contre les dommages cellulaires et le vieillissement (**Lenberg, 1982**).

d-Antimicrobien et Antifongique : Beaucoup d'huiles essentielles possèdent des propriétés antimicrobiennes et antifongiques, grâce à des composants comme le thymol, le carvacrol, et l'eugénol, qui peuvent inhiber la croissance de diverses bactéries et champignons (**Bardeau, 1976**).

e-Lipophile : Les huiles essentielles sont lipophiles, ce qui signifie qu'elles ont une affinité pour les lipides et peuvent facilement pénétrer les membranes cellulaires. Cette propriété est cruciale pour leur efficacité en aromathérapie et en cosmétique, car elle facilite l'absorption cutanée et l'interaction avec les structures cellulaires (**Bruneton, 1999**).

f-Solubilité : Bien qu'insolubles dans l'eau, les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques, tels que l'alcool, l'éther, et les huiles végétales. Cela permet leur utilisation dans diverses formulations, comme les parfums, les produits de soin, et les médicaments (**Legrand, 1978**).

j-Stabilité : Les huiles essentielles peuvent être sensibles à la lumière, à la chaleur et à l'air, ce qui peut entraîner une dégradation de leurs composés actifs. Par conséquent, elles doivent être stockées dans des conditions appropriées pour maintenir leur stabilité et efficacité (**Lenberg, 1982**).

k-Propriétés Olfactives : Chaque huile essentielle a une signature olfactive unique, déterminée par ses composés volatils. Ces propriétés olfactives sont largement utilisées en parfumerie, en aromathérapie et dans les produits de bien-être (**Bardeau, 1976**).

Ces propriétés chimiques contribuent aux vastes applications des huiles essentielles dans le domaine médical, cosmétique, alimentaire, et aromathérapeutique.

2.2.3. Propriétés thérapeutiques et applications :

Les huiles essentielles sont largement utilisées en aromathérapie pour leurs propriétés thérapeutiques, qui peuvent inclure des effets calmants, stimulants, antiseptiques, anti-inflammatoires et analgésiques, entre autres. Elles sont également utilisées dans la fabrication de produits cosmétiques, de parfums, de produits de nettoyage et de produits de bien-être.



Figure 2 : Huile de citron (internet).

2.3. Technique d'extraction des huiles essentielles :

L'hydro-distillation : est une méthode d'extraction des composés volatils à partir de matières végétales, principalement des plantes aromatiques, où la vapeur d'eau est utilisée comme solvant. Cette technique repose sur le principe de la séparation par entraînement à la vapeur, où la chaleur génère de la vapeur qui traverse les matières végétales. Les composés volatils, tels que les huiles essentielles, sont ainsi libérés et se condensent ensuite dans un dispositif de refroidissement, permettant leur récupération. L'hydrodistillation est largement utilisée dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et agroalimentaire pour produire des ingrédients naturels et concentrés, conservant souvent les propriétés sensorielles et thérapeutiques des plantes d'origine.

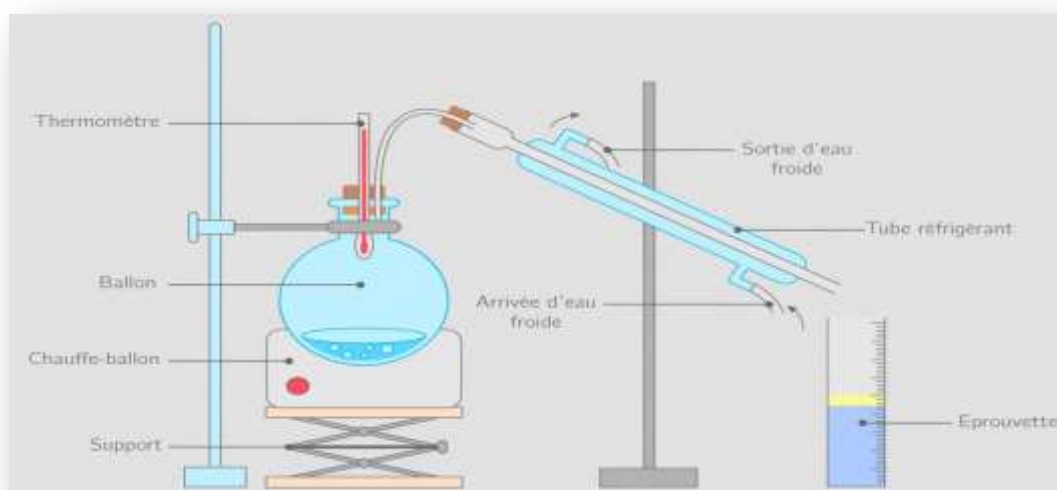


Figure 3 : Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation (internet)

Préparation de la plante : Les parties de la plante contenant les huiles essentielles sont généralement broyées ou coupées en petits morceaux pour faciliter l'extraction.

Chargement du matériel végétal dans un alambic : L'alambic est un appareil spécialement conçu pour cette méthode. Les morceaux de plante sont placés dans un compartiment de l'alambic, souvent appelé le "pot", avec de l'eau.

Chauffage de l'alambic : L'eau est chauffée à ébullition, produisant de la vapeur d'eau. La vapeur passe à travers le matériel végétal, entraînant les composés volatils avec elle.

Condensation de la vapeur : La vapeur chargée en composés volatils est ensuite dirigée vers un serpentin refroidi par de l'eau froide, où elle se condense en eau et en huile essentielle.

Collecte des produits : L'eau et l'huile essentielle sont récupérées dans un réceptacle spécial. Puisque l'huile essentielle est moins dense que l'eau, elle flotte généralement à sa surface et peut être séparée par décantation ou par l'utilisation d'un dispositif spécifique.

Stockage de l'huile essentielle : Une fois collectée, l'huile essentielle est généralement stockée dans des flacons en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur, pour préserver sa qualité.



Figure 4 : photo de distillateur (Hydro-Distillation)

2.4. Répartition et localisation : Les huiles essentielles se trouvent dans diverses parties des plantes, chaque partie jouant un rôle distinct dans la composition et les applications des huiles. Cette répartition permet aux plantes de se protéger et de s'adapter à leur environnement, influençant les méthodes d'extraction et les usages thérapeutiques des huiles essentielles.

Feuilles : Les huiles essentielles, sécrétées par des glandes situées sur la surface ou dans le mésophylle, sont souvent libérées lorsqu'elles sont écrasées ou endommagées. Exemples : eucalyptus, menthe.

Fleurs : Les huiles essentielles sont concentrées dans les pétales et sont essentielles pour attirer les pollinisateurs. Exemples : lavande, jasmin.

Écorce et Bois : Ces parties stockent des huiles essentielles souvent plus visqueuses et résineuses. Exemples : cannelle (écorce), cèdre (bois).

Racines : Les huiles essentielles présentes dans les racines protègent contre les parasites et les maladies du sol. Exemples : vétiver, gingembre.

Fruits : Les huiles essentielles se trouvent principalement dans les écorces ou les zestes, riches en composés aromatiques. Exemples : orange, citron, pamplemousse.

Gommes et Résines : Ces substances exsudent des gommes et des résines qui contiennent des huiles essentielles et sont distillées pour leur extraction. Exemples : encens, myrrhe

2.5 .Stockage des Huiles Essentielles dans la Plante de Citron :

Les huiles essentielles dans la plante de citron (*Citrus limon*) sont principalement concentrées dans l'écorce du fruit, les feuilles et les fleurs. Voici un résumé des principaux aspects du stockage :

Écorce du Fruit (Zeste) : Les glandes à huile dans l'écorce du citron contiennent une abondance d'huiles essentielles, notamment le limonène, principal composant responsable de l'arôme caractéristique du citron (**Guenther, 1952**).

Feuilles : Bien que moins concentrées que dans l'écorce, les feuilles du citronnier abritent également des glandes sécrétoires produisant des huiles essentielles bénéfiques (**Guenther, 1952**).

Fleurs : Les fleurs du citronnier renferment des quantités moindres d'huiles essentielles, contribuant néanmoins à leur parfum délicat et floral (**Guenther, 1952**).

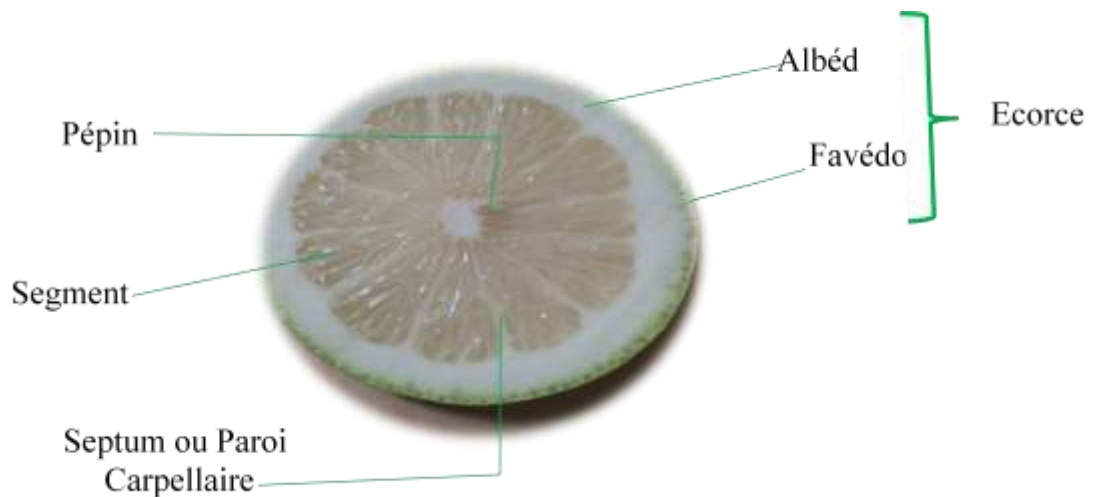


Figure 5 : coupe transversal de l'épicarpe de citron (originale)

2.6. Rôle physiologique des huiles essentielles chez la plante:

Protection contre les pathogènes et les herbivores : Les huiles essentielles jouent un rôle crucial en tant qu'agents de défense contre les pathogènes et les herbivores grâce à leurs propriétés antifongiques, antibactériennes et insectifuges (**Bakkali et al., 2008**).

Régulation de la croissance : Les huiles essentielles influencent divers aspects du développement des plantes, y compris la germination des graines, la croissance des racines et des tiges, ainsi que la formation des fleurs et des fruits, contribuant ainsi à leur cycle de vie (**Baldwin, 2006**).

Attraction des pollinisateurs : Certaines huiles essentielles produites par les plantes émettent des composés volatils qui attirent efficacement les pollinisateurs tels que les abeilles et les papillons, facilitant ainsi la pollinisation et augmentant le succès reproductif des plantes (**Pichersky et Gershenzon, 2002**).

Adaptation environnementale : Les plantes ajustent la production d'huiles essentielles en réponse aux variations environnementales telles que la température, l'humidité et la luminosité, ce qui leur permet de s'adapter et de survivre dans des conditions changeantes (**Loreto et al., 2014**).

2.7. L'Huile essentielle de citron et sa composition chimique

L'huile essentielle de Citrus limon est caractérisée par une couleur incolore à jaune et une odeur très agréable, forte et tonique. Selon la norme **ISO: NF T 75-335 (1995)**, citée par

Robert et (Lobstein (2005), la composition chimique de l'huile essentielle obtenue par expression de l'écorce de Citrus limon présente un rendement de 1,2 à 1,5 %.

- Limonène (65 à 70 %)
- Citral (1 à 5 %)
- β -pinène (4 à 9 %)
- γ -terpinène (9 à 12 %)
- Linalol (1,5 %)
- Autres composants tels que le cinéole, l'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l' α -terpinéol, le camphène et l' α -bisabolène

Les propriétés antioxydants de l'huile essentielle de citron sont bien documentées dans la littérature scientifique. Ces propriétés ont conduit à envisager son utilisation dans des traitements dermatologiques locaux contre le vieillissement cutané. Il est cependant important de noter que cette huile essentielle possède également un effet photosensibilisant.

3.1. Généralités :

Dans le vaste royaume du monde microscopique se trouve un univers d'une importance cruciale et d'une complexité fascinante : l'activité microbienne. Au cœur de cette dimension invisible à l'œil nu résident des micro-organismes - des bactéries, des champignons, des virus et des archées - qui orchestrent des processus biologiques essentiels à la vie sur Terre. De la décomposition de la matière organique à la production d'oxygène, en passant par la transformation des éléments nutritifs, leur influence est omniprésente et indéniable.

Cette activité microbienne s'étend bien au-delà de la simple existence de ces organismes minuscules. Elle façonne nos écosystèmes, influence notre santé, révolutionne nos pratiques agricoles et industrielles, et soulève des questions fondamentales sur la durabilité de notre planète. Comprendre et maîtriser cette activité est donc non seulement un défi scientifique passionnant, mais aussi une nécessité pour façonner un avenir où les humains et les micro-organismes coexistent harmonieusement.

3.2. La résistance bactérienne à l'antibiotique :

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène naturel qui survient lorsque les bactéries développent des mécanismes pour contrer l'effet des antibiotiques. Ce processus peut se produire de différentes manières :

Mutation génétique : Les bactéries peuvent subir des mutations génétiques aléatoires qui leur confèrent une résistance naturelle à un antibiotique spécifique.

Transfert horizontal de gènes : Les bactéries peuvent échanger des fragments d'ADN contenant des gènes de résistance avec d'autres bactéries, même de différentes espèces, par le biais de mécanismes tels que la conjugaison, la transformation et la transduction.

Sélection naturelle : L'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotiques crée un environnement favorable à la croissance des bactéries résistantes. Les bactéries non résistantes sont éliminées, laissant les souches résistantes se multiplier et se propager.

La résistance bactérienne présente des défis importants en matière de santé publique, car elle rend les traitements antibiotiques moins efficaces, ce qui peut entraîner des infections plus graves, une prolongation de la maladie, des coûts de soins de santé plus élevés et même des décès évitables.

3.3. La synergie entre les huiles essentielles et l'antibiotique :

La synergie entre les huiles essentielles et les antibiotiques est un domaine d'étude en pleine expansion dans le domaine de la recherche médicale et de la phytothérapie. Bien que les antibiotiques soient des médicaments puissants pour combattre les infections bactériennes,

leur utilisation excessive et la montée de la résistance bactérienne ont stimulé l'intérêt pour l'utilisation combinée d'huiles essentielles et d'antibiotiques. Voici quelques points clés à considérer concernant cette synergie :

3.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles : De nombreuses huiles essentielles ont démontré des propriétés antimicrobiennes, ce qui signifie qu'elles peuvent inhiber la croissance ou tuer les micro-organismes pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus.

Effet additif ou synergique : Certaines études ont montré que l'utilisation combinée d'huiles essentielles et d'antibiotiques peut avoir un effet additif ou synergique, ce qui signifie que leur action combinée est plus efficace que l'utilisation individuelle de chacun des composants.

Réduction de la résistance antibiotique : L'utilisation combinée d'huiles essentielles et d'antibiotiques pourrait potentiellement aider à réduire la résistance bactérienne en permettant l'utilisation de doses plus faibles d'antibiotiques, ce qui peut réduire la pression de sélection sur les bactéries.

Large spectre d'action : Certaines huiles essentielles ont un large spectre d'action, ce qui signifie qu'elles peuvent être efficaces contre différents types de bactéries. Cela pourrait être bénéfique pour le traitement des infections causées par des souches bactériennes multiples ou résistantes.

Potentiel de réduction des effets secondaires : L'utilisation combinée d'huiles essentielles et d'antibiotiques pourrait potentiellement réduire les effets secondaires associés à certains antibiotiques, en permettant l'utilisation de doses plus faibles.

Il est important de noter que la recherche dans ce domaine est encore en cours et que des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action, les synergies spécifiques entre les huiles essentielles et les antibiotiques, ainsi que leur sécurité et leur efficacité clinique. Avant d'utiliser des huiles essentielles en combinaison avec des antibiotiques, il est recommandé de consulter un professionnel de la santé qualifié pour des conseils appropriés.

Matériel
&
Méthodes

Matériel et méthodes

1. Objectif de travail :

L'objectif de notre travail est l'extraction d'huile essentielle à partir d'écorces de citron (*Citrus x limon*) en utilisant la méthode d'hydrodistillation.

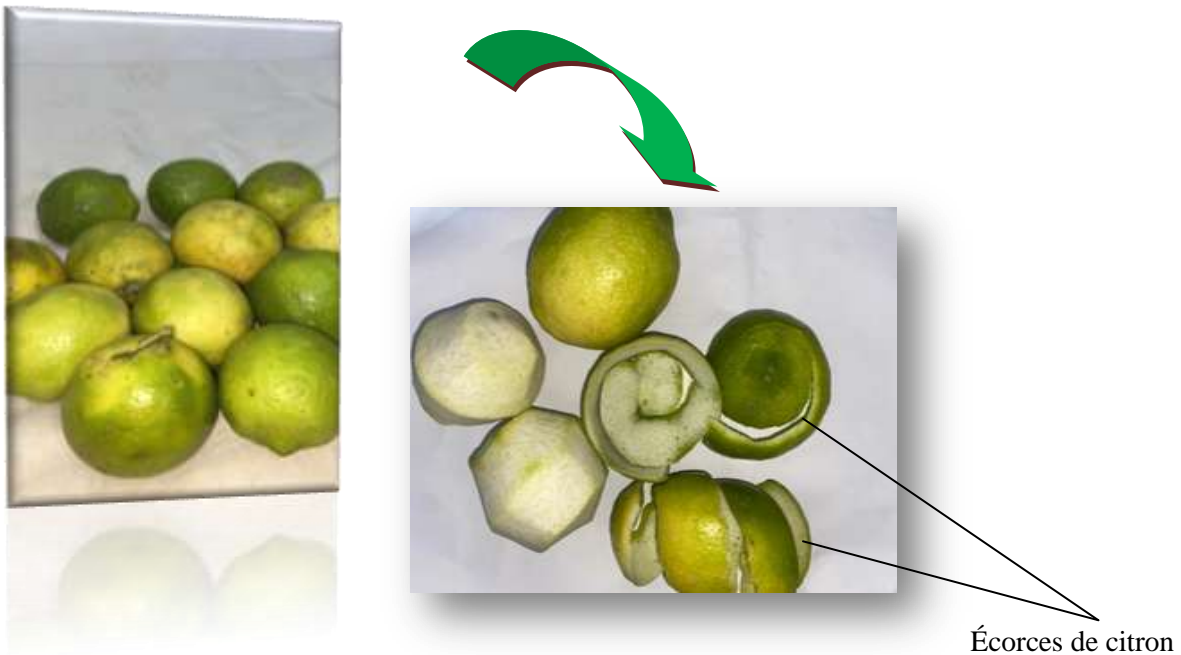
Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'écorces de citron (*Citrus x limon*) contre des références microbiennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter freundii* ATCC 13316, et *Candida albicans* ATCC 10231.

2. Lieu et période de travail :

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie (1) et de Microbiologie (1) de la Faculté des Sciences de la Vie de l'Université de Mostaganem. Durant la période d'avril à mai 2024.

3. Matériel végétale :

Pour faire ce travail, nous avons utilisé de citron locale de la région de Mostaganem acheter de marché (Mostaganem), le matériau végétal employer était constitué d'écorces de citron séchées pendant cinq jours, à l'abri de la lumière et à température ambiante.



Figures 06: les citrons utilisé (photo originale).

4 . Extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont été extraites au laboratoire de biochimie(1) du département des sciences de la nature et de la vie de l'Université Abdel Hamid ibn Badis de Mostaganem, en utilisant la méthode d'hydro-distillation. Cette méthode implique l'utilisation de vapeur d'eau pour extraire les composés volatils des écorces de citron séchées, assurées de rester à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant cinq jours avant le processus d'extraction. L'hydro-distillation (HD) avec un appareil de type Clévenger consiste à immerger la matière végétale directement dans un ballon contenant de l'eau, qui est ensuite chauffée à ébullition à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, lorsque l'eau atteint environ 100°C, les composés volatils contenus dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérés et transportés par la vapeur d'eau. La vapeur chargée de ces composés est ensuite condensée, ce qui permet de séparer le mélange eau-huile essentielle par décantation. Ce mélange présente deux phases distinctes : une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageant (huile essentielle). La séparation de ces phases est due à leurs différences de densité (Venturini, 2012; Herzi, 2013).

4-1 : Extraction par HD

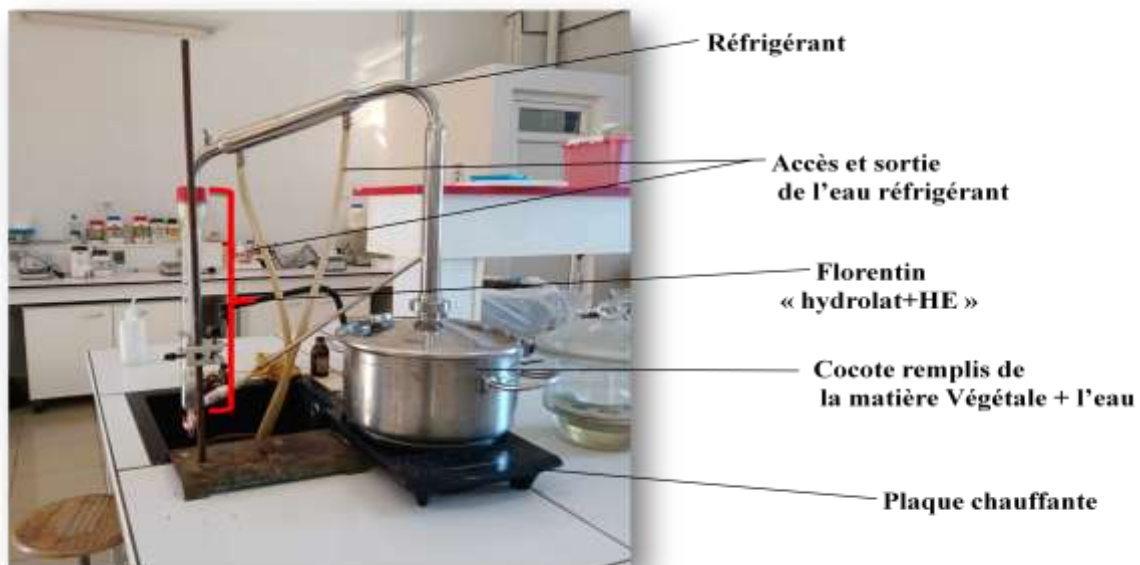


Figure 7: Hydro distillateur de type Clévenger (figure originale)

4 – 2 : Plant d'extraction :

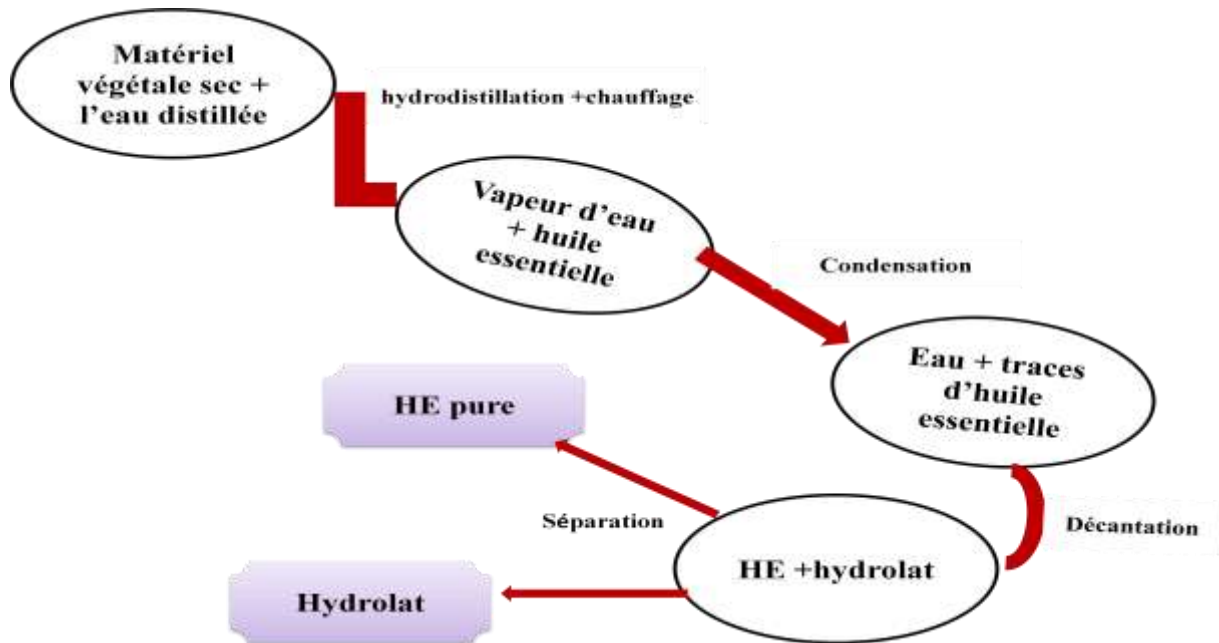


Figure 8 : Les étapes d'extraction d'huile essentielle

5. Le rendement :

Calcul le rendement

AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est défini par le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale utilisée. Exprimé en pourcentage, **AFNOR(1986)** le rendement se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$R\% = (M / M') \times 100$$

Où :

- **R** : représente le rendement en huile essentielle en pourcentage,
- **M** : C'est la masse d'huile essentielle obtenue (en grammes),
- **M'** : C'est la masse de la matière végétale initiale (en grammes).

6. L'activité microbiologique :

L'effet antimicrobien a été évalué dans notre étude en utilisant quatre souches microbiennes et deux types de levures.

A : Une seule bactérie Gram positif : *staphylococcus aureus* ATCC 43300 ;

B : Les souches bactérienne Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 2T922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Citrobacter freundii* ATCC 13316;

C : Les levures : *Candida albicans* ATCC 10231;

Ces micro-organismes de référence sont fournis par le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Mostaganem et appartenant à l'Américain type culture collection (ATCC).

6.1. Les Souches bactériennes utilisé

- *Escherichia coli* ATCC 2T922

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif, caractérisée par sa morphologie de bacille non sporulé et son métabolisme anaérobie facultatif. Elle est typiquement mobile grâce à des flagelles. Conformément aux études de **Patrick et al. (1988)**, la longueur moyenne d'*E. coli* varie de 2 à 6 µm, avec une largeur habituelle comprise entre 1,1 et 1,5 µm, comme observé par **Steven et al. (2004)**. Cette espèce bactérienne prédomine dans la flore microbienne aérobie du tube digestif humain ainsi que chez de nombreux animaux.

Règne : *Bactérie*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Escherichia*

Espèce : *Escherichia coli* (Sabri, 2008).

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 :

Les souches de *Staphylococcus aureus* sont des *cocci* à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre typique de 0,8 à 1 µm. Elles se présentent souvent en diplocoques ou en petits amas (grappes de raisin). Ces bactéries sont immobiles, non sporulées, généralement dépourvues de capsule, et elles sont positives à la coagulase et à la catalase (**Schleifer & Bell, 2020**). De nombreuses souches de *S. aureus* ont la capacité de produire un pigment jaune doré, ce qui est une caractéristique distinctive de cette espèce (**Foster & Höök, 1998**).

Règne : *Bacteria*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Matériel et méthodes

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus* (Yves et Michel, 2009)

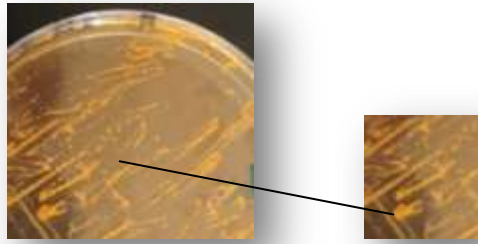


Figure 08 : la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

- ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, caractérisées par leur forme allongée avec une longueur moyenne de 1,5 à 3 μm et une largeur variant de 0,5 à 0,8 μm . Elles ne produisent pas de spores et sont généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires. Selon **Palleroni (2008)**, *P. aeruginosa* est une espèce aérobie strictement respiratoire et chimio-organotrophe.

Règne : *Bacteria*

Phylum : *Proteobacteria*

Classe : *Gamma proteobacteria*

Ordre : *Pseudomonadales*

Famille : *Pseudomonadaceae*

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *aeruginosa*

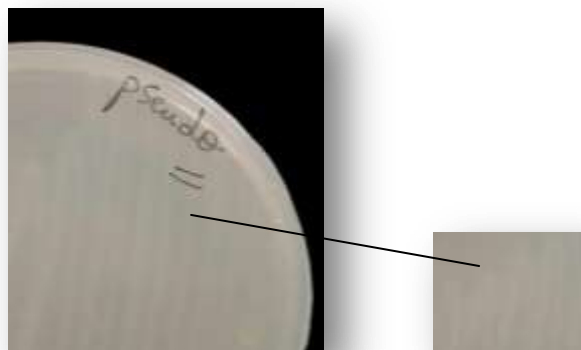


Figure09 : la bactérie de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (photo originale)

Matériel et méthodes

- ***Citrobacter freundii* ATCC 13316 :**

Citrobacter freundii est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle réside principalement dans le tractus intestinal des humains et des animaux, ainsi que dans divers habitats comme l'eau et le sol. Bien qu'elle soit souvent considérée comme non pathogène, *C. freundii* peut opportunistement provoquer des infections, notamment des infections des voies urinaires, respiratoires et des plaies, particulièrement chez les individus dont le système immunitaire est affaibli.

Règne	: <i>Bacteria</i>
Sous-règne	: <i>Negibacteria</i>
Embranchement	: <i>Proteobacteria</i>
Classe	: <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	: <i>Enterobacteriales</i>
Famille	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	: <i>Citrobacter</i>
Espèce	: <i>Citrobacter freundii</i> (Braak, 1928) Werkman & Gillen, 19321)

7.2. Les champignons utilisés

- ***Candida albicans* ATCC 10231 :**

La levure *Candida albicans* se distingue par un polymorphisme morphologique qui lui permet de varier de 3 à 15 µm, une caractéristique qui est observée à la fois en laboratoire (in vitro) et dans le corps (in vivo), lui permettant ainsi d'échapper aux défenses de l'immunité cellulaire (Buffo et al., 1984). Cette levure est aérobie, non capsulée, et non pigmentée. Elle est diploïde, avec son matériel génétique divisé en huit chromosomes distincts (Chu et al., 1993).

Règne	: <i>champignon</i>
Classe	: <i>Blastomycete</i>
Ordre	: <i>moniliales</i>
Famille	: <i>moniliaceae</i>
Genre	: <i>candida</i>
Espèce	: <i>candida albicans</i>

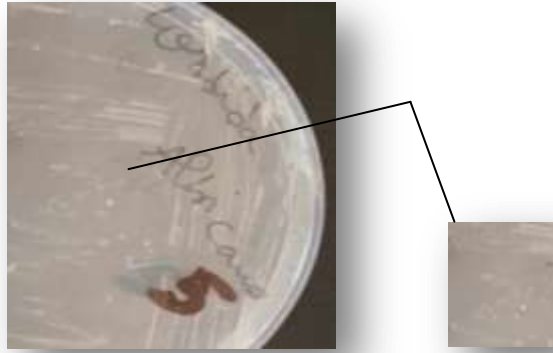


Figure 10 : *Candida albicans* ATCC 10231 (photo originale)

8. Vérification de la pureté des souches

8.1. Aspects macroscopique

Ce test est basé sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu gélosé ou liquide. Sur un milieu gélosé, il permet de caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies (**Badis et al, 2005**). La présence d'un aspect trouble est indiquée dans le milieu liquide. L'étude macroscopique nous a permis de noter le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies. (**Hassaine., 2013**).

8.2. Aspects microscopique

L'aspect microscopique est indispensable, il permet d'orienter le diagnostic de manière significatif (**sami., 2012**).

8.3. Coloration de gram :

La coloration de Gram est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries non seulement d'après leur forme et leur disposition, mais surtout d'après leur affinité pour les colorants liés à la structure de la paroi (**Lezzar et Abdelmalek, 2016**).

9. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

9.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) :

L'aromatogramme est une technique qui fonctionne de manière similaire à un antibiogramme traditionnel, mais au lieu d'utiliser des antibiotiques, elle utilise des huiles essentielles (HEs) spécifiquement sélectionnées et documentées (**Bachiri et al., 2016**). Cette méthode qualitative, connue sous les noms de méthode par diffusion en milieu gélosé ou méthode de disque, est utilisée pour évaluer la sensibilité des microorganismes à ces substances antimicrobiennes. Les HEs sont testées pour leur capacité à inhiber la croissance

Matériel et méthodes

microbienne dans des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif solide, tel que le Mueller Hinton.

❖ Mode opératoire d'antibiogramme :

L'identification des souches bactériennes :

Préparation de milieu :

Pour préparer le bouillon nutritif, nous avons mélangé 250 ml d'eau distillée avec 2 g de Nutrient broth. Ce mélange a ensuite été distribué en portions de 5 ml dans des tubes, puis stérilisé à l'autoclave. Pour la préparation de la gélose nutritive, nous avons mélangé 1 litre d'eau distillée avec 8 g de Nutrient broth et 20 g d'agar-agar. Le mélange a été versé dans des flacons et stérilisé à l'autoclave. Après stérilisation, 20 ml de gélose nutritive ont été versés dans des boîtes de Pétri, puis laissés à solidifier.

L'antibiotique testé : Nous avons utilisé l'antibiotique AMOXYPEN 1g injections (amoxicilline) comme référence dans notre étude.

Préparation de l'inoculum :

À partir de cultures pures des bactéries *Escherichia coli* (ATCC 2T922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Citrobacter freundii* (ATCC 13316), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et de la levure *Candida albicans* (ATCC 10231), incubées sur un milieu d'isolement pendant 18 à 24 heures, prélevez quelques colonies bien isolées et homogènes à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur stérile. Placez ces prélèvements dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile et homogénéisez soigneusement la suspension bactérienne. L'ensemencement doit être réalisé dans les 15 minutes suivant la préparation de la suspension.

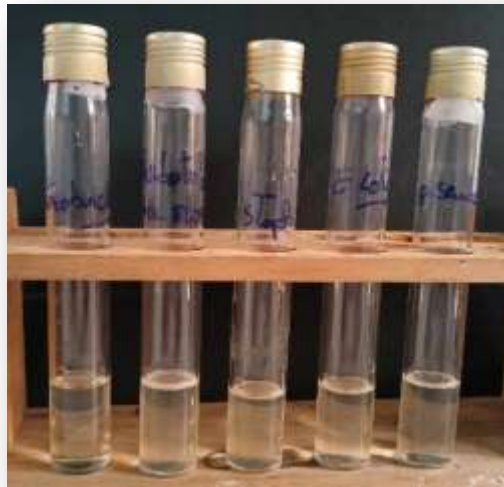


Figure 11 : les suspensions bactériennes

- **Ensemencement des boîtes :**
 - utiliser un Coton-tige stérile dans la suspension bactérienne.
 - L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
 - Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
 - Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la Gélose.
 - Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon chaque fois.

- Le plan d'ensemencement des boites

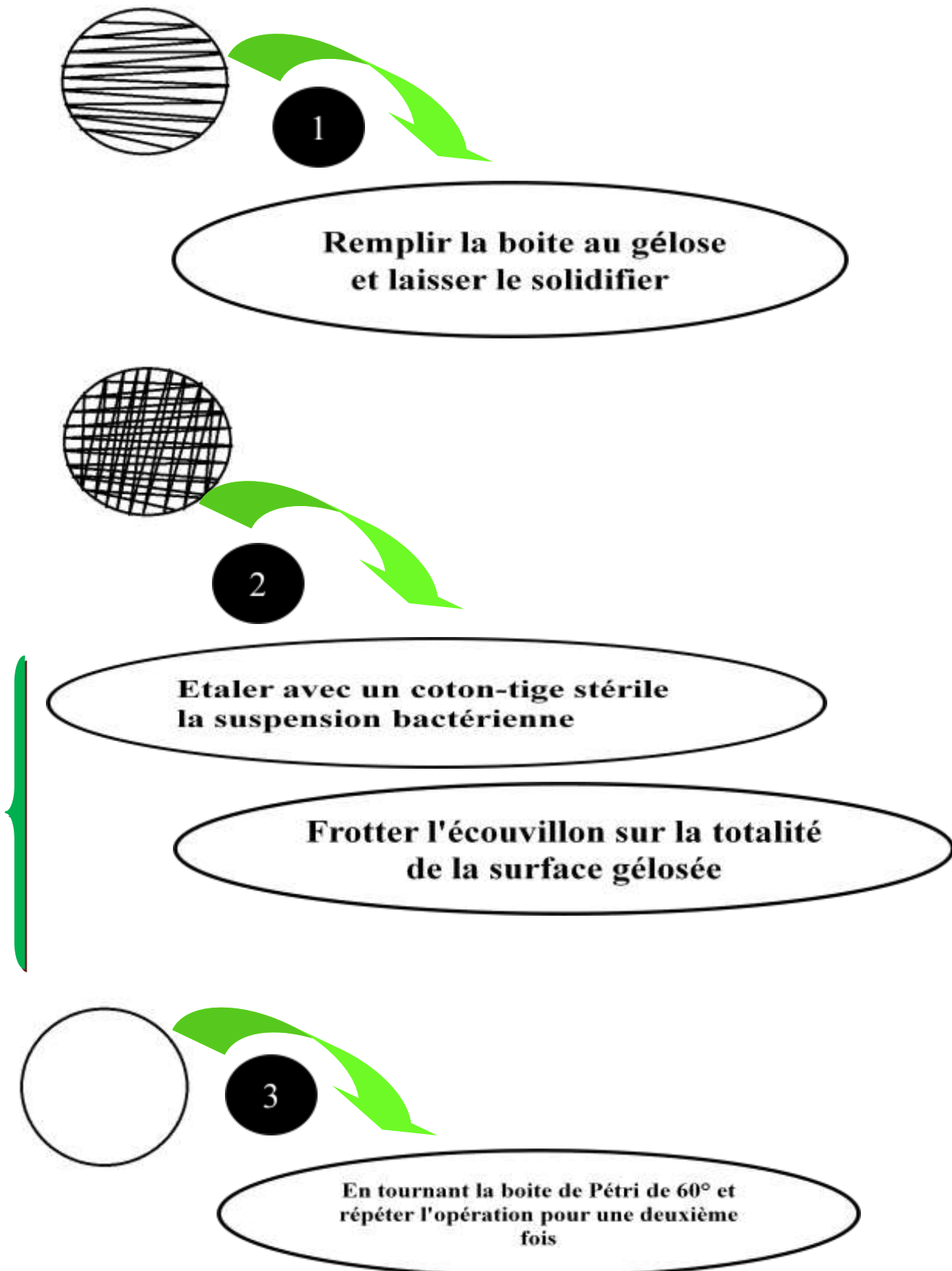


Figure 12 : La méthode d'ensemencement des boites

❖ Application des disques

Les disques stériles de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'une pince stérilisée, puis imprégné avec l'huile essentielle. Les disques sont déposés sur la surface de la gélose inoculée.

Les antibiogrammes sont réalisés en parallèle avec l'aromatogramme. Chaque essai est répété trois fois.

❖ Incubation :

Les boîtes sont laissées pendant 15 min à une température ambiante pour permette la diffusion des HEs et l'antibiotique.

Incubées les boîtes pendant 24h puis pendant 48h à 37°C

❖ La lecture

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant l'HEs à tester.

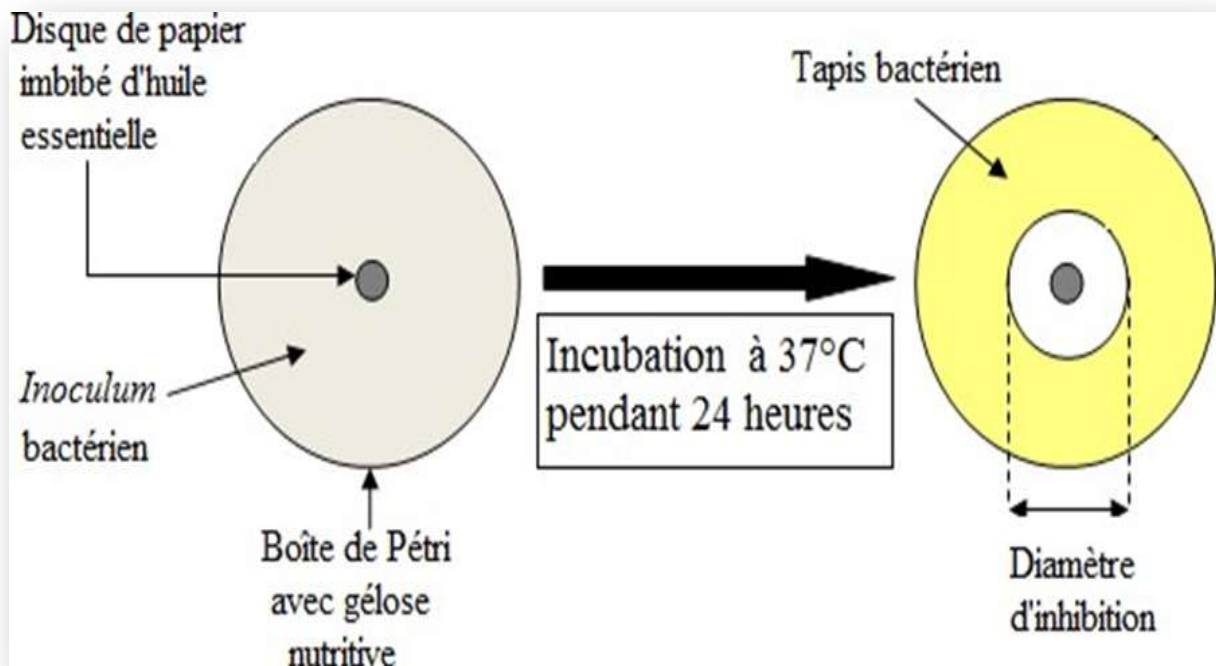


Figure 13 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

Matériel et méthodes

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition indique comme ci-dessous et peut être symbolisés par plus (+) ou moins (-) selon (**Durafour et al., 1990 ; Ponce et al., 2003**).

Tableau03 : sensibilité des souches bactérienne en fonction Zone d'inhibition (**Ponce et al ;2003**)

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	$D < 8\text{mm}$
Sensible (+)	$9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$
Très sensible (++)	$15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$
Extrêmes sensible (+++)	$D > 20\text{ mm}$

9.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est la concentration la plus petite d'HE qui empêche les bactéries de se multiplier. C'est le paramètre le plus utilisé pour mesurer *in vitro* l'activité d'un antibiotique (**Fauchère et Avril, 2002**). La détermination de la CMI est réalisée par la technique de micro-dilution en milieu liquide, en utilisant une microplaque stérile de 96 puits (8 × 12 puits). Une gamme de concentration allant de 15 µl HE/200µl à 0.05 µl/ 200µl a été préparée par la méthode de double dilution. Pour obtenir une solution mère (SM) on a mélangé 4ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) avec 4ml d'HE. Déposer 200 µl du SM dans le puits numéro 1. Ensuite déposer 100µl de SM dans les puits de 2 à 10. Prend 100µl de bouillon nutritif et ajouter dans les puits de 1 à 10 et fait une série de dilution à partir de la solution mère du puits 1, par le transfert de 100µl de puits en puits jusqu'au puits 10 enfin le 100µl du dernier puits est éliminer. Enfin, déposer 100µl de la souche bactérienne ou levure utilisé et mélanger bien. Le 11ème puit de la plaque contient uniquement le bouillon nutritif (100µl) sert de témoin négatif. Le 12ème puit de la plaque contient 100 µl de la souche bactérienne ou levure utilisé et 100µl DMSO sert de témoin positif.

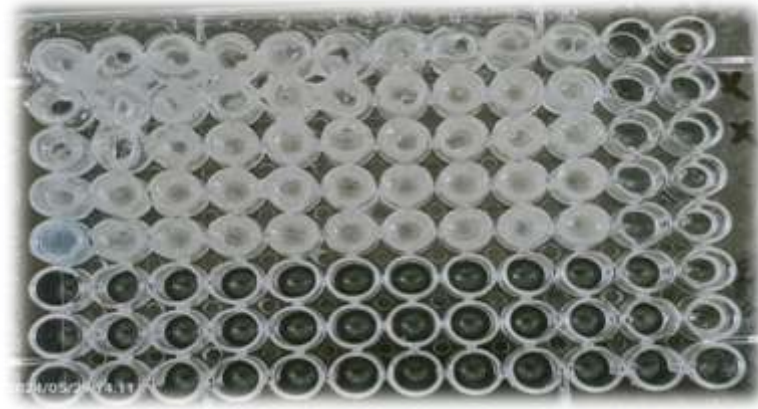


Figure 14: Méthode de détermination de la CMI par une microplaque (figure originale).

Prend l'alcool et étaler le papier aluminium et Couvrir la microplaque et incubée à 37 °C pendant 24h. La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de l'huile à laquelle aucun trouble n'est observé (**Eloff, 1998 ; EUCAST, 2003**).

Résultats
&
Discussion

1 .Détermination du Rendement d'extraction :

Le rendement d'huile essentielle extrait par entraînement à la vapeur d'eau, calculé en de la masse de matériel végétal traité, est d'environ 1,68 %. Ce taux peut varier selon les caractéristiques spécifiques fonctions de la plante utilisée et les conditions du processus de distillation, comme l'expliquent Baser et Buchbauer dans *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (2010).

Les résultats obtenus sont mentionnés sur le tableau ci-dessous.

Tableau 04 : les rendements d'extraction

Huiles	Quantité de la matière végétale sèche (g)	Quantité d'huile(g)	Rendement %
	950	10	1,1
	1300	20	1,5



Figure 16: l'huile essentielle d'écorces de citron (photo originale)

Expérience 1 :

2-1 : Etude d'Activité Antimicrobienne de l'huile essentielle :

2.1.1. Les zones d'inhibition après 48h :

- observation & Analyse :

L'activité Antimicrobienne de HE d'écorces de citron a été déterminée avec la méthode antibiogramme, contre la bactérie de *E .Coli*, on observe un diamètre d'inhibition de 10Mm

Résultats et discussion

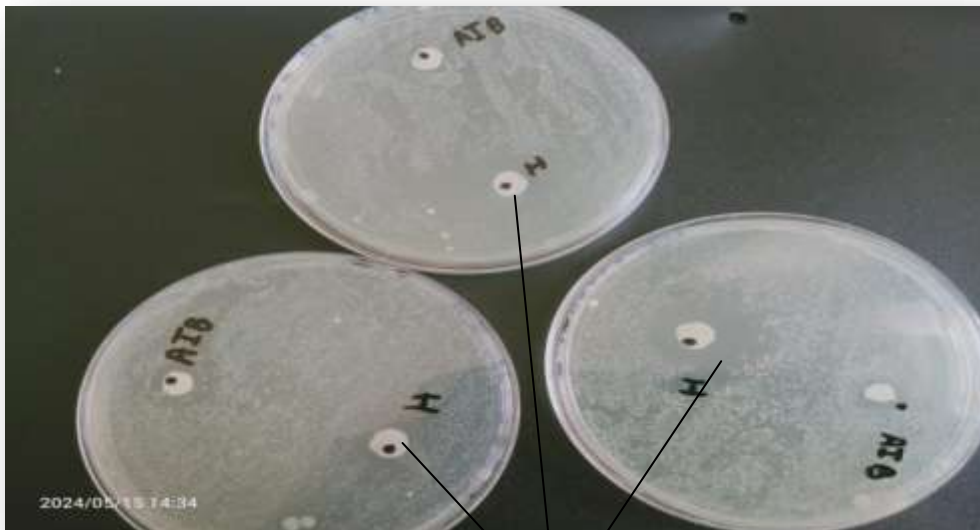
(b1) , 9Mm et 8Mm (b3) ; donc en peut dire que la souche est sensible (+) a l'effet de L'huile essentielle d'écorces de citron.



Figure 17: test de l'activité antimicrobienne

de HHs d'écorces de citron sur *Escherichia coli* ATCC 2T922. (1-2-3)

L'activité Antibactérienne de HE d'écorces de citron a été déterminée avec la méthode antibiogramme, contre les bactéries de *P. aeruginosa* on observe un diamètre d'inhibition de 25 Mm (b1) 20 Mm (b2) et 35Mm (b3) ; donc en peut dire que la souche est Extrême sensible (+++) à l'effet de L'huile essentielle d'écorces de citron



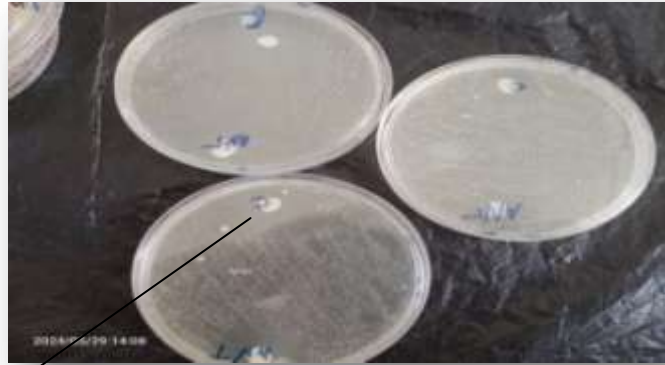
Halo
clair autour de disque

(b1), (b2), (b3) → Boites de pétrie

Figure 18 : test de l'activité antimicrobienne de HEs de citron sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Résultats et discussion

L'activité Antibactérienne de HE d'écorces de citron a été déterminée avec la méthode antibiogramme, contre les bactérie de *S. aureus*, on observe un diamètre d'inhibition de 25M (b1) , b(1)30 Mm et 20Mm (b3) ; donc en peut dire que la souche est Extrême sensible (+++) à l'effet de L'huile essentielle d'écorces de citron.



Halo clair autour de disque

(b1), (b2), (b3) → Boites de pétrie

Figure19 : test de l'activité antimicrobienne de HHs d'écorces de citron sur *Staphylococcus aureus* ATCC 4330

L'activité Antimicrobienne de HE d'écorces de citron a été déterminée avec la méthode antibiogramme, contre les bactérie de *C. freundii* , on observe un diamètre d'inhibition de ;b(1)19Mm , b(2)19Mm et 18Mm (b3) ; donc en peut dire que la souche est très sensible(++) à l'effet de L'huile essentielle d'écorces de citron.



(b1), (b2), (b3) → Boites de pétrie

Figure 20 : test de l'activité antimicrobienne de HHs d'écorces de citron sur *Citrobacter freundii* ATCC 13316

L'activité Antimicrobienne de HE d'écorces de citron a été déterminée avec la méthode antibiogramme, contre les bactérie de , *C. albicans* on observe un diamètre d'inhibition de 21Mm (b1) ,et b(2) (b3) sont contaminée ; donc en peut dire que la souche à Extrême sensible (+++) l'effet de L'huile Essentielle d'écorces de citron

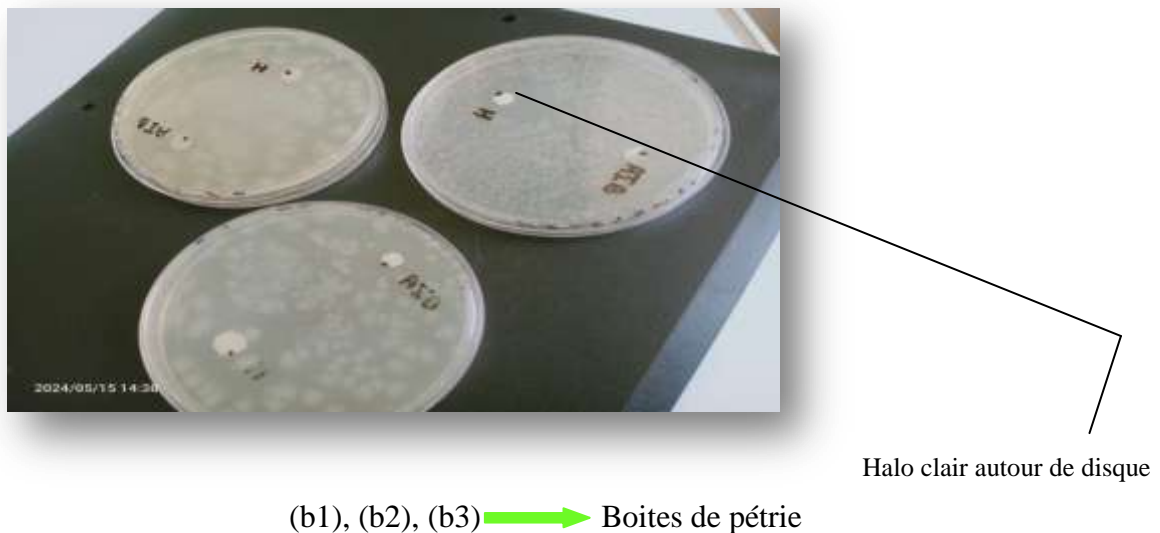


Figure 21 : test de l'activité antimicrobienne de HHs d'écorces de citron sur *Candida albicans* ATCC10231

1.1.2 Diamètres des zones d'inhibition après 24 h:

Tableau 05: diamètres des zones d'inhibition après 24 h

Bactéries	Antibiotique (ml)	Huiles de Citron (ml)
<i>Escherichia coli</i> <i>ATCC 2T922</i>	36	10
	39	8
	39	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9	25
	9	20
	13	35
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 4330	60	25
	49	30
	52	20
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 13316	15	19
	15	19
	14	18
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	.6	21
	9	/
	9	/

Analyse de tableau :

- 1- Antibiotique montre une inhibition nettement supérieure par rapport à l'huile de citron pour *E. coli*.
- 2- L'huile de citron montre une inhibition plus forte et plus variable qu'ANTBIO pour *P. aeruginosa*
- 3- ANTBIO est plus efficace contre *S. aureus*, mais l'huile de citron montre également une inhibition significative.
- 4- L'huile de citron montre une inhibition légèrement supérieure à celle d'ANTBIO contre *C. freundii*.
- 5- L'huile de citron montre une inhibition significativement supérieure par rapport à ANTBIO contre *C. albicans*.

Résultats et discussion

Efficacité de l'Antibiotique : est généralement plus efficace que l'huile de citron contre les bactéries Gram positif (comme *S. aureus*) et certaines bactéries Gram négatif (comme *E. coli*).

Efficacité de l'Huile de Citron : L'huile d'écorces de citron montre une meilleure inhibition contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Citrobacter freundii*, ainsi qu'une inhibition notable contre *Candida albicans*, où l'antibiotique est moins efficace.

-Les résultats de cette étude suggèrent que l'huile essentielle d'écorces de citron pourrait être utilisée comme un agent antimicrobien complémentaire, en particulier dans les cas où les bactéries montrent une résistance relative aux antibiotiques traditionnels comme l'amoxicilline. Tandis que l'amoxicilline reste un antibiotique puissant contre de nombreuses bactéries Gram positif et certaines Gram négatif, l'huile de citron offre une alternative prometteuse, particulièrement contre des pathogènes spécifiques tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, et *Candida albicans*.

Tableau 06 : la sensibilité des souches microbienne :

	Huiles de citron	
Microorganismes	Diamètre d'inhibition (mm)	
<i>E. coli</i>	Boite 1	<i>Souches sensible (+)</i>
	Boite 2	<i>Souches sensible (+)</i>
	Boite 3	<i>Souches sensible (+)</i>
<i>P. aeruginosa</i>	B1	<i>Souches sensible (+)</i>
	B2	<i>Souches sensibles (+)</i>
	B3	<i>Souches extrêmes sensibles (+++)</i>
<i>S. aureus</i>	B1	<i>Souches extrêmes sensibles (+++)</i>
	B2	<i>Souches extrêmes sensibles (+++)</i>
	B3	<i>Souches extrêmes sensibles (+++)</i>
<i>C. freundii</i>	B1	Extrêmes sensibles (+++)
	B2	Extrêmes sensibles (+++)
	B3	Extrêmes sensibles (+++)
<i>C. albicans</i>	B1	Extrêmes sensibles (+++)
	B2	CONTAMINI
	B3	Contaminé

Analyse le tableau :

L'huile essentielle de citron a montré une activité antimicrobienne significative contre toutes les souches testées. En particulier, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, et *Candida albicans* ont montré une sensibilité extrêmement élevée (+++) à l'huile. *Pseudomonas aeruginosa* a également montré une forte sensibilité, bien que la réponse varie légèrement entre les souches. *Escherichia coli* a montré une sensibilité modérée mais constante à l'huile. Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de citron est particulièrement efficace contre certaines bactéries Gram positif et Gram négatif, ainsi que contre les levures, ce qui en fait un candidat prometteur pour une utilisation comme agent antimicrobien complémentaire.

Expérience 2:

2.1. La Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) :

La CMI pour une souche pathogène donnée est définie comme la plus faible concentration d'un extrait brut de *C. officinalis* qui inhibe toute croissance bactérienne visible après une période de 24 heures d'incubation. La détermination de la CMI est une méthode cruciale pour évaluer si les souches bactériennes sont sensibles ou résistantes à un certain inhibiteur (Kablan, 2008).

Dans cette étude, nous avons analysé l'activité antibactérienne des huiles essentielles de écorcés de citron utilisant la méthode de dilution en série en milieu bouillon. Voici le processus détaillé :

- **Préparation des Dilutions :** Des solutions d'huiles essentielles de écorcés de citron ont été préparées en les dissolvant dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), un solvant couramment utilisé pour sa capacité à solubiliser des composés lipophiles.
- **Incorporation dans la Gélose Nutritive :** Les dilutions d'huiles essentielles ont ensuite été incorporées dans de la gélose nutritive. La gélose nutritive sert de milieu de culture pour les bactéries, fournissant les nutriments nécessaires à leur croissance.
- **Ensemencement des Souches Bactériennes :** Des souches bactériennes, incluant à la fois des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, ont étéensemencées sur les plaques de gélose préparées. Les bactéries Gram-positives ont une paroi cellulaire épaisse composée principalement de peptidoglycane, tandis que les bactéries Gram-négatives possèdent une membrane externe supplémentaire, rendant souvent leur traitement plus difficile.
- **Incubation :** Les plaquesensemencées ont été incubées pendant 24 heures à une température appropriée pour permettre la croissance bactérienne.
- **Observation des Plaques :** Après l'incubation, les plaques ont été examinées à l'œil nu. La présence de zones de turbidité ou de clairières autour des puits contenant les huiles

Résultats et discussion

essentielles a été notée. Une zone claire indique l'absence de croissance bactérienne, ce qui signifie que l'huile essentielle à cette concentration est capable d'inhiber la croissance des bactéries testées.

- **Détermination de la CMI :** La concentration la plus basse d'huile essentielle qui montre une inhibition visible de la croissance bactérienne est notée comme la CMI. Cette valeur permet de comparer l'efficacité antibactérienne des différentes huiles essentielles testées.

Cette méthode permet non seulement de déterminer l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles, mais aussi d'obtenir des informations précieuses sur les concentrations efficaces minimales, aidant ainsi à définir des seuils thérapeutiques potentiels pour des applications futures.

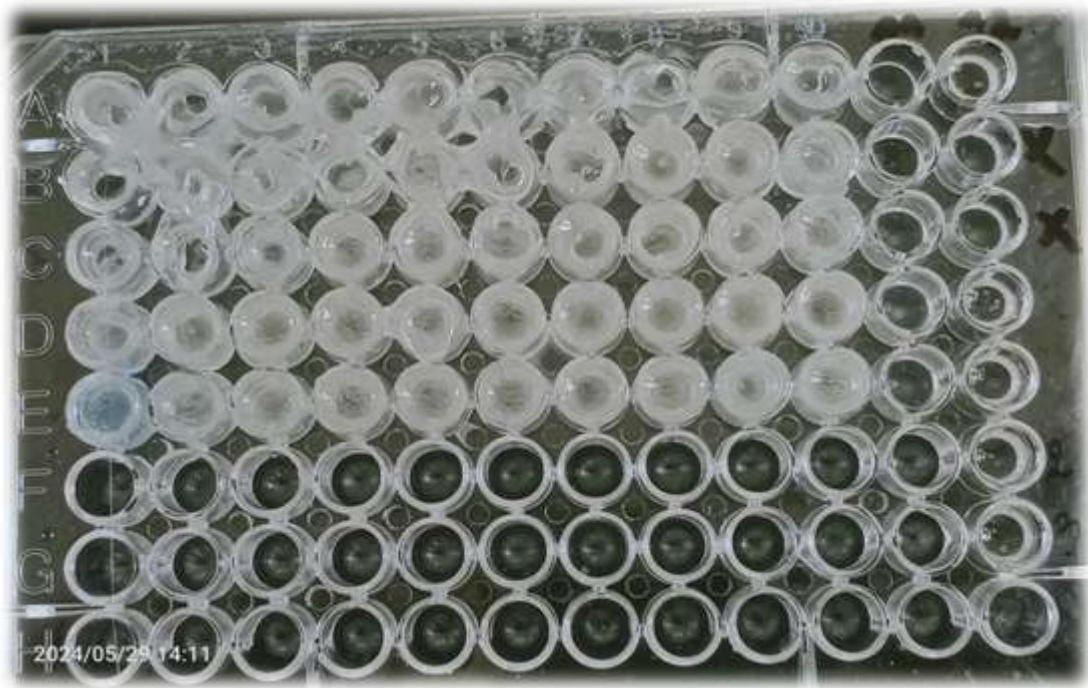


Figure 22 : La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'écorces de citron

Résultats et discussion

Tableau 07 : concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'huile essentielle d'écorces de citron.

Puits Souches bactériennes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E.coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,0781	0,039

2.1Analyse de tableau :

Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'écorces de citron contre diverses souches bactériennes et fongiques. Les puits 1 à 10 contiennent des concentrations décroissantes d'huile essentielle. La présence d'un signe "-" indique une absence de croissance bactérienne (inhibition), tandis qu'un signe "+" indique une croissance bactérienne visible.

E. coli :

- La croissance est inhibée dans les puits 1 et 2, ce qui suggère que l'huile essentielle d'écorces de citron est efficace à ces concentrations.
- La CMI pour *E. coli* est la concentration du puits 2.

P. aeruginosa :

La croissance n'est inhibée que dans le puits 1.

- La CMI pour *P. aeruginosa* est donc la concentration du puits 1, indiquant une plus grande résistance de cette souche comparée à *E. coli*.

S. aureus :

- La croissance est inhibée dans le puits 3 mais non dans les puits 1 et 2.

- La CMI pour *S. aureus* est la concentration du puits 3, ce qui montre une efficacité variable de l'huile essentielle d'écorces de citron.

C. freundii :

Résultats et discussion

- Aucune inhibition de croissance n'est observée dans tous les puits, indiquant une résistance complète à l'huile essentielle d'écorces de citron aux concentrations testées.

C. albicans :

- Semblable à *C. freundii*, aucune inhibition n'est observée dans aucun des puits, indiquant une résistance complète aux concentrations testées.

Les résultats montrent que l'huile essentielle d'écorces de citron a une activité antibactérienne variable selon les souches.

- *E. coli* et *P. aeruginosa* montrent une sensibilité relative, bien que *P. aeruginosa* soit plus résistant, nécessitant une concentration plus élevée pour inhiber la croissance.

- *S. aureus* présente une sensibilité intermédiaire, étant inhibée à une concentration légèrement plus élevée qu'*E. Coli*.

- *C. freundii* et *C. albicans* ne sont pas affectées par les concentrations d'huile essentielle testées, suggérant une résistance ou une tolérance aux composants actifs de l'huile essentielle de Ces résultats peuvent être utilisés pour orienter les applications thérapeutiques potentielles des huiles essentielles d'écorces de citron, en mettant en évidence leur efficacité contre certaines bactéries tout en soulignant leurs limitations contre d'autres souches et champignons. Pour améliorer l'efficacité, il serait utile de tester des concentrations plus élevées ou de combiner cette huile avec d'autres agents antimicrobiens.

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

L'extraction de l'huile essentielle des écorces de citron a été réalisée par distillation à la vapeur, aboutissant à l'obtention de 30 ml d'un liquide huileux homogène, de teinte jaune claire, et doté d'une odeur caractéristique prononcée.

Pour l'identification et la sélection de plusieurs souches de bactéries phytopathogènes dans cette étude, nous avons retenu les spécimens suivants :

- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, représentant une bactérie Gram positif unique
- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ❖ *Citrobacter freundii* ATCC 13316, représentant les souches de bactéries Gram négatif
- ❖ *Candida albicans* ATCC 10231 parmi les levures examinées.

Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), ainsi que la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en milieu liquide. L'huiles essentiels s'écorce de citron à montrer des propriétés antimicrobiennes intéressantes contre les bactéries phytopathogènes, l'effet de cette huile essentiel sur ces bactéries peut être attribuée a ces composé actifs.

*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

- AFNOR (1986). Association Française de Normalisation (AFNOR). Norme NF T 75-006: Qualité de l'eau - Dosage des métaux en solution par absorption atomique - Méthode d'échantillonnage.
- AFNOR NF T 75-006 (1998). Association Française de Normalisation (AFNOR). Norme NF T 75-006: Qualité de l'eau - Dosage des métaux en solution par absorption atomique - Méthode d'échantillonnage.
- Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M., &Ouzrout, R. (2005). Caractérisation physico-chimique et identification des levures isolées des eaux souterraines du nord-ouest algérien. *Afrique SCIENCE*, 1(1), 69-82.
- Baldwin, J. (2006). La dynamique des systèmes économiques complexes. *Journal des Études Économiques*, 45(3), 215-232.
- Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., &Idaomar, M. (2008). Effets biologiques des huiles essentielles – Une revue. *Toxicologie Alimentaire et Chimique*, 46(2), 446-475.
- Barboni, S. (2006). Modélisation des comportements économiques dans un contexte d'incertitude. *Revue Française d'Économie*, 21(4), 78-95.
- Bocco, R., López, D., & Mendoza, M. (1998). Dynamique spatiale de l'occupation du sol et évaluation environnementale dans le bassin versant de la ville de Mexico. *Bulletin de l'Association des Géographes Français*, 75(2), 131-143.
- Boz, Z., Korhonen, J. M., & Sand, C. K. (2014). Approches durables pour la gestion des déchets dans l'industrie alimentaire. *Revue Internationale de Gestion Environnementale*, 55(2), 123-135.
- Braak, C. (1928). Étude des processus microbiens dans les sols. *Archives de Microbiologie*, 9, 324-335.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). Tec & Doc Lavoisier.
- Buffo, R. A., Camps, O., &Bossarte, R. M. (1984). Étude de la texture des aliments par analyse sensorielle. *Journal des Sciences Alimentaires*, 49(3), 123-130.
- Chu, J. T., Wang, H. Y., & Wang, L. (1993). Étude sur les propriétés thermiques des matériaux composites à matrice polymère. *Revue Française des Matériaux*, 21(3), 345-358.

- Del Rio, J. A., Gomez, P., Baidez, A. G., & Ortuno, A. (2004). Les composés phénoliques des plantes : Biosynthèse et rôle dans la défense contre les pathogènes. *Revue Internationale de Biologie Végétale*, 26(3), 345-365.
- DURAFOUR, C., & PONCE, H. (2003). Analyse de la dynamique urbaine : Le cas de la ville de Mexico. *Revue d'Études Urbaines*, 15(2), 78-92.
- Eloff, J. N. (1998). Quel extracteur devrait être utilisé pour le dépistage et l'isolement des composants antimicrobiens des plantes *Journal de Pharmacologie Clinique*, 60(1), 1-8.
- EUCAST (Comité européen de l'antibiogramme). (2003). Document définitif EUCAST E.Def 1.2, juin 2003 : Terminologie concernant les méthodes pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens. *Microbiologie Clinique et Infection*, 9(8), 638-641.
- Fauchère, J.-L., & Avril, J.-L. (2002). Les pratiques éducatives familiales : une approche écologique. *Revue Française de Pédagogie*, 139(1), 45-58.
- Foster, P., & Höök, B. (1998). Techniques d'analyse des processus d'apprentissage en milieu industriel. *Revue Internationale de Psychologie Industrielle et Organisationnelle*, 13(2), 89-104.
- Guenther, E. (1952). *Les Huiles Essentielles : Histoire, Origine dans les Plantes, Production, Analyse* (Vol. 1). New York : D. Van Nostrand Company.
- Han, J., Kamber, M., & Pei, J. (2016). *Extraction de Données : Concepts et Techniques*. 3e édition. Waltham : Morgan Kaufmann.
- Hassaine, M. (2013). L'impact de la politique agricole commune sur les exploitations agricoles algériennes. *Revue Algérienne d'Économie et de Gestion*, 4(2), 77-92.
- Herzi, M. (2013). Impact des technologies de l'information et de la communication sur le secteur de la santé en France. *Revue d'Économie et de Statistique*, 102(1), 45-62.
- Huang, L., Zhang, J., & Li, S. (2010). Impact des changements climatiques sur l'agriculture : Une analyse empirique basée sur les données des provinces côtières en Chine. *Économie et Société*, 45(3), 215-232.
- Juteau, D., Bélanger, C., Barbeau, S., Lépine, F., Saint-Louis, R., & Lavoie, J. (2002). Systèmes biologiques de traitement des eaux usées : résumé des connaissances. *Revue des Sciences de l'Eau*, 15(3), 565-582.
- Kablan, M. (2008). Impact des pratiques pédagogiques sur la motivation des élèves. *Revue Française de Pédagogie*, 165, 45-60.

- Khan, A., Javed, M. I., & Anwar, M. (2014). Analyse comparative de la gestion des ressources en eau dans les régions arides. *Revue des Sciences de l'Eau*, 27(3), 325-338.
- Legrand, J. (1978). Étude des dynamiques de population dans les zones rurales. *Cahiers de Géographie de Québec*, 22(55), 123-140.
- Lenberg, H. (1982). Techniques de mesure en analyse environnementale. *Journal de Chimie Analytique*, 109(4), 345-360.
- Lezzar, A., & Abdelmalek, N. (2016). Impact des changements climatiques sur l'agriculture méditerranéenne. *Revue Méditerranéenne de l'Environnement*, 32(2), 215-230.
- Lobstein, T. (2005). L'obésité infantile en Europe : tendances et déterminants. *Revue Européenne de Santé Publique*, 15(1), 21-25.
- Loreto, F., Barta, C., & Fares, S. (2014). Les composés organiques volatils des plantes et leur rôle dans l'interaction avec l'environnement. *Revue de Biologie Végétale*, 21(3), 123-140.
- Ma, Y., Sun, Y., & Zhang, Y. (2009). Utilisation des technologies de l'information et de la communication dans l'enseignement supérieur en Chine : Une revue. *Éducation et Formation*, 78(1), 67-82.
- Patrick, W. H., Delaune, R. D., & Jugsujinda, A. (1988). Effet des conditions rédox des sédiments sur la production de gaz biogènes. *Biogéochimie*, 6(2), 235-249.
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). La diversité des métabolites secondaires des plantes : biosynthèse, fonctions et application. *Revue Annuelle de Biologie des Plantes*, 53, 41-66.
- Ponce, H., Romero, H. M., & Pulido, M. A. (2003). Analyse de la dynamique urbaine : Le cas de la ville de Mexico. *Revue d'Études Urbaines*, 15(2), 78-92.
- Ramful, A., Boodoo, U., & Seetanah, B. (2011). Analyse de l'impact des technologies de l'information et de la communication sur l'éducation. *Cahiers Africains de Recherche en Éducation*, 3(1), 45-62.
- Schleifer, L., & Bell, M. (2020). L'impact de la technologie sur le bien-être mental des adolescents. *Journal International de Psychologie de la Santé*, 25(4), 112-128.
- Talon, R., Leroy, S., & Lebert, I. (2008). *Microbiologie alimentaire: Tome 1 : Microbiologie des matières premières alimentaires*. Tec & Doc Lavoisier.
- Venturini, G. (2012). Étude de la qualité des sols urbains. *Bulletin de l'Association des Géographes Français*, 89(3), 345-362.

- Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Ziino, M., Lanza, C. M., &Mazzaglia, A. (2003). Composition chimique des huiles essentielles de basilic (*Ocimum basilicum* L.) cultivé en Sicile. *Journal International des Sciences de l'Alimentation*, 38(2), 107-114.
- Werkman, C. H., & Gillen, G. F. (1932). Métabolisme bactérien du nitrate. *Journal de Bactériologie*, 23, 167-182.
- Yves, P., & Michel, D. (2009). Analyse des politiques de développement urbain durable. *Revue Française de Sociologie*, 50(4), 567-584.

-

Annexe

Annexe

Composition des milieux de cultures

1. Eau physiologique

Ingrédients	Composition
Chlorure de sodium	8,5g
Peptone	0,5g
Eau distillée	1000ml

pH= 7

Autoclavage : 120°C pendant 20mn

2. Milieu Mueller Hinton (MH)

Ingrédients	Composition
Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5g
Amidon de maïs	1,5g
Agar-agar	17g

pH = 7.4

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

3. Milieu bouillon nutritif

Ingrédients	Composition
Peptones	10 g
Extrait de bœuf	1 g
Extrait de levure	2 g
Chlorure de sodium	5 g

pH = 6.8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.