



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale..بيولوجيا الحيوان. قسم :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Toxicologie*

Intitulé :

**Activité antimicrobienne des huiles essentielles de
deux variétés d'agrumes**

Présenté et soutenu par : BADAOUI CHOUROUK

Le : 17 Septembre 2020

CHEROUAT HALA

DEIF AYA

Jury d'évaluation :

Président de jurée : Dr. ATMANI-MERABET G.

MCB

USBC3

Examineur : Dr. BRIK N.

MAHU

USBC3

Encadrant : Dr. DALICHAOUECHE S.

MCA

USBC3

Année universitaire

2019/2020

Résumé

Les huiles essentielles sont des molécules naturelles considérées comme antioxydants et antimicrobiens. Ce travail porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les huiles essentielles de différentes espèces de citrons : *Citrus limon* L, *Citrus aurantifolia*, *Citrus limetta*, *Citrus medica* L.var. *sacroductyli* ; et deux espèces d'orange, *Citrus aurantium* (L) et *Citrus sinensis* présentent une meilleure activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif (+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) que les bactéries à Gram négatif (-) (*Escherichia coli*).

L'activité antifongique révèle que les huiles essentielles étudiées ont un fort pouvoir inhibiteur contre les quatre (4) espèces fongiques testées *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma longibrachiatum*. Avec cependant des DI différents d'une espèce à une autre.

Mots clés : Agrumes, Citrus, huiles essentielles, activité antifongique, activité antibactérienne.

Abstract

The aim of this work is focused on the study of the antimicrobial activity of citrus fruits. The antibacterial and antifungal activity of the different species of *citrus* : *citrus limon*, *citrus aurantifolia*, *citrus limetta*, *citrus medica L, var sacridactyli*, and two species of orange : *citrus aurantium* and *citrus sinensis*. Through three bacterial strains including the bacteria gram + *staphylococcus aureus* *bacillus subtilis* and gram - *escherichia coli* and four fungal species *candida albicans*, *aspergillus niger*, *fusarium oxysporum* and *trichoderma longibrachiatum*. The results obtained showed that the essential oils tested have very good antibacterial activity and a strong antifungal effect with respect to the strains tested.

Key words: citrus fruit, essential oils, antifungal activity, antibacterial activity.

ملخص

الهدف من دراستنا هو التطرق الى الاثر المضاد للميكروبات لزيوت الاساسية في الحمضيات، المضاد للجراثيم و المضاد للفطريات عند مختلف انواع الليمون *Citrus limon L*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus limetta*, و البرتقال *Citrus medica L.var.sacroductyli* و *Citrus aurantium (L)* و *Citrus sinensis* بالنسبة الى 3 سلالات ميكروبية *Escherichia coli* - *Bacillus subtilis et a gram + Staphylococcus aureus* و 4 سلالات فطرية *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* و *Trichoderma longibrachiatum*

وكانت النتائج هي ان التأثير المضاد للجراثيم قوي جدا بالنسبة للسلالات المجربة.

الكلمات المفتاحية: حمضيات، زيوت اساسية، تأثير مضاد للميكروبات، تأثير مضاد للجراثيم، تأثير مضاد للفطريات، citrus

Remerciements

En premier lieu nous tenons à remercier le bon dieu de nous avoir donné le courage et la foi pour la réalisation de ce travail.

Ensuite, nous adressons nos remerciements à tous les enseignants, qui sans eux, nous ne serons pas à ce stade de fin d'études. Leurs patiences et leurs consciences durant le travail sont le facteur de notre réussite.

*Nous adressons nos vifs remerciements à notre encadreur **Mme DALICHAOUECHE SOUHAILA**, pour son encadrement, sa confiance, son soutien et sa disponibilité et ses précieux conseils qui nous ont permis à bien mener ce travail.*

*Nous remercions aussi docteur **ATMANI-MERABET G**, pour sa disponibilité de présider notre jury.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à docteur **BRIK N**, pour l'honneur d'examiner notre travail.*

Enfin nous remercions nos familles qui nous ont toujours soutenues, et qui sont la lumière de notre vie, qui ne soit jamais éclaircit sans elles.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À ma très chère Mère et mon très cher Père

À Lina, Hiba, Oussama qui m'ont toujours encouragé pour

que je réussisse dans mes études

À ma famille et À ceux que j'aime et je respecte infiniment

*“ L'apprentissage de la vie, c'est de se donner les moyens de surmonter cette
angoisse qu'on a d'elle, en se structurant, en prenant ses responsabilités, en
se disciplinant.”*

BOTHOREL JEAN

“ Le savoir que l'on ne complète pas chaque jour diminue tous les jours.”

Proverbe Chinois

Hala

Dédicaces

À l'occasion de la fin de mes études, je tiens à remercier ma mère « Fatima », ma force d'être, mon futur mari « Lezhar », mes frères Khilou et Hamza, mes sœurs: Dounia, Sihem, Hassiba, Hanene et Sara mes belles sœurs Nacuel et Hanene pour leurs soutien moral et physique

Et bien sur sans oublier l'âme qui a veillé sur nous durant ce long chemin mon père que dieu garde son âme dans son vaste paradis « Moussa Deif »

Et mes sœurs de vie « sabrina, zaineb, nesrine »

Et aussi à toute ma famille Deif et amies qui ont été toujours à mes côtés.

Aya

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Aux êtres qui me sont les plus chers

À ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son support et amour ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

*À ma chère mère « Dalila » et à mon cher papa « Abdesslem »
que Dieu les garde et les protège.*

*À ma chère sœur « Amira » et à mon futur mari
« Bessassem » qui m'ont toujours soutenu et encouragé
durant ces années d'études*

*Aussi à mes amis qui m'ont permis d'oublier les moments de
stress et de découragement.*

À tous ceux qui ont contribué à ce travail de près ou de loin

Thourouk

ANSM : Agence nationale de sécurité
du médicament et des produits

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

C. albicans : *Candida albicans*

C. aurantium : *Citrus aurantium*

C. limon : *Citrus limon*

Climat M : Climat méditerranéen

Climat T : Climat tropical

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMF : Concentration minimale fongicide

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DAEC : *Escherichia coli* à adhésion diffuse

DI : Diamètre d'inhibition

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

EAEC : *Escherichia coli* entéroaggrégatifs

E. coli : *Escherichia coli*

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasifs

EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène

ETC : *Escherichia coli* entérotoxinogènes

F. oxysporum : *Fusarium oxysporum*

HD: Hydrodistillation

HE : Huile essentielle

HEH: Hydrodistillation

HEP: Pression à froid

MAD: Distillation accélérée au micro-
onde

PC: Pression à froid

PDA: Pomme de Terre-Dextrose

Ppm: Partie per million

PTT: Thrombocytopénique

SHH: Syndrome Hémolytique et
Urémique

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

T. longibrachiatum: *Trichoderma*
longibrachiatum

ZI: Zone d'inhibition

Figure1	Répartition des superficies agrumicoles par région	4
Figure 2	Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de pétri	20
Figure 3	Morphologie de <i>Candida albicans</i>	26
Figure 4	Colonies d' <i>Aspergillus niger</i>	27
Figure 5	<i>Fusarium oxysporum</i>	28
Figure 6	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	28
Figure 7	La zone d'inhibition du microorganisme <i>C.Albicans</i>	33

Tableau 1	Caractéristiques organoleptiques des principaux types d'agrumes	2
Tableau 2	Composition Biochimique d'Oranger	7
Tableau 3	Composition Biochimique de Citronnier	8
Tableau 4	Généralités sur les souches bactériennes utilisées	21
Tableau 5	Toxines impliquées dans la virulence de <i>S. aureus</i>	24
Tableau 6	Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	30
Tableau 7	CMI et CMB de l'huile essentielle <i>Citrus limon</i>	30
Tableau 8	Diamètre des zones d'inhibition et CMI	31
Tableau 9	La capacité de l'huile essentielle de citron contre les différents microorganismes pathogènes	32
Tableau 10	Activité antifongique de l'huile essentielle de citron obtenu par MAD, HD et CP	33
Tableau 11	Taux d'inhibition de <i>C. Albicans</i>	34
Tableau 12	Activité antifongique de l'HE en présence du DMSO 10%	34
Tableau 13	La croissance de <i>Candida albicans</i> dans la première phase du traitement	36
Tableau 14	La croissance de <i>Candida albicans</i> dans la deuxième phase du traitement	36
Tableau 15	La croissance de <i>Candida albicans</i> dans la troisième phase du traitement	37
Tableau 16	Activité anti-candida de l'huile essentielle de citron	38
Tableau 17	La sensibilité de <i>Candida</i> à l'huile essentielle	39
Tableau 18	Le diamètre de la zone d'inhibition (mm) et CMI ($\mu\text{g/ml}$)	40

Tableau 19	Activité antifongique de l'HE est déterminée par ZI (mm) et CMF (concentration minimale fongicide en mg/ml)	40
Tableau 20	Le taux de croissance fongique en fonction de concentration de l'huile essentielle	41
Tableau 21	Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Citrus limetta</i> var. Mitha (sweet lime)	42
Tableau 22	Comparaison entre différentes études Maghrébines sur l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'orange	43
Tableau 23	Comparaison entre différentes études européennes sur l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'orange	44
Tableau 24	Comparaison entre différentes études sur l'effet antifongique de l'HE d'orange sur <i>Candida albicans</i>	46
Tableau 25	Comparaison entre différentes études sur l'effet antifongique de l'HE d'orange sur <i>Aspergillus niger</i>	47
Tableau 26	Comparaison entre différentes études sur l'effet antifongique de l'HE d'orange sur <i>Fusarium oxysporum</i>	48

Sommaire

Résumé.....	i
Remerciements.....	ii
Dédicaces.....	iii
Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Table de matière.....	vii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I: GÉNÉRALITÉS SUR LES AGRUMES	
I.1. Définition.....	2
I.2. Caractères généraux.....	2
I.3. Historique.....	3
I. 4. Les zones de production en Algérie.....	4
I. 5. Composition chimique globale des agrumes.....	5
I. 6. Effets antibactérien et antifongique.....	5
I. 7. Quelques espèces d'agrumes.....	6
I. 7.1. L'orange.....	6
I. 7.2. Le citron.....	7
CHAPITRE II : LES SUBSTANCES ACTIVES : LES HUILES ESSENTIELLES	
II.1.Définition.....	10

II.2. Répartition et localisation.....	10
II.2.1. Répartition.....	10
II.2. 2. Localisation.....	10
II. 3. Composition chimique.....	10
II. 4. Propriétés et caractéristique des huiles essentielles.....	11
II. 4. 1. Propriétés physicochimiques.....	11
II. 4. 2. Propriétés pharmacologiques et activités biologiques.....	12
II. 5. Caractérisation physicochimiques des huiles essentielles.....	13
II. 6. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	14
II. 7.Toxicité des huiles essentielles.....	15
II. 8.Contrôle de qualité.....	15
II. 9.Utilisation des huiles essentielles en industries alimentaire.....	16
 CHAPITRE III : ÉVALUATION DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES DE CERTAINES ESPÈCES D'AGRUMES	
III. 1. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	18
III.2.Détermination des CMI, CMB et CMF.....	20
III. 3. Description de certaines souches étudiées.....	21
III. 3.1. Souches bactériennes.....	21
III. 3.1. 1. <i>Escherichia coli</i>	22
III. 3.1. 2. <i>Bacillus Subtilis</i>	23
III. 3.1. 3. <i>Staphylococcus aureus</i>	23
III. 3.2. Souches fongiques.....	25

III. 3.2.1. <i>Candida albicans</i>	25
III. 3.2. 2. <i>Aspergillus Niger</i>	26
III. 3.2.3. <i>Fusarium oxysporum</i>	27
III. 3.2.4. <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	28
III.4. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de citron.....	29
III.4. 1. Activité antibactérienne.....	29
III.4.2. Activité antifongique.....	33
III.4.2.1. Pouvoir de l'HE sur <i>Candida albicans</i>	33
III.4.2.2. Pouvoir de l'HE sur <i>Aspergillus niger, Fusarium oxysporum et Trichoderma longibrachiatum</i>	39
III.5. Pouvoir antimicrobienne des huiles essentielles d'orange.....	42
III.5.1. Activité antibactérienne.....	42
III.5.2. Activité antifongique.....	46
III.5.2.1. Pouvoir de l'HE d'orange sur <i>Candida albicans</i>	46
III.5.2.2. Pouvoir de l'HE d'orange sur <i>Aspergillus niger</i>	47
III.5.2.3. Pouvoir de l'HE d'orange sur <i>Fusarium oxysporum</i>	48

CONCLUSION

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction générale

Les bactéries et les champignons sont les microorganismes les plus dangereux causant des problèmes de santé. Dans la lutte perpétuelle contre les infections microbiennes, les antibiotiques ont été considérés comme l'arme absolue. Mais le phénomène de l'antibiorésistance des différents genres et espèces et les effets secondaires des médicaments de synthèse, sous-estimé ont remis d'actualité la phytothérapie. L'homme a utilisé des substances naturelles dans un large éventail de domaine industriel (Taghigolmakani et Moayyedi, 2015), pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

Un intérêt considérable a été suscité aux huiles essentielles extraites à partir de plantes aromatiques et dotées d'activités antimicrobiennes vis-à-vis des microorganismes pathogènes. De nombreuses études ont été réalisées en vue de l'estimation du pouvoir antiseptique des huiles essentielles depuis très longtemps.

Les écorces de citrons et d'orange sont riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine c et composés phénoliques) (Tian et al., 2001 ; Fisher et Philips, 2006 ; Singh et al., 2010) ; ce qui leur confère des propriétés : antibactériennes, anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, stimulantes, calmantes et relaxantes (Hoshi et al., 2010).

Plusieurs études ont été menées sur les activités biologiques des huiles essentielles de citron et d'oranges, ces derniers ont d'importantes activités antimicrobiennes, ils peuvent remplacer avec succès les antibiotiques qui montrent leur inefficacité contre les microorganismes résistants, qui constitue une menace pour la santé des humains et des animaux en raison de son évolution rapide tel que les bactéries à gram positive et négative et les différentes espèces fongiques et les levures,

De plus les huiles essentielles avec leurs larges spectres d'action vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces fongiques constituent une alternative très prometteuse, sans être une source de danger pour la santé humaine ou de pollution pour l'environnement (Broydé et Doré, 2013).

Pour cette raison l'objectif principale de cette étude bibliographique est la mise en valeurs de deux espèces d'agrumes très connues et très utilisées : le citron et l'orange. Afin de déterminer leur composition et d'évaluer leur activité antimicrobienne.

Ce présent document s'organise autour de trois chapitres.

Le premier chapitre présente des généralités sur les agrumes.

Le deuxième chapitre concerne les substances actives qui sont l'huile essentielle de citron et l'huile essentielle d'orange (amère et douce).

Le troisième chapitre présente les résultats de quelques études sur l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de citron et d'orange.

Chapitre I

Généralités sur les agrumes

I. GÉNÉRALITÉS SUR LES AGRUMES

I.1. Définition

Les Hespérides ou les agrumes viennent du mot italique *Acrumen* qui signifie saveur âcre, d'origine végétale composés de deux parties :

- La peau (la surface) : appelée le zeste riche en glande à huiles essentielles ;
- La pulpe organisée en quartiers comprenant des pépins et de nombreux poils gorgés de jus (Kara, 2018).

Ils présentent une grande diversité des fruits consommés : oranges, mandarines, clémentines, pomelos, citrons, limes, pamplemousses... (Kara, 2018).

I.2. Caractères généraux

Les agrumes sont de petits arbres, ou des arbustes, atteignant de 5 à 15 m de hauteur, assez souvent épineux, à feuillage dense, persistant à l'exception de quelques variétés hybrides dont les feuilles sont caduques ou semi-persistantes. D'un vert généralement très foncé, les jeunes plants et les jeunes pousses étant d'un vert nettement plus clair. Le fruit est formé de **segments** contenant les graines (Praloran, 1971).

Tableau 1 : Caractéristiques organoleptiques des principaux types d'agrumes (Samson, 1980 ; Davies et al., 1994 ; Vannière, 2002 ; Imbert et al., 2006 ; Duportal et al., 2013)

	Pamplemousse	Orange	Mandarine	Lime
Propriété gustative	Doux	Doux	Doux	Acide
Taille du fruit	Grosse à très grosse	Moyenne	Petite à moyenne	Petite
Teneur en sucre	+	+ à ++	++	-
Amertume *	- à ±	-	-	-
Épaisseur de l'épiderme	++	-	-	-
Adhérence de l'épiderme	+	++	-	++
Présence de pépins**	- à +	- à +	- à +	- à +
Teneur en jus	±	++	+	+
Coloration	Climat M	Climat M	Climat M	Climat M
De l'épiderme	Vert-jaune	Orange	orange	jaune
Climat T :	Verte-rose, partielle jaune	verte	verte	verte
Coloration de la pulpe***	Blanche, rose rouge	Orange à rouge	Orange	Jaune à verte

Légende : - nulle à faible ; + légère ; ± moyenne ; + importante ; ++ très importante

* La notion d'amertume est fonction du climat. En climat tropical, les températures régulièrement élevées entraînent une perte de l'amertume pour les pamplemousses (Saunt, 1990).

** La présence de pépins est propre à chaque variété, quel que soit le type d'agrumes (Davies et al., 1994).

*** La coloration de la pulpe liée à la température et au climat. La perte de cette chlorophylle est favorisée durant la maturation par de basses températures (Goldschmidt, 1997). En climat tropical, où les températures sont constamment hautes, le taux de chlorophylle est maintenu élevé et la peau des oranges et mandarines reste verte (Davies et al., 1994).

I.3. Historique

Les agrumes sont originaires des pays du Sud-est asiatique, les chinois les cultivèrent d'abord pour leurs parfums, puis pour leurs fruits. Par la suite leur culture se propage, à l'ensemble des pays du Sud-est asiatique (Sud du Japon et archipel de Malaisie) (Loussert, 1989).

Les Cédriatiers furent probablement les premiers agrumes cultivés en méditerranée à l'époque des Mèdes. Dès le X^{ème} siècle, les navigateurs arabes les propagent sur les côtes orientales de l'Afrique jusqu'au Mozambique (Loussert, 1989).

Christophe Colomb, à l'occasion de son second voyage (1493), les introduits en Haïti, à partir de laquelle la diffusion se fera vers le Mexique (1518), puis les Etats-Unis d'Amérique (1569 à 1890). Enfin, ce sont les navigateurs Anglo-Hollandais qu'en 1654 introduisent les premiers agrumes dans la province du Cap en Afrique du Sud (Loussert, 1989).

L'introduction de l'oranger en Algérie est ancienne sans qu'il soit possible de la dater avec précision mais le développement de sa plantation caractérise essentiellement l'époque coloniale (Mutin, 1969). Trabut (1905) a affirmé que l'étude de nombreux semis d'orangers et mandariniers réalisés en Algérie lui a permis de distinguer déjà un certain nombre de races.

Le mandarinier comme espèce a été introduite par Hardy en 1850 (Trabut et Marès, 1906), et de bonnes variétés ont pu être fixées par greffage (INRA, 2006). Au début du siècle une nouvelle espèce qui connaîtra le succès, le clémentinier, issu d'une hybridation entre un Mandarinier et un Bigaradier « Granito » a été trouvé, elle doit son nom au frère Clément

(INRA, 2006). Cette espèce a été découverte et mise au point en 1902 à Messerghin près d'Oran (Mutin, 1969).

Un grand nombre de variétés autochtones de citronniers a été signalé par Trabut (1908), Rebour (1945) et Wagneur (1973). Ce dernier a rapporté l'existence de certaines variétés comme Eureka, Villafrance et Vernia. Selon Masker (1987), les citronniers représentent 2% du verger agrumicole en Algérie.

I.4. Les zones de production en Algérie

Les agrumes présentent une importance économique considérable pour de nombreux pays. Il en est de même pour l'Algérie où ils constituent une source d'emploi et d'activité économique aussi bien dans le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (Farhat et al., 2010).

Les principales zones agrumicoles algériennes sont particulièrement concentrées dans les plaines Littorales et Sublittorales, où les conditions de sol et de climat sont favorables et ils sont localisés comme suite (Figure.1).

- ✓ La plaine de la Mitidja ;
- ✓ Le périmètre de la Mina et du Cas Chélif ;
- ✓ Le périmètre de l'Habra ;
- ✓ La plaine d'Annaba ;
- ✓ La plaine de Skikda (Younsi, 1990).

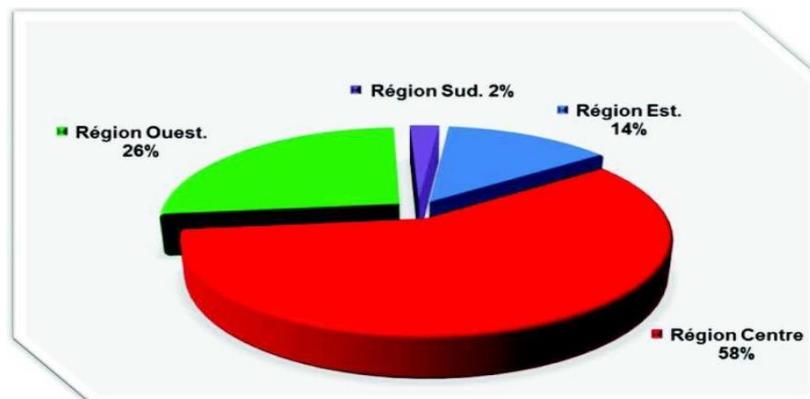


Figure 1: Répartition des superficies agrumicoles par région (MADRP, 2013).

I.5. Composition chimique globale des agrumes

La composition chimique des écorces d'agrumes est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété.

Les écorces d'agrumes présentent des teneurs élevées en eau (variant de 2,97-3,79 g/100g bs), soit 60% à 75% en base humide, et en sucres solubles (6,52-47,81 g/100g bs). De ce fait, c'est un coproduit hautement périssable qui fermente et présente un développement des moisissures (Farhat et al., 2011 ; Kammoun et al., 2011). Elles sont riches en protéines (1,79-9,06 g/100g bs) et en minéraux (2,52-10,03 g/100 bs) alors que les lipides sont très peu abondants (de 0,48 jusqu'à 4 g/100g bs).

Les écorces d'agrumes sont une source importante d'essences odorantes et d'huiles essentielles de 0,6 à 1% (Oreopoulou et al., 2007 ; Yeoh et al., 2008 ; Hosni et al., 2010 ; Farhat et al., 2011). Elles contiennent des pigments (essentiellement des caroténoïdes (0,01-0,20 g/100g bs) et des anthocyanes), des composés biologiquement actifs comme la vitamine C (0,109-1,150 g/100g bs) (Goulas et al., 2012 ; Barros et al., 2012) et les fibres alimentaires (6,30-82,69 g/100g bs) (Ghasemi et al., 2009 ; Magda et al., 2008). Les écorces d'agrumes sont également riches en composés phénoliques (0,67-22,32 g/100g bs).

I.6. Effets antibactériens et antifongique

Les écorces d'agrumes représentent un gisement important de composés phénoliques, qui sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (Bocco et al., 1998 ; Ma et al., 2009 ; Huang et al., 2010).

Le mécanisme est le suivant :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires bactériennes, la séquestration des substrats nécessaires à la croissance bactérienne ou la chélation de métaux tels que le fer
- L'inhibition du métabolisme microbien, dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires.
- Interaction avec la synthèse de l'ADN et l'ARN, des protéines, des lipides et de la fonction mitochondriale ainsi que la formation des complexes avec la paroi. Le mode d'action des agents antibactériens dépend également du type de micro-organismes. Les composés phénoliques ont une action antibactérienne surtout contre les Gram- dont les

groupes C=O réagissent avec les S-H et empêchent la croissance bactérienne, ils ont aussi une activité fongicide parfois vermifuge et cytotoxique (Mouffok, 2011).

I.7. Quelques espèces de citrus

Initialement, le genre *Citrus* s'est structuré autour de 4 taxons originaires d'Asie de l'est :

- Le cédratier (*Citrus medica*) ;
- Le pamplemoussier (*Citrus maxima*) ;
- Le mandarinier (*Citrus reticulata*) ;
- *Citrus micrantha* Wester, un proche parent de la lime *Citrus aurantifolia* Swingle (Nicolas, 2013).

Ces 4 groupes de base auraient donné lieu à des recombinaisons génétiques par hybridation, créant ainsi les autres types d'agrumes que l'on peut rencontrer aujourd'hui : orangers, bigaradiers, citronniers, pomelos (Nicolas, 2013).

I.7.1. L'oranger

I.7.1.1. Définition

L'oranger est un petit arbre ou arbuste, pouvant atteindre 10 à 15 m de hauteur environ. L'arbre est à rameaux nombreux ; formant une cime touffue, avec un feuillage vert sombre, glabre, persistant et légèrement ailé. Les feuilles sont persistantes, cirseuses, coriaces et alternes, la floraison blanche très parfumée, Le fruit est une baie, ronde ou allongée, souvent pourvue d'un mamelon proéminent du côté opposé au pédoncule fructifère (Teuscher et al., 2005).

I.7.1.2. Classification d'après (Kimball, 1999 ; Manner et al., 2006) :

Ordre : Géraniale

Famille : Rutacées

Genre : *Citrus*

Espèce : *Aurantium*

I.7.1.3. Composition biochimique

Tableau 2 : Composition Biochimique d'Oranger (sante.lefigaro.fr, 03_2020)

Composition	Teneur
Eau	85,97 g / 100 g
Fibres	2,2 g / 100 g
Glucides	12,54 g / 100 g
Lipides	0,15 g / 100 g
Protéines	0,19 g / 100 g
Energie	49 K Calories

I.7.2. Le citronnier

I.7.2.1. Définition

Le citronnier, un membre de la famille des *Rutacées*, est un petit arbre (arbuste) vert et aromatique dont la taille peut varier de 2 à 10 m de haut, porte 5-6 branches charpentières très fournies en rameaux, les racines superficielles forment un réseau dans les 80 premiers centimètres de sol. Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes, alternatives et persistantes, très adurantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visible à l'œil nu (Gollouin et Tonelli, 2013).

I.7.2.2. Classification selon (Padrini et al., 1996) :

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus limon*

I.7.2.3. Composition biochimique**Tableau 3 : Composition Biochimique de Citronnier (Souci et al., 1996)**

Composition	Teneur
Eau	90,20 g / 100 g
Glucide	3,16 g / 100 g
Protéines	0,70 g / 100 g
Lipides	0,60 g / 100 g
Acides Organiques	4,88 g / 100 g
Fibres alimentaires	0,50 g / 100 g
Les vitamines	51,26 g / 100 g
Les minéraux	211,95 g / 100 g
Apports énergétiques	36,48 K Calories

Chapitre II

Les substances actives : les huiles essentielles

II. LES SUBSTANCES ACTIVES : LES HUILES ESSENTIELLES

II.1. Définition

D'une manière générale, les huiles essentielles sont des mélanges odorants comportant de nombreuses molécules, obtenus par entraînement à la vapeur d'eau (hydrodistillation) de matières végétales d'origine botanique spécifiée ou par expression du péricarpe des agrumes, et séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (Huet, 1991). Aussi les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatiles, odorants et sensibles à l'effet de la chaleur, appelés également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices (Yahyaoui, 2005).

II.2. Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques et elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante (Belkou et al., 2005).

II.2.1. Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y aurait 17500 espèces aromatiques. Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité de familles: *Myrtaceae* (Girofle), *Lauraceae* (laurier), *Rutaceae* (citron), *Lamiaceae* (Menthe), *Apiaceae* (Coriandre), *Zingiberaceae* (Gingembre)... etc (Benkada, 1990).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante (Yahyaoui, 2005).

II.2.2. Localisation

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles. (Bouamer et al., 2004).

II.3. Composition chimique

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : Les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Teisseire, 1991).

II.3.1. Les terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart des cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Suivant les valeurs de n , on a les hémiterpènes ($n=1$), les monoterpènes ($n=2$), les sesquiterpènes ($n=3$), les triterpènes ($n=6$), les tétraterpènes ($n=8$) et les polyterpènes (Teisseire, 1991).

II.3.2. 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 (Teisseire, 1991).

II.3.3. Les autres constituants

Les constituants des huiles essentielles sont très variés. On y trouve en plus de terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres (Teisseire, 1991).

II.4. Propriétés et caractéristique des huiles essentielles

II.4.1. Propriétés physicochimiques

D'une manière générale, les propriétés et caractéristiques d'une huile essentielle sont les différents indices : pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation (Bruneton, 1999).

Les huiles essentielles sont généralement liquides à température ambiante sauf quelques-unes qui se présentent sous l'état solide (anis, fenouil, menthe de japon...). D'odeurs aromatiques, rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est plus souvent inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et, le plus souvent, sont doués d'un pouvoir rotatoire. Elles sont volatiles et entraînaibles par la vapeur d'eau, elles lui communiquent leur odeur.

Du fait de leur nature huileuse, ces produits sont très peu solubles dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques apolaire usuels, les huiles grasses, et dans les alcools à titre élevé et éther et la plupart de solvants organiques (Benkada, 1990).

Elles contiennent des substances volatiles ce qui les différencie des huiles « fixes ». Toutes les huiles volatiles sont acres, très inflammables, et très odorantes. Quantitativement, les teneurs en huiles essentielles sont faibles parfois très faibles elle est d'ordre de 0,1% à 1%, ceci explique le coût élevé de l'HE.

Elles sont très sensibles à l'oxydation et ont également tendance à se polymériser pour former des produits résineux. Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et perdent rapidement leur propriété, lorsqu'elles sont exposées au soleil, ou lumière, ou à la chaleur, elles absorbent de grande quantité d'oxygène en se résinifiant, en même temps leur odeur se modifie, leur point d'ébullition augmente et leur solubilité diminue.

Elles doivent être conservées dans des flacons en verre coloré bien fermés, à l'abri de l'air, de la lumière pour une meilleure protection (Bruneton, 1999 ; Benkada, 1990 ; Charpentier, 1998).

II.4.2. Propriétés pharmacologique et activités biologiques

Les HE sont d'un grand intérêt pour le domaine médical et pharmaceutique. En effet, elles sont un champ d'activité très large :

II.4.2.1. Pouvoir antiseptique :

En phytothérapie, les HE sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses. Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Benayad, 2008). Exemple : HE de cajepout ; HE de citron (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.2. Pouvoir antiviral :

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (Benayad, 2008). Exemple : HE d'origan, HE de tea tree (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.3. Pouvoir antifongique :

Exemple : HE de thym à thujanol, HE de thym à thymol (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.4. Pouvoir antibactérien :

Selon (Benayad, 2008), les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géraniol), etc. Exemple : HE d'origan, HE de thym à thymol (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.5. Pouvoir Antiparasitaire :

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites (Benayad, 2008). Exemple : HE de Cade, HE de tea tree (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.6. Pouvoir anti-inflammatoire :

Les HE sont très utilisés pour traiter les troubles articulaires inflammatoires, les bursites, les tendinites, les tennis-elbows... Par voie interne, les aldéhydes (citral, citronnellal, cuminal) sont doués de propriétés actives dans la lutte contre les états inflammatoires. (Arom-age.info, 04_2020). Exemple : HE de basilic ; HE de citron vert (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.7. Pouvoir calmant, anxiolytique :

De nombreuses molécules présentent un grand intérêt pour favoriser la détente et le sommeil : les aldéhydes terpéniques, les éthers et esters de la Lavande (arom-age.info, 04-2020). Exemple : HE d'orange sanguine (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.8. Pouvoir antispasmodique et anti sédatif :

Leurs principales indications sont les spasmes des muscles lisses ou striés (gastro-intestinaux, respiratoires, cardiaques et gynécologiques). Citons : le Ravensare, l'Eucalyptus citronné, Géranium rosat, Hélichryse, Lantanier, Tagète, Ylang-Ylang. Les esters, de charges négatives, ont une action antispasmodique plus nuancée (arom-age.info, 04-2020), Exemple : HE d'Aneth ; HE d'Angélique ; HE de Citron vert (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.9. Pouvoir cicatrisant :

L'HE d'Achillée mille-feuille et l'HE d'orange amère (doctissimo.fr, 04-2020).

II.4.2.10. Pouvoir Antioxydant :

HE de Curcuma (doctissimo.fr, 04-2020)

II.4.2.11. Pouvoir insecticide :

Le citronnellal de l'Eucalyptus citronné et de la Citronnelle. Le camphre du Ravintsara et du Romarin camphré. (Arom-age.info, 04-2020)

II.5. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles

Les caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur, goût) étaient autrefois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces

propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques (Yaacoub et Tlidjane, 2018). L'analyse physico-chimique reste donc indispensable et la mieux adaptée pour connaître la composition exacte d'huile essentielle, et donc la plante de laquelle elle est extraite (Yaacoub et Tlidjane, 2018).

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes on cite les méthodes micro analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces (Yaacoub et Tlidjane, 2018). Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques (Yaacoub et Tlidjane, 2018).

II.5.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode analytique chromatographique efficace, qui fournit d'excellentes séparations de mélanges quelque peu complexes dans un laps de temps raisonnable. Son principal inconvénient est qu'elle ne convient pas à tous les mélanges, car l'analyse dépend toujours de la volatilité et de la stabilité thermique des molécules étudiées (Staniszewska, et Kul, 2001). Cependant, la CPG est la technique de référence dans la séparation et l'identification des constituants volatils d'une huile essentielle. Cette technique permet l'individualisation des constituants, leur quantification, et le calcul de leurs indices de rétention (Bonnafoous, 2013).

II.5.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

C'est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge des différents constituants d'un mélange complexe (Dib et al., 2010).

II.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction. Les principales méthodes d'extraction sont :

- ✓ La distillation à la vapeur saturée
- ✓ Entraînement à la vapeur d'eau
- ✓ L'hydrodiffusion
- ✓ L'expression à froid
- ✓ Extraction par solvants
- ✓ Hydrodistillation
- ✓ Extraction par les corps gras
- ✓ Extraction par micro-ondes

Les étapes d'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quel que soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (Lucchesi, 2005).

II.7. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité, celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise (Degryse et al., 2008).

Les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, il ne faut donc jamais dépasser les doses prescrites, quel que soit la voie d'absorption (Englebin, 2011). Ainsi les HE ne seront toxiques par ingestion ou par contact que si des concentrations importantes sont utilisées (Degryse et al., 2008), car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée.

Paracelse a dit : "rien n'est poison, tout est poison, tout dépend de la dose".

II.8. Contrôle de qualité

Les recommandations de l'ANSM du 21/05/2008 portent, d'une part, sur les critères qualité des matières premières végétales d'où sont issues les huiles essentielles (dénomination botanique, conditions de production de la plante, partie de plante utilisée, famille chimique et méthode d'identification de la partie de la plante destinée à la production de l'huile essentielle ...) (Bonnafous, 2013).

Les huiles essentielles sont soumises à des facteurs de variabilité de deux types :

1. Des facteurs de variabilité intrinsèques sont liés à l'espèce, au genre, au clone, à l'organe sécréteur, à la zone géographique, à la saisonnalité, à l'environnement, au stade de maturation de la plante aromatique concernée, au moment de la cueillette, au type de séchage, de stockage, de conditionnement ... ;
2. Des facteurs de variabilité extrinsèques seront déterminés par les types d'extraction et les méthodes d'analyses et d'identification des composés (Bonnafous, 2013).

Les recommandations concernent :

- ✓ Les caractères organoleptiques (odeurs, couleur, saveur) ;
- ✓ Les mesures physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire) ;
- ✓ Les analyses chimique (chromatographie gazeuse/ spectrométrie de masse) (Bonnafous, 2013).

II.9. Utilisation des huiles essentielles en industries alimentaire

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Pingot, 1998 ; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 ; Aprotosoia et al., 2010). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (Grysole, 2005).

Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments, ceci est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Conner, 1993 ; Hammer et al., 1999). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Choi et al., 2000 ; Robert ; Lobstein, 2005 ; Bisignano et al., 2011). Récemment, certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant (Himed, 2011 ; Hellal, 2011).

Chapitre III

*Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles
essentielles de certaines espèces d'agrumes*

III. ÉVALUATION DE POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES DE CERTAINES ESPÈCES D'AGRUMES

III.1. Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide (Rhayour, 2002).

III.1.1. Technique en milieu liquide

III.1.1.1. Méthode des disques de Sarbach

L'essence est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'ensemble est placé dans des tubes à essai. Dans chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation (Banquour, 2000). L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide d'une anse prélevée sur le milieu liquide de subculture. Le pouvoir bactéricide partiel est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide (Benouda, 1982).

III.1.1.2. Méthode de Maruzuella

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après la durée d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (Banquour, 2000).

III.1.2. Techniques en milieu solide

III.1.2.1. Méthode de Morel et Rochaix

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des HE par solubilisation dans l'alcool à différentes concentrations et incorporation de chacune des concentrations dans un milieu gélosé, ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu (Beylier-Maurel, 1976).

III.1.2.2. Méthode de micro atmosphère

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance (Beylier-Maurel, 1976).

III.1.2.3. Aromatogramme (méthode de Vincent)

La méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme ou technique de l'antibioaromatogramme (Jacob ; Pellecuer et Tomei, 1979) est mise au point par Schroeder et Messing en 1949. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues (Bachiri et al., 2016). Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux huiles essentielles (Cornet, 1981).

Elle consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Un disque stérile de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégné d'une quantité connue d'huile essentielle est déposé sur le milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne. La dilution des HE se fait toujours dans un solvant tel que l'éthylène glycol I (DAYAL et Purohit, 1971), l'acétone (Martinez ; Montalvo et Seda, 1973), l'éthanol à 95% (Conner et Beuchat, 1984). Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose.

Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (Chao et al., 2000 ; Andrews, 2001 ; Wilkinson, 2006). La sensibilité aux différentes huiles essentielles est mesurée en fonction des diamètres des zones d'inhibition comme suit : non sensible (-) pour le diamètre moins sensible de 6 mm ; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm ; très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm (Ponce et al., 2003).

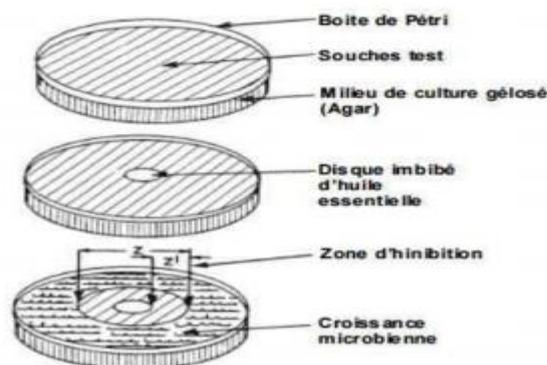


Figure 2: Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de pétri (Boukhatem et al., 2014).

III.2. Détermination des CMI, CMB et CMF

La sensibilité d'un même germe vis-à-vis d'une même HE diffère selon la méthode utilisée ou selon le mode de dispersion de l'HE dans le milieu de culture, l'interaction entre les agents émulsifiants (utilisés pour la dispersion des HE dans le milieu de culture) et les constituants des HE (faible solubilité), représente un facteur important pour la mesure de leur activité antibactérienne. Ce problème a été résolu par des travaux réalisés par Remmal et coll. (Remmal et al., 1993) en milieu liquide et en milieu solide, qui ont montré que les CMI et CMB obtenues en absence de détergents ou de solvants - dispersion dans l'agar 0,02%- sont nettement inférieures à celles obtenues en leur présence. Ceci démontre que le Tween et l'éthanol, couramment utilisés dans ce type d'étude, exercent une inhibition sur l'activité antimicrobienne des HE.

III.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance de 90% de la population microbienne (Chebaibiet et al., 2016).

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des HE dans des solutions de différents détergents comme

le Tween 20 et le Tween 80 (Benjlali et al., 1986 ; Allegrini et al., 1973) ou de solvant comme l'éthanol (Beylier-Maurel, 1976 ; Simeon, 1976).

III.2.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide et fongicide (CMB et CMF) en milieu solide

La concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum microbien initial (soit moins de 0,1% de survivants). Elle définit l'effet bactéricide ou fongicide d'une huile essentielle.

Cinq microlitres de la suspension bactérienne sont repiqués à partir des puits montrant une absence complète de la croissance bactérienne puis déposés « en strie » sur gélose approprié pour chaque germe (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour levures). Les boîtes ensemencées sont incubées pendant 18 heures pour les bactéries et 48h pour les levures à 37°C. La CMB (% v/v) de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactéries. (Chebaibiet et al., 2016).

III.3. Description de certaines souches étudiées

III.3.1. Souches bactériennes

Tableau 4 : Généralités sur les souches bactériennes utilisées (Dellaras, 2007 ; Joli et Reynaud, 2002 ; Hart et Shears, 1997).

Souches bactériennes	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Gram +	- Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif	-Infection hospitalière. - Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	-Le tube digestif	-Infections urinaires -Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastroentérites.

III.3.1.1. *Escherichia coli*

Décrite pour la première fois en 1885 après avoir été isolée dans des selles de nourrissons par l'allemand Theodor Escherich. Son nom actuel lui est ensuite donné en 1919 par Castellani et Chambers (Grimont, 1987). Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxydase (Le Minor et al., 1990). Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*.

Escherichia coli fait partie de la microflore commensale intestinale de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud. Elle représente près de 80% de la microflore aérobie (Ghebru, 1988). Elle est recherchée dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale ; sa présence fournit ainsi une indication sur une éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (ex. *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157 :H7...). Bien que la majorité des souches d'*E. Coli* soient commensales, certaines d'entre elles sont associées à des pathologies intestinales (Levine, 1987) ou extra-intestinales (Pohl, 1993).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de classification standardisée des souches appartenant à l'espèce *E. coli*. Les médecins utilisent une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 6 groupes :

a. Les *E. coli* Entérotoxinogènes (ETEC)

Elles sont majoritairement associées à deux syndromes cliniques importants, les diarrhées du nourrisson dans les pays en voie de développement et la diarrhée du voyageur. Ils sont présents essentiellement dans la partie proximale de l'intestin grêle et leur pouvoir pathogène s'explique par la sécrétion de toxines thermostables et/ou thermolabiles (Levine, 1987).

b. Les *E. coli* Enteropathogènes (EPEC)

Elles sont responsables de diarrhées infantiles et touchent en particulier les enfants en bas âge (<3 ans). Des lésions histopathologiques apparaissent lors d'infections. (Andrade et al., 1989).

c. Les *E. coli* Entéroaggrégatifs (EAEC)

Elles sont de plus en plus reconnues comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes dans les pays en voie de développement ainsi que les pays industrialisés. (Vial et al., 1988).

d. Les *E. coli* Entéroinvasifs (EIEC)

Elles sont responsables de syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnées d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en dysenterie (Brenner et al., 1973),

e. Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Elles sont responsables de diarrhées et d'infections urinaires. (Benz et Schmidt, 1992 ; Cookson et Nataro, 1996).

f. Les *E. coli* Enterohéorragiques (EHEC)

Elles sont à l'origine de troubles plus ou moins sévères allant d'une « simple » diarrhée peu hémorragique à des colites hémorragiques, voire à un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) chez l'enfant ou à un Purpura Thrombotique et Thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte, pouvant conduire parfois à la mort du patient (Riley et al., 1983).

III.3.1.2. *Bacillus Subtilis*

Le genre *Bacillus* englobe des bactéries à Gram positif, les cultures âgées peuvent apparaître à Gram négatif. Les *Bacillus* sont des bâtonnets droits à extrémité carrée ou arrondie ; de taille variable de 0.5-2.5 x 1.2-10 µ. Ils forment des endospores le plus souvent mobiles, à flagelles péritriches. Ils sont aérobies, parfois facultatifs, et catalase positif (Prescott et al., 2003).

Les *Bacillus* sont des bactéries telluriques largement répandues dans la nature, surtout dans le sol (Turnbull et Kramer, 1995).

III.3.1.3. *Staphylocoques*

Les *staphylocoques* sont des bactéries sphériques (coques) aérobie-anaérobie facultative à Gram positif, très résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture. *S. aureus*, communément appelé staphylocoque doré, est un staphylocoque à coagulase positive. Il a été nommé ainsi par Rosenbach en 1884 en raison de la production de caroténoïdes donnant à la

bactérie sa pigmentation de surface caractéristique (Licitra, 2013). C'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses dont la niche principale est la fosse nasale (Wertheim et al., 2005). D'autres sites peuvent également être colonisés par *S. aureus* tels que le pharynx, l'intestin, le périnée, la peau et les aisselles. Si l'Homme est le principal réservoir, ces bactéries sont également retrouvées dans l'environnement (eau, air, surfaces, aliments) et chez l'animal, notamment d'élevage.

La porte d'entrée principale de *S. aureus* est cutanée, il possède de nombreux facteurs de virulence et de pathogénicité (facteurs d'adhésion, toxines, enzymes) et exerce son pouvoir pathogène par la libération d'une ou de plusieurs toxines. Parmi les toxines, les entérotoxines libérées par la bactérie sont responsables de toxi-infections alimentaires (Tableau.5). (Shallcross et al., 2013).

Tableau 5 : Toxines impliquées dans la virulence de *S. aureus* (Vincenot et al., 2008)

Familles	Principales toxines	Mécanismes d'action ou syndromes toxiques spécifiques
Toxines superantigéniques	Toxine du choc toxique staphylococcique Entérotoxines A à E, G, I à U	Choc toxique staphylococcique par activation du système immunitaire et libération de cytokines de l'inflammation Réaction auto immune (maladie de Kawasaki, dermatite atopique, psoriasis, arthrites rhumatismales) Intoxication alimentaire
Toxines formant des pores	Toxines à hélice Alpha-hémolysine Gamma-hémolysine Leucocidine de Panton-Valentine	Destruction des cellules de défense de l'hôte par formation de pores au niveau des membranes cellulaires
Toxines à activité protéolytique	Exfoliatines	Syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée) Impétigo bulleux staphylococcique

III.3.2. Souches fongiques

III.3.2.1. *Candida albicans*

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires se multipliant par bourgeonnement. Le genre *Candida* comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* (Fitzpatrick et al., 2006).

Candida albicans, souvent associée à un champignon microscopique, est une levure diploïde (huit chromosomes) mesurant de 3 à 15 µm, non capsulée, non pigmentée et aérobie (Chu et al., 1993). Elle se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (Graser et al., 1996), formant ainsi des colonies blanches crémeuses. La levure *C. albicans* est dimorphe, caractérisée par deux formes, la forme normale appelée « levure » et la forme infectieuse appelée « mycélium ». Certains paramètres tels que le PH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (Sudbery, 2001) (figure.3) :

- ✓ La forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 µm avec parfois un bourgeon de formation ;
- ✓ La forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 µm de longueur et de 3 à 5 µm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (Sudbery, 2001 ; Sudbery et al., 2004). Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants (Barelle et al., 2006).
- ✓ La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (Anofel, 2007).

Cette levure représente la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante (Pfaller et Diekema, 2007) malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés (Anofel, 2007).

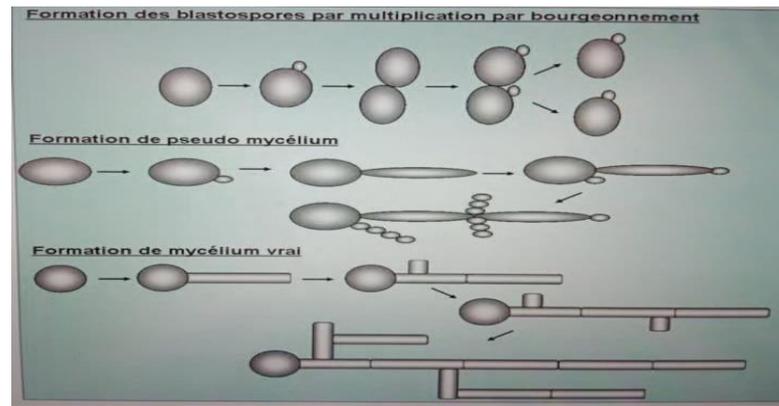


Figure 3: Morphologie de *Candida albicans* (Odds, 1988).

III.3.2.2. *Aspergillus Niger* :

Les *Aspergillus* sont sous la forme de champignons filamenteux septés et ramifiés (Figure.4): cette forme végétative est appelée mycélium. En condition de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium : les conidiophores. Il s'agit d'organes de fructification au bout des quels les têtes aspergillaires ou vésicules terminales sont retrouvées. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninucléées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides. Les phialides sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies, 2 à 3 μm de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement. La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Cette phase de croissance iso-diamétrale dure 3 à 4h à 37°C. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (Quatresous, 2011).

Aspergillus niger a été décrit en 1867 par le botaniste français Philippe Edouard Léon van Tieghem. Il a isolé ce champignon à partir des galles moulées avec l'objectif principal d'étudier la production de l'acide gallique par un procédé de fermentation fongique. Il est également largement utilisé pour la production des additifs alimentaires, l'acide citrique et l'acide gluconique. En 1917, il a été montré qu'*Aspergillus niger* produit de grandes quantités d'acide citrique dans un milieu contenant le sucre (Dijksterhuis et Wösten, 2013). Il est utilisé dans l'industrie alimentaire pour la production de nombreuses enzymes tels que l' α -amylase,

l'amyloglucosidase, les cellulases, la lactase, l'invertase, les pectinases et les protéases acides (Anonyme, 1997).



Figure 4: Colonies d'*Aspergillus niger* (http://fungi.myspecies.info/file/945,11_7_2020).

III.3.2.3. *Fusarium oxysporum*

Le genre *Fusarium* est bien connu pour son rôle important en phytopathologie, ce dernier regroupe un grand nombre d'espèces (Messiaen et Cassini, 1968). Parmi ces champignons telluriques, une espèce ubiquiste nommée *Fusarium oxysporum* est retrouvée dans tous les types de sols (Burgess, 1981) (Figure.5). Ce champignon filamenteux décrit par Snyder et Hansen en 1940, appartient à la famille des Tuberculiacées (classe des Hyphomycètes). Ce champignon a la capacité de provoquer des maladies sur de nombreuses espèces végétales cultivées, d'intérêt économique (Armstrong, 1981). En effet, certaines souches de *F. oxysporum* sont dites pathogènes et engendrent des fusarioses (trachéomycose, nécrose, fonte de semis) sur des plantes hôtes. Ces souches pathogènes ont une large gamme de plantes hôtes et la plupart envahissent le système vasculaire de ces plantes et présentent une spécificité parasitaire, c'est-à-dire que l'espèce ne peut attaquer qu'un hôte déterminé (Ozenda, 1990).



Figure 5: *Fusarium oxysporum*

(https://www.pinterest.com/pin/160581542937892826/11_07_2020)

Les *Fusarium oxysporum* comprennent un ensemble très diversifié de formes plus ou moins spécialisées (Dommergues et Mangenot, 1970). Cette forme spéciale (forma specialis, f.sp) présente une virulence particulière pour telle ou telle plante (Messiaen et Cassini, 1968; Snyder et Hansen, 1945). Les formes spécialisées de *Fusarium oxysporum* s'attaquent à la plupart des plantes cultivées mono et dicotylédones (El Modafar, 1994).

III.3.2.4. *Trichoderma longibrachiatum*

Trichoderma longibrachiatum est un champignon filamenteux saprophyte (Alanio et al., 2008 ; Gangneux et al., 2008) (Figure.6).

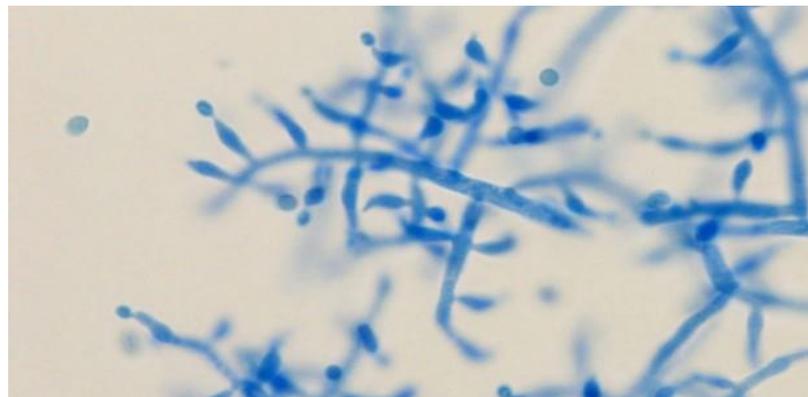


Figure 6 : *Trichoderma longibrachiatum*

(https://www.rna-seqblog.com/tag/trichoderma-longibrachiatum,11_07_2020)

Bissett a proposé une classification infragénérique de *Trichoderma* par laquelle le genre a été divisé en sections : section *Trichoderma pachybasium* section *Trichoderma saturnisporum*, section *Trichoderma longibrachiatum* et section *Trichoderma hypocreanum*.

(Bissett, 1984 ; Bissett, 1991). Les caractéristiques principales de la section *Longibrachiatum* inclus ce qui suit :

- ✓ Des colonies se développent rapidement et sont de 6 à 9 cm après 4 jours à 20° C
- ✓ Les chlamydo-spores sont présentes ou absentes
- ✓ Les conidiophores sont ramifiés, rameaux primaires est longuet et les branches secondaires sont généralement courtes
- ✓ Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet
- ✓ Les conidies sont unicellulaires, verte, lisse fortifiée et ellipsoïde à obovoïde.

III.4. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de citron

III.4.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est déterminée par la méthode des aromagrammes. Le principe de la méthode repose sur l'inhibition de la croissance microbienne dans la boîte de Pétri après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. En fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de résistante (-) pour les diamètres moins de 8 mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm (Himed, 2014).

Une étude Algérienne (Himed, 2014) sur l'évaluation du pouvoir de l'huile essentielle de *Citrus limon*, extrait par hydrodistillation du zeste frais de citron récolté dans la région de Takariet wilaya de Bejaia, sur des souches bactériennes impliqués dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires (bactéries à Gram positif (+) : *Staphylococcus Aureus* et bactéries à Gram négatif (-) : *Escherichia Coli*) a montré que les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée, ils ont constaté aussi que les souches Gram positif (*Staphylococcus aureus*) sont les souches les plus sensibles par rapport aux souches à Gram négatif (*Escherichia coli*). (Tableau.6)

Les CMI et CMB permettent de déterminer les pouvoir bactéricides et bactériostatique de l'huile essentielle étudié. Ils ont constaté que toutes les souches ont été inhibées totalement à 1 000 µg.ml⁻¹ les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) sont les plus sensibles à l'huile essentielle étudiée par rapport aux bactéries Gram négatif avec des CMI et CMB de 240 µg/ml et 300µg/ml respectivement (Tableau.7). D'après leurs résultats, le rapport CMB/CMI

est inférieur à 4, donc l'huile essentielle étudiée a un pouvoir bactéricide vis-à-vis à des souches bactériennes testées (Canillac et Mourey, 2001).

Tableau 6 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Citrus limon* (Himed, 2014)

Souches testés	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Sensibilité (Ponce et al)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,33 ± 1,52	Sensible et non résistante
<i>Escherichia coli</i>	9,5 ± 0,1	Sensible et non résistante

La souche : résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

Tableau 7 : CMI et CMB de l'huile essentielle *Citrus limon* (Himed, 2014)

Souches testées	CMI ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}^{-1}$)	CMB/CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	240	300	1,25
<i>Escherichia coli</i>	500	700	1,4

Une autre étude Algérienne menée par Boughendjioua (2013) a conclu que l'HE de citron (extraction à froid de la partie supérieure du péricarpe ou zeste frais de citron de la région de Collo wilaya de Skikda) ne montre aucune zone d'inhibition vis-à-vis de la souche étudiée (*Bacillus subtilis*). Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de H.E de *Citrus*. Il est bien connu que les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux HE que les bactéries à Gram (-), mais les mécanismes d'action des HE et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés. Il est à noter aussi, qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur des composants chimiques et l'activité antibactérienne de l'HE de *Citrus* testées pour les souches. En effet, le limonène composant majoritaire de l'HE (61.65%) a démontré une efficacité antimicrobienne inférieure. D'après ces observations, il est évident que le limonène n'a exercé aucune influence sur le potentiel antibactérien de H.E testée.

Les résultats d'une étude Tunisienne (Ben Hsouna et al., 2017) du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Citrus limon* (extraction par hydrodistillation des fleurs de *Citrus limon* récoltées dans la région du Cap Bon de la Tunisie) sur des bactéries Gram positif (+) (*Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*) et des bactéries Gram négatif (-) (*Escherichia coli*) qui contaminent les aliments ont montré que les bactéries à Gram positif (+) sont plus sensibles avec un intervalle de 0,078 à 0,625 mg/ml (Tableau.8).

Tableau 8 : Diamètre des zones d'inhibition et CMI (Ben Hsouna et al., 2017)

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	19 ± 0,8	0,625 ± 0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	22 ± 0,6	0,078 ± 0,5
<i>Escherichia coli</i>	15 ± 0,5	1,25 ± 0,6

La souche : résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm

Le pouvoir antibactérien de *Citrus Medica L.* var. *sarcodactylis* (Extraction par hydrodistillation) étudié par une équipe chinoise sur ces mêmes souches (Ze-Hua et al., 2019) a montré que l'huile essentielle de citron est un inhibiteur bactérien et un bactéricide. Le diamètre de la zone d'inhibition de croissance a été mesuré. La ciprofloxacine a été utilisée dans cette expérience comme témoin positif.

Le diamètre de la zone d'inhibition maximum est observé pour *Staphylococcus aureus* (19,2 ± 2,1 mm), suivi de *Bacillus subtilis* (16,3 ± 1,3 mm) et *Escherichia coli* (11,2 ± 0,9 mm). Les CMI et CMB sont dans les intervalles de 0,625-2,5 mg/ml et de 1,25-2,5 mg/ml. L'HE de citron présente la meilleure activité bactéricide contre *Staphylococcus aureus* avec un minimum de CMI et CMB (Tableau.9). Ces résultats sont similaires avec ceux d'autre chercheurs qui indiquent que l'huile essentielle d'agrumes inhibe *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* avec des CMI de 1%, 2% et 2% (Guo J., Et Al, 2018).

Tableau 9 : La capacité de l'huile essentielle de citron contre les différents microorganismes pathogènes (Ze-Hua et al., 2019)

Microorganisme	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)		CMB (mg/ml)	
	HE Ciprofloxacine	HE	Ciprofloxacine	HE	Ciprofloxacine
<i>Bacillus subtilis</i>	16,3 ± 1,3 23,7 ± 0,6	0,625	0,001	2,5	0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,2 ± 2,1 25,0 ± 0,3	0,625	0,001	1,25	0,001
<i>Escherichia coli</i>	11,2 ± 0,9 19,3 ± 0,9	2,5	0,001	2,5	0,002

La souche : résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm

Les résultats de la majorité de ces études sont montrés que l'huile essentielle de citron avait une certaine activité antibactérienne sur tous les agents pathogènes testés. Cette activité est associée aux composants phytochimiques des huiles essentielles ou au hydrocarbure monoterpénique ou sesquiterpénique et leurs dérivés oxygénés qui sont les principaux composants des huiles essentielles présentant des activités antimicrobiennes (Cakir et al., 2004).

De plus, l'HE a montré une meilleure activité contre les bactéries à Gram positif (+) que les bactéries à Gram négatif (-). Cela pourrait être attribué à la structure de la membrane bactérienne pour les bactéries à Gram négatif (-) qui possèdent une membrane riche en liposaccharides qui fournissent une surface hydrophile (Shakeri et al., 2014), et donc ce dernier agit comme une barrière de pénétration qui bloque les macromolécules de pénétrer dans la cellule (Kong et al., 2014). En conséquence les bactéries à Gram négatif (-) sont relativement résistantes aux antibiotiques hydrophobes.

III.4.2. Activité antifongique

III.4.2.1. Pouvoir de l'HE sur *Candida albicans*

Une étude Algérienne (Mohamed et al., 2007) sur la comparaison des différents types d'hydrodistillation de *Citrus* et le pouvoir antifongique de leur huile essentielle montre une activité antifongique positive établie par la présence de zones d'inhibition mesurable.

L'activité antifongique de l'huile essentielle des écorces d'agrume (citron) extraite par : pression à froid (PC), hydrodistillation (HD) et distillation accélérée au micro-onde (MAD) est présentée dans le tableau 10 et la figure 7. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle pourrait être due à l' α -terpinéol, terpinen 4-ol et géraniol.

Tableau 10 : Activité antifongique de l'huile essentielle de citron obtenu par MAD, HD et CP (Mohamed et al., 2007)

Microorganisme	Le diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	MAD	HD	CP
<i>Candida albicans</i>	25.0 \pm 1.8	18.5 \pm 1.1	13.5 \pm 2.1

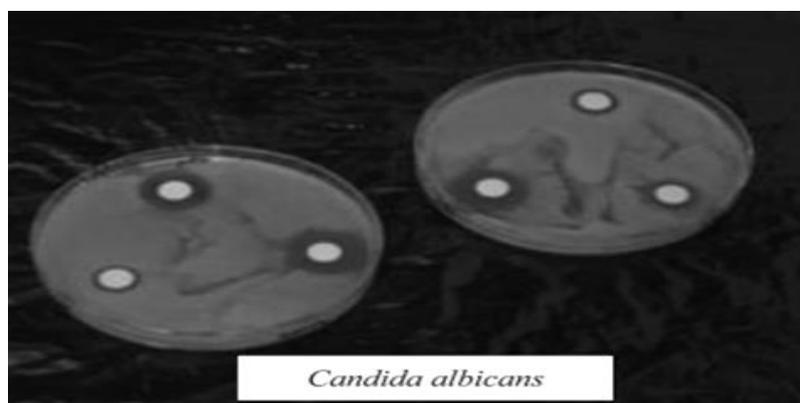


Figure 7 : La zone d'inhibition du microorganisme *C. Albicans* (Mohamed et al., 2007)

Ces résultats sont identiques à celle d'une étude marocaine (El Mansouri, 2013) sur l'évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales. Les résultats sont évalués dans le tableau 11 :

Tableau 11 : Taux d'inhibition de *C. Albicans* (El Mansouri, 2013)

	Taux d'inhibition de la pousse de <i>Candida albicans</i>				
<i>Citrus aurantifolia</i>	100-80% ^a	80-60%	60-40%	40-20%	20-0%
	81,82 ^b	--	--	--	--

a. La concentration de l'huile essentielle, b. le taux d'inhibition du champignon.

L'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a manifesté une puissante activité antifongique avec un taux d'inhibition supérieur à 80%.

Les résultats d'une deuxième expérience pour réévaluer l'activité antifongique sur *C. albicans* en présence d'un émulsifiant (DMSO 10%) montrent une augmentation du pouvoir inhibiteur de l'HE en présence de DMSO 10%. Ce dernier, en concentration utilisé, n'a pas d'effet inhibiteur sur la croissance fongique. (Tableau.12)

Tableau 12 : Activité antifongique de l'HE en présence du DMSO 10% (El Mansouri, 2013)

	Taux d'inhibition de la pousse de <i>Candida albicans</i>				
<i>Citrus aurantifolia</i>	100-80%	80-60%	60-40%	40-20%	20-0%
	100	--	--	--	--

Les tableaux (Tableau.13, 14 et 15) montrent les résultats de l'effet antifongique de l'huile essentielle de zeste de *Citrus limon* sur *Candida albicans* étudiée par une équipe Indonésienne (Iwan et al., 2015).

Dans la première phase, ils ont constaté l'effet de l'HE de *Citrus limon* avec les concentrations de 50%, 12.5%, 6.5%, 3.125%, 1.56% et 0.78%. La culture *C. albicans* sans traitement était le témoin positif et la culture *C. albicans* avec concentration de l'HE de *Citrus limon* 100% était le témoin négatif. Il n'y avait pas de croissance du champignon dans le témoin négatif par rapport au témoin positif car la turbidité est baisse. Sur les autres tubes traités avec

la concentration de 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.562% et 0.78% la turbidité dans le bouillon a augmenté cela signifie qu'il y avait une croissance de l'espèce *Candida albicans* (Tableau.13).

Ces résultats sont suivis par une deuxième phase en utilisant une concentration de 100% de l'HE de *Citrus limon* dans le premier tube et des huiles essentielles de *Citrus limon* dilués par le maïs pour obtenir des concentrations de 90%, 80%, 70%, 60% et 50% (Tableau.14). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de croissance de *Candida albicans* dans les tubes à concentration 100%, 90%, 80% et 70% mais les tubes à concentration 60% et 50% présentent une croissance fongique.

Dans la troisième phase la diffusion des cultures est réalisée dans les géloses Sabouraud dextrose dans les tubes 2 à 5 (90%, 80%, 70%, 60% et 50%) puis les colonies cultivées ont été mesurés. La croissance de *Candida albicans* est apparue dans le 4^{ème} tube (70% avec 7 colonies) et dans le 5^{ème} tube (60%) (Tableau.15). Ces résultats montrent que plus la concentration de l'HE de *Citrus limon* est élevée plus le nombre de colonies formées est faible (le 2^{ème} et le 3^{ème} tube avec 90% et 80% de l'HE).

Tableau 13 : La croissance de *Candida albicans* dans la première phase du traitement
(Iwan et al., 2015)

Tube N°	Concentration	Croissance des colonies
1	100 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(-)
2	50 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
3	25 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
4	12.5 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
5	6.25 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
6	3.125 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
7	1.5625 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
8	0.78125 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
9	Contrôle positif	(+)
10	Contrôle négatif	(-)

Tableau 14 : La croissance de *Candida albicans* dans la deuxième phase du traitement
(Iwan et al., 2015)

Tube N°	Concentration	Croissance des colonies
1	100 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(-)
2	90 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(-)
3	80 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(-)
4	70 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(-)
5	60 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
6	50 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	(+)
7	Contrôle positif	(+)
8	Contrôle négatif	(-)

Tableau 15 : La croissance de *Candida albicans* dans la troisième phase du traitement
(Iwan et al., 2015)

Tube N°	Concentration	Croissance des colonies
1	100 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	--
2	90 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	0
3	80 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	0
4	70 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	7
5	60 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	12.5
6	50 % de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	--
7	Contrôle positif	76
8	Contrôle négatif	0

Ces résultats sont en accords avec ceux d'une étude Iranienne (Saeid et Seddighe, 2009) qui a montré l'effet inhibiteur de l'HE de citron sur deux espèces de *Candida albicans*. L'activité antifongique de l'huile essentielle à 37°C était meilleure et supérieur à celle de 25°C (Tableau.16). L'effet inhibiteur de l'huile essentielle augmente lorsque la concentration de ce dernier est modifiée. L'activité antifongique est évaluée par mesure du diamètre de la zone autour des disques en papier. La plus petite ou la plus grande zone autour de la colonie est liée à la sensibilité ou à la résistance des champignons (*Candida*) à l'huile essentielle testé. La sensibilité de ces espèces au citron était sur le point de 12.5% (Tableau.17).

Tableau 16 : Activité anti-candida de l'huile essentielle de citron (Saeid et Seddighe, 2009)

Espèce	N°	% de l'huile essentielle ^a	Citron	
			25°C	37°C
<i>C. Albicans</i>	34 (80.95)	50	11.5 ± 0.6 ^b	13 ± 0.3
		25	10.2 ± 0.6	10 ± 11
		12.5	< 6.4	< 6.4
		6.25	< 6.4	< 6.4
		3.12	– ^c	–
		1.56	–	–
		0.78	–	–
		0.39	–	–
<i>C. Albicans</i> (PTCC5027)	1 (2.3)	50	12.7 ± 0.1	14 ± 0.3
		25	8.4 ± 0	11 ± 0.1
		12.5	< 6.4	< 6.4
		6.25	< 6.4	< 6.4
		3.12	–	–
		1.56	–	–
		0.78	–	–
		0.39	–	–

a. L'huile essentielle a été émulsifiée dans l'hexane, **b.** mm de la zone d'inhibition, **c.** Aucune dilution pour l'huile essentielle.

Tableau 17 : La sensibilité de *Candida* à l'huile essentielle (Saeid et Seddighe, 2009)

Concentration								
Zone (mm)	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39
< 7 ^a	0 ^d	0	6	8	–	–	–	–
7 – 11 ^b	2	6	2	0	–	–	–	–
>11 ^c	6	2	0	0	–	–	–	–

a. Résistant, b. modéré, c. Sensible, d. L'huile essentielle de citron utilisé en concentration entre 50-6.25%.

III.4.2.2. Pouvoir de l'HE sur *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma longibrachiatum*

L'effet de l'HE sur certains champignons tels que *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma longibrachiatum* est rapporté par plusieurs études.

Une étude Algérienne (Himed, 2020) sur la préservation du concentré de tomate par un agent antifongique, l'huile essentielle de zeste de *Citrus limon* de la variété *Euréka*, extraite par pression à froid (HEP) et par hydrodistillation (HEH) a permis de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition (ZI) autour du disque et la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE sur les souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Trichoderma longibrachiatum* et *Fusarium oxysporum*. (Tableau.18)

Les résultats de l'étude montrent que toutes les souches fongiques sont sensibles vis-à-vis de l'HE de *Citrus* extraite par HEH et HEP. Les diamètres d'inhibitions sont plus importants pour les souches testées par l'HE extraite par pression à froid par comparaison à l'hydrodistillation.

Les CMIs de l'HE extraite par HEP sont moins important par rapport aux l'HE extraite par HEH. Ces remarques signifient une activité antifongique forte de l'huile HEP par rapport à celle de l'huile HEH. L'espèce la plus sensible à huile essentielle extraite par les deux méthodes d'extraction est *Fusarium oxysporum*.

Tableau 18 : Le diamètre de la zone d'inhibition (mm) et CMI ($\mu\text{g/ml}$) (Himed, 2020)

Souches Testés	Le diamètre de la zone d'inhibition (mm)		La concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$)	
	HEH	HEP	HEH	HEP
<i>Aspergillus niger</i>	12.4 \pm 0.43	14.2 \pm 1.41	550	340
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	11.9 \pm 0.09	13.6 \pm 0.21	610	480
<i>Fusarium oxysporum</i>	13.8 \pm 0.06	17.8 \pm 0.03	350	180

D'autre part les résultats d'une étude Tunisienne (Ben Hsouna et al., 2017) sur l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus limon* contre les espèces *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*, montrent un fort effet inhibiteur de l'HE sur *Aspergillus niger* avec un ZI de 26 mm et une valeur de MFC de 0.625 et 0.5 mg/ml.

Il est également montré que l'HE a une activité antifongique contre *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* qui sont responsables de la détérioration de nombreux aliments.

Le β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllènesont très fongitoxiques contre les espèces *Fusarium* (Cakir et al., 2004). Les monoterpènes, l'alcool, le linalol (Pattwaik et al., 1997), α -pinène, 2- β -pinène et le limonène (Magiatis et al., 1999) exercent leurs effets toxiques contre les micro-organismes étudiés par la perturbation de la membrane fongique (Knobloch et al., 1989).

Tableau 19 : Activité antifongique de l'HE est déterminée par ZI (mm) et CMF (Concentration minimale fongicide en mg/ml) (Ben Hsouna et al., 2017)

Souches testées	ZI (mm)	CMF (mg/ml)
<i>Aspergillus niger</i>	26 \pm 0.9	0.625 \pm 0.4
<i>Fusariumoxysporum</i>	18 \pm 0.5	0.625 \pm 0.5

Une équipe Roumaine (Mariana et Camilia, 2012) a étudié l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus limon* sur gélose pomme de terre-dextrose (PDA) sur les espèces *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* comme des moisissures de contamination alimentaire. Ces espèces sont cultivées et le taux de croissance est attribué par la mesure de diamètre des colonies dans des boîtes de Pétri. Le diamètre de culture est mesuré dans les boîtes de contrôle contenant l'huile essentielle et la moyenne de taux de croissance montre que l'espèce *Aspergillus niger* était l'espèce la plus sensible à l'HE de *Citrus limon* par rapport au *Fusarium oxysporum*. (Tableau.20)

Tableau 20 : Le taux de croissance fongique en fonction de concentration de l'huile essentielle (Mariana et Camilia, 2012)

Les souches fongiques testées	Concentration de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i> (µl)				
	0	2	5	10	20
	Taux de croissance fongique (mm/h)				
<i>Aspergillus niger</i>	0.032	0.031	0.030	0.025	0.022
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.037	0.034	0.038	0.032	0.031

Ces résultats concordent avec ceux de Pakistan (Shabnam et al., 2013) qui a utilisé la méthode de diffusion sur des disques d'agar pour la détermination de l'activité antifongique de l'huile essentielle de zestes de *C. limetta* extraite par hydrodistillation sur différents agents pathogènes. Les résultats montrent une zone d'inhibition minimale par *Fusarium oxysporum* (11 mm) après 48 h d'incubation par rapport à *Aspergillus niger* (22 mm). Une diminution en pourcentage de la zone d'inhibition après 96 h allant de 11 à 27% pour les deux champignons. Cette diminution peut être due à l'inactivation ou à de faibles concentrations des composants actifs. (Tableau.21)

Tableau 21 : Activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus limetta* var. Mitha (sweet lime) (Shabnam et al., 2013)

Micro-organisme Testés	Le diamètre de la zone d'inhibition (mm)		Baisse de pourcentage en zone d'inhibition (mm) après 96 h
	Après 48 h	Après 96 h	
<i>Aspergillus niger</i>	22	17	26.22
<i>Fusarium oxysporum</i>	11	10	10.90

III.5. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'orange

III.5.1. Activité antibactérienne

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Pour la plupart de ces études l'effet antimicrobien est déterminé in vitro par la méthode de diffusion en milieu solide. Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable.

Différentes études montrent un pouvoir antibactérien de l'orange amer (*Citrus aurantium*) et de l'orange douce (*Citrus sinensis*) sur certaines bactéries Gram + et Gram -. Les résultats sont résumés dans les tableaux. 22 et 23 :

Tableau 22 : Tableau comparatif entre différentes études Maghrébines sur l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'orange

L'étude	Étude Algérienne		Étude Tunisienne	Etude Marocaine	
L'auteur	<i>C. auruntium</i> (Benabdi, 2019) : HD des feuilles fraîches	<i>C. sinensis</i> (Kaibi, 2016) : HD des feuilles fraîches	<i>C. auruntium</i> L. (Haj Ammar et al., 2012) : HD des fleurs fraîches	<i>C. auruntium</i> (Ouedrhiri et al., 2015) : HD des feuilles fraîches	
	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)	CMI
<i>Staphylococcus aureus</i>	08mm pour 10µl 10mm pour 20µl 12mm pour 30µl	/	0	12.33±1.52	1
<i>Escherichia coli</i>	0	/	18	8 ± 1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	/	25	12	14.33± 1.52	1

La souche : résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm

Tableau 23 : Tableau comparatif entre différentes études européennes sur l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'orange

L'étude	Étude brésilienne	Étude Chinoise	Étude Bulgare	
L'auteur	<i>Citrus sinensis</i> (Sheila Mello et al., 2012) : Distillation à la vapeur des feuilles fraîche	<i>Citrus sinensis</i> (Qingyun et al., 2018) : Extraction physique du zeste frais	<i>C. aurantium</i> L. (Desislava, 2018) : HD du zeste frais	
	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition (mm)	CMI
<i>S. aureus</i>	21.5 ± 1.1	3.13 ± 0.19	12,50 ± 0,40	60
<i>E. coli</i>	0.0 ± 0.0	1.56 ± 0.11	9.00 ± 0,47	>600
<i>B. subtilis</i>	85.0 ± 0.0	1.56 ± 0.07	12,50 ± 0,40	60

La souche : résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm

L'huile essentielle des feuilles fraîches de *C. aurantium* L a une excellente activité contre tous les micro-organismes testés. Une activité inhibitrice est observée pour *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 12mm pour 30 µl d'HE (Benabdi, 2019) et 12.33 ± 1.52 (Ouedrhiri et al., 2015). Le pouvoir antibactérien de cette HE est retrouvé également pour *B. subtilis* avec un DI de 14.33 ± 1.52 (Ouedrhiri et al., 2015).

L'huile essentielle des fleurs fraîches de *C. aurantium* La également une excellente activité contre tous les micro-organismes testé sauf pour *Staphylococcus aureus* car aucune

zone d'inhibition n'a été observée. Pour *E. coli* DI 18mm et pour *B. subtilis* il est de 12mm (Haj et al., 2012).

Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'activité de l'huile essentielle du zeste frais de *C. aurantium* L, les zones d'inhibition mesurées étaient de $12,50 \pm 0,40$ et la concentration inhibitrice minimale était de 60 ppm. La bactérie Gram négative testée présente une zone d'inhibition de $9,00 \pm 0,47$, avec une concentration inhibitrice minimale de plus de 600 ppm et c'est la bactérie la plus résistante (Desislava, 2019).

L'huile essentielle des feuilles fraîches de *C. sinensis* est inhibitrice à l'encontre de *Bacillus subtilis* DI 25 mm (Kaibi, 2016) et DI de $85,0 \pm 0,0$ (Sheila et al., 2012). Le DI à l'encontre de *S. aureus* est de $21,5 \pm 1,1$ (Sheila et al., 2012). Aucun diamètre d'inhibition n'est observé vis-à-vis d'*E. Coli*.

L'huile essentielle du zeste frais de *C. sinensis* ne montre aucune activité inhibitrice envers toutes les souches testées (Qingyun et al., 2018).

La différence observée dans la sensibilité des différents microorganismes à l'huile essentielle examinée est due à la différence dans la structure de la paroi cellulaire et la composition des deux groupes de bactéries. La présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif entrave la diffusion de l'huile essentielle à travers la membrane vers le cytoplasme de la cellule.

III.5.2. Activité antifongique de l'HE d'orange

III.5.2.1. Pouvoir de l'HE d'orange sur *Candida albicans*

Les résultats de quelques études sont résumés dans le tableau 24.

Tableau 24: Tableau comparatif entre différentes études sur l'effet antifongique de l'HE d'orange sur *Candida albicans*.

Études	Zone d'inhibition (mm)
Algérienne : Kaibi, 2016 : <i>C. sinensis</i> : HD des feuilles fraîches	19
Tunisienne : Haj Ammar et al., 2012 <i>C. aurantium</i> L. HD des fleurs fraîches	22
Nigérienne : Obidi et al., 2013 <i>C. sinensis</i> : HD des écorces fraîches	18-30
Brésilienne : Rodrigues ; Silva, 2018 : <i>C. sinensis</i> : HD des écorces fraîches	17

L'HE des feuilles fraîches de *C. sinensis* est modérément inhibitrice contre la souche *C. Albicans* avec un diamètre d'inhibition de 19mm (Kaibi, 2016). Le diamètre d'inhibition de l'HE de l'écorce fraîche varie selon la dilution de l'HE entre 18 et 30 pour l'étude Nigérienne (Obidi et al., 2013), et il est de 17 mm pour l'étude brésilienne (Rodrigues et Silva, 2018).

Concernant l'effet antifongique de l'HE des feuilles fraîches de *C. aurantium* L le diamètre d'inhibition est de 22mm (Haj et al., 2012).

III.5.2.2. Pouvoir de l'HE d'orange sur *Aspergillus niger*

Plusieurs études ont montré l'effet inhibiteur de l'HE d'orange sur *Aspergillus niger* avec cependant des concentrations et des diamètres d'inhibitions qui varient d'une étude à une autre. L'HE des feuilles fraîches de *Citrus sinensis* est inhibitrice avec une zone d'inhibition de 17cm (Kaibi, 2016). Les diamètres d'inhibition pour différentes concentrations de l'HE d'écorce de *Citrus sinensis* L sont respectivement de 57.0 ± 0.05 (0.27 %), 51.5 ± 0.17 (0.47 %) et 42.0 ± 0.10 (0.71 %) (Viuda-Martos et al., 2007).

La concentration minimale inhibitrice de l'HE de *C. sinensis* est de $500 \mu\text{g/mL}$ (Marcos et al., 2014). L'HE de *Citrus aurantium* montre une zone de 22 cm (Ben Bnina et al., 2019).

Tableau 25 : Tableau comparatif entre différentes études sur l'effet antifongique de l'HE d'orange sur *Aspergillus niger*.

Études	Zone d'inhibition (mm)
Algérienne : Kaibi, 2016 : <i>C. sinensis</i> : HD des feuilles fraîches	17
Espagnol : Viuda-Martos et al., 2007 : <i>Citrus sinensis</i> L, pression à froid de l'écorce	Orange 0.27 % : 57.0 ± 0.05 Orange 0.47 % : 51.5 ± 0.17 Orange 0.71 % : 42.0 ± 0.10
Tunisienne : Ben Bnina et al., 2019 : <i>Citrus aurantium</i> : HD des feuilles sèches	22

MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Brésilienne : Marcos et al., 2014 : <i>C. sinensis</i> par HD	500
---	-----

III.5.2.3. Pouvoir de l'HE d'orange sur *Fusarium oxysporum*

Les résultats des études Maghrébines ont montré un fort pouvoir inhibiteur selon des différentes concentrations avec des zones de grands diamètres pour les études Algériennes (Tableau.26)

Tableau 26 : Tableau comparatif entre différentes études sur l'effet antifongique de l'HE d'orange sur *Fusarium oxysporum*

Etudes	Dose (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)
Algérienne : Hamdani et al., 2012 <i>Citrus sinensis (L) Osbeck</i> HD des feuilles fraîches	1	100 ± 0,00
	0.8	76,84 ± 7.8
	0.6	76,59 ± 5,3
	0.4	65,90 ± 6,3
	0.2	50,33 ± 8,3
	0.1	19,40 ± 5,5
	0.05	9,53 ± 0,7
	0.01	2,86 ± 0,5
Tunisienne : Ben Bnina et al., 2019	/	8
Algérienne : Bendali et al., 2019 <i>Citrus aurantium L</i> HD des feuilles sèches	C1 (3200µl/ml)	89,3 ± 1,14
	C2 (1600µl/ml)	88,98 ± 0,21
	C3 (800µl/ml)	86,44 ± 1,74
	C4 (400µl/ml)	86,32 ± 1,64
	C5 (200µl/ml)	86,26 ± 1,55

Conclusion générale

Les huiles essentielles d'agrumes représentent une classe importante de substances chimiques sécrétées par les plantes, présentant plusieurs avantages pour la santé humaine

Les principaux objectifs visés par ce mémoire sont la comparaison des résultats des différentes études sur l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) de l'huile essentielle de deux variétés d'agrumes (citron et orange) vis-à-vis de certaines souches testées : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma longibrachiatum*.

Les résultats de la majorité des études ont montré que l'huile essentielle de citron avait une certaine activité antimicrobienne associée aux composants phytochimiques ou aux hydrocarbures, monoterpéniques ou sesquiterpéniques et leurs dérivés oxygénés.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les souches bactériennes à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) sont les souches les plus sensibles par rapport aux souches à Gram négatif (*Escherichia coli*) par la mesure d'une zone d'inhibition et la détermination des CMI et CMBs. Cela pourrait être attribué à la structure de la membrane bactérienne pour les bactéries à Gram négatif (-) qui possèdent une membrane riche en liposaccharides qui fournissent une surface hydrophile, et donc ce dernier agit comme une barrière de pénétration qui bloque les macromolécules de pénétrer dans la cellule.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique montrent que l'huile essentielle de citron exerce un effet antifongique puissant vis-à-vis *Fusarium oxysporum*. Le β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène étaient très fongitoxiques contre les espèces *Fusarium*. Les monoterpènes, l'alcool, le linalol, α -pinène, 2- β -pinène et le limonène exercent leurs effets toxiques contre les micro-organismes fongiques étudiés par la perturbation de la membrane fongique.

Les souches bactériennes à gram positive sont les plus sensibles à l'HE d'orange ceci est dû à la différence dans la structure de la paroi cellulaire des bactéries.

Concernant l'effet antifongique, toutes les souches testées, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* ont montré une sensibilité aux huiles essentielles extraites. Les valeurs des CMI traduisent une activité antifongique non négligeable.

Les résultats obtenus s'avèrent prometteurs dans l'agrandissement de l'arsenal thérapeutique des huiles essentielles d'agrumes dotées de propriétés antimicrobiennes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alanio A., Brethon B., Feuilhade de Chauvin M., Kervile E., Leblanc T., Lacroix C., Baruchel A., Menotti J. (2008).** Invasive Pulmonary Infection Due to *Trichoderma longibrachiatum* Mimicking Invasive *Aspergillo*sis in a Neutropenic Patient Successfully Treated with Voriconazole Combined with Caspofungin.
- Allegrini J., Simmeon de Buochberg M., Billot A. (1973).** Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier.
- Andrade J.R., Da Veiga V.F., De Santa Rosa M.R., Suassuna I. (1989).** An endocytic process in HEp-2 cells induced by enter pathogenic *Escherichia coli*. J Med Microbiol, 28: 49-57.
- Andrews J.M. (2001).** The Development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing . J. Antimic. Chemo., 48 (1) : 29-42.
- Anofel. (2007).** Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales, Elsevier- Masson, Paris.
- Anonyme. (1997).** Final risk assessment for *Aspergillus Niger*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4 (4) : 354-366.
- Aprotosoiaie 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. 46-54Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623p.
- Armstrong, G.N., Armstrong, J.K. (1981).** Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases, p. 391-399. In P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook (ed.), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park.
- 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.
- Banquour N. (2000).** Etude de l'effet de thym (décoction) et de son huile essentielle sur l'évolution de la flore microbienne et quelques paramètres chimiques du Smen, au cours de son élaboration. Thèse de doctorat, University Cadi Ayad, Marrakech.
- Barelle C.J., Richard M.L., Gaillardin C, Gow N.A., Brown A.J. (2006).** *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. Eukaryote, Cell, 5: 359-367.
- Barros, H. R.D.M., Ferreira T.A. P.D.C., Genovese M. I. (2012).** Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of *citrus* from Brazil. Food Chemistry, 134 : 1892-1898.
- Belkou H, Beyoud F., Taleb bahmed Z. (2005).** Approche de la composition biochimique de la menthe vert (*menthe spicata L*) dans la région de Ouargla, Mémoire DES, Unv Ouargla, pp 2,61.
- Benabdi B., Otmani A. (2019).** Evaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*, université akli Mohand oulhadj, bouira.

- Benayad N. (2008)** “Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées,”Mémoire, Université Kasdi Merbah , Ourgla,
- Ben Bnina E., Hajlaoui H., Chaieb I., Daami-Remadi M., Ben Said M., Ben Jannet H. (2019).** Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the tunisian *Citrus aurantium* essential oils. Czech Journal of Food Sciences, 37 (2): 81–92.
- Bendali A., Oulebsir C., Elhadi D., Djazouli Z. (2019).** Impact de la formulation sur le potentiel antifongique de l’huile essentielle du bigaradier *citrus aurantium L*, 9(2): 1677-1693.
- Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-Alaoui M., Ayadi A. (1986).** Méthode d’étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Médicinales et Phytothérapie.
- Ben hasouna A., Ben Halima N., Smaoui S., Hamdi N. (2017).** *Citrus lemon* essential oil : chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. Lipids in health and disease.
- Benkada M. (1990).** Isolation des huiles essentielles de la menthe suaveolens, ehrh (*Bous Domrane*) de la région de Tlemcen et leur analyse par différentes méthodes chromatographique mise en évidence du composé majoritaire « la pulégone », Thèse Magister.Univ Tlemcen, pp 42,76.
- Benouda A. (1982).** Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles de trois plantes médicinales marocaines : L’armoise blanche, Le thym et l’eucalyptus. Thèse de doctorat en médecine, faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.
- Benz, I., Schmidt, M.A. (1992).** AIDA-I the adhesion involved in diffuse adherence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. Mol Microbiol, 6: 1539-1546.
- Beylier-Maurel M.F. (1976).** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. Rivista Italiana. E.P.P.O.S.
- 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 Group. pp. 529-548.
- Bissett J A. (1984).** revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. Can J Bot, 62:924–931.
- Bissett J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Pachybasium. Can. J. Bot, 69: 2373-2417.
- Bissett J A. (1991).** revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can J Bot, 69:2418–2420.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E. Richard, H., Berset, C. (1998).** Antioxydant Activity and Phenol Composition of *Citrus* Peel and Seed Extracts. J. Agric. Food Chem, 46(6) : 2123-23.

- Böhme, K.; Barros-Velázquez, J.; Calo-Mata, P.; Aubourg, S.P. (2014).** Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activity of Essential Oils: Mechanisms and Applications. In *Antimicrobial Compounds*; Springer: Berlin, Germany, pp. 51–81.
- Bonnaïous Catherine. (2013).** Traité scientifique aromathérapie aromathologie & aromachologie. Ed Dangles, France, PP 95-97.
- Bouamer A., Bellaghit M., Mollay A. (2004).** Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe vert et la menthe poivrée de la région de Ouargla ; Mémoire DES .Unive. Ouargla, p 2-5 ; 10 ; 19 ; 21-22.
- Boudjemaa N E., Ben Guegua H. (2010).** L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- Boughendjioua H. (2015).** Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse de doctorat. Biologie végétale. Université ANNABA. Algérie.
- 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 Thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]. International Journal of Innovation and Applied Studies 8, 1418.
- Bouziani M. (2002).** Les pathologies infectieuses : Aspect épidémiologique et prophylactique. Dar El Gharb.
- Brenner D., Fanning G., Miklos G. et Steigerwalt A. (1973).** Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. Int J Syst Bacteriol, 23: 1-7.
- Broydé H., Doré T. (2013).** Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus spp.* Cahier Agriculture, 22 : 182-94.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 2ème
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales 3ème éd, Tec et Doc, Paris, pp 484-540.
- Burgess L.W. (1981).** General ecology of the Fusaria. In *Fusarium: diseases biology and taxonomy*. (ed. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook), p. 225-235. Pennsylvania State University Press. University Park and London
- Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S., Hirata T. (2004).** Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flav Frag J, 19:62–8.
- Canillac N. et Mourey A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. Food Microbiol, 18: 261-268.
- 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.

- Charpentier B. (1998).** Guide de préparateur pharmacie, Ed, Masson, Paris France ; pp 1068-1071,1242p.
- Chebaibi A., et al. (2016).** Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytotherapie*, 14(6):355-362.
- Choi H-S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. (2000).** Radical Scavenging Activities of *Citrus* Essential Oils and Their Components: Detection Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, 48, pp. 4156-4161.
- Chu W.S., Magee B.B and Magee P.T. (1993).** Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol*, 175: 6637-6651.
- Conner D. E. (1993).** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M.; Branen A. L. Antimicrobials in foods, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.
- Cookson, S.T., Nataro, J.P. (1996).** Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. *Microb Pathol*, 21: 421-434.
- Cornet F. (1981).** L'aromatogramme. *Phytomédecine*, 1et 2, 109-117.
- Daouda Toure. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Université Felix Houphouët-Boigny : unité de formation et de recherche sciences médicales Abidjan, 153.
- Davies F.S., Albrigo L.G. (1994).** *Citrus*. Crop production science in horticulture. CAB International, Wallingford (UK). 254p.
- Dayal, B., Purohit, R.M. (1971).** Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. *The flavor industry*, 2: 484-485.
- Degryse A., Delpha I., Voinier M. (2008).** Risque et bénéfices possible des huiles essentielles, ingénieurs de génie sanitaire, Atelier de santé environnement.
- Dellaras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. 654 p.
- Desislava T., Rositsa D., Bogdan., Yana H., Aleksandar S., Zapryana D., Georgi K. (2019).** Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium L* zest against some pathogenic microorganisms, *Z. Naturforsch*, 74(5–6) c: 105–111.
- Dib, M.E.A., et al. (2010).** Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus Desf.* Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation. *Chemistry Central Journal*, 4(1): p. 16.
- Dijksterhuis J., Wösten H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. *Studies in mycology*, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, an institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- Dommergues, Y., Mangenot F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Edition MASSON. 40-45p.
- Dosoky N., Setzer W. (2018).** Biological Activities and Safety of *Citrus spp.* essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences*. 19.10.3390/ijms19071966.

Drugeon H., Legallou F., caillon J. (1991). Méthodes d'étude de l'activité bactéricide p 113-126. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P & Goldstein F. Maloine Paris.

Duportal M., Jorda E., Sanchez C., Imbert E., Loeillet D., Vannière H. (2013). Citron. FruiTrop (h.s. FOCUS). CIRAD, Montpellier. 141p.

Dumitrescu., Dauwaldera O., Gilleta Y., Vandenescha F., Etiennea J., Linaa G., Tristana A. (2008). Les infections communautaires à *Staphylococcus aureus* en pédiatrie : émergence des *staphylocoques* dorés résistants à la méticilline d'origine communautaire. Revue francophone des laboratoires, 407 :71-80.

El Mansour k. (2013). Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Médecine. Université Cadi Ayad. Marrakech.

El Modafar C. (1994). Aspects histologiques et biochimiques des interactions hôte-parasites (*Platanus spp. Ceratocystis fimbriata f.sp. platani*). Réactions associées à la défense de l'hôte. Thèse Doctorat d'Etat. Université de Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. 258p.

Englebin M. (2011). Essences et huiles essentielles: précaution d'emplois et conseils d'utilisation. Centre de formation en aromathérapie.

Eveillard M. (2007). Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Biologie cellulaire. Angers : université d'Angers. p159.

Farhat A., Fabiano-Tixier A.S., El Maataoui M., Maingonnat J.F., Romdhane M., Chemat F. (2011). Microwavesteam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. Food Chemistry, 125 : 255-261.

Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. Flavour and fragrance journal. Algeria.

Ferhat M.A., Meklati B.Y. et Chemat F. (2010). Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. ED. OPU, n°5130. Alger. 157 p.

Fisher K., Phillips C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology. 101, 1232-1240.

Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E and Butler G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. BMC. Evol. Biol, 6: 99.

Freeman-Cook L., Freeman-Cook .K. (2006). *Staphylococcus aureus* infections. Chelsea House Publishers. Philadelphia, p 26-29.

- Gangneux J P., Drogoul A S. (2008).** Infections fongiques invasives : nouvelles données épidémiologiques et écologiques. *Hématologie*, 14, n° spécial 4: 9.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ebrahim Zadeh, M.A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 *citrus* species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22, 3 : 277-281.
- Ghebru, H. (1988).** Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise et sciences vétérinaires en microbiologie immunologie, Nantes.
- Goldschmidt E.E. (1997).** Effect of climate on fruit development and maturation. The Hebrew University of Jerusalem, Palestine 5p.
- Goulas V., Manganaris, G.A. (2012).** Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of *Citrus* fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*. 131 : 39-47.
- Graser Y., Volovsek M., Arrington J., Schonian G., Presber W., Mitchell T.G., Vilgalys R. (1996).** Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93: 12473-12477.
- Grimont, P. (1987).** Taxonomie des *Escherichia*. *Méd Mal Infect*, 6-10.
- Grysole J. (2005).** La commercialisation des huiles essentielles in 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.
- Guo J.-J., Gao Z.-P., Xia J.-P., Ritenour M.A., Li, G.-Y., Shan Y. (2018).** Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *citrus* essential oils from the main cultivated varieties in China. *LWT-Food Sci. Technol.* 97: 825–839.
- Haj Ammar A., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Romdhane M., Zagrouba F. (2012).** Chemical Composition and in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Citrus aurantium L.* Flowers Essential Oil (Neroli Oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 15 (n° 21). pp.1034-1040. ISSN 1028-8880.
- Hamdani f., Allem R., Meziane M., Houari A., Setti B., Ali Arous S., Bourai M. (2012).** chemical profile and antifungal activity of essential oils extracted from leaves of *citrus aurantium* and *citrus sinensis* (l) osbeck of algeria. International Science and Technology Conference, Dubai, 13-15 December.
- 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.
- Hart T., Shears P. (1997).** Atlas de poche de microbiologie. Medicinesciences. Lavoisier, 314p.
- Hellal Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus* : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.

- Himed L. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles 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 Mentouri – Constantine. 65 p.
- Himed L., Merniz S., Bnbraham M. (2014).** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. Algerian Journal of Natural Products. Algeria.
- Himed L., Merniz S., Benbraham M., Boudjouada E., M Barkat. (2020).** Préservation du concentré de tomate par un agent antifongique (huile essentielle du citron). African journal of food. Agriculture, Nutrition and development. Algeria.
- Hosni K., Zhaed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Sebei H. (2010).** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species : Evidence for the genotypic influence. Food chemistry. 123 : 1098-1104.
- Huang Y. S., Ho S. C. (2010).** Polymethoxy flavones are responsible for the antiinflammatory activity of *citrus* fruit peel. Food Chemistry, 119(3): 868-873.
- Huet R. (1991).** Les huiles essentielles d'agrumes. Fruits, 46(4-6): 501-683.
- Imbert E., Loeillet D., Vannière H., Bertin Y., Vernière C., Quilici S., Didier C., Bourgeois P. (2006).** Pomelo. FruiTrop (h.s. FOCUS). CIRAD, Montpellier. 108 p.
- INRA. (2006).** Rapport sur le dépistage du *Citrus tristeza* closterovirus (CTV) au niveau du parc à bois agrumicole. ITAFV, CNCC, INPV. Ministère de l'Agriculture, Alger 2003, Algérie
- Iwan H., Desiana R., Priyo H., Diah S E. (2015).** Fungal inhibitory effect of *Citrus Limon* peel essential oil on *Candida albicans*. Dental journal. Indonesia.
- 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
- Jerse A E., Yu J., Tall B D., Kaper J B. (1990).** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 87: 7839-7843.
- Joli B., Reynaud A. (2002).** Entérobactéries : Systématique et méthode de diagnostic. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, p 392.
- Kaibi FZ., Timizar A. (2016).** Etude de quelques activités biologiques antimicrobienne antioxydant et cicatrisante de deux agrumes *citrus limonum* et *citrus sinensis*, université saad dahlab –Blida.
- Kalemba D., Kunicka A. (2003).** Antibactérien et antifongique propriétés des huiles essentielles. Curr. Med. Chem, 10:813-829. Kararnan, I., F. Sahin, M. Gulluce, H. Oigutcu, M. Sengul et A. Adyguzel, 2003. Activité antimicrobienne des extraits aqueux et méthanoliques de *Juniperusoxycedrus L. J.* Ethnopharmacol, 85: 231-235.
- Kammoun Bejar A., Ghanem N., Mihoubi D., Kechaou N., Boudhrioua Mihoubi, N. (2011).** Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. Journal of Food Engineering. 7, 5, 1-25.

- Kara Mohamed. (2018).** Les agrumes. Cour en ligne.
- Kimball D A. (1999).** *Citrus* processing, a complete guide, second edition. Kimball D.A., Ed. Gaithersburg. An Aspen publication.450 pages
- Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essen Oil Res*, 1: 119–28
- Kong M., Chen X G., Liu C S., Liu C G., Meng X H., Yu L J. (2008).** Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 65 : 197–202.
- Konowalchuk J., Speirs J I., Stavric S. (1977).** Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 18: 775-779.
- Le Minor L., Popoff M Y., Bockemuhl J. (1990).** Supplement 1989 to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*.
- Levine M. (1987).** *Escherichia coli* that cause diarrhea : entero toxigenic, entero pathogenic, entero invasive, entero hemorrhagic, and entero adherent. *Journal of infectious Diseases*, 155 : 377-389.
- Levine M M., Edelman R. (1984).** Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews* 6: 31-51.
- Licitra G. (2013).** Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg Infect Dis [Internet]* Vol. 19.
- Loussert R. (1989).** Les agrumes, arboriculture. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113p.
- Lowy F D. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339: 520–32.
- Lucchesi, M.-E. (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion.
- Ma Y. Q., Chen J. C., Liu D. H., Ye X. Q. (2009).** Simultaneous extraction of phenolic compounds of *citrus* peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1): 57- 62.
- MADRP :** Ministère de l'Agriculture du développement Rural et de la Pêche.
- Magda R A., Awad A M., Selim K A. (2008).** Evaluation of mandarin and orange peels as natural sources of antioxidant in biscuits. *Journal of Food Science & Technology*. 75-82.
- Magiatis P., Melliou E., Skaltsouns A., Chinou I B., Mitaku S. (1999).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus var. chia*. *Planta Med*, 65:749–52.
- Manner Harley I., Buker Richard S., Easton Smith V., Ward Deborah., Elevation Craig R. (2006).** *Citrus (citrus) Fortunella (kumquat)*. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry.
- Marcos Gomes S., Maria das G., Cardoso Maurilio J., Soares Luís R., Batista Samísia M F., Machado Milene A., Andrade Camila M O., de Azeredo Juliana Maria Valério Resende, Leonardo M. A. Rodrigue. (2014).** Use of Essential Oils of the Genus *Citrus* as Biocidal Agents, *merican Journal of Plant Sciences*, 2014, 5, 299-305 Published Online February.
- Mariana F., Camelia U. (2012).** Antimicrobial activity of essential oils against four food-borne fungal strains. *U.P.B. Sci. Bull., Series B, Vol. 74, Iss. 2. Romania*.

- Martinez Nadal, N.G., Montalvo, A.E., Seda, M. (1973).** Antimicrobial properties of bay and other phenolic essential oils. *Cosmetics and perfumery*. 88: 37-38.
- Masker A. (1987).** Etat actuel du verger agrumicole et perspectives de développement. MAP-ITAFV, 1^{er} Séminaire National sur les Agrumes, Chlef 2-4 mars.
- Maughan, H., Van der Auwer, G. (2011).** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 789-797.
- Messiaen C M., Cassini R. (1968).** Recherche sur les fusarioses. IV-La systématique *Fusarium*. *Ann. Epiphyt*, 19 : 387-454.
- Mouffok S. (2011).** Etude des metabolites secondaires de *Centaurea pubescens ssp. omphalotricha* (Asteraceae) ; Mémoire de Magister en chimie organique ; Université Hadj lakhd; pp 159.
- Mutin, G. (1969).** L'Algérie et ses agrumes In : *Revue de géographie de Lyon*. Vol 44 n°1, 1969. Pp. 5-36.
- Narashima Rao B G V., Subba Rao. (1972).** The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi. II. The flavor industry.
- Nataro J P., Kaper J B. (1998).** Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11:142-201.
- Nguyen Van J C., Kitzis M D., Ly A., Chalfine A., Carlet J., Ben Ali A., Goldstein F., (2006).** Détection de la colonisation nasale de *Staphylococcus aureus*. *Pathologie Biologie*, 54 : 285-292.
- Nicolas J. (2013).** Phase exploratoire à la mise en place d'un schéma d'approvisionnement de plants d'agrumes sains et authentiques en Guyane. Mémoire de fin d'études. Ecole Supérieure d'Agro-Développement International. France.
- Nicole T.; François G., (2013).** Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Edition Brigitte Peyrot Poos, Paris Lavoisier SAS.
- Obidi O F., Adelowotan A O., Ayoola G A., Johnson O O., Hassan M O., Nwachukwu S C U. (2013).** Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens, *The International Journal of Biotechnology*, 2(6):113-122.
- O'Brien, A., LaVeck G., Griffin D., Thompson M. (1980).** Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. *Infection and immunity*, 30 : 170-179.
- Odds J C. (1988).** *Candida* and *candidosis*. Elsevier Science Health Science Division.
- Oke F., Aslim B., Ozturk S., S. Altundag. (2009).** Essentiel pétrole composition, antimicrobien et activités antioxydantes de *Satureja cuneifolia* Dix. *Food Chem.*, 112 : 874-879.
- Oreopoulou, V., Tzia, C. (2007).** In *Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food*, chapitre 11:Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietaryfibers, antioxidants and colorants. Springer, USA : 209-232.
- Ouedrhira W., Bouhdida S., Mounyr B., El OualiLalamib A., Sandrine M., Fouad O C., Hassane G. (2015).** Chemical composition of *Citrus aurantium L.* leaves and zest essential oils, their antioxidant,

antibacterial single and combined effects, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1):78-84.

Ozenda P. (1990). Les organismes végétaux, tome 1 : Végétaux inférieurs, Masson, 220 p.

Padrini F., Lucheroni M T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques. Paris : Ed. De Vecchi . 212 Pages.

Pattnaik S., Subramanyam V R., Bapaji M., Kole CR. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89 : 39–46.

Pfaller M A., Diekema D J. (2007). Epidemiology of invasive *candidiasis*: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev*, 20: 133-163.

Pingot A. (1998). Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp. 230- 236.

Pohl P. (1993). Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire*.

Ponce A G., Fritz R., del Valle C E., Roura S I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of *organic Swisschard*. *Lebensmittel-Wissenschaftund - Technologie*, 36: 679-684.

Praloran C. (1971). Les agrumes. Ed. éditeur 8348, Paris, n° 5, p. 25.

Prescott L M., Harley J P., Klein D A. (2003). Microbiologie. Edition De boeck Ed. 2ième édition française, 525-526 PP.

Qingyun G., Ke L., Weihui D., Balian Z., Wenxia Y., Jiong C. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis Osbeck cv. Newhall*) peel essential oils. *Food SciNutr. Sep* ; 6(6) : 1431–1437. Published online Jun 14. doi : 10.1002/fsn3.688.

Quatresous N. (2011). *Aspergillose* humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Limoges.

Rebour. (1945). Union des syndicats des producteurs d'agrumes, 502 pages.

Remmal A., Tantaoui Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M. (1993). Improved method for the determinatin of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. *J. Essent. Oil. Res.*

Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat, Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz, Fès.

Riley L W., Remis R S., Helgerson S D., Mc Gee H B., Wells J G., Davis B R., Hebert R J., Olcott E S., Johnson L M., Hargrett N T., Blake P A., Cohen M L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, 308 : 681-685.

Robert A., Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.

- Rodrigues A S., Silva Michelli A B. (2018).** Evaluation of Antibacterial and antifungal Activity of the essential oil from citrus fruits. Multi disciplinary Core scientific journal of knowledge. 03 year, Ed. 06, vol. 03, pp. 106-118. ISSN: 0959-2448.
- Saeid Mahdavi O, Seddighe E. (2009).** Comparison of anti-*Candida* activity of thyme, pennyroyal, and lemon essential oils versus antifungal drugs against *Candida* species. Jundishapur Journal of Microbiology. Iran.
- Samson J A. (1980).** Tropical Fruits. Longman, London. 250p.
- Saunt J. (1990).** *Citrus* variety of the world. Sinclair International Limited, Norwich, England. 126 p.
- Shabnam J., Rauf A., Khurram S., Shaista N., Salman S., Yasar S. (2013).** Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Citrus limetta* var. *Mitha* (sweet lime) peel in Pakistan. African journal of microbiology research. Pakistan.
- Shakeri A., Khakdan F., Soheili V., Sahebkar A., Rassam G., Asili J. (2014).** Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. kopetdaghensis. *Ind. Crop. Prod.* 58, 315–321.
- Shallcross L J., Fragaszy E., Johnson A M., Hayward A C. (2013).** The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in *staphylococcal* disease : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 13: 43–54.
- Sheila Mello da S., Anildo C J., Gerson N S., Fábio L S., Cleide Rosana W V. (2012).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against foods spoilage and food borne pathogens, *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.7, p.1300-1306.
- Simeon De bouchberg M., Allegrini A., Bessière C., Attisso M., Passet J., Granger R. (1976).** Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimio types de *Thymus vulgaris* Linnaeus. *Rivista Italiana.*, E.P.P.O.S.
- Singh, A., Singh, V.K., Quraishi, M.A. (2010).** Effect of fruit extracts of some environmentally benign green corrosion inhibitors on corrosion of mild steel in hydrochloric acid solution. *Journal of Materials and Environmental Science.* 1, 162-174.
- Snyder W C., Hansen H N. (1945).** The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*, 32 : 657-666
- Souci S W., Fachmann W., Kraut H. (1996).** Fruit. In “Food composition and nutrition tables”. Ed. CRC.
- Staniszewska M., Kula J. (2001).** Composition of the essential oil from wild carrot umbels (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) growing in Poland. *Journal of Essential Oil Research*, 13(6) : p. 439-441.
- Sudbery P. E. (2001).** The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol.*, 41 : 19-31.
- Sudbery P., Gow N., Berman J. (2004).** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends. Microbiol.*, 12 : 317-324.

- Taghi-golmakani, M., Moayyedi, M. (2015).** Comparison of heat and mass transfer of different microwave assisted extraction method of essential oil from *citrus Limon (Lisbon variety)* peel. Food Science and Nutrition 3(6):506-518.
- Teisseire P J. (1991).** Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 480p.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005).** Plantes aromatiques. Ed. Tec et Doc-Lavoisier, Paris.544 Pages.
- Tian, Q., Miller, E.G., Ahmad, H., Tang, L., Patil, B.S. (2001).** Differential inhibition of human cancer cell proliferation by *citrus limonoids*. Nutrition and Cancer. 40,180-184.
- Trabut L., Marès R. (1906).** L'Algérie Agricole en 1906. Ed. Direction de l'agriculture, 534p.
- Traburt L. (1908).** L'arboriculture dans le Nord de l'Afrique (suite). Revue Horticole d'Algérie, n°1 (janvier) : 1-13.
- Turnbull P C., Kramer J M. (1995).** *Bacillus*. In Manual of Clinical microbiology, 349-56.
- Vannière H. (2002).** Agriculture spéciale. Les plantes comestibles. Les espèces fruitières : les agrumes, In : Mémento de l'agronome. CIRAD, Montpellier. p929-940.
- Vial P.A ; Robins-Browne R ; Lior H ; Prado V ; Kaper J.B ; Nataro J.P ; Maneval D ; Elsayed A and Levine M.M. (1988).** Characterization on enteroadherent aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 158 : 70-79.
- Vincenot F., Saleh M., Prévost G. (2008).** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. Revue Francophone des Laboratoires, 407: 61–9.
- Viuda-Martos M Y., Ruiz-Navajas J., Ferná'ndez-Lo'pez J., Pe'rez-A'lvarez. (2008).** Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils, Food Control 19 ; 1130–1138.
- Wagneur W. (1973).** Classification et description des espèces et variétés ; agrumes, olivier, prunier, noyer. Polycope.
- Weirtheim. H F., Melles D C., Vos M C., et al. (2005).** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis, 5 : 751–62.
- Wilkinson J M. (2006).** Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapitre 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, 405 p.
- Yaacoub R., Tlidjane I. (2018).** Caractérisation physico-chimiques et analyses biologiques de l'huile essentielle des grains de *Cuminum cyminum L.* et de *Foeniculum vulgare Mill.* Extraite par hydrodistillation et CO2 supercritique : Etude comparative. Mémoire de master, génie chimique, université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi. Département de génie des procédés. Algérie.
- Yahyaoui N. (2005).** Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Menthe Spicata L* sur *Rhyzoperlhudominicu (F.) (Coleoptera, Bostrychidae)* et *Triboiumconfusm (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae)*.Thèse de Magister en sciences agronomiques, option Ecologie, INA, El-Harrach.

Yeoh S., Shi J., Langrish T A G. (2008). Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218 : 229-237.

Ze-Hua L., Ming C., Yuan-Shuai L., Pei-Long S., Shao-Lei L. (2019). Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica L. var. sarcodactylis*. *Molecules*. China

Site d'internet :

- <https://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-aliments/orange/composition>
- <https://www.rna-seqblog.com/tag/trichoderma-longibrachiatum/>
- <https://www.pinterest.com/pin/160581542937892826/>
- <http://fungi.myspecies.info/file/945>

Présenté par : BADAOUI CHOUROUK

CHEROUAT HALA

DEIF AYA

Encadrant : Dr. DALICHAOUECHE S.

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme :

Master en : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes

Résumé :

Les huiles essentielles sont des molécules naturelles considérées comme antioxydants et antimicrobiens. Ce travail porte sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les huiles essentielles de différentes espèces de citrons : *Citrus limon* L, *Citrus aurantifolia*, *Citrus limetta*, *Citrus medica* L.var. *sacroductyli* ; et deux espèces d'orange, *Citrus aurantium* (L) et *Citrus sinensis* présentent une meilleure activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif (+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) que les bactéries à Gram négatif (-) (*Escherichia coli*).

L'activité antifongique révèle que les huiles essentielles étudiées ont un fort pouvoir inhibiteur contre les quatre (4) espèces fongiques testées *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma longibrachiatum*. Avec cependant des DI différents d'une espèce à une autres.

Mots clés :

Agrumes, Citrus, huiles essentielles, activité antifongique, activité antibactérienne

Jury d'évaluation :

Président de jurée : Dr. ATMANI-MERABET G.

MCB

USBC3

Examineur : Dr. BRIK N.

MAHU

USBC3

Encadrant : Dr. DALICHAOUECHE S.

MCA

USBC3

Date de soutenance : 17 septembre 2020