



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

THEME

Évaluation des activités biologiques de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*

Réalisé par :

Mohammed Belkebir Fethia

Taib Wiame

Soutenu le 30/06/2024 devant le jury composé de :

Présidente	Mme Abdelli W.	MCA	U. Khemis Miliana
Promotrice	Mme Benouaklil F.	MCA	U. Khemis Miliana
Co-promotrice	Mme Casasni L.	MAB	U. Khemis Miliana
Examinatrice	Mme Guermache L.	MAB	U. Khemis Miliana

2023 /2024

Remerciements

Nous exprimons notre profonde gratitude tout d'abord à « Dieu », de nous avoir donné le courage, la volonté et la force pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier profondément notre encadreur, Madame Benouaklil Fatouma, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour la confiance qu'elle nous a accordée. Merci pour avoir toujours été disponible, pour être à notre écoute, et pour nous avoir guidé. Nous tenons à exprimer également toute notre gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit ainsi que mon co-encadreur, Madame Cassasni., sans qui le travail n'aurait pas abouti.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements aux membres du jury:

- Dr Abdelli, d'avoir accepté de présider ce travail.
- Dr Guermache, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Dr Khadraoui pour avoir réalisé la CGMS au laboratoire de valorisation de substances naturelles, et Dr Chaouchi pour son aide au cours de l'activité antioxydante au laboratoire de chimie au département des sciences et technologies.

Nos sincères remerciements s'adressent au personnel du laboratoire de bactériologie « Laboratoire d'analyse médicale de Dr Zibouche à Ain Defla » pour leur aide.

Nos vifs remerciements vont également à Madame Nadjiba et Afaf, ingénieures au laboratoire de microbiologie à l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, pour leur aide et la mise à notre disposition du matériel de leur laboratoire, ainsi qu'à Madame Nadia, ingénieure de laboratoire de physiologie végétale, qui nous a facilité la tâche d'extraction de l'huile essentielle. Sans oublier Madame Samira, ingénieure de laboratoire des souches pathogènes à l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, pour son aide.

Nous ne terminerons pas sans remercier nos familles et tous ceux qui ont participé, de loin ou de près, à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je tiens à dédier cet ouvrage à ma mère, **KHEIRA**, véritable oasis de tendresse et phare éclairant le chemin qui mène vers la réussite, pour ses sacrifices, ses conseils, son soutien sans faille et sa présence réconfortante dans ma vie.

Je remercie infiniment mon père, **MOHAMED**, pour tous ses efforts, ses orientations et son attention constante.

Je rends hommage à ma merveilleuse grand-mère, **AICHA**, dont le soutien, aussi bien moral que matériel, ne m'a jamais fait défaut tout au long de mon existence.

À mon cher frère, **HAKIM**, qui a été mon compagnon de route à chaque étape de ce travail.

À mes chères sœurs : **MONA, NOUJOU** et **NOURA**, qui sont restées à mes côtés jusqu'à ce jour.

À mes meilleures amies.

Et à tous ceux que j'ai eu le plaisir de connaître, sans exception.

À l'ensemble de mes professeurs, à qui je dois tant.

Pour conclure, je dédie mes pensées les plus bienveillantes à tous ceux qui m'ont soutenu dans la finalisation de ce travail.

Fethia

إهداء

{و آخر دعواهم أن الحمد لله رب العالمين}

الى المعلم الأول الذي أثار بضيائه هداه بصائرنا واخرجنا من كلمات الجهل إلى نور العلم و ارشدنا لطريق العلم و بشر
السائرين على هذا الطريق بالجنة فقال (و من سلك طريقا يلتمس فيه علما سهل الله له به طريقا الى الجنة) سيدنا محمد
أهدي هذا النجاح الى نفسي الطموحة أولا الى نفسي العظيمة القوية التي تحملت كل العثرات و اكملت رغم الصعوبات
،ابتدت بطموح و انتهت بنجاح ثم إلى من سعى معي لإتمام مسيرتي الجامعية

إلى من كلل العرق جبينه و من علمني أن النجاح لا يأتي إلا بالصبر والإصرار ،إلى النور الذي أنار دربي و السراج الذي
لا ينطفئ نوره بقلبي أبدا من بذل الغالي والنفيس و استمديت منه قوتي و اعتزازي بذاتي "والدي العزيز" شفاه الله
إلى من جعل الجنة تحت أقدامها وسهلت لي الشدائد بدعائها إلى الإنسانية العظيمة التي لا طالما تمننت أن تقر عينها برويتي
في يوم هكذا أُمي العزيزة

إلى ضلعي الثابت وأمان أيامي إلى من شددت عضدي بهم فكانوا لي يبابع أرتوي منها إلى خيرة أيامي و صفوتها الى قرّة
عيني " إخواني وإخوانتي الغاليين

إلى رمز الوفاء الى الكتف الذي لا يميل الى الرجل العظيم الذي شجعني للوصول إلى طموحاتي سندي رفيق عمري و
دربي عبد الحفيظ

للأصدقاء الأوفياء و رفقاء السنين لأصحاب الشدائد والأزمات إلى من أفاضني بمشاعره و نصائحه المخلصة عائلتي
أهديكم هذا الإنجاز و ثمرة نجاحي الذي لا طالما تمنيتّه ها انا اليوم اكملت و اتممت اول ثمراته بفضلته سبحانه و تعالى
الحمد لله على ما وهبني وان يجعلني مباركة و أن يعينني أينما كنت فمن قال انا لها نالها فأنا لها و ان ابت رغما عنها اتيت
بها فالحمد لله شكرا و حبا و امتنانا على البدء والختام

Wiame

Résumé

Le but de notre étude était d'évaluer l'impact de la composition de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (orange amère) sur ses activités biologiques, en mettant un accent particulier sur l'activité antibactérienne et antioxydante.

Nous avons extrait cette huile essentielle par la technique d'hydrodistillation, obtenant un rendement satisfaisant de $1,24 \pm 0,20$ % à partir de 250 grammes de l'écorce de *Citrus aurantium* étudiée. La composition chimique de l'huile a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CG-MS), révélant que la majorité de ses composants sont des hydrocarbures monoterpéniques, représentant 82,99 %.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été évaluée *in vitro* par deux méthodes différentes (Aromatogramme et Micro-atmosphère) sur douze souches bactériennes (six souches ATCC et six souches cliniques). La majorité des souches ont montré une très faible sensibilité. Cependant, *Bacillus subtilis* ATCC (9372) a présenté une sensibilité remarquable. Pour la méthode micro-atmosphère, aucun résultat significatif n'a été observé pour toutes les souches à l'exception de *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*.

Pour ce qui est de l'évaluation du pouvoir antioxydant, utilisant les méthodes de piégeage des radicaux libres (DPPH) et le pouvoir réducteur (FRAP), les résultats ont été les suivants : une CE50 de 25,83 $\mu\text{g/ml}$ pour la méthode DPPH et une CE50 de 35,59 $\mu\text{g/ml}$ pour la méthode FRAP, indiquent que l'huile essentielle des écorces de *C. aurantium* affichait une remarquable activité par ces deux méthodes, même si elle demeure moins active que l'acide ascorbique (42,31 $\mu\text{g/ml}$).

Mots clés : *Citrus aurantium*, huile essentielle, CG-MS, activité antibactérienne, activité antioxydante.

كان الهدف من دراستنا تقييم تأثير تركيبة زيت البرتقال العطري (البرتقال المر) على نشاطه البيولوجي، مع التركيز بشكل خاص على النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للأكسدة .

لقد قمنا باستخلاص هذا الزيت العطري باستخدام تقنية التقطير بالماء، حيث حصلنا على نسبة استخلاص مُرضية بلغت 1.24%±0.20 من 250 غرام من قشر البرتقال المر . وقد تم تحديد التركيب الكيميائي للزيت باستخدام جهاز الرصد بالكروماتوجرافي غازي متصل بجهاز الطيف الكتلي (CG-MS) ، والذي كشف أن الغالبية العظمى من مكوناته هي الهيدروكربونات الأحادية التربينية، وتشكل 82.99 %.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري *in vitro* باستخدام طريقتين مختلفتين (الأروماتوغرام والميكرو-أتموسفير) على اثنتي عشرة سلالة بكتيرية) ست سلالات ATCC وست سلالات سريرية .(وقد أظهرت غالبية السلالات حساسية ضعيفة جداً. في حين، فإن بكتيريا (*Bacillus subtilis* ATCC9372) قد أظهرت حساسية ملحوظة. بالنسبة لطريقة الميكرو-أتموسفير، لم يتم ملاحظة أي نتائج ذات دلالة لكل السلالات باستثناء *Bacillus* و *Klebsiella pneumoniae* و *subtilis*، والتي أظهرت حساسية.

بالنسبة لتقييم القدرة المضادة للأكسدة، باستخدام طرق مسح الجذور الحرة (DPPH) والقدرة الاختزالية (FRAP) ، كانت النتائج على النحو التالي:تركيز (CE50) قدره 25.83 ميكروجرام/مل لطريقة DPPH ، و CE50 قدره 35.59 ميكروجرام/مل لطريقة FRAP ، وهذا يدل على أن زيت قشر *C. aurantium* يظهر نشاطاً لافتاً بكلا الطريقتين، حتى لو كان أقل نشاطاً من حمض الأسكوربيك

كلمات المفتاحية: *Citrus aurantium*, الزيت العطري, CG-MS , النشاط المضاد للميكروبات, DPPH , FRAP.

Abstract

The aim of our study was to assess the impact of the composition of the essential oil of *Citrus aurantium* (bitter orange) on its biological activities, with a particular focus on antibacterial and antioxidant activities.

We extracted this essential oil using the hydrodistillation technique, achieving a satisfactory yield of 1.24% \pm 0.20 from 250 g of *Citrus aurantium* peel. The chemical composition of the oil was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), revealing that the majority of its components are monoterpene hydrocarbons, accounting for 82.99%.

The antibacterial activity of the essential oil was evaluated in vitro using two different methods (Aromatogram and Micro-atmosphere) on twelve bacterial strains (six ATCC strains and six clinical strains). The majority of the strains showed very low sensitivity. However, *Bacillus subtilis* ATCC (9372) exhibited remarkable sensitivity. For the micro-atmosphere method, no results were observed for any of the strains except for *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus subtilis*, which showed sensitivity.

Regarding the evaluation of antioxidant power, using the methods of free radical scavenging (DPPH) and reducing power (FRAP), the results were as follows: an EC₅₀ of 25.83 μ g/ml for the DPPH method and an EC₅₀ of 35.59 μ g/ml for the FRAP method, indicating that the essential oil from the peels of *C. aurantium* displayed remarkable activity by both methods, even if it remains less active than ascorbic acid.

Keywords: *Citrus aurantium*, essential oil, GC-MS, antimicrobial activity, DPPH, FRAP.

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	16
Tableau II.2 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme	24
Tableau III.1 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle étudiée.....	32
Tableau III.2 : Densité relative.....	32
Tableau III.3 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>citrus aurantium</i>	34
Tableau III.4 : Sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.....	43
Tableau III.5 : Inhibition de la croissance bactérienne par la méthode d'aromatogramme.....	47
Tableau III.6 : Inhibition de la croissance bactérienne par la méthode de micro-atmosphère.....	51
Tableau III.7 : CE50 de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> , du BHT et de l'acide ascorbique.....	57
Tableau III.8 : CE50 de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> , du BHT et de l'acide ascorbique.....	62
Tableau III.9 : Résultats de la comparaison des valeurs des CE ₅₀ obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP.....	65

Liste des figures

Figure I.1 : Structure chimique des chémotypes contenus dans les huiles essentielles.....	4
Figure I.2 : Schéma des appareils d'hydrodistillation.....	6
Figure I.3 : Bigaradier	8
Figure I.4 : Fleures ,feuilles et écorces de <i>Citrus aurantium</i>	10
Figure I.5 : Répartition de <i>Citrus aurantium</i> dans le monde.....	11
Figure II.1 : Arbre de l'orange amère.....	15
Figure II.2 : Carte géographique du lieu de récolte des bigarades.....	15
Figure II.3 : Illustration de la démarche expérimentale.....	17
Figure II.4 : Clevenger	18
Figure II.5 : Instrument Perkin Elmer Clarus 600.....	22
Figure II.6 : Aromatogramme	26
Figure II.7 : Micro-atmosphère.....	27
Figure III.1 : Teneur en eau dans les pelures de <i>Citrus aurantium</i>	30
Figure III.2 : Huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	31
Figure III.3 : Pycomètre rempli avec l'huile essentielle.....	33
Figure III.4 : pH de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	34
Figure III.5 : Chromatogramme de l'huile essentielle des pelures de <i>Citrus aurantium</i>	40
Figure III.6 : Résultats d'antibiogramme.....	45
Figure III.7 : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	48
Figure III.8 : Résultats de micro-atmosphère avec un volume 10 µl de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	52
Figure III.9 : Résultats de micro-atmosphère avec un volume 50 µl de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	53
Figure III.10 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	56
Figure III.11 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.....	56

Figure III.12 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration du BHT.....	57
Figure III.13 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration de <i>Citrus aurantium</i> et l'acide ascorbique et BHT.....	57
Figure III.14 : Pouvoir réducteur du fer d'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	60
Figure III.15 : Pouvoir réducteur du fer de BHT.....	61
Figure III.16 : Pouvoir réducteur du fer d'acide ascorbique	61
Figure III.17 : Pouvoir réducteur du l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> et BHT et acide ascorbique.....	62
Figure III.18 : Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	64
Figure III.19 : Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	64
Figure III.20 : Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations du BHT.....	65
Figure III.21 : Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> , de l'acide ascorbique et du BHT.....	65
Figure III.22 : Résultats de la comparaison des valeurs de CE ₅₀ obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP.....	66

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

ATCC: American Type Culture Collection.

ECBU: Examen cytobactériologique des urines.

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

MH : Mueller Hinton.

HE : Huile essentielle.

PAM : Plantes aromatiques et médicinales

DPPH : 2,2diphényl 1-picrylhydrazyle

FRAP : Pouvoir de réduction du fer

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
ملخص	
Abstract	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Huiles essentielles.....	3
I.1.1. Lieux de synthèse des huiles essentielles.....	3
I.1.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	3
I.1.3. Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles.....	5
I.1.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	5
I.1.5. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	6
I.2. Bigaradier (<i>Citrus aurantium</i>).....	7
I.2.1. Nomenclature.....	8
I.2.2. Classification botanique.....	9
I.2.3. Description botanique.....	9
I.2.4. Répartition géographique.....	10

I.3. Activités biologiques des agrumes.....	12
I.3.1. Activité antimicrobienne.....	12
I.3.2. Activité antioxydante.....	12

Chapitre II: Matériel et Méthodes

II.1 Matériel.....	14
II.1. Matériel non biologique.....	14
II.1.1. Matériel végétal.....	14
II.1.2. Matériel microbien.....	16
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Extraction de l'huile essentielle.....	18
II.2.2. Etude analytique de l'huile essentielle.....	19
II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne in vitro.....	22
II.3.1. Antibiogramme.....	23
II.3.2. Aromatogramme.....	25
II.3.3. Méthode de micro-atmosphère.....	26
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	27
III.4.1. Pouvoir anti-radicalaire par la méthode DPPH.....	27
III.4.2. Pouvoir de réduction du fer : FRAP.....	28

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1. Etude analytique.....	30
------------------------------	----

III.1.1. Teneur en eau.....	30
III.1.2. Rendement en huile essentielle.....	30
III.1.3. Caractères organoleptiques.....	31
III.1.4. Mesure des grandeur physique et chimique.....	32
III.2. Composition Chimique.....	34
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	42
III.3.1. Antibiogramme.....	42
III.3.2. Méthode d'aromatogramme.....	46
III.3.3. Méthode de micro-atmosphère.....	50
III.4. Activité antioxydante.....	55
III.4.1. Pouvoir anti-radicalaire par la méthode DPPH.....	55
III.4.2. Pouvoir de réduction du fer : FRAP.....	60
Conclusion	68

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) forment une richesse naturelle précieuse dont l'exploitation exige une connaissance approfondie des propriétés à promouvoir. Les qualités thérapeutiques des plantes médicinales sont liées à la présence de divers agents bioactifs appartenant à différentes classes chimiques, Ces propriétés dues souvent à la fraction d'huile essentielle (Ouraini et *al.*, 2005)

L'Algérie, de part sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquelles s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des PAM (Boukhatem et *al.*, 2010).

Les huiles essentielles sont des composants actifs importants des plantes aromatiques et possèdent des propriétés qui trouvent des applications dans des domaines variés tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture. De nombreuses huiles essentielles et leurs constituants, traditionnellement utilisés pour leurs activités biologiques et antibactériennes, doivent principalement leur efficacité à leur composition chimique, reconnue depuis l'Antiquité (Zineb et *al.*, 2018).

La famille des Rutacées est une grande famille qui comprend un ensemble d'agrumes connus tels que *C. medica* L., *C. limon* (L.) Burm. f. (citron), et *C. aurantium* L. (Pagnoux et *al.*, 2013). Ce dernier est parmi les principales cultures d'arbres cultivées dans le monde entier (Zahr et *al.*, 2023).

Citrus aurantium suscite un grand intérêt chez les chercheurs, notamment pour son activité antimicrobienne, comme le suggèrent les études de BENNADJA et *al.*, (2019) ainsi que celles de SALAMA et *al.*, (2016). À notre connaissance, il n'existe pas d'études réalisées par la méthode de micro-atmosphère. De nombreuses recherches se sont penchées sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* en utilisant la méthode DPPH, comme les travaux de MAJNOONI et *al.*, (2012) et de Ghasemi et *al.*, (2009). Cependant, il existe peu d'études utilisant la méthode FRAP, en l'occurrence LAGHA et *al.*, (2013).

Les huiles essentielles issues de diverses catégories végétales possèdent des qualités antimicrobiennes et antioxydantes (Caccioni et *al.*, 1998). L'objectif principal de cette étude est d'examiner l'activité antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, qui a été récoltée dans la région de Djelida, Aïn Defla.

Dans cette perspective, notre recherche présentée dans ce manuscrit, est divisée en trois chapitres :

Le premier chapitre offre une revue de la littérature en introduisant la plante *Citrus aurantium* et son huile essentielle étudiée.

Le deuxième chapitre est dédié à la partie expérimentale, exposant les méthodes employées pour l'extraction ainsi que l'analyse de l'huile essentielle.

Le troisième chapitre présente et discute les résultats obtenus, y compris l'analyse de la composition de l'huile essentielle par CG-MS, en mettant en contexte avec des études préexistantes, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne en utilisant deux techniques (aromatogramme et micro-atmosphère) et enfin l'estimation du pouvoir antioxydant par deux méthodes (DPPH et FRAP).

Pour conclure, l'étude se termine par un résumé des conclusions tirées et des perspectives.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances huileuses qui peuvent être plus ou moins liquides. Elles sont produites par de nombreuses plantes et sont responsables de leur parfum caractéristique. Les huiles essentielles jouent un rôle essentiel dans la préservation des plantes, en les aidant à se défendre contre les organismes nuisibles tels que les insectes, les bactéries ou les champignons (Chelsea *et al.*, 2017).

La production d'huile essentielle peut augmenter lorsque la plante est soumise à des conditions de stress, telles que la sécheresse, les attaques d'insectes ou les variations de température. Cela peut être une stratégie de défense de la plante pour se protéger des agressions extérieures et préserver sa survie. Cette réponse au stress peut conduire à une augmentation de la concentration des composés actifs dans l'huile essentielle, ce qui peut parfois renforcer leurs propriétés thérapeutiques (Maksoud *et al.*, 2021).

I.1.1. Lieux de synthèse

Les huiles essentielles sont en effet la fraction odorante volatile extraite des végétaux. Elles représentent le parfum concentré de la plante et sont utilisées dans divers domaines. Les huiles essentielles peuvent être extraites à partir de différentes parties de plantes, comme les feuilles, les fleurs, l'écorce, le bois, le zeste, les graines, les baies, les fruits et même les bulbes peuvent tous être une source d'huiles essentielles (Boukhatem *et al.*, 2019).

Chaque partie de la plante peut contenir des composés aromatiques différents, ce qui donne aux huiles essentielles leurs propriétés et leurs parfums caractéristiques (Festy *et al.*, 2018).

I.1.2. Composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles varie grandement selon la plante dont elles sont extraites. En général, les huiles essentielles sont complexes et constituées d'un mélange de nombreux composants, notamment des terpènes, des sesquiterpènes, des phénols, des aldéhydes, des esters, des alcools et des cétones (Bakkali *et al.*, 2008).

Ces différents composés varient en proportions et confèrent à chaque huile essentielle ses propres caractéristiques uniques et ses propriétés thérapeutiques (Figure I.1) (Lawrence 2006).

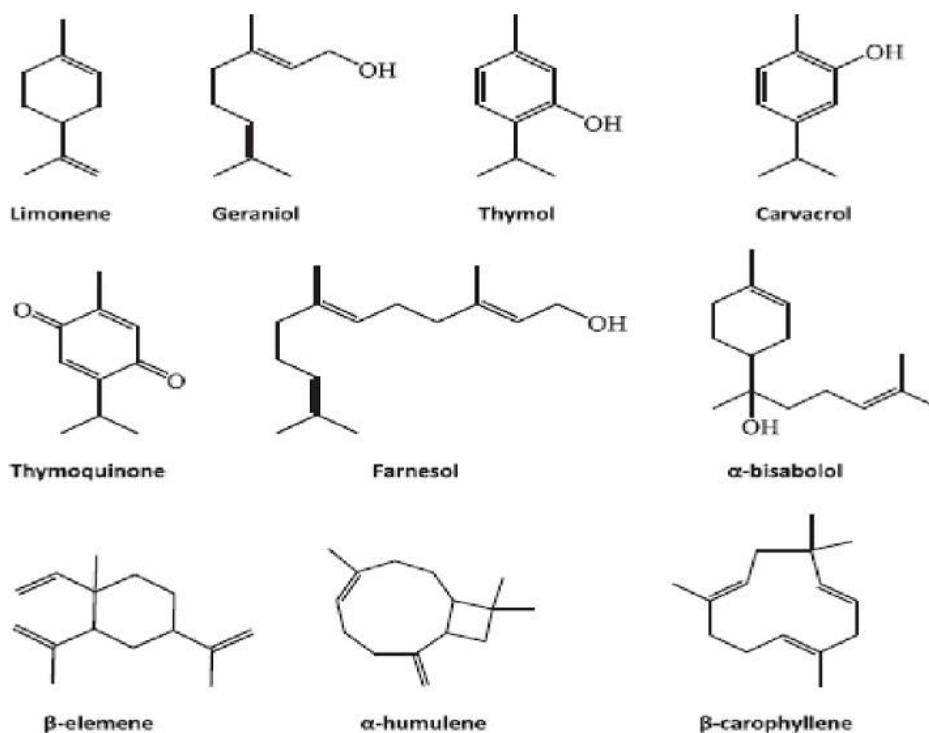


Figure I.1 : Structure chimique des chémotypes contenus dans les huiles essentielles (Bouyahya et *al.*, 2018) .

I.1.2.1. Composés Terpéniques

Le groupe des terpènes représente la catégorie la plus conséquente avec près de 3 000 variétés documentées dans les écrits scientifiques. Cette famille inclut les monoterpènes, qui contiennent dix atomes de carbone, les sesquiterpènes avec quinze, et les diterpènes avec vingt atomes de carbone. Ces molécules organiques sont construites sur un schéma répétitif de cinq atomes de carbone, correspondant à la formule $(C_5H_8)_n$. L'isoprène constitue la structure élémentaire de ces composés. (Bouyahya et *al.*, 2018) .

I.1.2.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les composés aromatiques issus du phénylpropane représentent une classe de composés organiques présents dans les huiles essentielles, en quantités bien moindres par rapport aux monoterpènes et sesquiterpènes. Parmi eux figurent l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique identifiés dans les huiles essentielles de cannelle, l'eugénol typique des huiles essentielles de girofle, l'anéthole et l'aldéhyde anisique, composants des huiles essentielles de

badiane, d'anis et de fenouil, sans oublier le saffrole caractéristique des huiles essentielles de saffrafras (Couic et *al.*, 2013).

I.1.3. Propriétés physiques et chimiques

À température ambiante, les huiles essentielles (HE) se présentent généralement sous forme liquide. Cependant, il est intéressant de noter que, lorsqu'elles sont exposées à de basses températures, certaines d'entre elles peuvent cristalliser. Parlant de leur solubilité, elles se mélangent très bien avec les huiles grasses, ce qui les rend idéales pour diverses préparations. En outre, les huiles essentielles sont connues pour être volatiles et doivent être manipulées avec soin pour préserver leur intégrité, car elles sont susceptibles à l'altération et sont particulièrement sensibles à l'oxydation. Contrairement aux huiles grasses qui peuvent rancir, les huiles essentielles ne rancissent pas (Toutain et *al.*, 1987).

De plus, les huiles essentielles sont moins visqueuses que les huiles végétales, ce qui affecte leur mode de diffusion dans l'air (Guenther et *al.*, 1948).

I.1.4. Méthodes d'extraction

Parmi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles, nous distinguons:

I.1.4.1. Hydrodistillation

L'extraction par hydrodistillation est une méthode d'extraction des huiles essentielles dans laquelle la matière première végétale est immergée dans un bain d'eau et portée à ébullition. Cette méthode est généralement réalisée à pression atmosphérique et peut être effectuée avec ou sans cohobage, c'est-à-dire sans récupération des eaux aromatiques lors de la décantation (Figure I.2) (Boukhatem et *al.*, 2019).

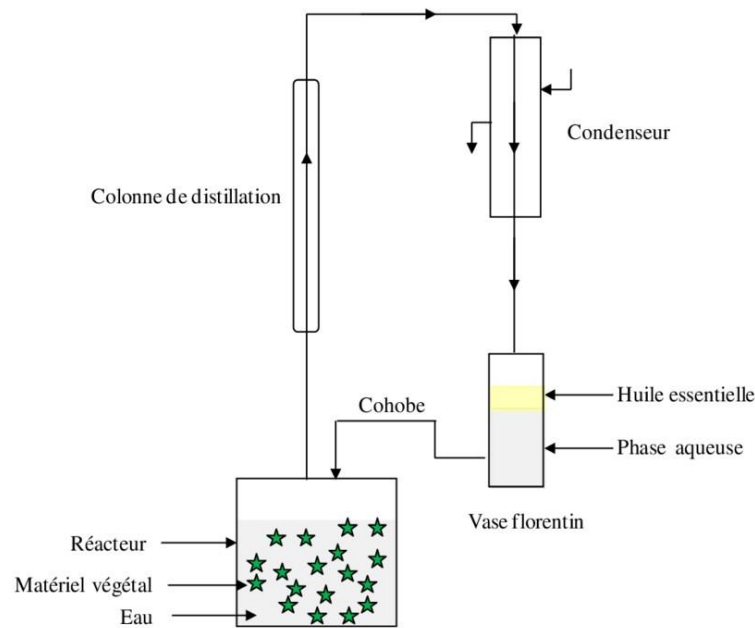


Figure .I.2 : Schéma des appareils d'hydrodistillation (Boukhatem et *al.*, 2019)

I.1.4.2. Expression à froid

L'extraction par pression à froid est une technique couramment utilisée pour obtenir les huiles essentielles d'agrumes tels que l'orange, la mandarine, le citron et le pamplemousse. Cette procédure implique la pression mécanique des fruits pour libérer l'huile essentielle contenue dans leurs zestes. Aujourd'hui, ce processus est réalisé à l'aide de centrifugeuses modernes (Aboughe et *al.*, 2014).

I.1.5. Domaines d'utilisation

Les huiles essentielles sont des extraits concentrés obtenus à partir de différentes parties de plantes et sont appliquées dans une variété de domaines et le plus important d'entre eux : pharmacologie, cosmétologie, industries agroalimentaires et agriculture.

I.1.5.1. Pharmacologie

L'huile essentielle représente un élément précieux en complément des thérapies conventionnelles. Elle joue notamment un rôle significatif dans le domaine de l'aromathérapie clinique. Pour s'assurer de sa fiabilité, il est préférable de choisir celles issues de cultures biologiques, reconnaissables par leur certification Bio (Françoise et *al.*, 2013).

I.1.5.2. Cosmétologie

Les huiles essentielles sont utilisées dans divers produits cosmétiques comme les shampoings, les savons, les crèmes et autres pour leur parfum agréable et leurs propriétés bénéfiques pour la peau et les cheveux. Elles sont présentes en quantité modérée pour garantir leur efficacité tout en minimisant les risques d'allergies ou d'irritations (Aline et *al.*, 2021).

I.1.5.3. Industries agroalimentaires

Les huiles essentielles s'avèrent être des agents naturels précieux dans l'industrie alimentaire. Elles ne se contentent pas de rehausser le goût des aliments, mais contribuent également à leur conservation grâce aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de certains de leurs composants. En optant pour les huiles essentielles, l'industrie alimentaire peut proposer des produits plus sains et plus naturels aux consommateurs, tout en garantissant une meilleure conservation. Cette alternative s'inscrit parfaitement dans la tendance croissante vers une alimentation plus saine et plus respectueuse de l'environnement (Bessah et *al.*, 2015).

I.1.5.4. Agriculture

Les huiles essentielles sont des produits d'origine végétale, ce qui les rend non toxiques pour les humains et moins dangereuses pour les agriculteurs lors de leur manipulation. Contrairement aux pesticides de synthèse, les huiles essentielles ne laissent pas de résidus chimiques nocifs dans les aliments ou dans l'environnement, ce qui en fait une option plus sûre pour la santé humaine et l'écosystème (Regnault et *al.*, 2020).

De plus, les biopesticides à base d'huiles essentielles sont généralement moins chers que les pesticides de synthèse. Les huiles essentielles peuvent être extraites à partir de plantes cultivées, ce qui réduit les coûts de production par rapport à la fabrication de produits chimiques de synthèse (Catani et *al.*, 2022).

I.2. Bigaradier (*Citrus aurantium*)

La famille des Rutaceae, qui comprend les plantes à fleurs souvent désignées sous le nom de famille des "rues" ou des agrumes, regroupe quelque 155 genres et plus de 1600 espèces. Parmi les petits arbres d'agrumes de cette famille se trouve le *Citrus aurantium*, plus connu sous le nom d'orange amère (Hamedi et *al.*, 2019).

Le Bigaradier (Figure I.3) est une plante répandue. L'ensemble de ses parties, à savoir, feuilles, fruits, écorces, fleurs et racines sont traditionnellement employées dans le traitement de divers pathologies (Karthikeyan et *al.*, 2014).



Figure I.3 : Bigaradier (Ghédira et *al.*, 2015)

I.2.1. Nomenclature

Citrus aurantium, connu sous divers noms, est une plante aux multiples facettes et à l'histoire riche. Couramment appelé oranger amer ou bigaradier. Son fruit est désigné sous les termes de "Seville orange" renvoyant à son association célèbre avec la ville de Séville en Espagne (Mannucci et *al.*, 2018).

L'extrait de ce fruit, surtout son huile essentielle, est aussi appelé néroli, tirant son nom de la princesse italienne Nerola (Suryawanshi et *al.*, 2011).

Citrus aurantium est un vrai carrefour de culture et de botanique, se parant de noms variés qui reflètent son importance à travers les âges et les frontières :

Nom scientifique : *Citrus aurantium* (Ooghe et *al.*, 1997)

Nom anglais : Bitter orange (Mabberley., 2004)

Nom français : Bigaradier, oranger amer (Ghédira et *al.*, 2015)

I.2.2. Classification botanique

Selon BIBALANI et *al.*, (2011), la classification botanique de *Citrus aurantium* est comme suit :

Règne : Plantae

Sous-Règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Rosidés

Commande : Sapindales

Famille : Rutacées

Genre : *Citrus*

Espèces : *Citrus aurantium* L.

I.2.3. Description botanique

Tous les agrumes appartiennent au genre *Citrus*, famille des Rutacées (Sirajudheen, 2016). *Citrus aurantium*, se présente sous la forme d'un arbuste ornemental épineux de 4 à 5 mètres de hauteur, reconnu pour ses oranges amères. Il est couramment cultivé dans les régions méditerranéennes. Le tronc de cet oranger s'étend en branches touffues (Hadrach et *al.*, 2009).

La fleur de *Citrus aurantium* se caractérise par son blanc éclatant . Les feuilles de *Citrus aurantium*, quant à elles, se distinguent par leur robustesse. Elles arborent une forme allongée et des bords légèrement crénelés, leur surface est d'un vert brillant (Jacquemond et *al.*,1986).

L'écorce de *Citrus aurantium* est généralement épaisse et rugueuse. Elle a une couleur qui varie du vert, lorsqu'elle est sur un fruit jeune, à un orange plus intense et profond quand le fruit arrive à maturité. La surface extérieure est souvent bosselée et peut porter de petites fosses, où se logent les glandes d'huiles essentielles (Figure I.4) (Periyanayagam et *al.*, 2013).



Figure I.4 : Fleurs, feuilles et écorces de *Citrus aurantium*
(Suryawanshi et *al.*,2011)

I.2.4. Répartition géographique

I.2.4.1 Dans le monde

Citrus aurantium trouvé dans l'environnement luxuriant de l'Asie tropicale, cet arbre s'est désormais implanté et est cultivé à grande échelle dans les climats chauds et humides des zones tropicales et subtropicales. (Suryawanshi et *al.*, 2011)

Sa propagation s'est étalée jusqu'à l'Afrique de l'Est, à l'Arabie, la Syrie et aussi dans l'Amérique du Nord (Mannucci et *al.*, 2018) .

Avec le temps, il s'est répandu à l'Europe et les zones limitrophes de la Méditerranée. Aujourd'hui, il se trouve principalement dans les régions du sud de l'Europe, le long des côtes méditerranéennes, y inclus le sud de la France, l'Italie, l'Espagne, la Tunisie, l'Algérie, la Côte

d'Ivoire, Haïti, les États-Unis et le Brésil (Figure I.5) . Entre autres, la Tunisie se distingue par sa position en tant que premier producteur mondial de bigaradiers (Ghédira et *al.*, 2015)

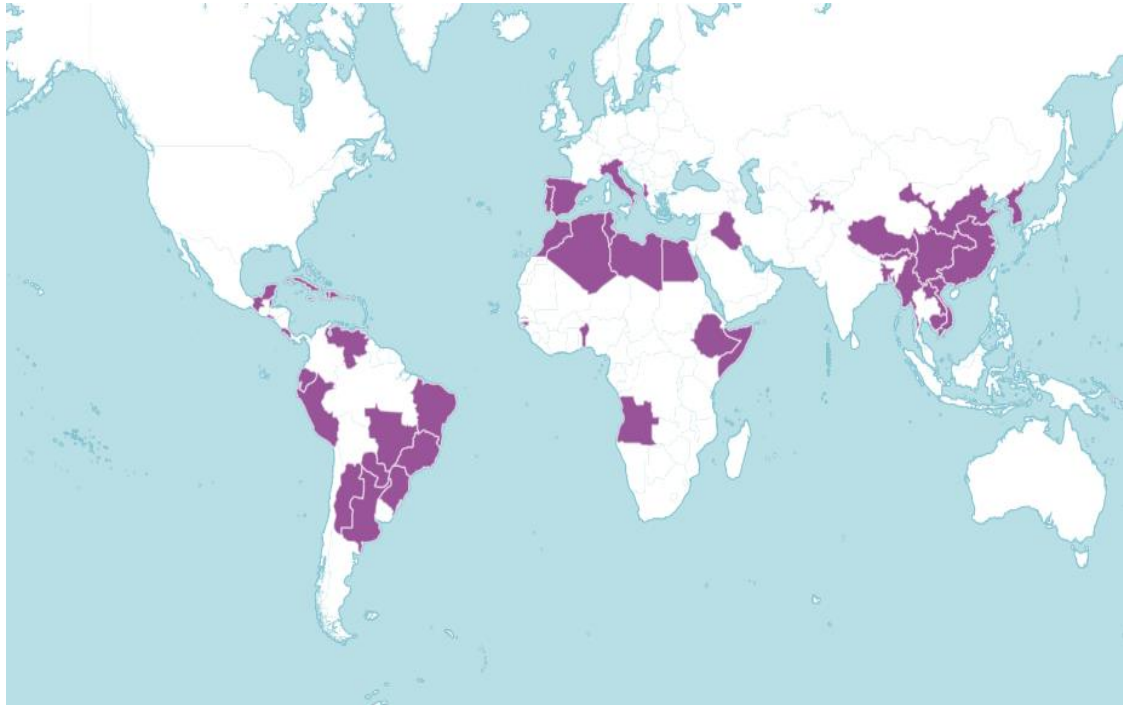


Figure I.5 : Répartition de *Citrus aurantium* dans le monde (Kew Gardens)

I.2.4.2. Dans l'Algérie

La présence des agrumes en Algérie remonte à l'arrivée des Arabes qui ont apporté l'orange amère et le citronnier au début du XVIIIe siècle. La culture de ces fruits a considérablement progressé pour atteindre une production annuelle de 400 000 tonnes, dont 300 000 tonnes d'agrumes spécifiquement. Les plantations d'agrumes s'étendent sur 45 449 hectares, représentant 0,6 % de la surface agricole totale du pays et 11 % de la superficie dédiée à l'arboriculture. La majorité des orchards d'agrumes, soit 90 %, sont répartis dans 13 zones géographiques, parmi lesquelles quatre, à savoir Blida, Chlef, Mascara et Relizane, comptent pour 55 % de la zone de plantation totale (Saharaoui et *al.*, 2009).

I.3. Activités biologiques

Les huiles essentielles sont dérivées de composants botaniques et possèdent un éventail d'activités biologiques, qui incluent des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, et antioxydantes. Ces activités sont dues à la richesse des huiles essentielles en composés volatils comme les terpénoïdes et phénols. Ces molécules interagissent avec les bactéries et les virus, inhibant ainsi leur croissance ou leur métabolisme. Cela rend les huiles essentielles attrayantes pour le développement de nouvelles préparations thérapeutiques et compléments dans le secteur de la santé (Edris, 2007).

I.3.1. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est étudiée en raison de leur potentiel à inhiber ou à détruire les organismes pathogènes. Elles contiennent une multitude de composés volatils tels que les terpènes, les phénols et les aldéhydes, qui sont principalement responsables de leurs propriétés antimicrobiennes (Bakkali *et al.*, 2008).

Ces composants agissent de diverses façons, par exemple, en perturbant la membrane et l'enveloppe cellulaire des micro-organismes (Hyldgaard *et al.*, 2012), en modifiant le métabolisme interne de la cellule et en interrompant la signalisation cellulaire (Nazzaro *et al.*, 2013). La diversité chimique des huiles essentielles joue un rôle clé dans leur effet antimicrobien, car elle peut empêcher les organismes de développer rapidement une résistance (Burt, 2004).

De plus, des études montrent que les huiles essentielles peuvent être utilisées en combinaison avec des antibiotiques conventionnels pour améliorer leur efficacité (Swamy *et al.*, 2016).

I.3.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles est attribuée à leur richesse en composés phénoliques et autres antioxydants naturels tels que le carvacrol, le thymol, l'eugénol et le limonène. Ces substances chimiques sont capables de piéger les radicaux libres, de chélater les ions métalliques catalyseurs de l'oxydation et d'inhiber les enzymes oxydantes (Miguel, 2010; Teixeira *et al.*, 2013).

La capacité antioxydante des huiles essentielles est généralement évaluée en utilisant des tests *in vitro*, comme le test DPPH (2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl), le test ABTS (acide

2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)), et le test FRAP (pouvoir de réduction du fer) (Amorati et *al.*, 2013).

Ces tests mesurent la capacité d'une substance à agir comme un donneur d'électrons et à neutraliser les espèces réactives à l'oxygène, contribuant ainsi à la protection contre l'oxydation et le stress oxydatif, des facteurs connus pour leur rôle dans le développement de nombreuses maladies chroniques et le vieillissement (Bakkali et *al.*, 2008).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Cette étude expérimentale étalée entre le mois de Février et le mois de Mai 2024, a été réalisée sur plusieurs étapes :

- L'extraction de l'huile essentielle de la plante étudiée *Citrus aurantium*, effectuée au laboratoire de physiologie végétale à l'université Djillali Bounaama de Khemis Miliana.
- L'analyse par CGMS au laboratoire de Valorisation de Substances Naturelles à l'université Djillali Bounaama de Khemis Miliana.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne, accomplie au niveau du laboratoire d'analyses médicales de Dr Zibouche à Ain Defla.
- L'évaluation de l'activité antioxydante, accomplie au niveau du laboratoire d'analyses et de chromatographie en phase gazeuse à l'université Djillali Bounaama de Khemis Miliana.

II.1 Matériel

II.1 Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé se résume en appareillage, verrerie, milieux de culture et produits chimiques. Tout ce matériel consommable et non consommable est détaillé dans l'annexe 01.

II.1.2 Matériel biologique

II.1.2.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de l'orange amère ou bigarade (*Citrus aurantium*), plus précisément : les écorces des fruits. La récolte des fruits a été faite manuellement dans la région de Djilida à Aïn-defla, située dans le centre-nord de l'Algérie, durant le mois de Février 2024. Les fruits étaient bien murs et ne présentaient aucun signe de blessure ou d'infection (Figure.II.1)



Figure II.1 : Arbre de l'orange amère (*Citrus aurantium*) (Originale, 2024)

II.1.2.2 Caractérisation de la région de récolte

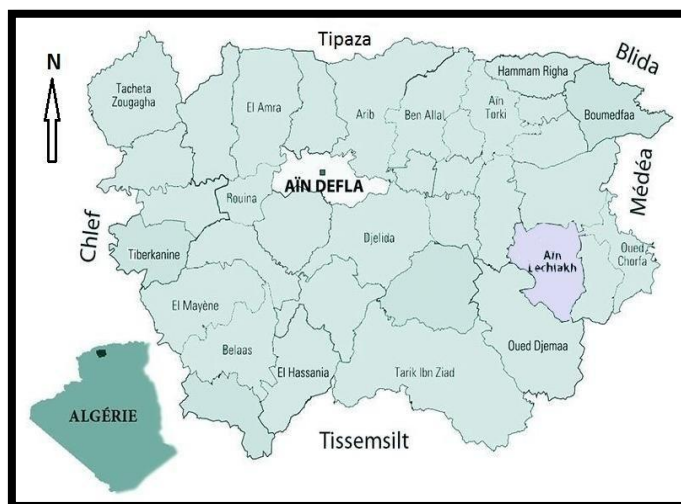
Les caractéristiques de la région de récolte (Djelida à Ain Defla) (Figure II.2) sont :

Wilaya : Ain Defla

Région : Djelida

Altitude : 413 m

Climat : méditerranéen avec été chaud et sec



a



b

Figure II.2 : Carte géographique du lieu de récolte des bigarades,

a : Wilaya de Ain Defla (Hallouz et *al.*, 2018), b : Djelida (ONS ,2008)

II.1.2. Matériel microbien

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'orange amère a été évaluée sur des bactéries nosocomiales fournies du laboratoire de bactériologie de Dr Zibouche à la wilaya d'Ain defla et des bactéries de référence ATCC obtenues auprès du laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche et de Développement de SAIDAL (Alger) du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa et de l'Institut Pasteur. Ces bactéries ont été conservées et maintenues en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats (Tableau II.1).

Tableau II.1 : Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

	Souches bactériennes	Origine	Souches bactériennes	Origine
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	ECBU
	<i>Entérocooccus faecalis</i>	ATCC 2035	<i>Entérocooccus faecalis</i>	ECBU
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC9372	<i>Bacillus subtilis</i>	ECBU
Gram négatif	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	ATCC4352	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	ECBU
	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	ATCC 15442	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	ECBU
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25 922	<i>Escherichia coli</i>	ECBU

ATCC: American Type Culture Collection

ECBU: Examen cytotbactériologique des urines

II.2. Méthodes

Notre démarche expérimentale est résumée par la figure suivante :



Écorce de bigarade (*Citrus aurantium*)

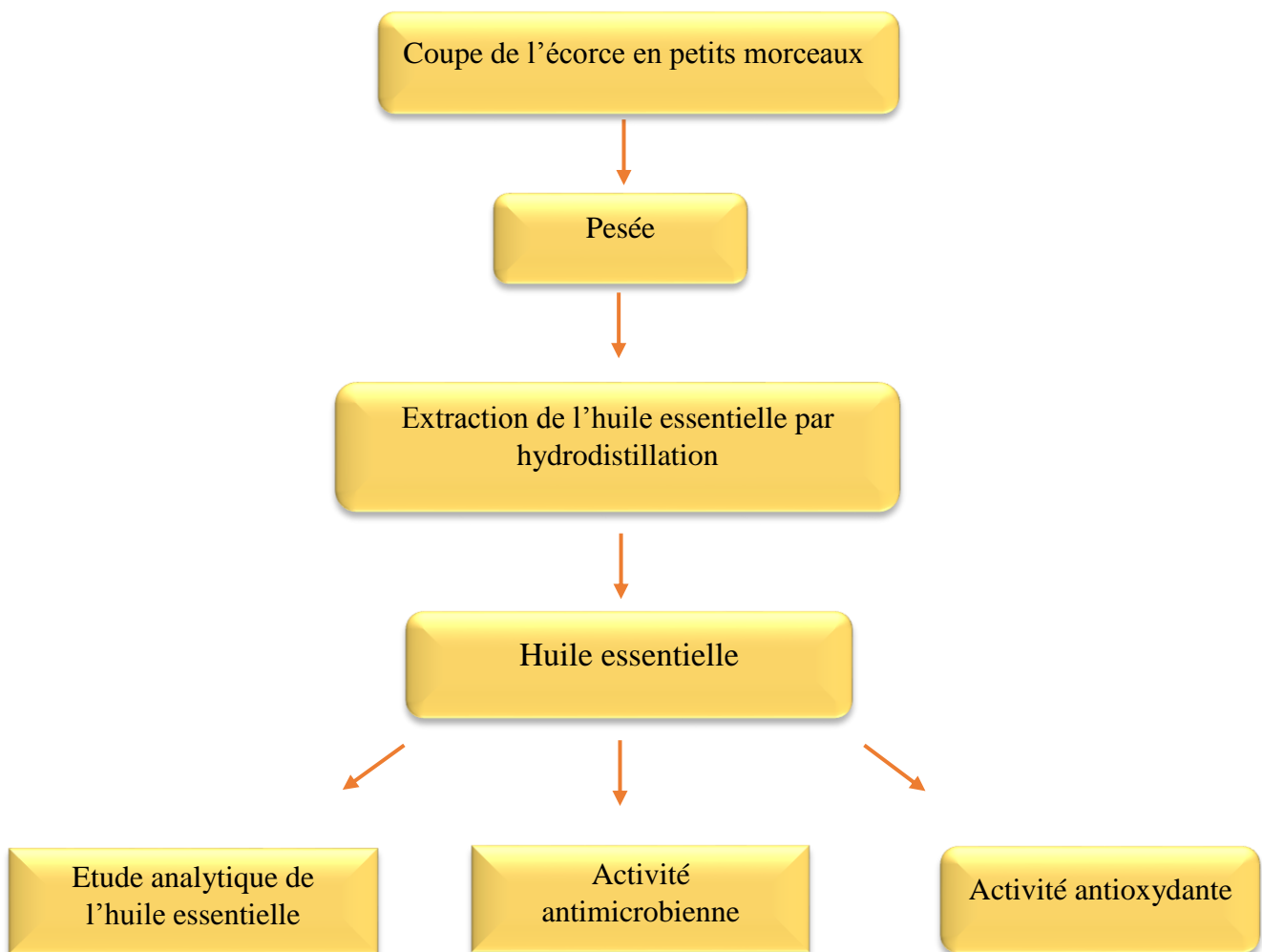


Figure II.3. Illustration de la démarche expérimentale

II.2.1. Extraction de l'huile essentielle

Selon le protocole de AZHDARZADEH *et al.*, (2016), Les écorces de *Citrus aurantium* sont lavées à l'eau afin d'éliminer toute impureté, suivies d'un épluchage manuel minutieux. Après cela, 500 grammes d'écorces préparées sont déposés dans un ballon de distillation d'une capacité de 2000 ml. Un ajout de 1 litre d'eau distillée est nécessaire pour humidifier le matériel végétal avant de procéder à l'extraction de l'huile essentielle.

Cette extraction est réalisée par hydrodistillation, un processus qui dure 4 heures par un appareil de type Clevenger. À la fin de la distillation, nous recueillons à l'aide d'une seringue la couche supérieure constituée d'huile essentielle(Figure.II.4).



Figure II.4 : Clevenger (Originale, 2024)

II.2.1.1. Conservation de l'huile essentielle

Pour une conservation optimale des huiles essentielles, il est recommandé d'utiliser des flacons en verre opaque pour les protéger de la lumière UV, qui peut altérer la composition biochimique des huiles essentielles. Il est également conseillé de les stocker à des températures comprises entre 5 °C et 4 °C et de bien fermer les flacons pour éviter la volatilisation progressive des principes actifs des huiles essentielles (Baudoux, 2017).

II.2.1.2. Teneur en eau

Selon GHANMI et *al.*, 2010, La teneur en eau des écorces de *Citrus aurantium* est déterminée de la manière suivante :

Une masse (m_f) de 30 g de l'écorce est pesée dans une boîte de pétri, puis introduite à l'étuve portée à une température de 60 °C. Ce matériel végétal reste soumis au séchage jusqu'à l'obtention d'une masse constante (m_s). L'opération a été répétée trois fois.

$$H(\%) = \left[\frac{M_f - M_s}{M_f} \right] \times 100$$

Avec :

M_f : masses de la plante à l'état frais

M_s : masses de la plante à l'état sec.

II.2.1.3. Rendement en huile essentielle

Selon BOUSSAADA et CHEMLI (2007), le rendement est exprimé en pourcentage. Il est calculé par la formule suivante :

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

Avec :

RHE : Rendement en huile essentielle en %

M' : Masse de l'huile essentielle en gramme

M : Masse de la matière végétale utilisée en gramme.

II.2.2. Étude analytique de l'huile essentielle

L'étude analytique de l'huile essentielle englobe l'examen des propriétés organoleptiques, la mesure de deux grandeurs physique et chimique, et l'analyse par Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/MS).

II.2.2.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* ont été notées.

II.2.2.2. Mesure des grandeurs physique et chimique

a. Densité relative

Selon ALILI et *al.*, (2022), La densité relative à 20°C est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C.

Cette grandeur est sans dimension et son symbole est $d_{20/20}$. Le pycnomètre doit être nettoyé soigneusement et rincé successivement au moyen d'éthanol puis d'acétone et séché à l'intérieur. Il est alors pesé vide muni de son bouchon à 0,001 g. Ensuite, le pycnomètre est rempli d'eau distillée bouillie puis refroidie à 20°C. L'ensemble est plongé dans un bain thermostatique durant 30 min en ajustant le niveau d'eau au trait repère. Le pycnomètre est bouché et l'extérieur est essuyé. Puis il est pesé plein. Enfin, le pycnomètre est vidé, rincé et séché comme au début. Puis les mêmes opérations sont effectuées en remplaçant l'eau par l'échantillon d'huile essentielle. La densité relative $d_{20/20}$ est donnée par la formule suivante :

$$d_{20/20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Avec :

m_0 : masse en grammes du pycnomètre vide .

m_1 : masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau .

m_2 : masse en grammes du pycnomètre rempli en huile essentielle.

b. Potentiel d'Hydrogène (pH)

Le potentiel d'hydrogène noté pH est une grandeur qui permet de mesurer l'activité chimique de l'ion hydrogène dans une solution. D'autre part, le pH indique le degré d'acidité ou de basicité d'une solution, c'est-à-dire si la solution est acide, basique ou neutre.

Le potentiel d'Hydrogène a été évalué à l'aide d'un papier pH, nous commençons par prendre une bande de papier pH et la plaçons sur un carreau blanc afin de faciliter l'observation des changements de couleur. Nous utilisons ensuite une pipette pour déposer avec précaution quelques gouttes d'huile essentielle sur le papier pH. Nous observons attentivement la couleur qui apparaît sur le papier et la comparons aux différentes nuances de la gamme de référence qui varient selon le pH. Enfin, nous notons la valeur du pH correspondante après avoir trouvé la teinte qui correspond le mieux sur l'échelle de référence.

II.2.2.3. Analyse par CG/MS

La technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) exploite les différences de distribution des composants d'un mélange entre une phase stationnaire fixe dans la colonne et une phase mobile. Lorsque le mélange est introduit dans la colonne, un gaz vecteur le propulse, et les composants interagissent diversement avec la phase stationnaire, progressant à des vitesses variables, ce qui entraîne leur séparation. À la sortie de la colonne, un détecteur adéquat génère des signaux enregistrés comme des pics chromatographiques (De Maack et *al.*, 1997).

Nous avons utilisé un instrument Perkin Elmer Clarus 600, dans les installations du laboratoire de Valorisation de Substances Naturelles à l'université Djilali Bounaama de khemis Meliana .

La fragmentation moléculaire s'est faite par impact électronique avec une énergie de 70eV, la colonne chromatographique, une RTX-VMS capillaire de 60 mètres de longueur et 0,25 mm de diamètre, possédait un film d'une épaisseur de 0,25 µm. Le programme de température initiait avec une température de colonne de 60°C durant une minute.

Ensuite, la température augmentait graduellement à un rythme de 4°C par minute jusqu'à atteindre 240°C, température à laquelle la colonne demeurerait stable pendant trois minutes. L'ensemble du processus de balayage pour l'identification des composés durait une heure. L'injection de l'échantillon était réalisée à une température de 250°C, en mode splitless avec un ratio de split de 1/200. Une quantité de 0,3 µl de l'huile essentielle était injectée. L'hélium était utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1 ml/min (Atilia et *al.*,2015).



Figure II.5 : Instrument Perkin Elmer Clarus 600 (Originale, 2024)

II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode d'aromatogramme selon le protocole de KHRIBCH et *al.*, (2018).

a : Préparation de l'inoculum

Les espèces cibles ont été revivifiées et repiquées sur gélose nutritive, puis incubées à une température optimale de développement (37°C) pendant 24h.

Pour préparer l'inoculum, deux colonies bien isolées et identiques de chaque bactérie ont été prélevées et placées dans 5ml d'eau physiologique dans un tube stérile. Après agitation, l'inoculum a été ajusté à un étalon de turbidité de 0,5 McFarland. Selon les besoins, cela a été réalisé en ajoutant un fragment de colonie ou en diluant avec de l'eau physiologique stérile. Une turbidité de 0,5 Mc Farland correspond à une densité optique de 0,08-0,13 à une longueur d'onde de 620 nm. La concentration finale de l'inoculum est approximativement de l'ordre de (10⁸ UFC/ml) (Khribch et *al.*,2018).

II.3.1. Antibiogramme

II.3.1.1. Ensemencement

Ensemencement du milieu de culture, à savoir, le milieu Mueller-Hinton, qui est communément utilisé pour les antibiogrammes. Ce dernier est uniformément ensemencé par les bactéries. Ceci est fait à l'aide d'un écouvillon stérile qui est trempé dans l'inoculum bactérien, puis étalé sur toute la surface de la gélose en zigzag pour s'assurer d'une répartition homogène (Khribch et al., 2018).

II.3.2.2. Application des disques d'antibiotiques

Selon KHRIBCH et al., (2018), Les disques d'antibiotiques ont été déposés à l'aide d'une pince stérile en appuyant doucement sur chaque disque pour s'assurer de son application et pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

Après l'incubation à 37°C pendant 18 à 24 h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse à l'extérieur de la boîte fermée. Les résultats obtenus ont été interprétés en fonction de diamètre critique pour chaque antibiotique.

Tableau II.2 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme (standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale)

	Antibiotique	Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)		
			R (≤)	I	S (≥)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomycine	--	--	--	--
	Gentamicine	10	12	13-14	15
	Pénicilline	10	28	--	29
	Amykacine	30	14	15-16	17
<i>Entérocooccus faecalis</i>	Rifampicine	30	14	15-18	19
	Erythromycine	15	13	14-22	23
	Levofloxacine	5	13	14-16	20
	Furanes	300	14	15-16	17
	Fosfomycine	200	12	13-15	16
<i>Escherichia coli</i>	Ertapeneme	10	18	19-21	22
	Amoxicilline +ac Clavulanique	20/10	13	14-17	18

	Amykacine	30	14	15-16	17
	Gentamicine	10	12	13-14	15
	Ciprofloxacine	5	15	16-20	21
	Céphazoline	30	12	13-14	15
	Amoxicilline	10	13	14-16	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tetracycline	30	14	15-18	19
	Ticarcilline+Ac.clavulanique	75/10	15	16-23	24
	Amykacine	30	14	15-16	17
	Tobramycine	10	12	13-14	15
	Pipéracilline	100	14	15-20	21
	Céftazidime	30	14	15-17	18
	Aztréonam	30	15	16-21	32
	Nétilmicine	30	12	13-14	15
<i>Bacillus subtilis</i>	Ticracilline+acide clavulanique	75/10	15	16-23	24
	Céfoxitime	30	19	20-24	25
	Penzylpénicilline	10	22	24-28	29
	Kanamycine	30	12	13-14	15
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	Fosfomycine	200	12	13-15	16
	Céfoxitime	30	19	20-24	25
	Penzylpénicilline	10	22	24-28	29
	Imipénème	10	14	16-18	19
	Céfoxitine	5	14	15-24	25

II.3.2. Aromatogramme

Selon BENOUAKLIL et *al.*, (2021), La méthode de diffusion sur gélose a été utilisée pour évaluer l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite de l'écorce de *Citrus aurantium*. Cette évaluation a porté sur douze souches différentes, y compris des bactéries Gram positif et Gram négatif, comme détaillé dans le tableau II.1.

L'objectif était de comparer l'action antimicrobienne de cette huile à celle de plusieurs agents antibactériens standards. Pour ce faire, des suspensions microbiennes ont été inculquées sur le milieu de culture approprié (Mueller-Hinton), à l'aide d'un écouvillon. Puis, des disques absorbants stériles de 6 mm imprégnés de 10 μ L de l'huile essentielle ont été disposés à l'aide d'une pince sur les géloses précédemment inoculées, trois disques par boîte de Pétri. Après une période d'incubation de 24 heures à 37 °C, l'activité antimicrobienne a été mesurée en se basant sur la taille de la zone d'inhibition, c'est-à-dire le diamètre de l'aire sans croissance microbienne observable, en prenant en compte le diamètre du disque (Figure II .6).

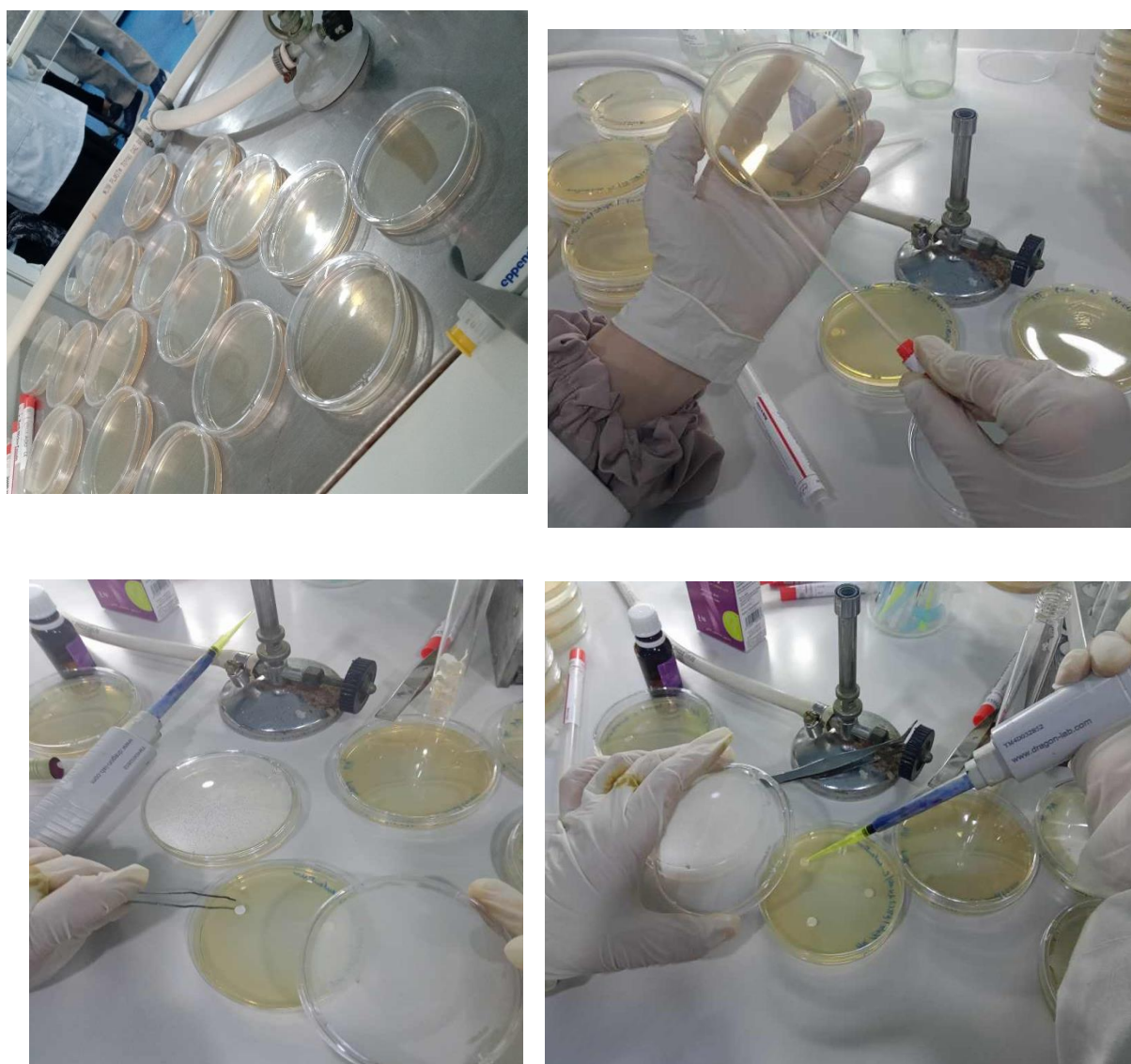


Figure II.6 : Aromatogramme (Originale, 2024)

II.3.3. Méthode de micro-atmosphère

Cette méthode se distingue de l'aromatogramme traditionnel par l'emplacement différent du disque imprégné d'huile essentielle. Au lieu de le déposer directement sur le milieu de culture gélosé, nous plaçons le disque sur le couvercle interne de la boîte de Pétri qui est ensuite retournée, ce qui positionne le disque en bas et non en contact avec la gélose. Cette configuration permet aux composés volatils d'agir sur les bactéries sans qu'une interaction liquide-directe ne se produise, ciblant ainsi uniquement l'influence de la phase gazeuse de l'huile essentielle. Dans cette étude, nous utilisons deux doses (10 μ l et 50 μ l). Trois répétitions ont été effectuées en utilisant trois boîtes de Petri pour chaque dose. (Boukhatem et *al.*, 2014).

Pour la première dose, 10 μ l d'huile essentielle est déposée avec précision sur un disque stérile de 6 mm.

Pour la deuxième dose, 50 μ l d'huile essentielle est déposée avec précision sur un disque stérile de 12 mm.

Les boîtes de Petri sont par la suite incubées à une température de 37°C pendant une durée de 24 heures.

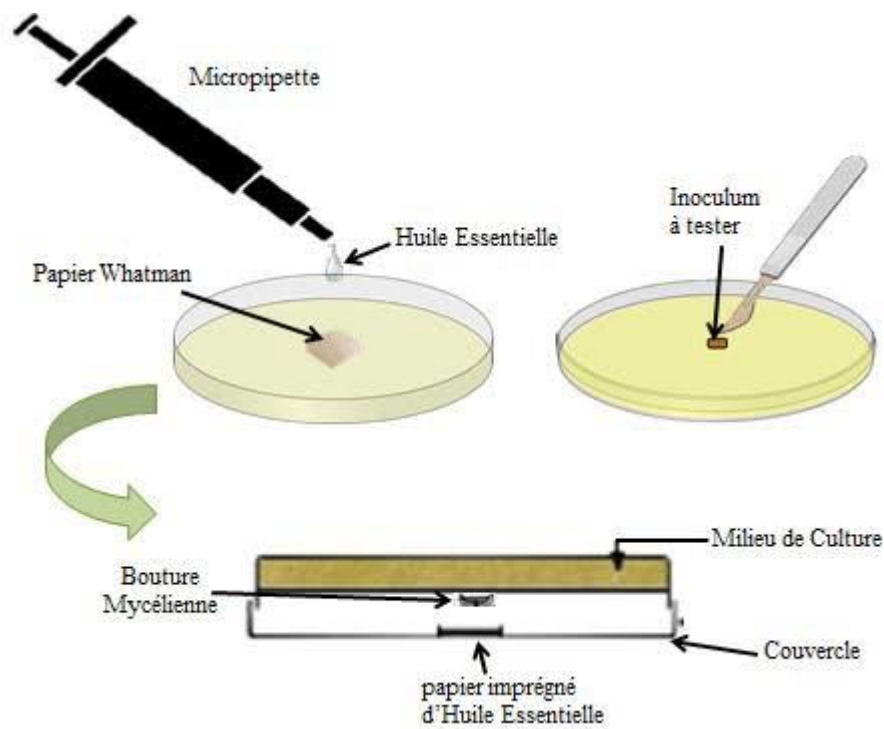


Figure II.7 : micro-atmosphère (Attrassi.,2023)

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante

II.4.1. Test de DPPH

Selon ATERE et *al.*, (2018), une solution de DPPH à 0,004 % dans l'éthanol est préparée. Puis 1 ml de solution DPPH est ajouté à 1ml d'huile essentielle à différentes concentrations (10 µg /ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml). Il est crucial de bien mélanger le contenu des tubes et de les laisser reposer à l'abri de la lumière pendant 30 minutes pour une réaction adéquate. À l'issue de l'incubation, nous mesurons l'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm avec un spectrophotomètre, en prenant comme blanc de référence de l'éthanol pur. Le pourcentage d'inhibition est alors calculé en utilisant la formule :

$$I (\%) = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

où

Ac : est l'absorbance du contrôle

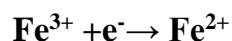
At : est l'absorbance de l'échantillon testé.

Ensuite, un graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait est tracé, permettant ainsi de déduire la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) du graphique. Des antioxydants de référence, le BHT et l'acide ascorbique, sont utilisés comme témoins positifs.

II.4.2. Test du pouvoir de réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Principe

Selon HABIBOU et *al.*, (2019), le principe de l'activité antioxydante d'un extrait est basé sur son potentiel réducteur, équivalent à son pouvoir antioxydant. Cette méthode consiste à évaluer la capacité des extraits à transformer le fer ferrique (Fe^{3+}) qui fait partie intégrante du complexe hexacyanoferrate $K_3Fe(CN)_6$, en fer ferreux (Fe^{2+}). Dans son état initial, le fer ferrique confère au complexe une couleur jaune. Suite à la réduction, influencée par la présence d'antioxydants qui fournissent des électrons, le fer ferrique se transforme en fer ferreux, provoquant un changement de couleur vers le bleu ou le vert. L'intensité de ce changement de couleur, de jaune à bleu ou vert, est directement proportionnelle à la capacité antioxydante de l'extrait examiné, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité des antioxydants présents. Le changement de la coloration de jaune à bleu ou vert est proportionnel à l'activité antioxydante.



Protocole

Selon BOUGANDOURA et *al.*, (2013), le pouvoir réducteur de l'huile essentielle de citron est déterminé comme suit :

Initialement, 1 ml de l'huile essentielle à différentes concentrations (10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml) est mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate à une molarité de 0,2M et un pH de 6,6, ainsi que 2,5 ml d'une solution à 1% d'hexacyanoferrate de potassium ($K_3Fe(CN)_6$). Ce mélange est ensuite incubé à une température de 50 °C pendant 20 minutes. Pour précipiter les protéines, 1 ml d'acide trichloracétique à 10% est ajouté post-incubation, suivie d'une centrifugation à 3000 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu de chaque tube est ensuite soigneusement séparé et mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ à 0,1%. Ce mélange est laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 30 minutes et les absorbances ont été mesurées à 700 nm dans un spectrophotomètre.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Etude analytique

III.1.1. Teneur en eau

Le séchage des écorces du fruit étudié révèle une teneur en eau qui avoisine les quatre cinquièmes. Elle est de $75,8\% \pm 1,55$ chez *Citrus aurantium* comme illustré dans la figure suivante :

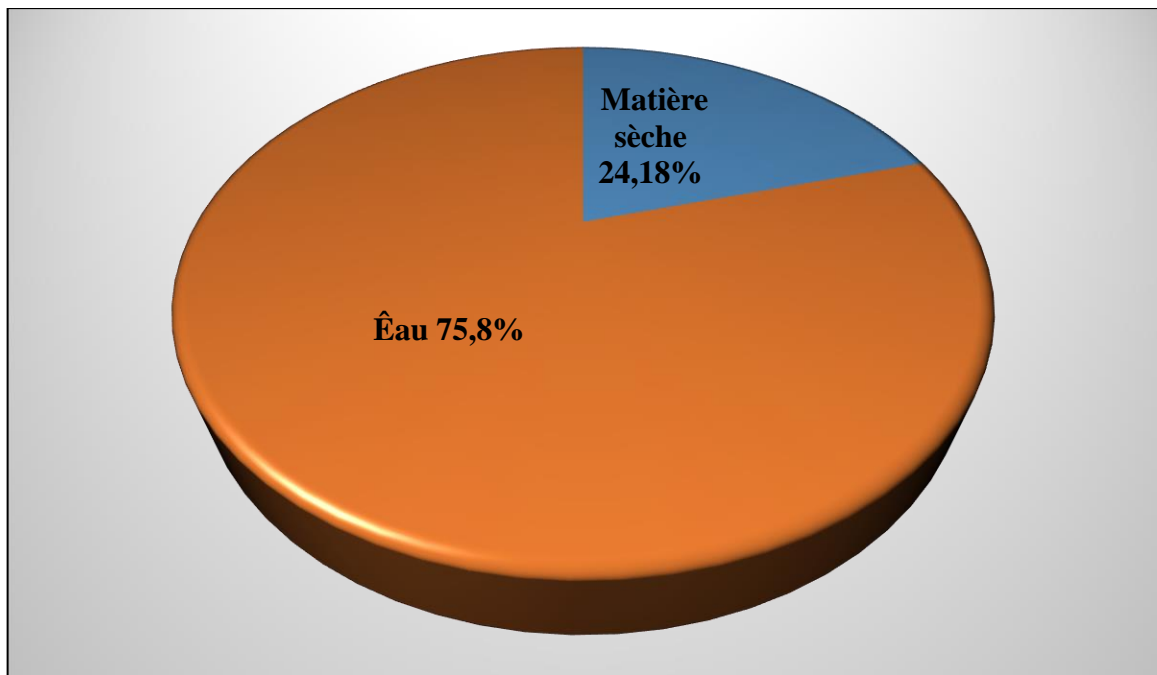


Figure.III.1. Teneur en eau dans les pelures de *Citrus aurantium*

III.1.2. Rendement en huile essentielle

L'huile essentielle a été soigneusement extraite de l'écorce fraîche par hydro distillation. Il a été observé que les pelures de *Citrus aurantium* contiennent $1,24 \% \pm 0,20$ d'huile essentielle.

Dans notre recherche, le rendement en huile essentielle de *Citrus aurantium* était comparé à celui obtenu par SARROU et *al.*, en 2013 ayant appliqué la méthode d'hydrodistillation sur les écorces de la même espèce cultivée en Grèce. Ils ont trouvé un rendement de 1,67 %.

Les données de notre étude montrent un rendement élevé par rapport aux chiffres publiés par B'CHIR et ARNAUD (2023) en Iran, où le travail portant sur les écorces de *Citrus aurantium* révélait un rendement de 0,86 %.

Les variations des rendements en huile essentielle de *Citrus aurantium* constatées dans cette étude comparée à d'autres peuvent être expliquées par la multiplicité des paramètres influençant le rendement. Ces paramètres englobent l'espèce étudiée, le génotype, les conditions environnementales, le moment de la récolte ainsi que la méthode de séchage (Sarrou et *al.*, 2014)

III.1.3. Caractères organoleptiques

L'huile essentielle des pelures étudiées est très aromatique. Elle est liquide huileuse et de couleur jaune pâle (Figure III.2).

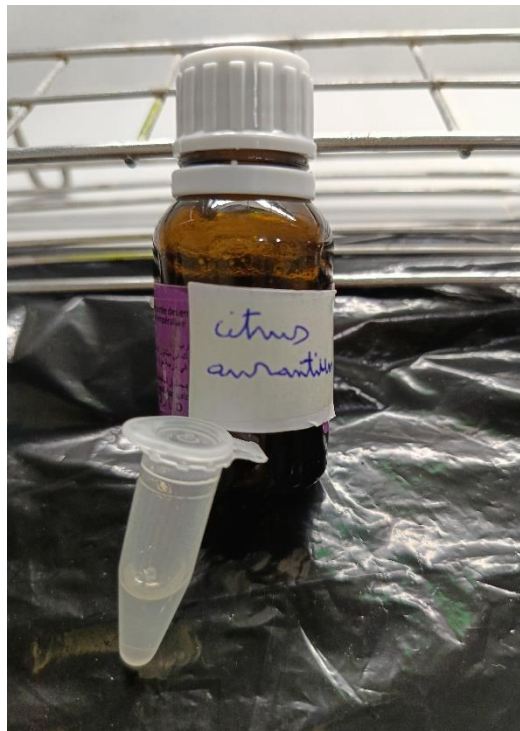


Figure III.2 : Huile essentielle de *Citrus aurantium* (Originale, 2024)

Le tableau III.1 récapitule les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle obtenue à partir des pelures de *Citrus aurantium*.

Tableau III.1: Caractères organoleptiques de l'huile essentielle étudiée

Espèce	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Citrus aurantium</i>	Liquide	jaune pâle	Arôme frais et agréable ,parfum d'orange
Norme AFNOR	Liquide mobile limpide	Jaune très pâle à brun	Fraiche, verte et fleurie subtilement sucrée avec des touches d'agrumes et d'hespéridés, caractéristique et agréable

Les caractéristiques organoleptiques de notre huile essentielle correspondent à celles rapportées dans diverses études menées à l'échelle internationale.

L'huile essentielle de *Citrus aurantium*, extraite de l'écorce de l'orange amère, présente les propriétés organoleptiques qui suivent : Aromatiquement, elle offre un parfum complexe où la fraîcheur des notes agrumes se mêle à une légère amertume, caractéristique des huiles essentielles d'agrumes. Visuellement, cette essence a une apparence claire avec une coloration qui va du jaune pâle au transparent. Au goût, bien qu'elle ne soit généralement pas consommée, elle se caractérise par une saveur amère. Ces caractéristiques peuvent légèrement varier suite aux variations climatiques, géographiques, et techniques utilisées lors de l'extraction (Stratakos et al., 2016).

III.1.4. Mesure des grandeur physique et chimique

a. Densité relative

La densité relative d'une l'huile essentielle constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une huile essentielle. Notre résultat de l'ordre de 0,7968 est conforme aux normes internationales (AFNOR NF T.75-202). Selon l'Association Française de Normalisation, les huiles essentielles appartenant aux espèces *Citrus*, ont une densité relative inférieure à 1 (Tableau III.2).

Tableau III.2. Densité relative

$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$		$d = 0,7968$
$m_0 = 57,1687 \text{ g}$	$m_1 = 58,2557 \text{ g}$	$m_2 = 58,0349 \text{ g}$

Dans notre étude, la densité relative de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* s'est avérée inférieure à celle rapportée par BOUKHENNOUFA et *al.*, en 2019, qui, après avoir procédé à l'hydrodistillation des écorces de la même espèce en Algérie, ont trouvé une densité de 0,88.

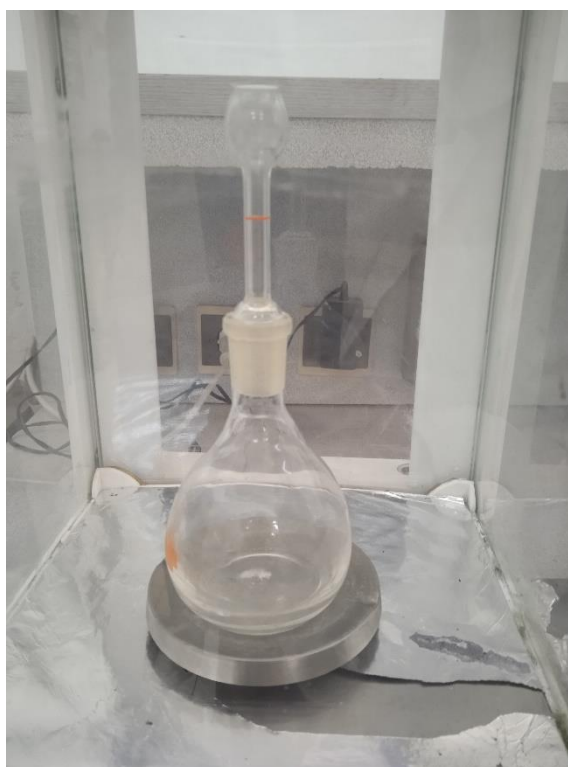


Figure.III.3. Pycnomètre rempli avec l'huile essentielle (Originale, 2024)

b. Potentiel d'Hydrogène (pH)

Le pH de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, qui est autour de 5,5, indique une nature légèrement acide. Cette acidité modérée peut être bénéfique dans les différentes applications, où un pH proche de celui-ci pourrait contribuer à la préservation et à la stabilité des formules (Figure .III.3).



Figure. III.4. pH de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (Originale, 2024)

III.2. Composition Chimique

L'analyse de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus aurantium* a permis d'identifier comme composants prédominants le limonène (66.72%) et le myrcène (7.25%). Ces éléments sont représentatifs de la principale catégorie chimique de l'huile, à savoir, les hydrocarbures monoterpéniques.

Tableau III.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*

N°	Composé	Formule Chimique	Classé Chimique	TR (min)	%
1	Limonène	C ₁₀ H ₁₆	<i>Hydrocarbure monoterpénique</i>	10.143	66.72
2	Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	<i>Hydrocarbure monoterpénique</i>	8.663	7.25
3	α-pinène	C ₁₀ H ₁₆	<i>Hydrocarbure monoterpénique</i>	7.242	2.31
4	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	<i>Monoterpène oxygéné</i>	11.548	2.19
5	β-pinène	C ₁₀ H ₁₆	<i>Hydrocarbure monoterpénique</i>	8.331	2.08
6	Methyl cyclopentane	C ₆ H ₁₂	<i>Hydrocarbure monoterpénique</i>	3.027	1.38

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle a permis d'identifier le Limonène comme constituant majoritaire avec 66,72 % de la composition totale. Suivi ensuite par le β -myrcène et l' α -pinène avec les pourcentages respectifs de 7,25 % et de 2,31 %. Le linalol, le β -pinène, ainsi que le méthyl cyclopentane, sont aussi présents en quantités appréciables, représentant 2,19 %, 2,08 % et 1,38 %. D'autres éléments tels que le β -ocimène, le tétrapentacontane, le linalool, l'oxyde de linalool et l' α -terpinéole contribuent également à la complexité de cette huile, chacun d'eux se situant entre 1,30 % et 1,01 %.

Il a été constaté que les hydrocarbures monoterpéniques forment la grande majorité de l'huile essentielle avec un pourcentage de 82,99%. Les monoterpènes oxygénés constituent une petite partie, à hauteur de 4,60%. Quant aux sesquiterpènes hydrocarbonés et leurs dérivés, ils comptabilisent 3,60%, tandis que la proportion des sesquiterpènes oxygénés et leurs dérivés est de 1,44%.

Des recherches menées sur les écores des fruits de *Citrus aurantium* en Tunisie, où l'hydrodistillation a été effectuée à l'aide d'un appareil de type Clevenger par CHAEIB et *al.*, (2017). Le limonène se distingue avec une concentration atteignant 67,1%. À la suite, d'autres composés apparaissent tels que le β -pinène à 4,02%, le myrcène à 3,17%, le β -ocimène à 2,36% et l' α -pinène à hauteur de 1,18%.

D'après BOUUSAADA et *al.*, (2007), travaillant en Tunisie sur l'écorce qui a été retirée du fruit frais et coupée en petits morceaux, l'huile essentielle était quasiment constituée par les hydrocarbures monoterpéniques, représentant entre 90,1 et 95,6 % de la totalité de l'essence. Le limonène était le composant majeur de cette essence, avec un pourcentage de 87 à 92,2 %. Parmi les autres monoterpènes hydrocarbonés présents en moindre quantité, le β -myrcène est le seul à excéder le seuil de 1,5%.

D'après les études effectuées par HASNAE et *al.*, (2016) sur les écorces des fruits de *Citrus aurantium* au Maroc, où l'hydrodistillation a duré quatre heures, les hydrocarbures monoterpéniques étaient dominants, représentant 85,55%.

III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

III.1. Antibiogramme

L'évaluation de l'efficacité des antibiotiques contre douze bactéries pathogènes (tant Gram positif que Gram négatif) est réalisée par l'observation des zones d'inhibition formées autour des disques imprégnés d'antibiotiques sur un milieu de culture. Ces zones incolores indiquent le degré d'activité antibactérienne des agents antimicrobiens testés. Les résultats obtenus sont organisés et présentés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques

	Souches ATCC	Antibiotique	Diamètre (mm)	Souches cliniques	Antibiotique	Diamètre(mm)
Bactéries Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 2035)	TIC	R	<i>Enterococcus faecalis</i>	TIC	S
		K	S		K	S
		FOX	R		FOX	I
		NET	S		NET	S
		FF	R		FOS	S
		CT	I		FTN	S
		IMP	S		RIF	S
		CX	S		E	S
				LVX	S	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	TIC	R	<i>Staphylococcus aureus</i>	TIC	R
		K	S		K	S
		FOX	S		FOX	I
		NET	S		NET	S
		TCC			P	S
		CT	R		GMN	S
		FF	S		AKN	S
				VAN	S	
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC9372)	TCC	R	<i>Bacillus subtilis</i>	TCC	R
CT		R	CT		R	
P		R	P		I	
K		I	K		I	
Bactéries Gram-	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TIC	R	<i>Escherichia coli</i>	TIC	R
		FOX	S		FOX	S
					K	S
					NET	S
					FTN	S
					GMN	S
					AKN	S
		K	S		ETP	S
		NET	S		CIP	S
		CT	R		CZN	S
	P	I	AMC	S		
	FF	S	AK	S		
	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC4352	CT	R	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	CT	R
		P	R		P	S
		FF	I		FF	R
		IMP	I		IMP	S
		CX	S		CX	I
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	TIC	R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TIC	R
		TCC	R		FOX	R
		P	R		K	I
CT		I	NET		S	

TIC : Ticarcilline ; **K** : Kanamycine ; **FOX** : Céfoxitine ; **TCC** : Ticarcilline+ acide clavulanique ; **NET** : Nétilmicine ; **CT** : Céfoxitime ; **FF** : Fosfomycine ; **P** : Penzylpénicilline ; **AKN** : Amikacine ; **IMP** : Imipénème ; **CX** : Céfoxitine ; **FOS** : Fosfomycine ; **FTN** : Nitrofurantoïne ; **RIF** : Rifampicine ; **E** : Erythromycine ; **LVX** : Lévofoxacine ; **GMN** : Gentamicine ; **VAN** : Vancomycine ; **ETP** : Ertapenème ; **CIP** : Ciprofloxacine ; **CZN** : Céfazoline ; **AMC** : Amoxicilline+ acide clavulanique ; **AX** : Amoxicilline

R : Résistant ; **S** : Sensibilité ; **I** : Intermédiaire.

Nous avons testé l'efficacité de douze antibiotiques spécifiques contre douze bactéries pathogènes, dont six souches de référence ATCC et six souches cliniques. Les résultats révèlent que toutes les souches ont montré des zones d'inhibition considérables en réponse à la plupart des antibiotiques testés, avec des diamètres d'inhibition allant de 20 à 38 mm (Annexe 04).

D'autre part, *Enterococcus faecalis* a montré une résistance à la Ticarcilline, mais s'est avéré sensible aux autres antibiotiques testés. Une résistance à la Ticarcilline a aussi été observée chez *Escherichia coli* qui est à la fois sensible pour les autres antibiotiques testés.

En ce qui concerne *Staphylococcus aureus*, une résistance à la Ticarcilline, avec un diamètre d'inhibition de 7 mm, a été notée. Ainsi, la même souche présente une sensibilité intermédiaire à la Céfexime, caractérisée par un diamètre d'inhibition de 15 mm.

Quant à *Pseudomonas aeruginosa*, elle a démontré une sensibilité à la Ticarcilline, à la Ciprofloxacine et à l'Amikacine, avec des diamètres d'inhibition de 38 mm, 29 mm et 28 mm, respectivement. Cependant, une résistance à la Nétilmicine, à la Céfexime et à la Ticarcilline a été enregistrée (Figure III.6).

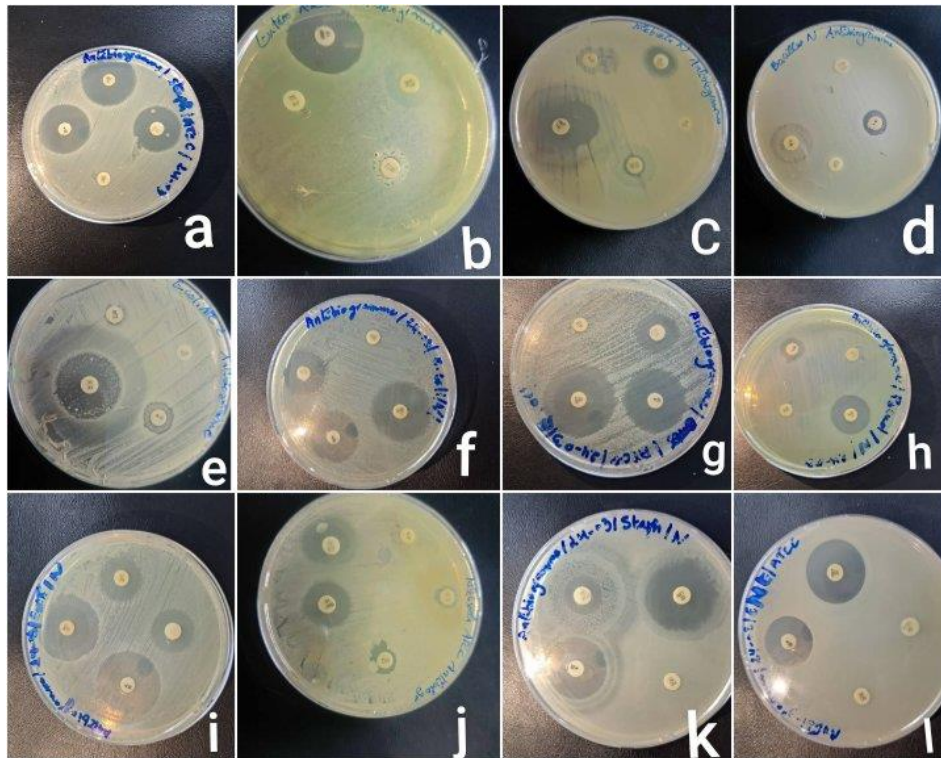


Figure III.6: Résultats d'antibiogramme (Originale, 2024)

a : *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) **b :** *Enterococcus faecalis* **c :** *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; **d :** *Bacillus subtilis* **e :** *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) ; **f :** *Klebsiella pneumoniae* ; **g :** *Escherichia coli* ; **h :** *Pseudomonas aeruginosa* ; **i :** *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), **j :** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; **k :** *Staphylococcus aureus* ; **l :** *Enterococcus faecalis* ATCC 2035

À la suite de l'analyse des souches de référence ATCC, les résultats montrent que *Escherichia coli* (ATCC 25922) a présenté une résistance à la Ticarcilline ainsi qu'une sensibilité modérée à la Céfixime, indiquée par une zone d'inhibition de 18 mm.

De son côté, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) s'est révélé résistant à la Ticarcilline et à l'Oxacilline avec une zone d'inhibition de 6 mm, tout en étant sensible aux autres antibiotiques testés.

Quant à *Enterococcus faecalis*, il a été sensible à la Nétilmicine et à la Kanamycine, avec des zones d'inhibition de 24 mm et 20 mm respectivement, mais il a résisté à la Ticarcilline et à la Céfixime. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) s'avère sensible de façon intermédiaire contre Aztréonam avec un diamètre de 30mm.

La souche de *Klebsiella pneumoniae* a manifesté une sensibilité à la Cefixime, à la Pénicilline et à l'Imipénème avec des zones d'inhibition de 17 mm et 21 mm respectivement, tout en développant une résistance à la Fosfomycine et au Céfotaxime.

D'autre part, *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) a révélé une sensibilité de niveau intermédiaire face à la Kanamycine avec un diamètre de 15 mm, mais s'est avéré résistant aux autres antibiotiques testés.

Concernant *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), elle a affiché une sensibilité à l'imipénème et au céfotaxime avec un diamètre de 16 mm et 19 mm respectivement, en dépit d'une résistance à la Fosfomycine et au Céfotaxime.

Bacillus subtilis a indiqué une sensibilité intermédiaire à l'Imipénème et à la Kanamycine par une zone d'inhibition de 11 mm et 14 mm respectivement, ainsi qu'une résistance au Céfotaxime et à la combinaison Ticarcilline avec l'acide clavulanique.

D'après les résultats des zones d'inhibition obtenus et à la comparaison des effets des antibiotiques sur les souches de référence ATCC et les souches cliniques, il a été observé que les souches cliniques présentent des zones d'inhibition plus marquées que les souches de référence ATCC.

De plus, les bactéries Gram positif se sont montrées plus sensibles que les bactéries Gram négatif.

III.3.2. Méthode d'aromatogramme

L'analyse de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été effectuée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Cette approche qualitative se fonde sur la détermination des diamètres de la zone d'arrêt de croissance des bactéries, mesurés en millimètres, autour des disques saturés avec les huiles essentielles testées. Cette technique a facilité la détection et la quantification de l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle contre douze souches bactériennes spécifiques. Les résultats des mesures sont compilés et exposés dans le tableau III.5.

Selon MEENA et SETHI., (1994) et JEOVETZ et *al.*, (2000), l'huile essentielle est considérée respectivement comme une huile sans action inhibitrice (-), une huile à action inhibitrice intermédiaire (+), une huile à action inhibitrice importante (++) ou une huile à action

inhibitrice très efficace (+++), en ayant un diamètre $\varnothing < 10\text{mm}$, $10\text{mm} \leq \varnothing < 16\text{mm}$, $16\text{mm} \leq \varnothing < 25\text{mm}$ ou $\varnothing \geq 25\text{mm}$.

Tableau III.5: Inhibition de la croissance bactérienne par la méthode d'aromatogramme

	Souches ATCC	Zone d'inhibition	Sensibilité	Souches cliniques	Zone d'inhibition	Sensibilité
Bactéries Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 2035	9mm±0	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	9,33 mm ±1,25	+
	<i>Bacillus Subtilis</i> ATCC 9372	18,67 mm ±2,08	++	<i>Bacillus Subtilis</i>	9,3 mm ±1,70	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9 mm ±1,63	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5 mm ±1,08	-
Bactéries Gram-	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	8,67 mm ±1,70	-	<i>Escherichia coli</i>	6,5 mm ±0	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	7,33 mm ±0,47	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,83 mm ±0,76	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6,83 mm ±0,24	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,5 mm ±0	-

Les résultats de l'activité antimicrobienne reportés dans le Tableau ci-dessus montrent que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* étudiée est active vis-à-vis des bactéries Gram (+): *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* clinique et *Enterococcus faecalis* clinique. Les autres bactéries Gram (-) et Gram (+) se sont montrées résistantes.

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* démontre une capacité d'inhibition significative à l'encontre de *Bacillus subtilis* ATCC 9372, se révélant plus efficace comparativement à d'autres souches bactériennes, avec une zone d'inhibition mesurée à $18,67 \pm 2,08$ mm.

Les bactéries Gram positif *Bacillus subtilis* clinique et *Enterococcus faecalis* clinique, révèle une sensibilité intermédiaire avec des zones d'inhibition de $9,3 \text{ mm} \pm 1,70$ et $9,33 \text{ mm} \pm 1,25$ respectivement.

Staphylococcus aureus ATCC 6538 présente une sensibilité modérée avec une zone d'inhibition de $9 \text{ mm} \pm 1,63$. Cependant, la souche clinique de *Staphylococcus aureus* montre une résistance avec une zone d'inhibition plus réduite, soit de $7,5 \text{ mm} \pm 1,08$.

Concernant les souches de référence Gram négatif, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, elles se montrent résistantes avec des zones d'inhibition de $8,67 \text{ mm} \pm 1,70$, $7,33 \text{ mm} \pm 0,47$ et $6,83 \text{ mm} \pm 0,24$ respectivement.

De même, les souches cliniques de ces mêmes bactéries Gram négatif affirment également leur résistance, avec pour *Escherichia coli* ATCC 25922 une zone d'inhibition de $6,5 \text{ mm} \pm 0$, pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 une zone de $6,83 \text{ mm} \pm 0,67$ et pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 une zone de $6,5 \text{ mm} \pm 0$.

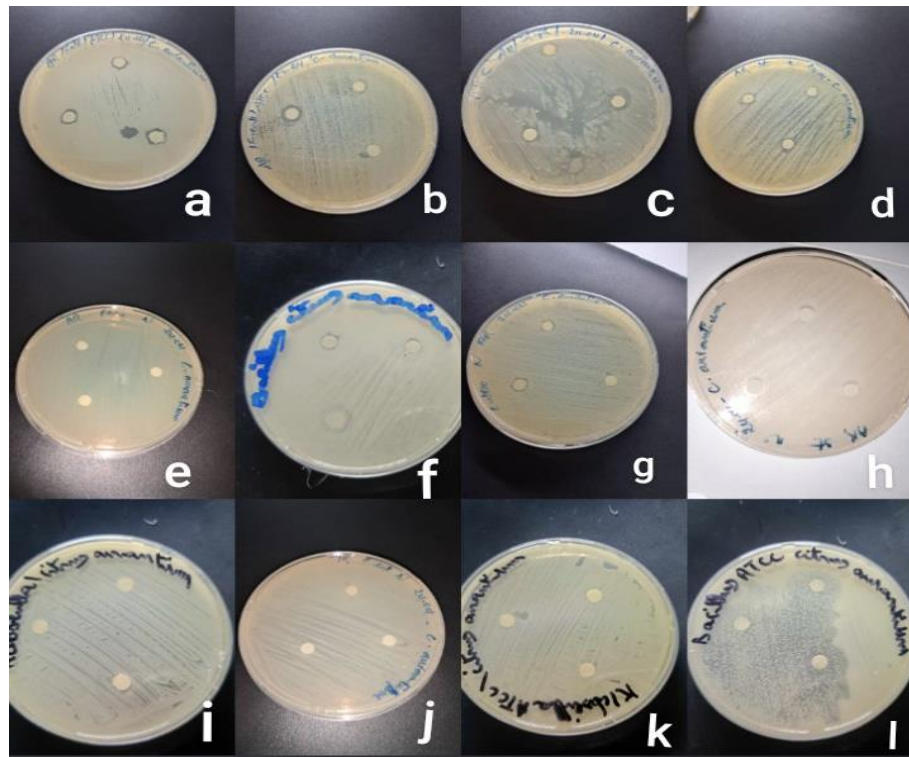


Figure.III.7 : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (Originale, 2024)

a : *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) ; **b :** *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; **c :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) ; **d :** *Escherichia coli* ; **e :** *Pseudomonas aeruginosa* ; **f :** *Bacillus subtilis* ; **g :** *Enterococcus faecalis* ; **h :** *Staphylococcus aureus* ; **i :** *Klebsiella pneumoniae* ; **j :** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; **k :** *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) ; **l :** *Bacillus subtilis* (ATCC 9372)

Les résultats de l'aromatogramme indiquent que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* n'a pas révélé d'activité antibactérienne contre toutes les souches testées à l'exception d'*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) (Figure.III.7).

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles est étroitement associée à leur composition chimique. Selon les recherches de TENEVA et *al.*, (2019), il a été mis en évidence une forte présence de limonène et d' α -pinène, des hydrocarbures monoterpéniques, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

En générale, des observations similaires aux nôtres ont été rapportées par divers auteurs internationaux, bien que les parties de la plante utilisées puissent différer.

Les travaux de BENNADJA et *al.*, (2019) ont consisté en la récolte de feuilles fraîches de *Citrus aurantium* à Annaba, dans l'est de l'Algérie, Il est ressorti de cette analyse que l'extrait était essentiellement constitué de linalool, représentant 44,52 % de sa composition. Leur recherche a aussi démontré l'efficacité de cette extraction dans la lutte contre des bactéries communes en contexte clinique. Aussi il a étudié l'activité antimicrobienne de la même espèce. Pour ce faire, ils ont utilisé un milieu de culture de Muller Hinton, en appliquant un disque de 6 mm avec une dose de 10 μ l. Ils ont observé une résistance d'*Escherichia coli* (ATCC 25922).

Selon l'étude menée par SALMA et *al.*, (2016) au Maroc sur l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des fleurs d'oranger amer, il a été révélé que cette huile, provenant de *Citrus aurantium*, contient principalement du limonène, du linalol, du γ -élémen et de l' α -terpinéol. Tout en explorant son activité antimicrobienne, ils ont observé une sensibilité moyenne contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition significatives, démontrant ainsi l'efficacité potentielle de cette huile dans le domaine antimicrobien.

D'après OUEDRHIRI et *al.*, (2015), l'huile essentielle obtenue à partir du zeste de *Citrus aurantium* par hydrodistillation au Maroc pourrait avoir une activité antibactérienne qui est due à ses principaux composants. Ils ont constaté que le linalyle, avec sa fonction d'ester, ainsi que le β -linalool et l' α -terpinéol, avec leurs fonctions alcooliques, sont parmi ces composants clés.

Les recherches conduites par ENIS et *al.*, (2019) en Tunisie étudiant les propriétés de l'huile essentielle des écorces de *Citrus aurantium* extraite par hydrodistillation, ont enregistré une résistance contre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), par un diamètre d'inhibition de 7mm.

III.3.3. Méthode de micro-atmosphère

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été effectuée en utilisant la technique de la micro-atmosphère, basée sur la mesure de l'inhibition de la croissance bactérienne par les

composants volatils de l'huile essentielle à une température d'incubation spécifique. Les résultats correspondants sont indiqués dans le Tableau III.6.

Tableau III.6 : Inhibition de la croissance bactérienne par la méthode de micro-atmosphère avec 50 µl de l'huile essentielle étudiée

	Souches ATCC	Zone d'inhibition (mm)	Sensibilité	Souches cliniques	Zone d'inhibition (mm)	Sensibilité
Bactéries Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 2035	0	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	-
	<i>Bacillus Subtilis</i> ATCC 9372	0	-	<i>Bacillus Subtilis</i>	11,67±0,67	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	-
Bactéries Gram-	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0	-	<i>Escherichia coli</i>	0	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	0	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,67±1,61	++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	-

Les résultats obtenus par la méthode de micro-atmosphère, en utilisant un volume de 10 µl d'huile essentielle de *Citrus aurantium*, ont dévoilé la résistance de toutes les souches bactériennes testées (Figure.III.8).

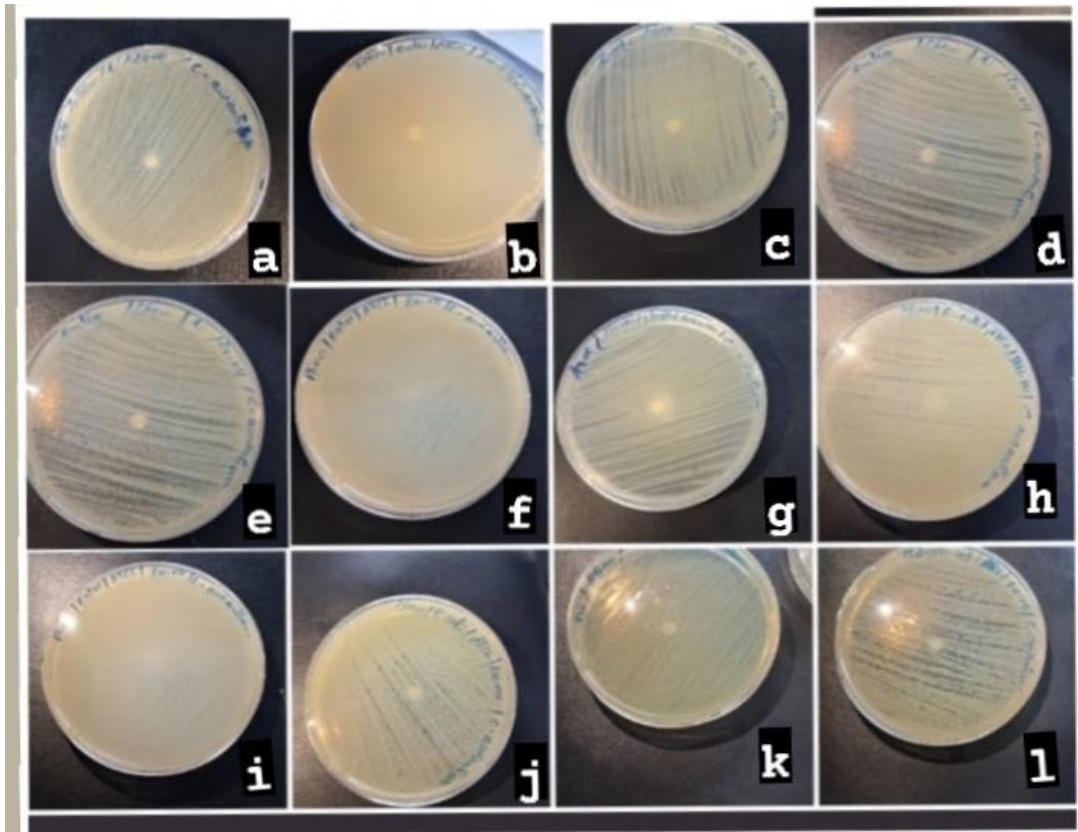


Figure.III.8 : Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère avec un volume 10 μ l de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (Originale, 2024)

a : *Enterococcus faecalis* ATCC 2035 , **b :** *Escherichia coli* ATCC 25922 , **c :** *Pseudomonas aeruginosa* , **d :** *Staphylococcus aureus* , **e ;** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352
f : *Bacillus subtilis* , **g :** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 , **h :** *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
i : *Bacillus Subtilis* ATCC 9372 **j :** *Klebsiella pneumoniae* **k :** *Enterococcus faecalis* **L :** *Escherichia coli*

L'utilisation de 50 μ l d'huile essentielle de *Citrus aurantium* dans le cadre de la méthode de micro-atmosphère a permis de constater l'absence d'une action inhibitrice sur la croissance de la plupart des souches bactériennes étudiées, à l'exception des souches *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis* qui se sont révélées sensibles à l'huile (Figure.III.9)

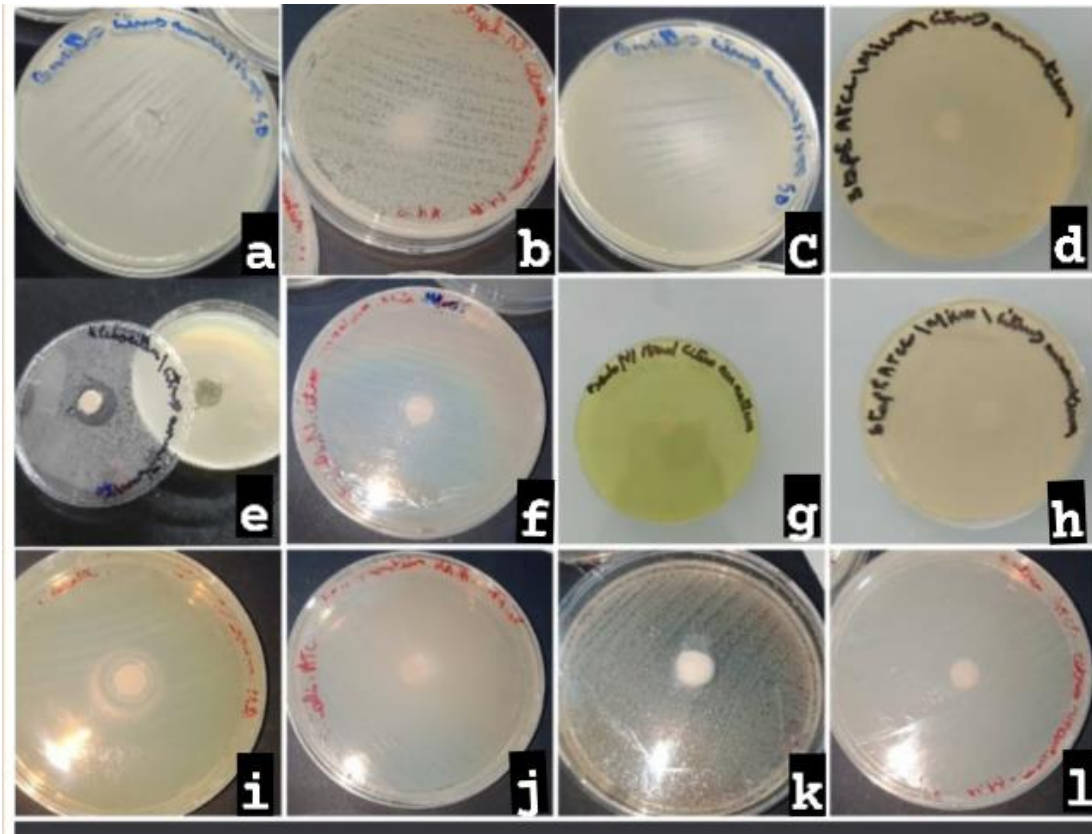


Figure.III.9 : Résultats de micro-atmosphère avec un volume 50 μ l de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (Originale, 2024)

a ; *Enterococcus faecalis*, **b** : *Escherichia coli* ATCC 25922 , **c** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 , **d** : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 , **e** : *Klebsiella pneumoniae*, **f** : *Bacillus subtilis* ATCC 9372 , **g** : *Pseudomonas aeruginosa*, **h** : *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 **i** : *Bacillus Subtilis* **j** ; *Staphylococcus aureus* **k** : *Enterococcus faecails* ATCC 2035 **L** : *Escherichia coli*

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* a démontré une efficacité, en particulier contre la bactérie Gram négatif *Klebsiella pneumoniae*, montrant une sensibilité caractérisée par une zone d'inhibition mesurant $12,67\text{mm} \pm 1,61$. Quant à la souche Gram positif, *Bacillus subtilis*, une sensibilité a été observée avec un diamètre de zone d'inhibition de $11,67\text{mm} \pm 0,67$.

L'activité antibactérienne en phase vapeur de l'huile essentielle de *Citrus* dépend de ses composés chimiques. Selon KENGNE et al. (2019), elle est due à la présence de monoterpènes oxygénés ainsi qu'à celle d'aldéhydes, de phénols, d'alcools et de cétones.

À nos connaissances, il n'y a aucun travail publié sur les effets antibactériens de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* par la méthode de micro-atmosphère, cependant, il y a quelques travaux sur ses effets antifongiques.

Selon l'étude réalisée par AL-NASER et *al.*, 2019 en Syrie, l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, connue aussi sous le nom d'oranger amer, a montré une activité antifongique significative contre cinq espèces de champignons: *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, et *Sclerotium cepivorum*. L'efficacité inhibitrice observée pourrait être attribuée aux composants chimiques de l'huile, tels que le linalol, l'oxyde de caryophyllène, l'alpha-pinène et l'alpha-terpinéol, qui font partie des monoterpènes.

D'après l'étude menée par ANWAR et *al.*, 2016 en Tunisie, l'huile essentielle obtenue par distillation à la vapeur des fleurs d'oranger amer a démontré des propriétés antifongiques. Cette efficacité a été mesurée par la zone d'inhibition de croissance (ZIC) en présence de diverses espèces de champignons. Cette huile essentielle a prouvé sa capacité à inhiber la croissance de différents *Aspergillus*, notamment, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus fumigatus*, ainsi que de plusieurs espèces de *Fusarium*, telles que *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium culmorum*. Les composés limonène et (E)-nérolidol ont été particulièrement identifiés comme responsables des activités antifongiques de l'huile essentielle.

Selon les recherches menées par MAKHLOUF et *al.*, en 2022 en Algérie, l'huile essentielle extraite des feuilles de *Citrus aurantium* possède un effet antifongique inhibiteur accentué, ce qui pourrait être dû à une teneur haute en terpénoïdes comme le limonène. En complément, l'étude réalisée par JING et *al.*, en (2014) a révélé l'efficacité de certaines molécules, notamment le limonène, l'octanal, le citral, l' α -terpinéol, le néral, le géraniol et le β -myrcène, dans la lutte contre une vaste gamme de pathogènes.

III.3.3.1. Comparaison de la sensibilité des souches

Les résultats obtenus démontrent que quatre bactéries se sont révélées sensibles à l'huile essentielle, à savoir : *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* clinique et *Enterococcus faecalis* clinique. La micro-atmosphère a révélé que deux bactéries : *Bacillus Subtilis* et *Klebsiella pneumoniae* présentaient une sensibilité

particulièrement élevée, ce qui suggère que cette méthode est plus efficace que celle de la micro-atmosphère.

De plus, il a été observé que *Bacillus subtilis* clinique et *Bacillus subtilis* ATCC 9372 présentent une sensibilité importante.

Il est largement admis que l'antibiogramme représente la technique la plus fiable pour identifier la résistance antibiotique et définir les traitements les plus adaptés face aux infections bactériennes.

Quant à l'aromatogramme, malgré son intérêt dans l'évaluation de l'efficacité des huiles essentielles contre les agents pathogènes et les champignons, il ne bénéficie pas de la même reconnaissance en termes de validation et de standardisation que l'antibiogramme. Cette méthode est davantage employée pour explorer les alternatives naturelles face à la résistance aux antibiotiques, notamment contre les bactéries réfractaires.

L'analyse réalisée par YALA et *al.*, (2016) présente des conclusions différentes des nôtres. En examinant cinq huiles essentielles et en les comparant aux antibiotiques (ATB), ils ont constaté que ces huiles essentielles offraient des diamètres d'inhibition plus importants.

L'efficacité de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* dans l'activité antimicrobienne peut varier selon le mode d'application, notamment la diffusion par l'air ou le contact direct. Cependant, il est généralement admis que le contact direct peut être plus efficace pour une action antimicrobienne ciblée. Cela s'explique par le fait que le contact direct assure une concentration plus élevée de l'huile essentielle sur les micro-organismes cibles, augmentant ainsi les chances d'inhiber ou de tuer ces agents pathogènes.

III.4. Activité antioxydante

Dans cette étude, nous avons analysé l'effet antiradicalaire de l'huile essentielle issue de *Citrus aurantium* en utilisant deux méthodes : la méthode de capture des radicaux libres DPPH et la méthode de FRAP, tout en comparant son pouvoir antioxydant à celui de l'acide ascorbique et du BHT, qui sont des antioxydants standards.

III.4.1. Pouvoir anti-radicalaire par la méthode DPPH

L'analyse de l'absorbance s'est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm. À partir de ces données, nous avons pu calculer les pourcentages d'inhibition. Ces pourcentages ont ensuite servi à établir les graphiques qui représentent la variation du

pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations (Figure III.10, III.11, III.12). Les détails des mesures d'absorbance sont fournis dans l'Annexe 07.

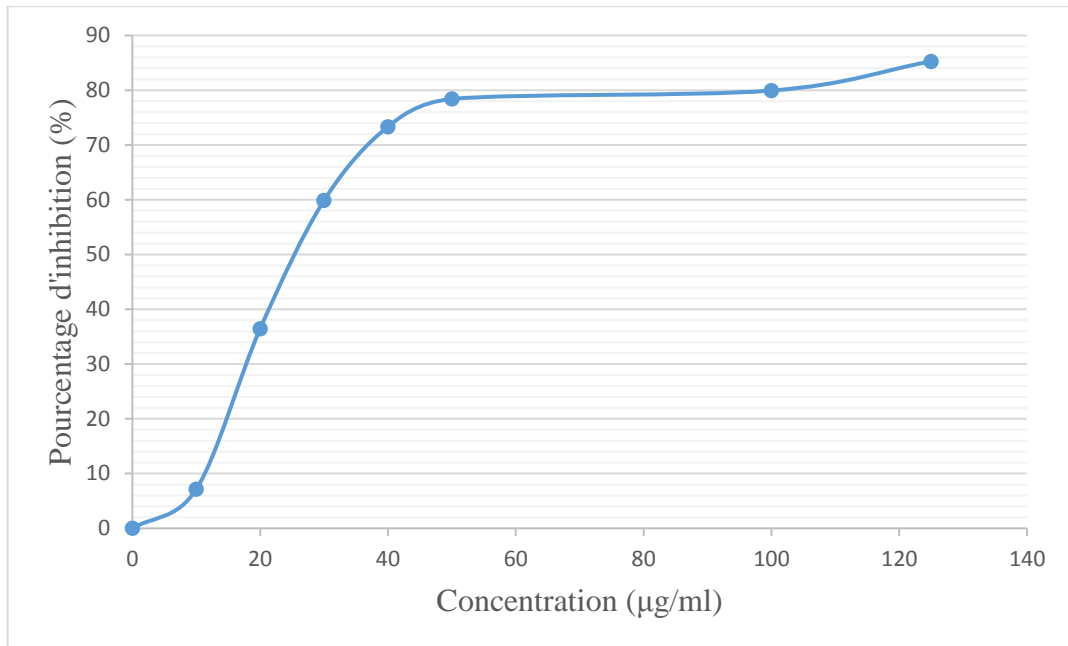


Figure III.10 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*.

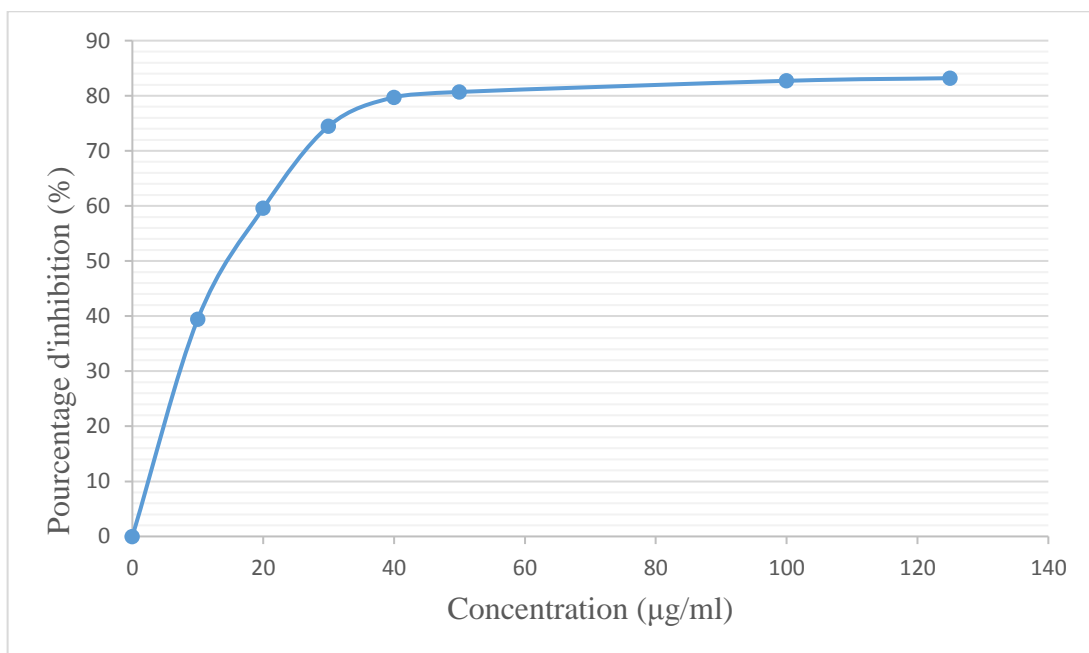


Figure III.11 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique

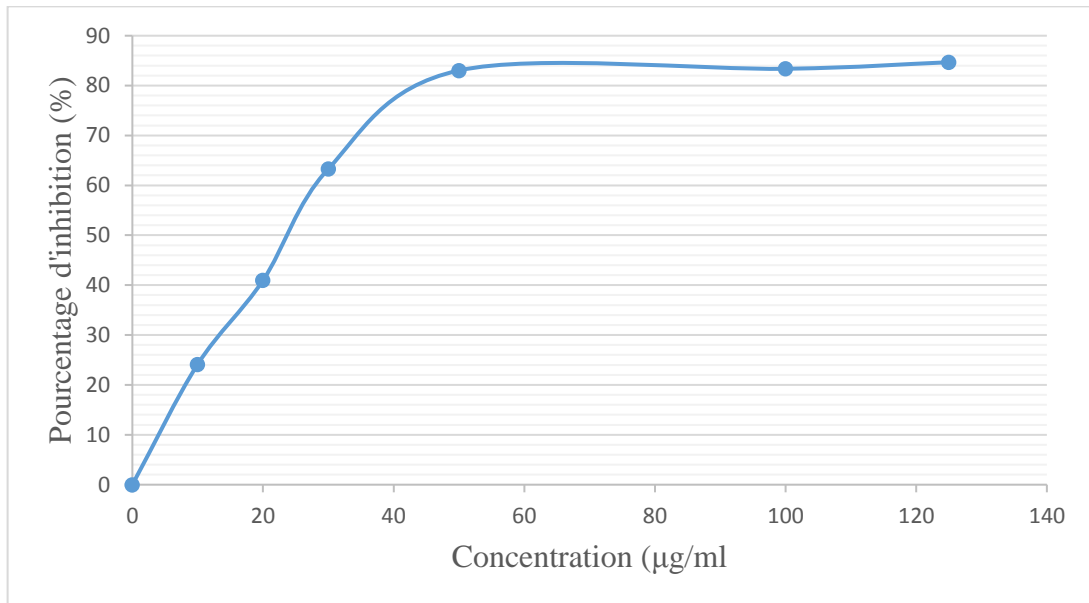


Figure III.12 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration du BHT

Les données révèlent que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente proportionnellement avec la concentration de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, de même pour l'acide ascorbique et le BHT.

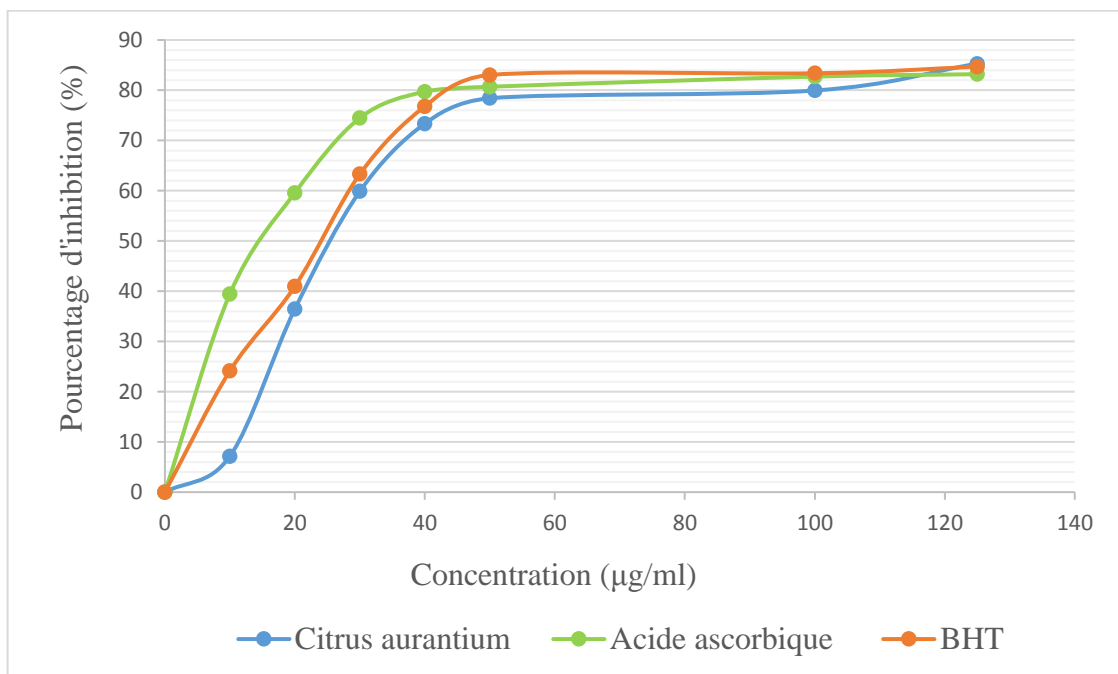


Figure III.13 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du DPPH en fonction de la concentration de *Citrus aurantium* et l'acide ascorbique et BHT

Il est à noter que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a atteint sa plus haute capacité d'inhibition à une concentration de 125 µg/ml, avec un taux d'inhibition de 85,27%, alors qu'une activité de 7,15% a été observée pour une concentration de 10 µg/ml.

Quant à l'acide ascorbique, son activité inhibitrice à hauteur de 39,45%, correspond à une concentration de 10 µg/ml et son efficacité atteignant 80,69%, est à 50 µg/ml.

Pour le BHT, le niveau d'inhibition commence à se stabiliser à 83,03% à 50 µg/ml, tandis qu'il est de 24,13% pour une concentration de 10 µg/ml.

Initialement, l'acide ascorbique se distingue par sa supériorité en terme d'efficacité antioxydante, ensuite le BHT, suivi de près par l'huile essentielle de *Citrus aurantium*. Cependant, les observations finales révèlent que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* se hisse en tête en matière de potentiel antiradicalaire, précédant ainsi le BHT et l'acide ascorbique avec des pourcentages antiradicalaires respectifs de 85,2734%, 84,68% et 83,19% pour la même concentration de 125 µg/ml.

L'efficacité antioxydante de l'huile de *Citrus aurantium* est fortement liée à sa composition chimique. D'après les travaux de HSOUNA et *al.*, (2013), c'est surtout la présence de monoterpènes oxygénés qui joue un rôle crucial dans cette propriété. Parmi ces composés, le thymol et le carvacrol, deux phénols bien connus, sont les principaux contributeurs à l'activité antioxydante des huiles essentielles qui les contiennent.

III.4.1.1. Mesure des CE50

La valeur CE50 mesure la capacité antioxydante d'une substance, indiquant la quantité nécessaire pour baisser de 50% la concentration d'un radical libre. Une valeur CE50 faible reflète une forte activité antioxydante du composé (Ismailiet *al.*, 2017). Les résultats des calculs des CE50 sont présentés dans le tableau III.7.

Tableau III.7 : CE50 de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, du BHT et de l'acide ascorbique.

Substrat	CE50 (µg /ml)
Huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	25,83
BHT	24,04
Acide ascorbique	15,23

Les données recueillies révèlent que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* est capable de neutraliser le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) en le convertissant en une diphenyl-picrylhydrazine jaune, affichant une valeur CE50 de 25,83 µg/ml. En comparaison, l'acide ascorbique présente une valeur CE50 de 15,23 µg/ml, et celle du BHT est de 24,04 µg/ml.

Ces observations indiquent que, bien que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* et le BHT démontrent une capacité antioxydante, leur efficacité est inférieure à celle de l'acide ascorbique. De plus, la valeur CE50 de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* se trouve être très proche de celle observée pour le BHT.

L'efficacité de cette activité dépend de la capacité de l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle des composants phénoliques de l'huile essentielle à se déplacer. Quand un radical libre DPPH est présent, l'atome d'hydrogène lui est transmis, transformant ainsi le radical libre en une molécule DPPH stable. Cela entraîne une réduction de la concentration du radical libre ainsi qu'une baisse de l'absorbance pendant la durée de la réaction, jusqu'à ce que la capacité de l'antioxydant à céder de l'hydrogène soit épuisée (Villano et al., 2007).

L'analyse conduite par GHASEMI et al., (2009), étudiant l'activité antioxydante sur les écorces de *Citrus aurantium* en Iran, a révélé une valeur de CE50 estimée à 1,9 mg/ml.

L'étude réalisée par HSOUNA et al., (2013), qui ont exploré l'activité antioxydante de l'huile essentielle issue des fleurs de *Citrus aurantium* en Tunisie, et mesuré par les méthodes de radical libre DPPH et ABTS, a révélé une valeur de CE50 de 1,85 µg/ml.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, obtenue à partir des feuilles par hydrodistillation, a été évaluée par MAJNOONI et al., (2012). Les échantillons ont été collectés dans le sud de l'Iran. L'huile essentielle a montré un effet anti-radicaux DPPH, avec une CE50 de 0,9 µg/ml.

Selon les recherches de AIT-MIMOUNE et al., (2022), sur l'huile essentielle de *Citrus aurantium* étudiant l'activité antioxydante, il se trouve que l'acide ascorbique a manifesté une activité antioxydante remarquable, avec une valeur CE50 de 15 µg/ml. Parallèlement, l'huile essentielle étudiée a également montré des propriétés antioxydantes. En se focalisant sur les valeurs CE50, ils ont découvert que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* surpassait les autres

composés en efficacité dans la neutralisation des radicaux DPPH, avec un CE50 de 77,6 µg/ml. Cette efficacité antioxydante attribuée aux extraits végétaux est en grande partie due à leur composition chimique.

III.4.2. Pouvoir de réduction du fer : FRAP

L'évaluation du pouvoir réducteur illustre la faculté d'une molécule à transformer un oxydant (le fer ferrique Fe^{3+}) en sa forme réduite, le fer ferreux Fe^{2+} , par donation d'un électron.

Les capacités réductrices de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* ainsi que de l'acide ascorbique et du BHT ont été évaluées par spectrophotométrie à 700 nm. Il est à noter que toute hausse de l'absorbance indique une amélioration du pouvoir réducteur.

Ces absorbances ont par la suite été utilisées pour construire des graphiques illustrant l'absorbance en fonction de diverses concentrations (Figure III.14, Figure III.15, Figure III.16). Les informations détaillées concernant les mesures d'absorbance se trouvent dans l'Annexe 10.

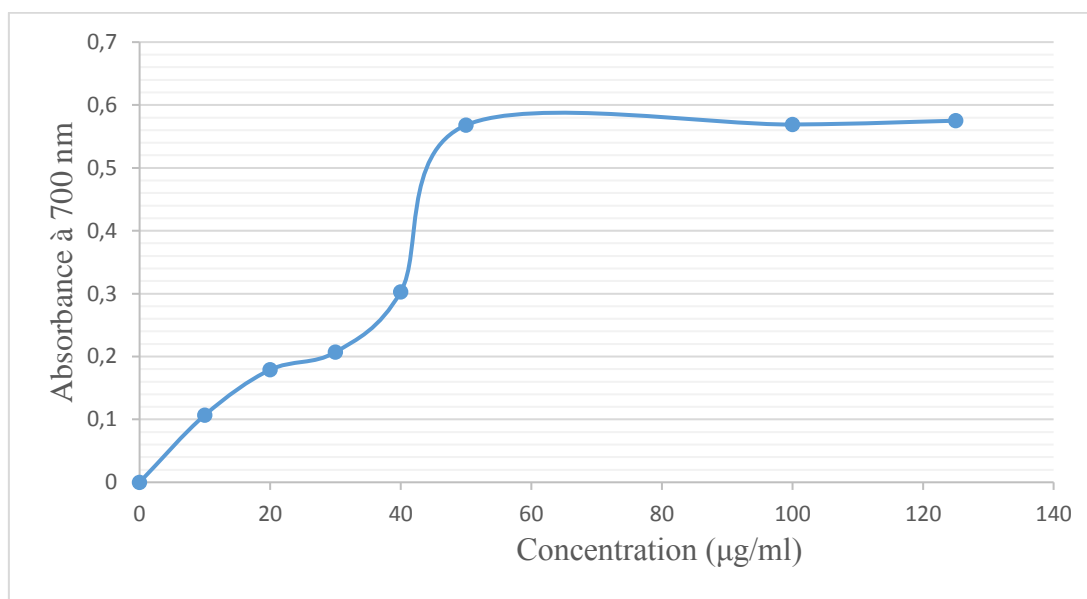


Figure.III.14 : Pouvoir réducteur de fer par l'huile essentielle de *Citrus aurantium*

Il a été constaté que l'effet réducteur de fer par l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a atteint son pic à une concentration de 125 µg/ml, affichant une absorbance de 0,575, alors qu'une activité réduite est observée avec une absorbance de 0,11 à 10 µg/ml.

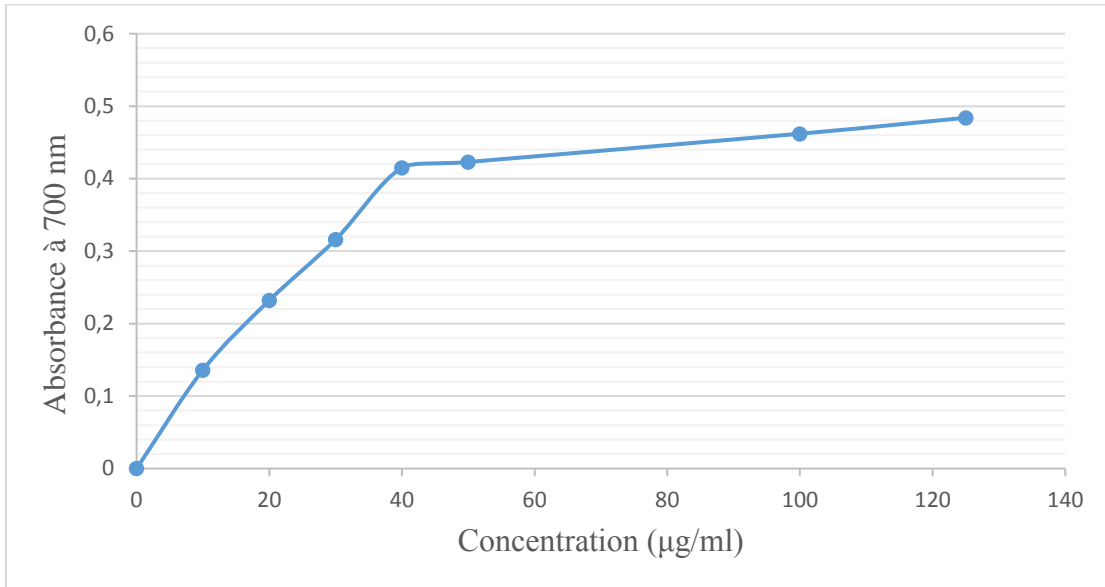


Figure.III.15 : Pouvoir réducteur du fer par le BHT

Dans le cas du BHT, l'activité réductrice maximale du fer est notée à la concentration de 125 µg/ml avec une absorbance de 0,484, tandis qu'à une concentration plus faible de 10 µg/ml, l'activité diminue, reflétée par une absorbance de 0,136.

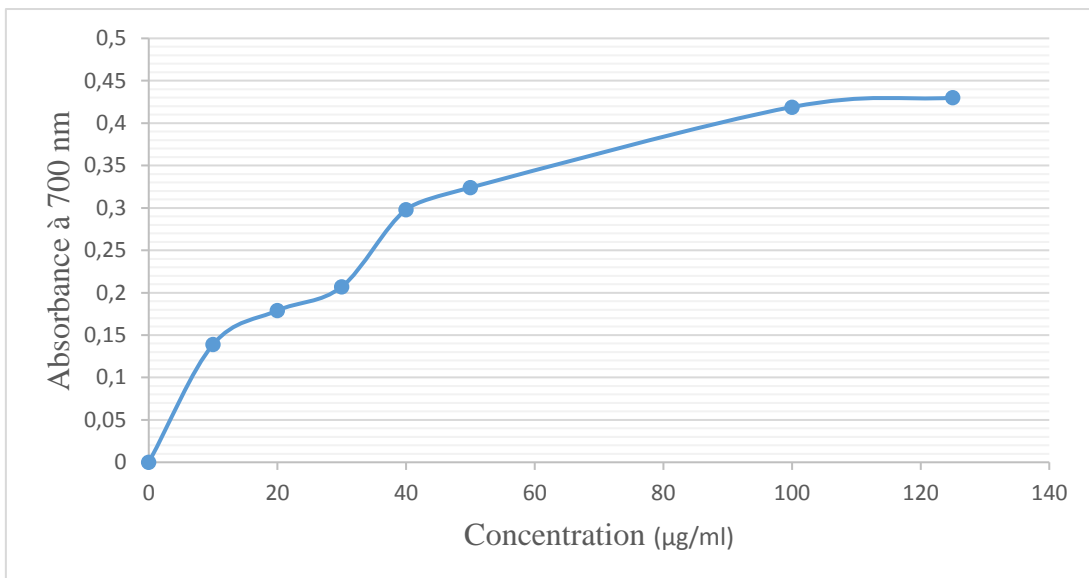


Figure.III.16 : Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique

Pour l'acide ascorbique, nous notons une absorbance maximale de 0,430 indiquant l'effet réducteur le plus fort du fer à 125 $\mu\text{g/ml}$. À une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$, une activité minimale est enregistrée avec une absorbance de 0,139.

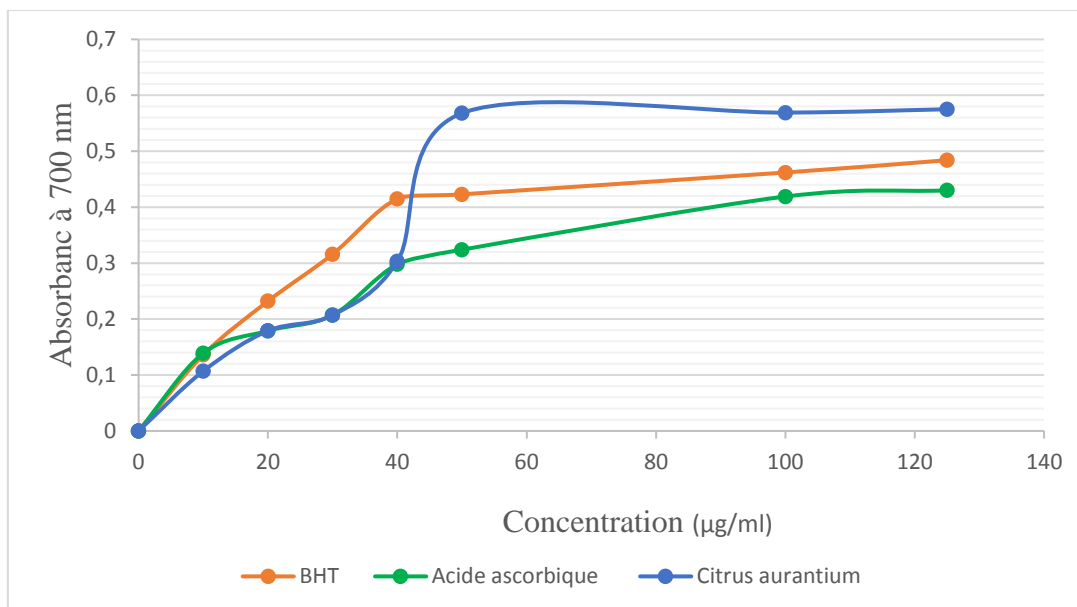


Figure.III.17 : Pouvoir réducteur de fer par l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, le BHT et l'acide ascorbique

Lors de l'évaluation du potentiel réducteur de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus aurantium* en comparaison avec le BHT et l'acide ascorbique, à une concentration de 125 $\mu\text{g/ml}$, il a été constaté que l'huile essentielle démontrait une capacité de réduction du fer supérieure, estimée à 0,575.

Ces données révèlent que, dans la méthode FRAP, l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* est supérieure à celle du BHT et de l'acide ascorbique, ces derniers se classant respectivement après.

Il est à noter qu'à l'échelle internationale, des conclusions concordant avec les nôtres ont été identifiées par différentes recherches.

La capacité antioxydante de l'huile de *Citrus aurantium* est intrinsèquement liée à sa composition chimique. Selon les recherches réalisées par SARROU et *al.*, en (2014), la présence du composé limonène est déterminante et joue un rôle crucial dans cette propriété.

L'étude menée par EL OIKEH en 2014 sur l'extrait des graines de *Citrus sinensis* originaire de la région de Bénin (Nigeria) a mis en évidence un pouvoir antioxydant, quantifiée via la méthode FRAP.

D'après l'étude menée par LAGHA et *al.*, (2013) sur les écorces de *Citrus aurantium* en Algérie, il a été constaté que le pouvoir réducteur est fortement corrélé au contenu total en phénols dans les écorces de *Citrus aurantium*, avec une absorbance présentant un coefficient de corrélation de 0,81.

L'étude menée par FARAHMANDFAR et *al.*, (2020) sur les propriétés antioxydantes des écorces de *Citrus aurantium* en Iran, évaluée par la méthode FRAP, a révélé une efficacité remarquable.

III.4.2.1. Mesure des CE50

La valeur CE50 de FRAP mesure la concentration nécessaire pour réduire de 50% l'activité réductrice du fer. Une CE50 basse indique une forte capacité antioxydante. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le tableau III.8.

Tableau III.8 : CE50 de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, du BHT et de l'acide ascorbique.

Substrat	CE50 (µg/ml)
Huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	35,59
Acide ascorbique	42,31
BHT	28,57

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* possède une capacité de réduction de fer, avec une valeur CE50 s'établissant à 35,59 µg/ml. À titre de comparaison, l'acide ascorbique a une valeur CE50 de 42,30 µg/ml, tandis que le BHT affiche une valeur CE50 de 28,57 µg/ml.

Ces constatations révèlent que bien que l'acide ascorbique et le BHT affichent une capacité à réduire le fer, ils se montrent plus efficaces que l'huile essentielle de *Citrus aurantium*.

Les courbes des graphiques (Figure III.18, III.19, III.20) montrent le changement du pourcentage de réduction du fer en fonction de différentes concentrations. Des informations détaillées sur ces mesures sont disponibles dans l'Annexe 10.

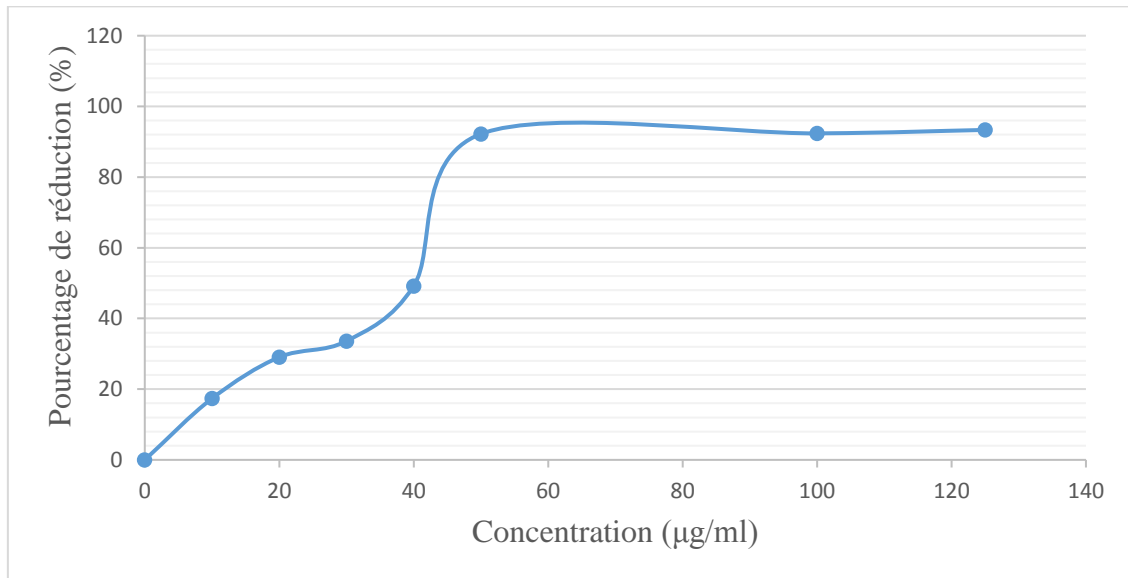


Figure.III.18. Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de *Citrus aurantium*

Il a été observé que l'activité réductrice de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* sur le fer est maximale à une concentration de 125 µg/ml, avec un taux de réduction de 93,34%. En revanche, à une concentration plus faible de 10 µg/ml, le taux de réduction observé diminue significativement, atteignant seulement 37,37%.

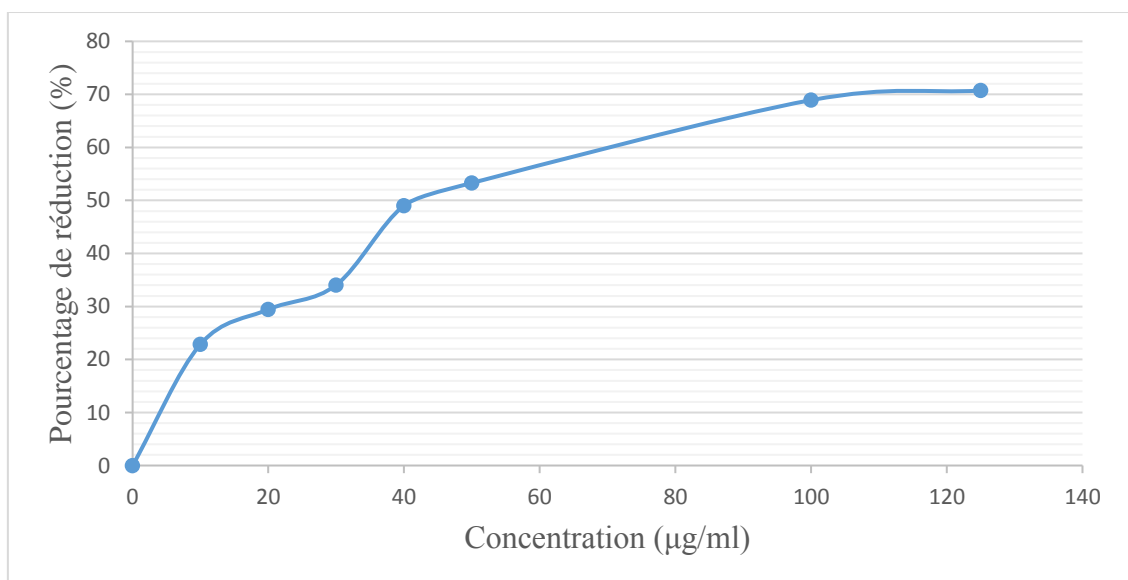


Figure.III.19. Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

Concernant l'acide ascorbique, un pourcentage maximal de 70,72% illustre le pouvoir le plus intense de réduction du fer à une concentration de 125 µg/ml, à 10 µg/ml, le pourcentage observé est de 22,86 %, indiquant une capacité de réduction plus modeste.

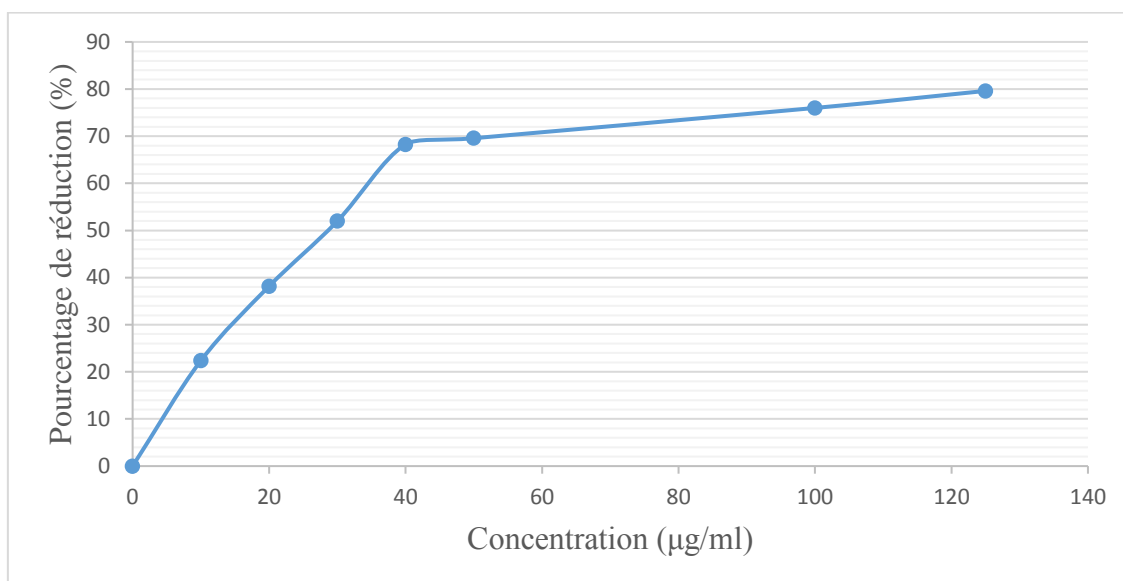


Figure.III.20. Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations du BHT

Pour le BHT, l'efficacité maximale dans la réduction du fer est observée à une concentration de 125 µg/ml, où elle atteint un pourcentage de 79,60%. Lorsque la concentration est réduite à 10 µg/ml, cette efficacité chute, avec un pourcentage de 22,36%.

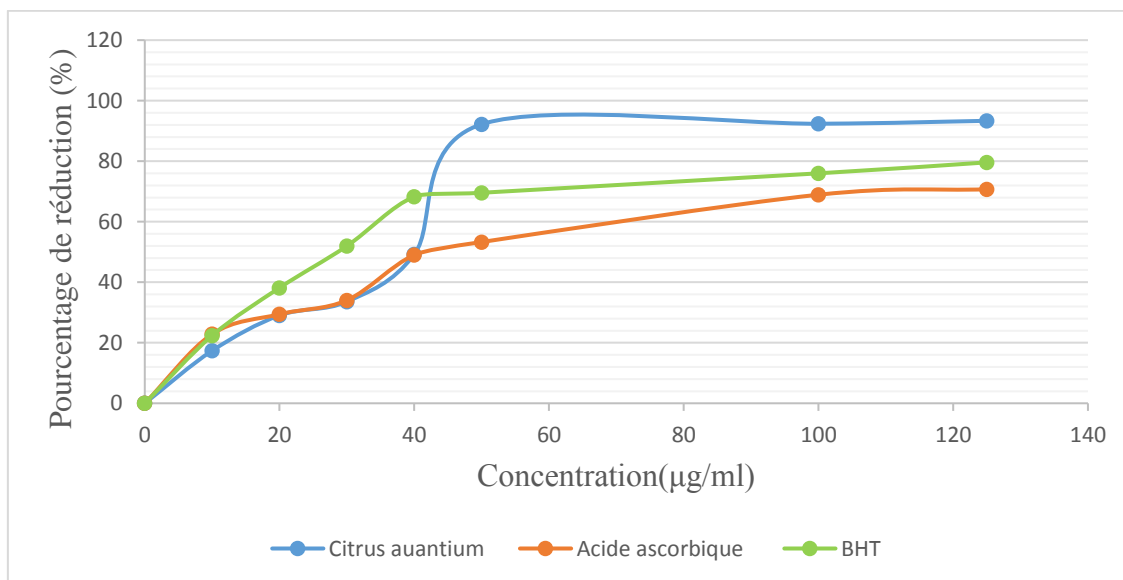


Figure.III.21. Pourcentage de réduction de fer en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de *Citrus aurantium*, de l'acide ascorbique et du BHT

Dans l'étude comparative des capacités réductrices du fer entre l'huile essentielle obtenue des écorces de *Citrus aurantium*, le BHT, et l'acide ascorbique à une concentration identique de 125 µg/ml, il a été observé que l'huile essentielle présente une supériorité notable,

avec un pourcentage impressionnant de 93,34%, contre 79,60% pour le BHT et 70,72% pour l'acide ascorbique.

III.3.2.2. Comparaison de l'activité antioxydante par les méthodes de DPPH et FRAP

Deux techniques ont été utilisées pour mesurer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, en se basant principalement sur la capacité de capturer les radicaux libres ou de réduire le fer, l'analyse DPPH et l'analyse FRAP. Les issues de cette comparaison ont été illustrées dans le tableau III. 9 et la figure III.22.

Tableau III.9 : Résultats de la comparaison des valeurs des CE_{50} obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP

	CE_{50} du test de DPPH	CE_{50} du test de FRAP
Huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	25,83 μ g/ml	35,59 μ g/ml
Acide ascorbique	15,23 μ g/ml	42,30 μ g/ml
BHT	24,04 μ g/ml	28,57 μ g/ml

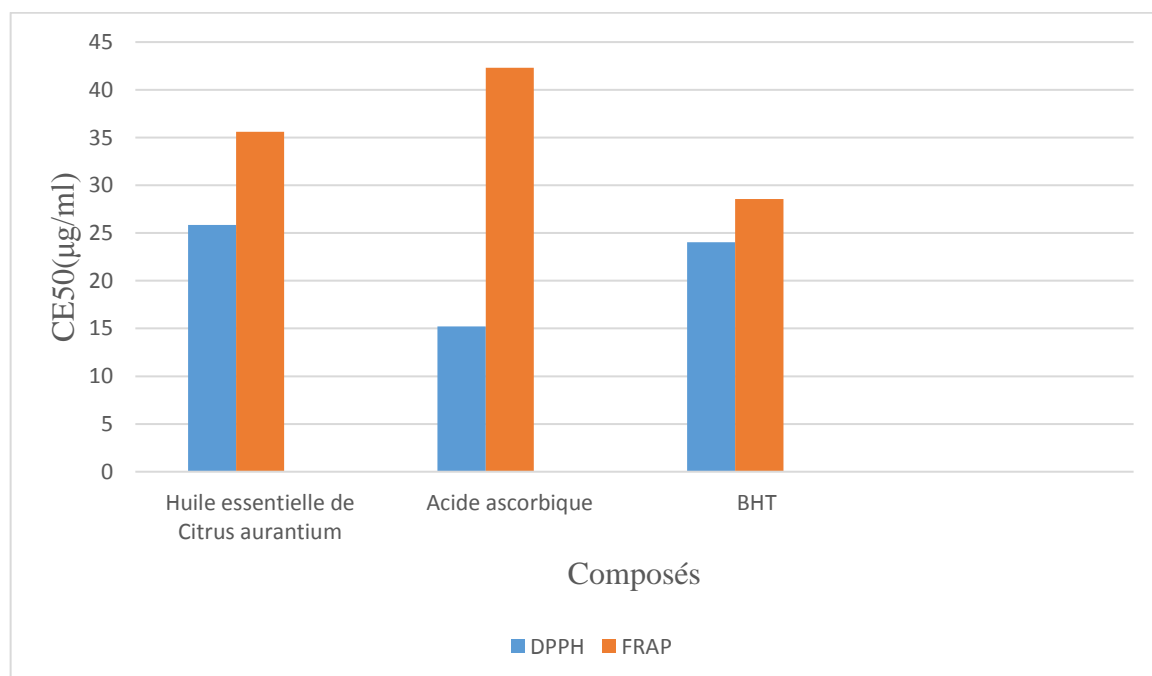


Figure III.22: Résultats de la comparaison des valeurs de CE_{50} obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP

Nous avons découvert que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* exerce une activité inhibitrice de DPPH plus élevée que son activité réductrice de Fer.

Pour l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, la CE50 mesurée par la méthode DPPH est de 25,83 µg/ml, tandis que pour le même échantillon, la CE50 déterminée par la méthode FRAP est de 35,59µg/ml. Par ailleurs, pour l'acide ascorbique, la CE50 dans la méthode DPPH est de 15,23 µg/ml, alors que dans la méthode FRAP, elle est de 42,30 µg/ml. En ce qui concerne le BHT, les valeurs de CE50 sont relativement proches : 24,04 µg/ml pour le potentiel oxydant dans la méthode DPPH et 28,57 µg/ml pour le pouvoir réducteur de fer dans la méthode FRA

CONCLUSION

CONCLUSION

Le présent travail est consacré à l'extraction de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* récoltée de la région de Aïn Defla (Djelida), par la technique d'hydrodistillation, à l'étude analytique, à la caractérisation physicochimique et à l'évaluation de l'activité antibactérienne par plusieurs méthodes et l'évaluation de l'activité antioxydante par les méthodes de DPPH et de FRAP.

L'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau est une méthode simple et efficace. Le calcul du rendement moyen en huile essentielle de la plante étudiée nous a révélé une valeur importante de $1,24 \% \pm 0,20$.

L'étude organoleptique de l'huile essentielle des écorces montre que cette dernière est très aromatique, d'une couleur jaune pâle et d'une odeur fraîche.

Le contrôle physicochimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* met en évidence la qualité de cette huile. Elle se distingue par un pH acide (5,5) et une densité relative de 0.796.

L'analyse de la composition de l'huile par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a mis en évidence la présence de limonène en tant que composant prédominant, représentant 66,72 % de la composition totale, suivi du bêta-myrcène à hauteur de 7,25 % et de l'alpha-pinène constituant 2,31 % de l'huile.

L'étude de l'activité antibactérienne des antibiotiques vis-à-vis les douze germes pathogènes testés montre que toutes les souches présentent des zones d'inhibitions très importantes avec des diamètres variant entre 20 mm et 38 mm.

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de l'aromatogramme et celle de micro-atmosphère a permis de démontrer le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* contre douze souches bactériennes. Avec la méthode de l'aromatogramme, la majorité des souches ont montré une très faible sensibilité, à l'exception de *Bacillus subtilis* ATCC (9372) qui a présenté une sensibilité significative. Quant à la méthode de micro-atmosphère, aucun résultat n'a été observé pour toutes les souches à l'exception de *Klebsiella*

pneumoniae et *Bacillus subtilis*, qui ont montré une sensibilité avec un diamètre des zones d'inhibition de $12,67\text{mm} \pm 1,61$ et $11,67\text{mm} \pm 0,67$, respectivement.

En évaluant l'activité antioxydante via les méthodes DPPH et FRAP, il a été révélé que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* possède une notable capacité antioxydante. Cette capacité est quantifiée par la concentration efficace à 50% (CE50), qui est de $25,83 \mu\text{g/ml}$ pour l'huile essentielle. En parallèle, la CE50 du BHT est de $24,04 \mu\text{g/ml}$ et celle de l'acide ascorbique de $15,23 \mu\text{g/ml}$. Dans la méthode FRAP, la CE50 de l'échantillon analysé a atteint $35,59 \mu\text{g/ml}$, comparée à $28,57 \mu\text{g/ml}$ pour le BHT et $42,31 \mu\text{g/ml}$ pour l'acide ascorbique.

En perspectives, nous préconisons d'approfondir les études sur *Citrus aurantium* pour évaluer ses effets anti-inflammatoires et antivirales, en complément de son activité antimicrobienne déjà connue, ce qui offrirait une vision plus complète de ses applications thérapeutiques potentielles.

Références bibliographiques

- Aboughe, A.S., Aworet, S.R., et Eyele, M.M.,** «Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon», *Phytothérapie*, V.13, (2014), 283–287.
- Adjovi, Y.C.S., Fossou, P.J., Tahirou, A., et Ahehehinnou, H.U.,** «Evaluation de l'utilisation des huiles essentielles de six plantes aromatiques collectées au Bénin dans la lutte alternative contre les aflatoxins », (2022).
- Ait-Mimoune, N., Bouti, K., Benabdi, B., et Otmani, A.,** « Chemical Characterization and Biological Activities of *Citrus reticulata* and *Citrus aurantium* Essential Oils. *Journal of Environmental Treatment Techniques* », V.10(2), (2022), 182-186.
- Alili, D., Brahim, O., et Doumandji, A.,** « Obtention et caractérisation physicochimique et chromatographique de l'huile essentielle des graines de *Foeniculum vulgare* Mill.(Fenouil sauvage) ». *AGROBIOLOGIA*, V.12(1), (2022), 2850-2861.
- Aline, D.M.,** «Manuel de phytothérapie écoresponsable», (médecin), Edition Terre vivante, (2021).
- Al-Naser, Z., Al-Abrass, N., et Al-Masri, M.S.,** « Chemical Composition and Antifungal Activity of bitter orange (*Citrus aurantium* L.) essential oil against plants pathogenic fungi ». *JKAU: Sci*, V.32(1), (2019), 11-16.
- Amorati, R., Foti, M.C., et Valgimigli, L.** «Antioxidant activity of essential oils», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.61(46), (2013), 10835-10847.
- Anwar, S., Ahmed, N., Speciale, A., Cimino, F., et Saija, A.,** « Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* », (2016), 259-268. Academic Press.
- Atailia, I., et Djahoudi, A.,** « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *géranium rosat* (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie ». *Phytothérapie*, V.13(3),(2015), 156-162.
- Atere, T. G., Akinloye, O.A., Ugbaja, R.N., Ojo, D.A., et Dealtry, G.,** « In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costusafer* leaf. *Food Science and Human Wellness* », V.7(4) ,(2018), 266-272 .
- Attrassi, K.,** Antifungal activity of two essential oils against the rot of citrus fruit in Morocco. *Revue de l'entrepreneuriat et de l'innovation*, (2023), 5(20).

Azhdarzadeh, F., et Hojjati, M., « Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils ». *Nutrition and Food Sciences Research*, V.3(1), (2016), 43-50.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., et Idaomar, M., « Biological effects of essential oils – A review», *Food and Chemical Toxicology*, V.46(2), (2008), 446-475.

Bano, U., Khan, A.F., Mujeeb, F., Maurya, N., Tabassum, H., Siddiqui, M.H., et Farooqui, A., « Effect of plant growth regulators on essential oil yield in aromatic plants. *J. Chem. Pharm. Res* », V.8(7), (2016), 733-739.

Baudoux, D. (2017)., « Chapitre 6. Propriétés physiques des essences et HE. Dans : D. Baudoux, *Aromathérapie: 100 huiles essentielles* », 37-38. Paris: Dunod.

B'chir, F., et Arnaud, M.J., « Chemical profile and extraction yield of essential oils from peel of *Citrus limon*, *Citrus aurantium*, and *Citrus limetta*: a review. *Studies in Natural Products Chemistry* », V.79, (2023), 135-204.

Bendali, A., Oulebsir, C., El-Hadi, D., et Djazouli, Z. E., « Impact of the formulation on the potential anti fungal activity essential oil of *Citrus aurantium* L. *AgroBiologia* », V.9(2), (2019), 1677-1693.

Bennadja, S., Ounaissia, K., Bouzaata, C., et Ailane, L., «Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Citrus aurantium* L. growing in Eastern Algeria». *Int J Innov Approach Agricult Res*, V.3(1), (2019), 81-86.

Benouaklil, F., Hamaidi-Chergui, F., Hamaidi, M. S., et Saidi, F., « Valorisation d'une adventice poussant en Algérie: *Chrysanthemum coronarium* L. *Phytothérapie* », V.19(5-6),(2021), 316.

Bessah, R., «Revue des Energies Renouvelables», V.18(3), (2015), 513–528.

Bibalani, G.H., et Mosazadeh, S.F., « Recognition and consumption uses and medicinal properties of sour orange (*Citrus aurantium*) by rural people in East part of Gilan Province (North Iran) », *J Med Plants Res*, V.5, (2011), 1238-1243.

Bougandoura, N., et Bendimerad, N., « Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature et Technology* », (2013). V.(9), 14.

Boukhatem, M.N., Ferhat, A., et Kameli, A., «Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature », *Une*, V.3(4), (2019), 1653-1659.

- Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., et Djamel, T.,** « 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* », V.8.(4), (2014),1418.
- Boukhenoufa, A., Meddah, A.T.T., Meddah, B., et Sonnet, P.,** « Comparative study of *Artemisia herba alba* asso and *Citrus aurantium* essential oils. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* », V.9(3), (2019), 622-627.
- Boussaada O., et Chemli R.,** « Seasonal Variation of Essential Oil Composition of *Citrus aurantium* L. var. amara. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* »,V.10(2), (2007),109-120.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., et Dakka, N.,** « Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie* », V.16(5), (2018), 254.
- Burt, S.,** « Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food A review». *Int J Food Microbiol*; V.94(3), (2004), 223-253.
- Chaieb, I., Zarrad, K., Sellam, R., Tayeb, W., Ben Hammouda, A., Laarif, A., et Bouhachem, S.,** Chemical composition and aphicidal potential of *Citrus aurantium* peel essential oils. *Entomologia Generalis*, 37.(1), (2018).
- Catani, L., Grassi, E., Di Montanara, A.C., Guidi, L., Sandulli, R., Manachini, B., et Semprucci, F.,** « Essential oils and their applications in agriculture and agricultural products: A literature analysis through VOSviewer », *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, V.45, (2022), 102-502.
- Chaieb, I., Zarrad, K., Sellam, R., Tayeb, W., Ben Hammouda, A., Laarif, A., et Bouhachem, S.,** Chemical composition and aphicidal potential of *Citrus aurantium* peel essential oils. *Entomologia Generalis*, 37(1), (2017), 153-162.
- Couic-Marinier, F., et Lobstein, A.,** « Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques* », V.52(525), (2013), 22-25.
- Dieng, S.I.M., Fall, A.D., Diatta-Badji, K., Sarr, A., Sene, M., Sene, M., et Bassene, E.,** « Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* », V.11(2), (2017), 768-776.
- Edris, A.E.,** « Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to*

Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives», V.21(4), (2007),308-323.

Enis, B.B., Hajlaoui, H., Chaieb, I., Daami-Remadi, M., Ben Said, M., et Ben Jannet, H., « Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the Tunisian *Citrus aurantium* essential oils », (2019).

Farahmandfar, R., Tirgarian, B., Dehghan, B., et Nemati, A., « Comparison of different drying methods on bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel waste: Changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders. Journal of Food Measurement and Characterization», V.14, (2020),862-875.

Festy, D., « Ma bible des huiles essentielles ». Éditions Leduc, (2018).

Festy, D., " Ma bible des huiles essentielles". Edition enrichie et illustrée, (2014).

Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Isamili, M.R., Houti, H., El Monfalouti, H., et harrouf, Z., « Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental) ». Phytothérapie, V.8(5), (2010), 295-301.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y., et Ebrahimzadeh, M.A., « Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 *citrus species* peels and tissues ». Pak J Pharm Sci, V.22(3), (2009), 277-281.

Ghédira, K., et Goetz, P., « *Citrus aurantium* L. var. amara Link Oranger amer–Bigaradier (Rutaceae) ». Phytothérapie, V.13(5),(2015), 320-327.

Guenther, E., « The Essential Oils. V.(1), History-Origin in Plants-Production- Analysis. D. Van Nostrand Company(1948) ».

Habibou, H.H., Idrissa, M., Ikhiri Khalid, P., et Benjamin, O., « Activité Antioxydante des extraits méthanoliques de différents organes de *Detarium microcarpum* Guill, et Perr ». *Eur Sci J*, V.15(12), (2019), 1857-7881.

Hadrich, B., Dahak, K., Abdenouri, N., et Kenchaou, N., « Etude de séchage des feuilles de bigaradier ». Revue des énergies renouvelables ,(2009), 145 - 149.

Hallouz, F., Karahacane, H., Meddi, M., Bouslimani, W., Belkacem, F.Z.B., et Sadi, F., « Use of sewage sludge in agriculture in Ain Defla Region, Algeria». Journal of Environmental and Agricultural Sciences, V17, (2018), 42-54.

- Hamed, A., Zarshenas, M.M., Jamshidzadeh, A., Ahmadi, S., Heidari, R., et Pasdaran, A.,** « *Citrus aurantium* (Bitter orange) seeds oil: pharmacognostic, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties». *Trends in Pharmaceutical Sciences*, V.5(3),(2019) ,153-164.
- Hasnae, B., Btissam, B., Ibrahim, E.M., Amine, S., Mohammed, B., Mohammed, E.B., et Mostafa, M.,** « Chemical composition, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of peel essential oils of *citrus aurantium* grown in Eastern Morocco ». *Der Pharmacia Lettre* , V.8(4), (2016), 239-245.
- Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., Brahim, N.B., Sebei, H.,** « Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus species* : Evidence for the genotypic influence ». *Food Chemistry*, V.123(4), (2010), 1098-1104.
- Hsouna, A. B., Hamdi, N., Halima, N. B., et Abdelkafi, S.,** « Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities ». *Journal of Oleo Science*, V.62(10), (2013), 763-772.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., et Meyer, R.L.,** « Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components ». *Frontiers in Microbiology*, V(3), (2012),12.
- Ismaili, R., Houbairi, S., Sanâa, L., Khadija, M., et Abdeslam, L.,** « Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales marocaines». *European Scientific Journal*, ESJ, V.13(12), (2017), 323.
- Jacquemond, C., et Blondel, L.,** « Contribution à l'étude des porte-greffe des agrumes: le *Poncirus trifoliata*. 1ère partie: étude des caractères botaniques(1986) ».
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., et Zhou, Z.,** « Antifungal activity of *citrus* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* », V.62(14), (2014), 3011-3033.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A., et Metodiev, S.,** « Seasonal depending variations of the composition and biological activities of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) essential oils from Bulgaria ». *Scientia Pharmaceutica*, V.68(3), (2000), 323-328.
- Karthikeyan., V et , Karthikeyan., J.,** « *Citrus aurantium* (Bitter Orange): A Review of its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology ». V.4(4),(2014), 766-772.
- Khribch, J., Nassik, S., Houadfi, M., Zrira, S., et Oukessou, M.,** « Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'escherichia coli d'origine aviaire ». *Revue marocaine des sciences agronomiques et vétérinaires*, V6(3), (2018), 300-307.

Lagha-Benamrouche, S., et Madani, K., « Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products* », V.50, (2013), 723-730.

Lawrence., B.M., « Progress in Essential Oils ». *Perfumer and Flavorist*. V.31, (2006), 48-52.

MAACK, F., et SABLIER, M., « Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse ». *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, V.3(2614),(1994), 2614-1.

Mabberley, D.J., « *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical application ». *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, V.49(3), (2004),481-498 .

Majnooni, M.B., Mansouri, K., Gholivand, M.B., Mostafaie, A., Mohammadi-Motlagh, H. R., Afnanzade, N.S., Mir-Mehdi, A., et Piriyaie, M., « Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* L », *African Journal of Biotechnology*, V.11(2), (2012), 498-503.

Makhlouf, K.E., Boungab, K., Elouissi, A., et Daikh, Z. E., « Antifungal activity of *citrus aurantium* l. Essential oil against crown rot of wheat caused by *fusarium graminearum*». *Pakistan Journal of Phytopathology*, V.34(2), (2022), 201-211.

Maksoud, S., Abdel-Massih, R.M., Rajha, H.N., Louka, N., Chemat, F., Barba, F.J., et Debs, E., *Citrus aurantium* L. active constituents, biological effects and extraction methods. an updated review. *Molecules*, V.26(19), (2021), 5832.

Mannucci, C., Calapai, F., Cardia, L., Inferrera, G., D'Arena, G., Di Pietro, M., et Calapai, G., « Clinical Pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety». *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, (2018).

Meena, M.R., et Sethi, V., « Antimicrobial activity of the essential oils from spices», *Food Miguel, M.G.,* « Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review». *Molecules*, V.15(12), (2010), 9252-9287.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., et De Feo, V., « Effect of essential oils on pathogenic bacteria». *Pharmaceuticals*, V.6(12) ,2013), 1451-1474.

Oikeh, E.I., « Phenolic content and in vitro antioxidant activities of sweet orange ».

ONS (organisation national statistiques 2008).

Ooghe, W.C., et Detavernier, C.L.M., « Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis* by flavonoids» . Journal of Agricultural and Food Chemistry, V.45(5), (1997),1633-1637.

Ouedrhiri, W., Bouhdid, S., Balouiri, M., Lalami, A.E.O., Moja, S., Chahdi, F.O., et Greche, H., « Chemical composition of *Citrus aurantium* L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects ». J. Chem. Pharm. Res, V.7(1), (2015), 78-84.

Periyanayagam, K., Dhanalakshmi, S., et Karthikeyan, V., « Pharmacognostical, SEM and EDAX profile of the leaves of *Citrus aurantium* L.(Rutaceae) ». Innovare Journal of Health Sciences, V.1(2),(2013),1-5.

Regnault, R.C., Hemetsberger, S., et Buchbauer, G., « Use of essential oils in agriculture. In Handbook of essential oils », (2020),873-917.

Ribeiro, S.O., Fraselle, S., Baudoux, D., Zhiri, A., Stévigny, C., et Souard, F., « Proposals for Antimicrobial Testing Guidelines Applied on Ajowan and Spanish Lavender Essential Oils». Planta medica, V.87(10/11), (2021), 754-763.

Saharaoui, L., et Hemptinne, J.L., « Dynamique des communautés des coccinelles (Coleoptera: Coccinellidae) sur agrumes et interactions avec leurs proies dans la région de Rouiba (Mitidja orientale) Algérie ». In Annales de la société entomologique de France. V.45(2), (2009),245-259.

Salma, M., Abdellah, F., El Houssine, A., Kawtar, B., et Dalila, B.,S « Comparison of the chemical composition and the bioactivity of the essential oils of three medicinal and aromatic plants from Jacky Garden of Morocco ». Int. J. Pharm. Phytochem. Res, V.8, (2016), 537-545.

Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimasi-Theriou, K., et Therios, I., « Volatile compounds and antioxidant activity of peel essential oils and methanolic extracts of four Greek *Citrus species: Citrus bergamia, Citrus medica, Citrus aurantium* and *Fortunella japonica*. (2014) ».

Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., et Therios, I., « Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece». Molecules, V.18(9), (2013), 10639-10647.

Science and Technology, V.31,(1994) , 68-70.

Stratakos, A.C., et Koidis, A., « Essential oils in food preservation, flavor and safety. Methods for Extracting Essential Oils; Preedy, VR, Ed». Academic Press: Cambridge, MA, USA,(2016), 31-38.

Suryawanshi, J.A.S., « An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases». African Journal of Plant Science, V.5(7), (2011), 390-395.

Swamy, M.K., Akhtar, M.S., et Sinniah, U.R., « Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review». Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. (2016).

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M., Nunes, M. L., et Batista, I., « Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils». Industrial Crops and Products, V43, (2013), 87-95.

Teneva, D., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z., et Kostov, G., « Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms». Zeitschrift für Naturforschung C, V.74(5-6), (2019), 105-111.

Tisserand, R., et Young, R., « Essential oil safety: a guide for health care professionals. Elsevier Health Sciences ». (2013).

Toutain, F., « Activité biologique des sols, modalités et lithodépendance. Biology and Fertility of Soils », V3(1),1987,31-38.

Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., et Garcia- Parrilla, M.C.,« Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical », Talanta, V.71, (2007), 230– 235.

Wayne, P., « Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ». 3rd ed. IL: Allured Publishing Corporation. United States,(2008).

Yala, J.F., Mabika, R.M., Camara, B., Souza, A., Lepengue, A.N., Seydou, T., Kone, D., « In vitro antibacterial activity of *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Lippia multiflora*, *Melaleuca quinquenervia* essential oils and Neco on extended-spectrum-lactamases producing or non-producing bacterial strains ». Journal of Medicinal Plants Research, V.10(43), (2016), 796-804.