

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض

Faculté Des Sciences de la Nature et de
la Vie et des Sciences de la Terre

Département : des sciences biologiques



جامعة الجيلالي بونعامة – خميس مليانة

Université Djilali Bounaama
Khemis Miliana

قسم : علوم البيولوجيا

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

**Activités antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle
de *Citrus aurantiifolia***

Réalisé par :

Benammar Hassiba

Benammar Samia

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

Président	Mr	Bouras H.	MCB	U. Khemis Miliana
Promotrice	Mme	Benouaklil F.	MCA	U. Khemis Miliana
Examinatrice	Mme	Cassasni L.	MAB	U. Khemis Miliana

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Avant tout, nous tenons à exprimer notre gratitude infinie envers Dieu, le Tout - Puissant et Miséricordieux, pour nous avoir accordé la force et le courage nécessaire pour mener ce travail à bien.

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre profonde reconnaissance et nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme Benouaklil F**, Maitre de conférences A à l'Université de Djilali Bounaama de Khemis Miliana, pour nous avoir accepté et honoré en dirigeant ce travail avec beaucoup d'attention et de soin. Nous la remercions sincèrement pour la confiance qu'elle nous a accordé et la responsabilité qu'elle a manifesté à notre égard, en nous apportant tout son soutien et en nous assistant à chaque étape, sans retenue d'informations tout au long de ce travail. Nous avons beaucoup appris à ses côtés et nous lui exprimons notre gratitude la plus profonde.

Nous tenons également à exprimer nos plus vifs remerciements aux membres du jury :

- **Dr. Bouras H.** d'avoir accepté de présider ce travail.

- **Dr. Cassasni L.** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à M. Khadraoui qui nous a simplifié la tâche de détermination de la composition chimique de notre huile par la CGMS.

Nous tenons également à exprimer notre grande gratitude envers les employés du laboratoire de bactériologie « laboratoire d'analyse médicale de Dr Zibouche à Ain Defla » pour leur accueil et leur aide.

Nous adressons nos sincères remerciements à M. Chaouchi pour son aide précieuse dans la réalisation de l'activité antioxydante.

Et nous exprimons également notre profonde gratitude à Mme Nadia, ingénieure en laboratoire de physiologie végétale, ainsi qu'à Mme Afaf et Nadjia, ingénieures en laboratoire de microbiologie, et Mme Kalthoum ingénieure en laboratoire de Biochimie pour leur précieuse contribution.

Enfin, sans oublier tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail aux personnes les plus chères à nos cœurs.

À notre chère mère **Khadija**, qui nous a toujours encouragé et soutenu, et a été à nos côtés pendant les moments difficiles de notre parcours scolaire. Elle est une lumière qui éclaire nos chemins et une force qui nous pousse vers la réussite.

À la mémoire de notre cher père adoré **Abdelkader**, qui nous a toujours encouragé et éclairé sur l'importance des études, en nous inculquant les valeurs de l'effort et du savoir. Il était une source d'inspiration et de motivation inépuisable, laissant une empreinte indélébile dans nos cœurs et nos esprits.

À notre cher frère **Mohammed**, et à nos chères sœurs **Aya**, **Nadjet** et **Hayet**, qui ont toujours été un soutien et un appui pour nous à chaque étape de notre vie. Nous vous exprimons toute notre gratitude et notre reconnaissance.

À nos chères amies : **Amina**, **Fatima**, **Ibtissem** et **Ihsan**

À toutes les personnes que nous aimons, qui nous aiment, qui nous ont aidé ou soutenu, sans exception.

Hassiba et Samia

Résumé

Les huiles essentielles sont des molécules naturelles possédant un large éventail d'activités biologiques importantes. Ce travail porte sur l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia* collectée de la région de Boumedfaa Wilaya de Ain Defla sur douze souches bactériennes.

L'extraction de l'huile essentielle à partir des pelures de *Citrus aurantiifolia* par hydrodistillation a donné un rendement de $2,74\% \pm 0,39$. C'est une huile avec un aspect liquide, de couleur jaune très pâle et d'odeur forte, aromatique, fraîche et citronnée. Elle se distingue par un pH acide de 5,5 et par une densité relative de 0.7953. La composition chimique de l'huile par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CGMS) a révélé la présence de 100 composés. Le limonène (33.26%), le β -pinène (12.27%), le γ -terpinène (8.44%) sont les composés majeurs. Ainsi, les hydrocarbures monoterpéniques représentent la classe prédominante avec un pourcentage de 66.05%.

Le pouvoir antimicrobien de cette huile a été évalué par la méthode d'aromatogramme et la méthode de micro-atmosphère : la méthode d'aromatogramme montre que les zones d'inhibition les plus élevées de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* sont de $20,33 \text{ mm} \pm 3,46$, $12,83 \text{ mm} \pm 1,04$ et $12,67 \text{ mm} \pm 0,94$ pour *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) respectivement. Tandis que, la méthode de micro-atmosphère indique que la phase vapeur de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a une efficacité antibactérienne contre les souches de *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Bacillus subtilis* (souche clinique) et *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) avec des zones respectives de $8,5 \text{ mm} \pm 2,12$; $9,17 \text{ mm} \pm 1,08$ et $14,5 \text{ mm} \pm 3,54$.

L'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a dévoilé des valeurs de CE_{50} de $24,33 \text{ } \mu\text{g/ml}$ par le test de DPPH et de $31,70 \text{ } \mu\text{g/ml}$ par la méthode de FRAP.

Mots-clés : *Citrus aurantiifolia*, huile essentielle, CG-MS, activité antimicrobienne, aromatogramme, micro-atmosphère, activité antioxydante, DPPH, FRAP.

الملخص

الزيوت العطرية هي جزيئات طبيعية تتمتع بمجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية الهامة . يتناول هذا العمل دراسة النشاط المضاد للأوكسدة والمضاد للمكروبات لزيت عطري من حمضيات أرونتيفوليا *Citrus aurantifolia* المجمع من منطقة بومدفع، ولاية عين الدفلى، على إثني عشر سلالة بكتيرية.

أعطى استخراج الزيت العطري من *Citrus aurantifolia* بواسطة التقطير المائي مردودا بنسبة 2,74% الزيت الناتج ذو مظهر سائل، لون أصفر باهت جدا ورائحة قوية، عطرية، منعشة وحمضية. يتميز بدرجة حموضة حمضية 5,5 وكثافة نسبية 0.7953. كشف التحليل الكيميائي للزيت بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية الموصولة بمطياف الكتلة (CGMS) عن وجود 100 مركب. الليمونين (33.26%) بيتا بينين (12.27%) والجاما تربينين (8.44%) هي المركبات الرئيسية بالتالي، تمثل الهيدروكربونات مونوتاربيينية أكبر فئة بنسبة 66,05% .

تم تقييم القوة المضادة للمكروبات لهذا الزيت بواسطة طريقة الأروماتوغرام وطريقة ميكرو أتموسفير: تظهر طريقة الأروماتوغرام أن أكبر مناطق تثبيط لزيت *Citrus aurantifolia* هي 20,33 مم ± 3,46 ، 12,83 mm ± 1,04 و 12,67 مم ± 0,94 لسلاطات *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) ، *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) و *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) على التوالي. بينما تشير طريقة الميكرو أتموسفير إلى أن الطور البخاري للزيت العطري من *Citrus aurantifolia* له فعالية مضادة للبكتيريا ضد سلاطات *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) ، *Bacillus subtilis* (souche clinique) و *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) مع مناطق تثبيط بالترتيب 8,5 مم ± 2,12 ، 9,17 مم ± 1,08 و 14,5 مم ± 3,54 .

كشفت دراسة النشاط المضاد للأوكسدة لزيت *Citrus aurantifolia* عن قيم CE_{50} تبلغ 24,33 ميكرو غرام/مل بواسطة إختبار DPPH و 31,70 ميكرو غرام/مل بواسطة طريقة FRAP.

الكلمات المفتاحية *Citrus aurantifolia*، الزيت العطري، CGMS، نشاط مضاد للمكروبات، أروماتوغرام، ميكرو أتموسفير، نشاط مضاد للأوكسدة، DPPH، FRAP

Abstract

Essential oils are natural molecules with a wide range of important biological activities. This work focuses on the study of the antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantiifolia* collected from the region of Boumedfaa Wilaya of Ain Defla on twelve bacterial strains.

The extraction of essential oil from the peels of *Citrus aurantiifolia* by hydrodistillation gave a yield of $2.74\% \pm 0.39$. It is an oil with a liquid appearance, very pale yellow in color and with a strong, aromatic, fresh and lemony odor. It is distinguished by an acidic pH of 5.5 and a relative density of 0.7953. The chemical composition of the oil by gas chromatography coupled with mass spectrophotometry (CGMS) revealed the presence of 100 compounds. Limonene (33.26%), β -pinene (12.27%), γ -terpinene (8.44%) are the major compounds. Thus, monoterpene hydrocarbons represent the predominant class with a percentage of 66.05%.

The antimicrobial power of this oil was evaluated by the aromatogram method and the micro-atmosphere method: the aromatogram method shows that the highest inhibition zones of *Citrus aurantifolia* essential oil are 20, 33 mm \pm 3.46, 12.83 mm \pm 1.04 and 12.67 mm \pm 0.94 for *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) respectively. While, the micro-atmosphere method indicates that the vapor phase of *Citrus aurantifolia* essential oil has antibacterial effectiveness against strains of *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Bacillus subtilis* (clinical strain) and *Klebsiella pneumoniae* (clinical strain) with respective areas of 8.5 mm \pm 2.12; 9.17mm \pm 1.08 and 14.5mm \pm 3.54.

The study of the antioxidant activity of *Citrus aurantifolia* essential oil revealed EC50 values of 24.333 μ g/ml by the DPPH test and 31.70 μ g/ml by the FRAP method.

Key words: *Citrus aurantiifolia*, essential oil, GC-MS, antimicrobial activity, aromatogram, micro-atmosphere, antioxidant activity, DPPH, FRAP.

Liste des tableaux

Tableau I.1 :	Classification botanique de <i>Citrus aurantifolia</i>	3
Tableau I.2 :	Production de citrons et de limes dans quelques pays du monde.....	6
Tableau II.1 :	Souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	20
Tableau II.2 :	Conditions opératoires de la CG-MS.....	26
Tableau I.3 :	Antibiotiques testés et leurs diamètres critiques.....	28
Tableau III.1 :	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	40
Tableau III.2 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> .	42
Tableau III.3 :	Sensibilité des souches bactériennes testées aux antibiotiques.....	54
Tableau III.4 :	Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	57
Tableau III.5 :	Résultats de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> par la méthode de micro-atmosphère.....	60
Tableau III.6 :	CE ₅₀ de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> , d'acide ascorbique et de BHT obtenues par le test de DPPH.....	68
Tableau III.7 :	CE ₅₀ de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> , d'acide ascorbique et de BHT obtenues par le test de FRAP.....	76
Tableau III.8 :	Résultats de la comparaison des valeurs des CE ₅₀ obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP.....	76

Liste des figures

Figure I.1 :	Organes de <i>Citrus aurantifolia</i>	4
Figure I.2 :	Coupe transversale de <i>Citrus aurantifolia</i>	4
Figure I.3 :	Six principaux pays producteurs d'agrumes au monde.....	5
Figure I.4 :	Exemples de structures mono- et sesquiterpènes.....	9
Figure I.5 :	Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane.....	10
Figure I.6 :	Photo du dispositif de l'expression à froid.....	11
Figure I.7 :	Principe d'extraction par hydrodistillation.....	12
Figure I.8 :	Différents mécanismes antiviraux des huiles essentielles.....	16
Figure II.1 :	<i>Citrus aurantiifolia</i>	19
Figure II.2 :	Carte géographique de la zone de récolte, Boumedfaa en Algérie.....	19
Figure II.3 :	Schéma représentatif des différentes étapes de l'expérimentation.....	21
Figure II.4 :	Dispositif d'hydrodistillation Clevenger.....	22
Figure II.5 :	Conservation de l'huile essentielle.....	22
Figure II.6 :	Pycnomètre.....	25
Figure II.7 :	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrophotométrie de masse.....	26
Figure II.8 :	Illustration de la méthode de l'aromatogramme.....	30
Figure II.9 :	Aromatogramme.....	32
Figure II.10 :	Illustration de la méthode de micro-atmosphère.....	33
Figure II.11 :	Micro-atmosphère.....	34
Figure II.12 :	Structure du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle de sa forme réduite, la 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (Molyneux, 2004)	35
Figure II.13 :	Test de DPPH.....	36
Figure III.1 :	Teneur en eau et en matière sèche de <i>Citrus aurantifolia</i>	38
Figure III.2 :	Huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	39
Figure III.3 :	Pycnomètre rempli d'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	41
Figure III.4 :	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	50
Figure III.5 :	Résultats d'antibiogramme.....	53

Figure III.6 :	Résultats d'aromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	56
Figure III.7 :	Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère à une dose de 10 µl de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	61
Figure III.8 :	Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère à une dose de 50 µl de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	62
Figure III.9 :	Pourcentage de sensibilité des souches bactériennes étudiées à l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> et aux antibiotiques testés...	64
Figure III.10 :	Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	65
Figure III.11 :	Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	66
Figure III.12 :	Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de BHT.....	67
Figure III.13 :	Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> , d'acide ascorbique et de BHT.....	67
Figure III.14 :	Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	70
Figure III.15 :	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.....	70
Figure III.16 :	Pouvoir réducteur du BHT.....	71
Figure III.17 :	Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> , de l'acide ascorbique et du BHT.....	72
Figure III.18 :	Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	73
Figure III.19 :	Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.....	73
Figure III.20 :	Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHT.....	74

Figure III.21 : Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i> , l'acide ascorbique et le BHT.....	75
Figure III.22 : Résultats de la comparaison des valeurs de CE ₅₀ obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP.....	77

Liste des abréviations

FAO :	Food and Agriculture Organization
ISO :	International Organization for Standardization
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthiciline
ONS :	Office national des statistiques
DSA :	Direction des Services Agricoles
AFNOR :	Association française de normalisation
CG-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse
CG :	Chromatographie phase gazeuse
MS :	Spectrophotométrie de masse
GN :	Gélose nutritive
ATCC :	American type culture collection
DZI :	Diamètre de zone d'inhibition
DO :	Densité Optique
GV :	Gaz Vecteur
DPPH :	1,1- diphényl-2-picrylhydrazyle
FRAP :	Ferric Reducing Antioxidant Power
BHT :	Butylhydroxytolulène
CE₅₀ :	Concentration efficace à 50%

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. Lime (*Citrus aurantiifolia*) 3

I.1.1. Nomenclature..... 3

I.1.2. Classification botanique..... 3

I.1.3. Description botanique..... 3

I.1.4. Répartition géographique..... 5

I.1.4.1. Répartition géographique dans le monde..... 7

I.1.4.2. Répartition géographique en Algérie..... 7

I.2. Huiles essentielles..... 7

I.2.1. Définition..... 7

I.2.2. Localisation des huiles essentielles..... 7

I.2.3. Caractéristiques et description physique..... 8

I.2.4. Composition chimique..... 8

I.2.4.1. Terpènes – terpénoïdes.....	8
I.2.4.2. Composés aromatiques.....	10
I.2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	10
I.2.5.1. Expression à froid.....	10
I.2.5.2. Hydrodistillation.....	11
I.2.6. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	12
I.2.6.1. En pharmacologie.....	12
I.2.6.2. En cosmétologie.....	13
I.2.6.3. En industries agroalimentaires.....	13
I.2.6.4. En agriculture.....	13
I.2.6.5. En médecine.....	14
I.3. Activités biologiques des huiles essentielles	14
I.3.1. Activité antibactérienne.....	14
I.3.2. Activité antifongique.....	15
I.3.3. Activité antivirale.....	16
I.3.4. Activité antioxydante.....	17

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel	18
II.1.1. Matériel non biologique.....	18
II.1.2. Matériel végétal.....	18
II.1.2.1. Présentation de la zone de récolte.....	19
II.1.3. Matériel microbien.....	20
II.2. Méthodes	21

II.2.1. Extraction de l'huile essentielle.....	21
II.2.2. Conservation de l'huile essentielle.....	22
II.2.3. Teneur en eau.....	23
II.2.4. Détermination du rendement en huile essentielle.....	23
II.2.5. Analyse de l'huile essentielle.....	24
II.2.5.1. Détermination des propriétés organoleptiques.....	24
II.2.5.2. Potentiel d'Hydrogène (pH).....	24
II.2.5.3. Densité relative.....	24
II.2.5.4. Analyse chromatographique de l'huile essentielle.....	25
II.2.6. Etude de l'activité antimicrobienne.....	27
II.2.6.1. Préparation des souches et ajustement de la charge bactérienne.....	27
II.2.6.2. Antibiogramme.....	27
II.2.6.3. Méthode d'aromatogramme.....	30
II.2.6.4. Méthode de micro-atmosphère.....	33
II.2.7. Etude de l'activité antioxydante.....	35
II.2.7.1. Test de DPPH.....	35
II.2.7.2. Test de FRAP.....	37

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Etude analytique.....	38
III.1.1. Teneur en eau.....	38
III.1.2. Rendement en huile essentielle.....	38
III.1.3. Caractères organoleptiques de l'huile essentielle.....	39
III.1.4. Détermination du pH.....	40
III.1.5. Densité relative.....	41

III.1.6. Composition chimique.....	41
III.2. Activité antibactérienne.....	53
III.2.1. Antibiogramme.....	53
III.2.2. Aromatogramme.....	56
III.2.3. Micro-atmosphère.....	60
III.2.4. Comparaison de la sensibilité des souches.....	63
III.3. Activité antioxydante.....	65
III.3.1. Test de DPPH.....	65
III.3.2. Test de FRAP.....	69
III.3.3. Comparaison de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP.....	76
Conclusion.....	78

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Introduction

Les bactéries sont à l'origine de plusieurs maladies. Leurs résistances aux antibiotiques est de plus en plus prononcée, rendant nécessaire une nouvelle stratégie pour réduire ou éliminer ces affections sans dépendre des produits synthétiques. Dans ce contexte, il est logique de trouver des molécules bioactives issues des plantes, qui ont évolué pour protéger leurs hôtes contre les infections (Boutabia et *al.*, 2016).

Depuis l'Antiquité, de nombreuses plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent application dans divers domaines tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétique et l'agriculture grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : flavonoïdes, alcaloïdes, saponosides, vitamines... et les huiles essentielles (Fyad et *al.*, 2013).

L'Algérie est connue pour son immense variété de plantes médicinales, grâce à sa grande superficie et sa grande diversité bioclimatique (Ghomari et *al.*, 2014). L'institut national de la recherche agronomique d'Algérie (INRAA) a signalé dans son rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques par l'alimentation et l'agriculture en 2006 que la flore algérienne comprend plus de 626 espèces, sous espèces et variétés médicinales. Cependant, malgré les espèces spontanées utiles et cultivées disponibles en Algérie, seule 1% est utilisé (INRA, 2006).

Les *Citrus* sont utilisés dans divers domaines tels que l'alimentation et la cosmétique. Ils contiennent des quantités importantes de métabolites secondaires bénéfiques, intégrés dans de nombreux médicaments en raison de leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Les scientifiques et les chercheurs ont mené de nombreuses études sur l'huile essentielle de différentes espèces de *Citrus*, notamment celle de *Citrus aurantifolia*.

Comme nous disons précédemment plusieurs travaux ont été effectuée pour déterminer la composition chimique et les effets antimicrobiens de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*. Comme ceux de COSTA et *al.*, (2014) qui ont étudié l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle ainsi que sa composition chimique, tandis que SAFAEIN LAEIN et *al.*, (2021) ont démontré ses activités antimicrobiennes et antioxydantes. Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a encore réussi à dévoiler les effets antibactériens des composés volatiles et peu de travaux ont étudié leur activité antioxydante par la méthode de FRAP.

Pour mieux connaître les effets de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* et l'utiliser tant pour éliminer les bactéries pathogènes que pour son effet antioxydant, nous nous sommes intéressées à cette espèce.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* récoltée dans la région de Boumedfaa, située dans la Wilaya de Ain Defla. Et d'estimer son pouvoir antioxydant.

Notre travail est subdivisé en trois chapitre :

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique sera présentée sur la plante de *Citrus aurantifolia* étudiée et sur les huiles essentielles et leurs activités biologiques.

Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés, notamment l'extraction de l'huile essentielle, l'analyse de sa composition chimique par le CG-MS, l'étude analytique, l'évaluation de son activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme et par la méthode de micro-atmosphère ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante par le test de DPPH et le test de FRAP.

Le troisième chapitre est réservé aux résultats obtenus et à leur discussion.

Enfin, le travail se conclut par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Lime (*Citrus aurantiifolia*)

I.1.1. Nomenclature

L'espèce *C. aurantiifolia* est également connu sous le nom de lime en anglais, limah en Arabe, et citronnier en Français (Manner et al., 2006).

I.1.2. Classification botanique

D'après NARANG et al., (2016), la position taxonomique de *Citrus aurantiifolia* est celle indiquée comme suit (Tableau I.1) :

Tableau I.1: Classification botanique de *Citrus aurantiifolia*

Règne	Plantae
Sous règne	trachéobionta
Super-division	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>C. aurantiifolia</i>

I.1.3. Description botanique

C. aurantiifolia, communément appelé "key lime" ou "Mexican lime" (Ketaam et al., 2024), est un petit arbuste d'environ 5 mètres de haut à feuilles persistantes. Il se ramifie densément de manière irrégulière et porte des épines courtes. Ses feuilles sont alternées, elliptiques à oblongues-ovales (4-8 cm × 2-5 cm) avec une marge crénelée. Les fleurs d'un pouce de diamètre, sont blanches jaunâtres avec une légère teinte violette sur les bords. Les fruits sont des baies globuleuses à ovoïdes de 3 à 6 cm de diamètre et ont parfois une papille

apicale. Ils sont jaunes à maturité mais généralement récoltés vert pour le commerce. Les fruits et les fleurs apparaissent tout l'année, avec une abondance de mai à septembre dans l'hémisphère Nord. Leurs écorces très fines avec des segments densément glandulaires contenant des vésicules pulpaire jaunes-vertes. Le jus de fruit est acide et parfumé, aigre comme le jus de citron mais plus aromatique. Les graines sont petites, dodues, ovoïdes, pales et lisses, avec un embryon blanc (Figure I.1 ; Figure I.2) (Enejoh *et al.*, 2015).



Figure I.1 : Organes de *Citrus aurantifolia* (a) fruits ; (b) fleurs ; (c) tige (Arbonnier, 2002).

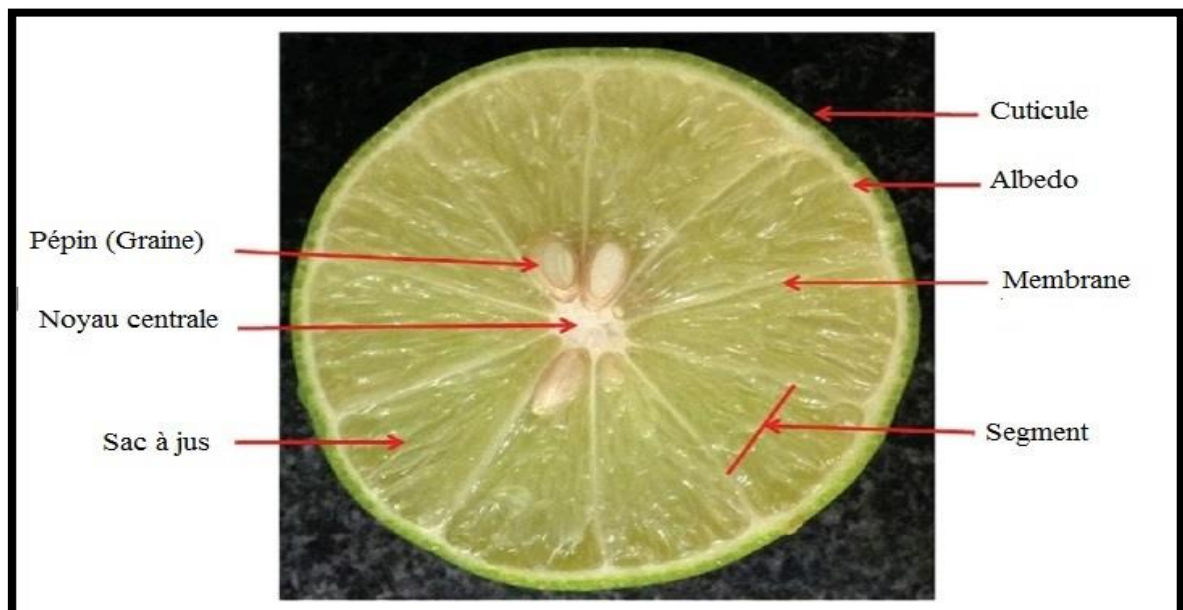


Figure I.2 : Coupe transversale de *Citrus aurantifolia* (Narang *et al.*, 2016).

I.1.4. Répartition géographique

I.1.4.1. Répartition géographique dans le monde

Citrus aurantifolia est une espèce très répandue dans de nombreux pays du monde entier et qui pousse dans les régions chaudes subtropicales ou tropicales telles que le sud de Floride, l'Inde, le Mexique, l'Égypte et les Antilles. L'origine de cette plante est de l'Asie du sud-Est (Figure I.3 ; Tableau I.2) (Kataki et al., 2023).

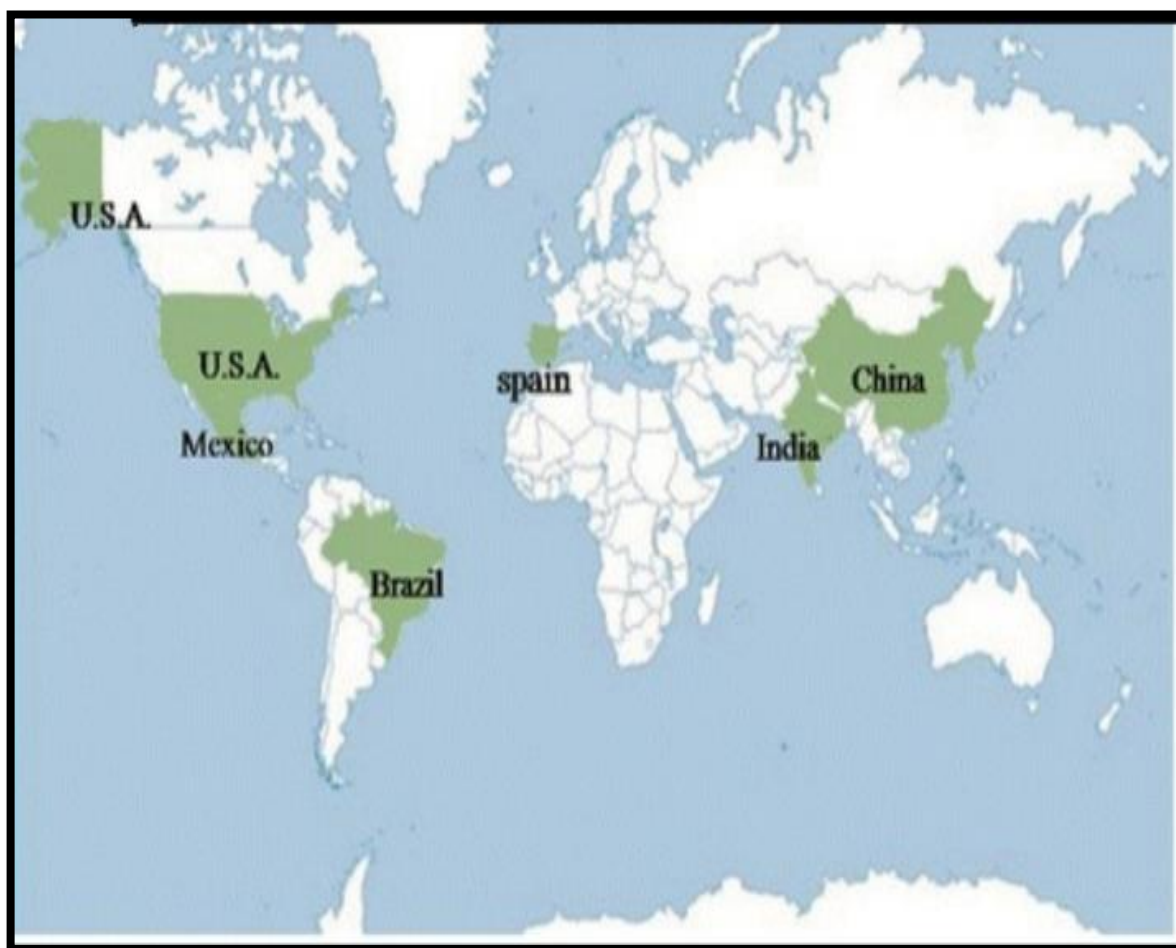


Figure I.3 : Six principaux pays producteurs d'agrumes au monde (Lv et al., 2015).

Tableau I.2 : Production de citrons et de limes dans quelques pays du monde (par milliers de tonnes) (FAO, 2015)

Année	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014
Monde	12924.8	12756.8	13414.3	13303.5	12943.4	13172.3
Hémisphère Nord	9942.2	1 0001.8	9972.5	9996.7	9771.5	10490.3
USA	827.4	882.0	920.0	850.0	912.0	832.0
Région méditerranéenne	2714.7	2688.3	2933.1	2927.7	2675.9	3173.6
Mexico	1966.0	1891.0	2133.0	2055.0	1950.0	2250.0
Espagne	687.9	558.2	717.9	736.2	666.7	1057.0
Algérie	41.4	44.0	44.0	41.4	41.4	41.0
Egypte	329.7	320.0	320.0	323.0	323.0	301.0
Maroc	42.0	42.0	80.0	154.4	47.5	41.0
Tunisie	41.8	37.3	47.5	49.0	44.0	58.0
Hémisphère sud	2982.6	2755.1	3441.8	3306.8	3171.9	2682. 0
Argentine	1350.0	1000.0	1550.0	1300.0	1300.0	700. 0
Brazil	899.8	1020.7	1126.7	1208.3	1100.0	1100. 0
Chilien	162. 0	155. 0	153. 0	160. 0	160.0	160. 0
Pérou	208. 0	233. 0	224.7	234.1	230.0	275. 0
Afrique du sud	214. 0	216. 0	257. 0	260.0	245.0	312.0

I.1.4.2. Répartition géographique en Algérie

L'Algérie détient une collection variétale composée de 178 variétés d'agrumes représentant un patrimoine génétique inestimable. Ces cultures occupant une surface totale de 45.040 hectares, sont réparties dans trois régions principales : le centre avec 28 243 hectares, l'Est avec 4 811 h et l'Ouest avec 11 658 hectares. Ces agrumes sont principalement cultivés dans les plaines irrigables, telles que la plaine de Mitidja (44%), le périmètre de la Mina et le Ba Chelif (14%), le périmètre de Bouna Moussa et plaine de Safsaf (16%), et la plaine de Habra et Mascara (25%) (Kerboua, 2002).

I.2. Huiles essentielles

I.2.1. Définition

Le terme « huiles » vient de la capacité des huiles essentielles à se solubiliser aux graisses, tandis que le terme « essentielles » désigne l'odeur émise par la plante productrice (Chemat *et al.*, 2012).

Selon ISO 9235 (International Organization for Standardization), une huile essentielle est un « produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de *Citrus* (agrumes), soit par distillation, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques » (ISO 9235, 2021).

Selon la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (Pharmacopée européenne, 2016).

I.2.2. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées et conservées dans différentes structures, telles que les poils sécréteurs ou trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux excréteurs (Loupy, 2006).

Les huiles essentielles sont produites naturellement par le végétal et se trouvent dans différentes parties telles que les fleurs (comme la rose), les sommités fleuries (comme la

lavande), les feuilles (comme la citronnelle), les écorces (comme la cannelle), les racines (comme l'iris), les fruits (comme la vanille), les bulbes (comme l'ail), les rhizomes (comme le gingembre) ou les graines (comme la muscade). (Serrato-Valenti et *al.*, 1997 ; Parthasarathy et *al.*, 2008).

I.2.3. Caractéristiques et description physique

À température ambiante, les huiles essentielles se trouvent généralement dans un état liquide, rarement visqueux. Leur caractère volatil explique leur parfum distinctif et leur capacité à être transportées par la vapeur d'eau. De manière générale, ces huiles sont moins denses que l'eau (densité < 1). De plus, elles réagissent à la lumière polarisée et présentent souvent un indice de réfraction élevé, des caractéristiques physiques uniques à chaque huile essentielle. Leur couleur varie également, allant du bleu profond pour la tanaïsie à un jaune à peine perceptible pour la plupart des autres huiles essentielles (Baudoux, 2017).

I.2.4. Composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles est le produit du métabolisme secondaire des plantes, qui est influencé par plusieurs facteurs génétiques et environnementaux tels que la température, la lumière, le stade de développement, la période de récolte, la nutrition, l'eau et les méthodes d'extraction (Morais, 2009 ; Dhifi et *al.*, 2016).

Les huiles essentielles se composent principalement de deux groupes de constituants : les terpénoïdes, comprenant les mono et sesquiterpènes, et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, qui sont moins fréquents (Bruneton, 1999).

I.2.4.1. Terpènes - terpénoïdes

Les terpènes, des métabolites secondaires présents dans les plantes, sont caractérisés par un squelette carboné composé d'unité d'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène). La formation de terpène est initiée par la voie de l'acide mévalonique dans le cytoplasme des cellules végétales. Divers processus biochimiques notamment des réarrangements et des oxydations conduisent à la synthèse des terpénoïdes. Ces modifications biochimiques donnent des terpénoïdes de dérivés oxygénés de terpènes, tels que des acides, des alcools, des cétones, des aldéhydes, des esters et des éthers (Lichtfouse, 2013) (Figure I.4).

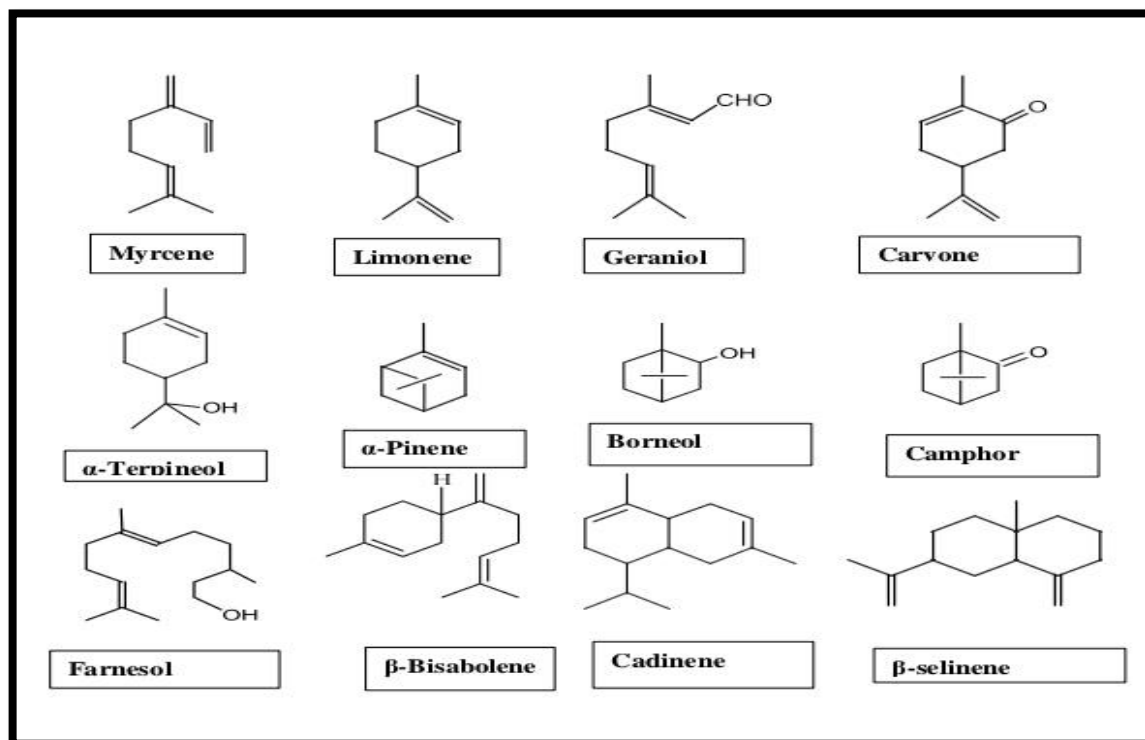


Figure I.4: Exemples de structures mono- et sesquiterpènes (Selmi et *al.*, 2022).

A. Monoterpènes

Les monoterpènes sont des composés naturels constitués de 10 hydrocarbures de carbone, dont la majorité sont insaturés. Les dérivés oxygénés de monoterpènes, tels que les alcools, les cétones, et les acides carboxyliques sont connus sous le nom de monoterpénoïdes. (Bajpai, 2019).

B. Sesquiterpènes

En termes de fréquence dans les huiles essentielles, les sesquiterpènes se classent en deuxième position, juste après les monoterpènes qui sont les plus répandus. Les sesquiterpènes sont composés de trois unités d'isoprène, ce qui leur confère la formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Ce groupe présente une diversité structurale (Croteau et *al.*, 2000). Les sesquiterpènes peuvent être linéaire, ramifié ou cyclique (Başer et *al.*, 2007).

I.2.4.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont moins fréquents que les terpènes (Bakkali et *al.*, 2008). Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles (Kunle et *al.*, 2003) (Figure I.5).

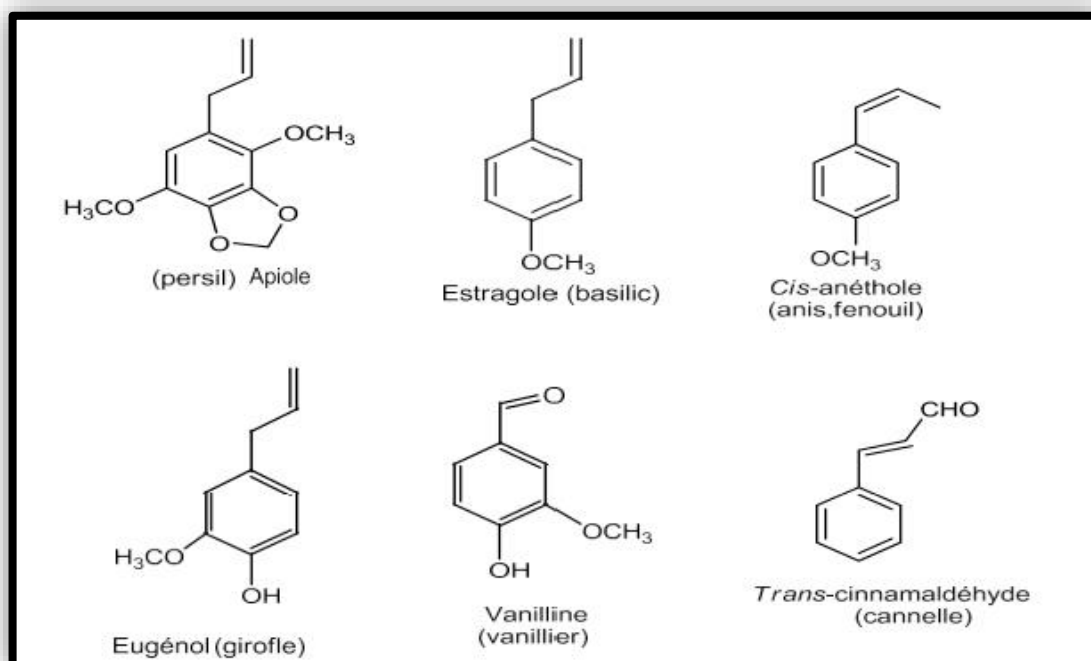


Figure I.5 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane (Selmi et *al.*, 2022).

I.2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

I.2.5.1. Expression à froid

Cette méthode est utilisée pour extraire les essences volatiles présentes dans les enveloppes des agrumes en les déchirant mécaniquement. Elle implique la rupture ou la fragmentation des membranes des sacs oléifères présents dans la couche intermédiaire du fruit, juste sous l'écorce, afin de collecter leur contenu intact et non altéré. Autre fois, l'extraction des essences d'agrumes, notamment celles de *Citrus*, était réalisée manuellement. Ce n'est que dans les premières années du XXe siècle que cette méthode a été mécanisée et industrialisée, en réponse à l'augmentation de la demande et dans le but de réduire les coûts de production tout en améliorant les rendements (Belsito et *al.*, 2007 ; Ferhat et *al.*, 2016) (Figure I.6).

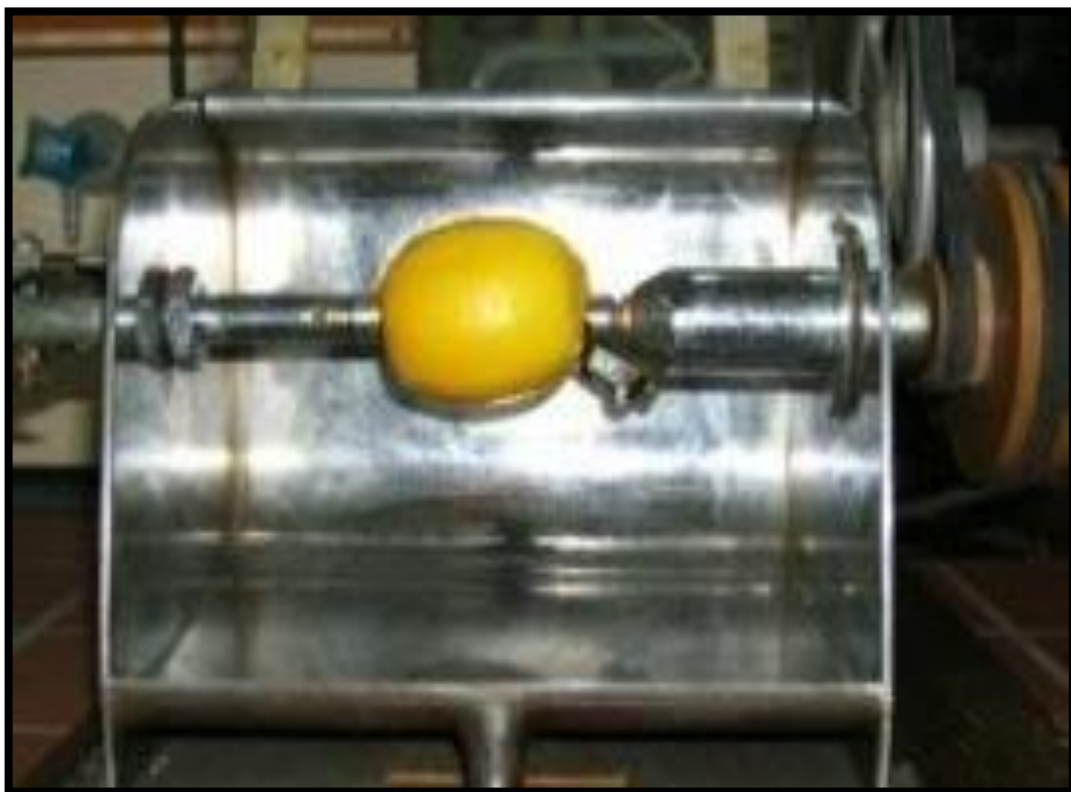


Figure I.6: Dispositif de l'expression à froid (Chenni et *al.*, 2017).

I.2.5.2. Hydrodistillation

La méthode d'hydrodistillation (HD) est couramment utilisée pour extraire les huiles essentielles, permettant ainsi d'extraire des produits naturels ayant un point d'ébullition élevé et insolubles dans l'eau. Le processus comprend l'immersion totale du matériau végétal dans l'eau, suivi de son ébullition, généralement réalisée à pression atmosphérique. Ensuite, la vapeur formée est condensée à l'aide d'un système de réfrigération à un débit d'eau. Le temps de distillation varie en fonction du type de matériau végétal utilisé, les parties ligneuses nécessitant des temps de distillation plus longs que les plantes herbacées (Katekar et *al.*, 2022) (Figure I.7).

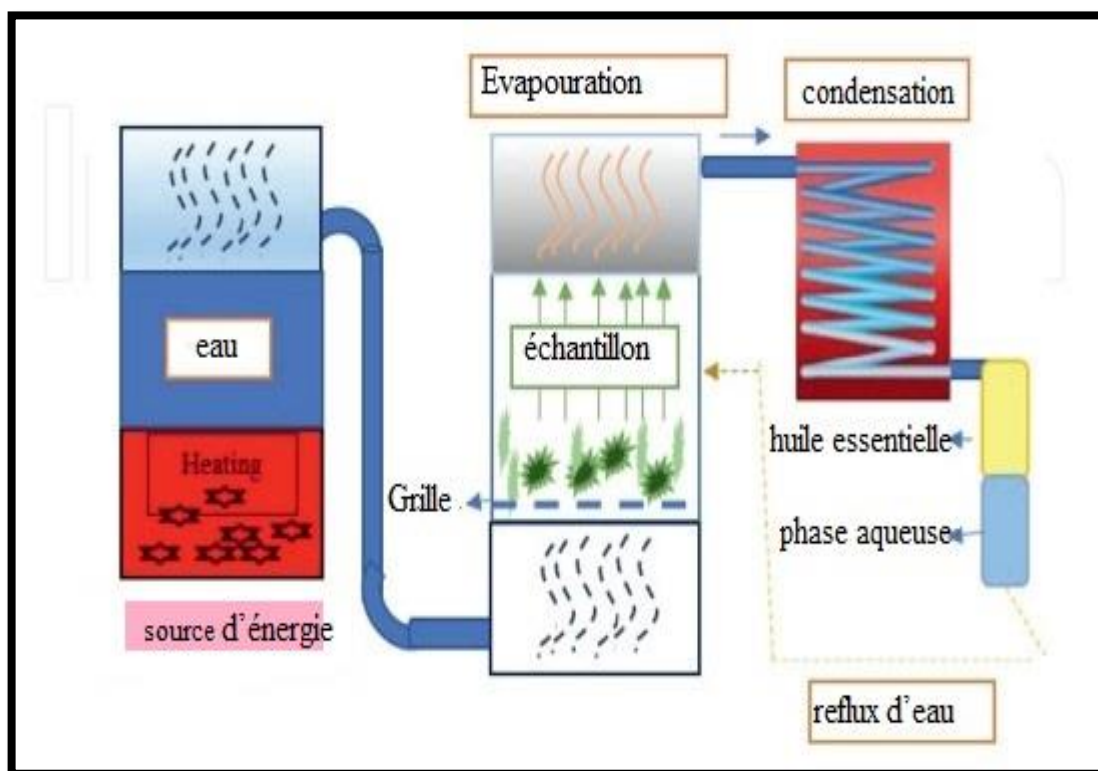


Figure I.7: Principe d'extraction par hydrodistillation (Souiy, 2023).

I.2.6. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

I.2.6.1. En pharmacologie

De nombreux chercheurs examinent de près l'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, en se focalisant notamment sur le potentiel en tant qu'agents anticancéreux, antimicrobiens, antiviraux et favorisant la pénétration cutanée (Aziz *et al.*, 2018).

Les huiles essentielles et leurs éléments actifs peuvent être administrés principalement de quatre manières : voie orale, rectale, cutanée ou pulmonaire. Le choix de la méthode d'administration dépend de la composition chimique de l'huile essentielle, de l'objet thérapeutique et de la sensibilité individuelle du patient concerné (Pisseri *et al.*, 2008), ils sont utilisés pour :

- ❖ **L'aromathérapie** : consiste à utiliser les huiles essentielles à des fins médicales dans les soins et les traitements. Elle peut également impliquer l'inhalation des arômes, dont les effets bénéfiques se manifestent au niveau du système limbique du cerveau.

Le massage aromathérapique, qui implique l'utilisation d'huile essentielle couramment pratiqué par les aromathérapeutes. En réalité l'aromathérapie constitue une sous-catégorie de la phytothérapie (Lee et *al.*, 2012).

- ❖ **La phytothérapie** : est l'utilisation des plantes médicinales dans des préparations galénique ou pharmaceutique (Pandey et *al.*, 2011).

I.2.6.2. En Cosmétologie

Depuis longtemps, les huiles essentielles ont été utilisées non seulement dans le domaine de la parfumerie, mais aussi dans celui de la beauté en général. Aujourd'hui, en raison de l'interdiction par l'union européenne de plus de 13000 produits chimiques dans les cosmétiques, et pour répondre à la demande croissante des consommateurs en ingrédients naturels, les huiles essentielles ont retrouvé leur place parmi les ingrédients essentiels des produits cosmétiques, facilitant ainsi la création de formulations certifiées Bio (Fourmentin et *al.*, 2024).

I.2.6.3. En industries agroalimentaires

Actuellement, l'utilisation excessive d'additifs antimicrobiens synthétiques dans la transformation des aliments suscitent des inquiétudes croissantes quant à leur sécurité, en raison de leurs conséquences néfastes, de nombreux additifs alimentaires peuvent présenter une toxicité résiduelle (Bonomo et *al.*, 2017).

Les additifs alimentaires de synthèse sont remplacés par les huiles essentielles qui sont utilisés pour la conservation et prolongation de la durée de conservation de divers aliments, incluant des fruits et végétaux, produits laitiers, la viande, les poissons et les fruits de mer (Rout et *al.*, 2013).

I.2.6.4. En agriculture

Une piste explorée consiste à exploiter les plantes sous différentes formes. De nombreux exemples illustrent leur utilisation en santé végétale et animal. Par exemple, le traitement des semences de maïs ou de riz avec des fongicides formulés à partir d'huile essentielle de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), de thym (*Thymus vulgaris*), ou de basilic (*Ocimum gratissimum*) permet de réduire l'inoculum initial responsable de la pourriture des épis de maïs et des tiges au champ (Tagne et *al.*, 2013).

I.2.6.5. En médecine

Les huiles essentielles ont été fréquemment employées dans la médecine traditionnelle et populaire pour leurs multiples activités biologiques, incluant des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, immunomodulatrices, antimicrobiennes (antivirales, antifongiques, antibactériennes), anti-rhumatismales, expectorantes, antitussives et sédatives (Brahimi et *al.*, 2016 ; Dhifi et *al.*, 2016).

Les études *in vitro* ont révélé que 187 huiles essentielles ont démontré des effets anticancéreux sur 112 lignées cellulaires (Osanloo et *al.*, 2022). Les composés tels que les terpènes et les phénylpropanoïdes présents dans ces huiles essentielles ont démontré une activité antitumorale spécifique contre les lignées cellulaires cancéreuses MCF7, A549 et HT144, mettant en lumière leur capacité cytotoxique et thérapeutique dans la lutte contre le cancer (Souza et *al.*, 2022).

Les huiles essentielles agissent contre le cancer grâce à divers mécanismes tels que l'immunomodulation, les effets antioxydants et la modulation de la multirésistance aux médicaments (Al- Harrasi et *al.*, 2022).

I.3. Activités biologiques des huiles essentielles

Des études ont démontré que les huiles essentielles possèdent un large éventail d'activités biologiques importantes, notamment antimicrobienne, antifongique, anti-inflammatoire, antioxydante, antihistaminique, anticholinestérasique, anticancéreuse, anti-âge...etc. Ces activités les qualifient pour une utilisation dans multiples domaines tels que la conservation des aliments, les médicaments, les industries, l'agriculture et bien d'autres encore (Nikita et *al.*, 2023).

I.3.1. Activité antibactérienne

Les effets antibactériens des huiles essentielles se manifestent de deux manières : soit en limitant la croissance bactérienne (bactériostatique), soit en tuant les cellules bactériennes (bactéricide) (Tariq et *al.*, 2019).

Les caractéristiques antibactériennes des huiles essentielles ont été examinées à travers divers observations et études chimiques qui les présentent comme des moyens potentiels pour résoudre le problème de la résistance microbienne aux médicaments, tels que l'effet antimicrobien de deux huiles essentielles de plante traditionnelles, *Thymus vulgaris* et

Eucalyptus globulus contre des isolats de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) (Tohidpour et al., 2010).

Les huiles essentielles peuvent agir sur les bactéries de différents mécanismes d'actions. Leurs effets physiologiques peuvent se traduire par le ralentissement ou l'inhibition, notamment sur : le métabolisme global des bactéries, la formation et la croissance des colonies bactériennes, la multiplication des bactéries, la sporulation, la synthèse de toxines et la production de biofilms (Chabenat et al., 2021).

La fonction antibactérienne d'une huile essentielle peut être :

- Quantitative, correspondant à la polyvalence de l'huile essentielle avec un spectre d'activité pouvant être étroit ou large.
- Qualitative, qui correspond à l'intensité de son action, soit bactériostatique ou bactéricide (Chabenat et al., 2021).

L'efficacité antibactérienne d'une huile essentielle dépend principalement du type de bactérie impliquée. Elle résulte de l'action des composants individuels de l'huile, ainsi que leurs interactions. Par exemple, l'association de faibles quantités de paracymène, un composé organique aromatique présent naturellement dans certaines plantes, avec du carvacrol, montre une efficacité accrue contre *Staphylococcus aureus* par rapport à l'utilisation isolée du carvacrol (Ultee et al., 2002).

I.3.2. Activité antifongique

Les infections fongiques, dues à des organismes eucaryotes, posent un défi pour leur identification et leur traitement thérapeutique par rapport aux infections bactériennes. La composition de la paroi cellulaire des champignons qui est la cible des agents antifongiques diffère de celle des cellules humaines en raison de la présence de chitine. Même si les traitements chimiques sont souvent efficaces, des souches résistantes peuvent apparaître. La gravité de l'infection dépend de facteurs tels que la charge d'agent infectieux et l'état immunitaire de l'hôte. Les extraits végétaux, l'un des produits naturels, peuvent offrir des perspectives prometteuses dans l'inhibition des infections fongiques (Yichen et al., 2017 ; Kalemba et al., 2003).

Certaines huiles essentielles présentent une activité antifongique comparable à celle des fongicides synthétiques (Zabka et al., 2014).

WHILEY et *al.*, (2018), dans leur étude sur les propriétés antifongiques des huiles essentielles, ont signalé les huiles de clou de girofle, de thym, d'arbre à thé, d'origan et de *Citrus* comme les huiles les plus efficaces.

I.3.3. Activité antivirale

Les huiles essentielles sont connues pour être actives contre certains virus, tandis que les mélanges d'huiles essentielles se sont révélés efficaces contre les virus de la grippe et de l'herpès simplex de type 1 (Brochot et *al.*, 2017). Les phénylpropanoïdes et les sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles contribuent à leur pouvoir antiviral (Astani et *al.*, 2011) (Figure I.8).

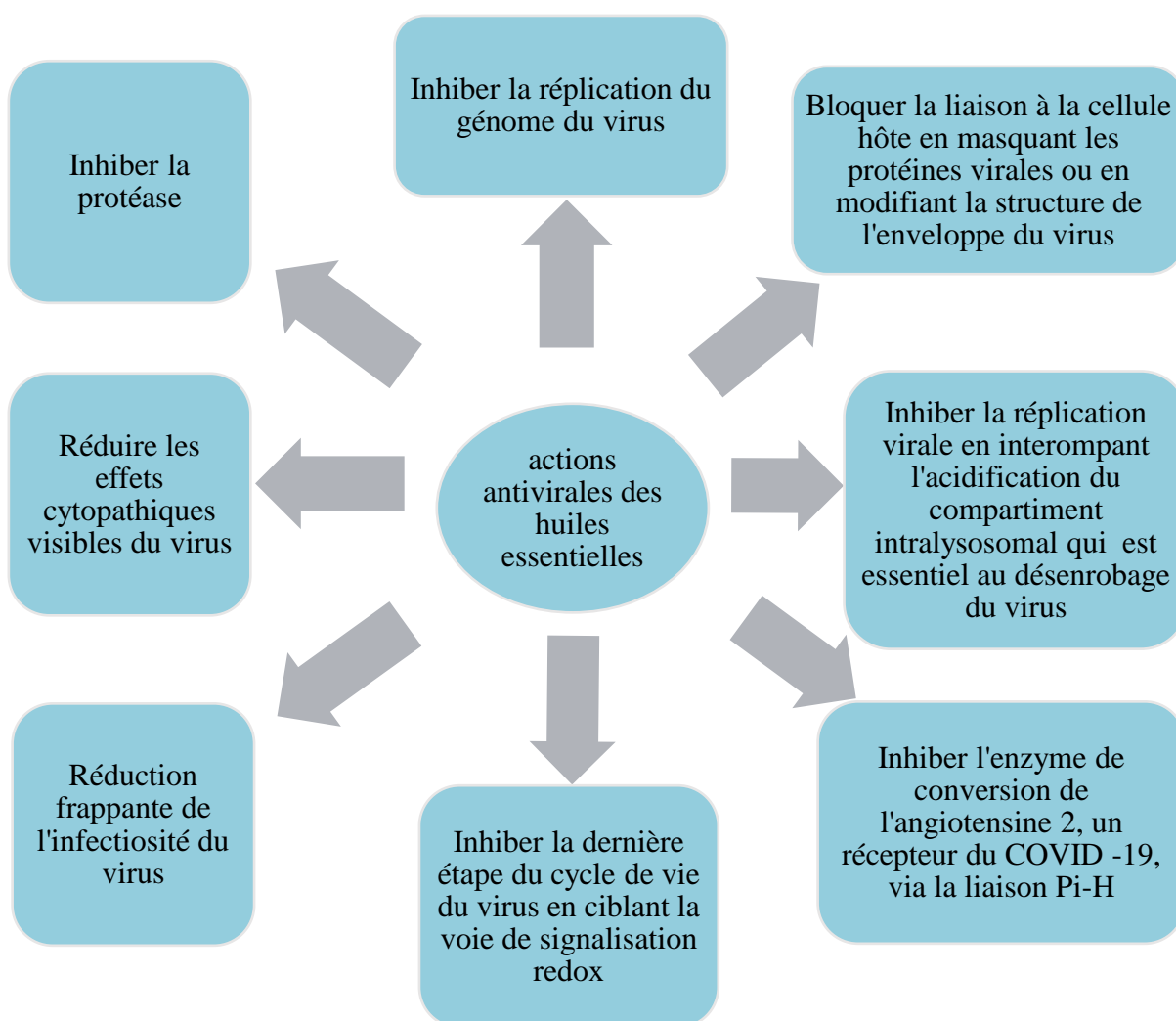


Figure I.8 : Différents mécanismes antiviraux des huiles essentielles (Abou Baker et *al.*, 2021).

I.3.4 Activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles occupent une place centrale dans divers processus biologiques. Ces pouvoirs sont dus à la capacité inhérente de certains de leurs composants, en particulier les phénols, à arrêter ou retarder l'oxydation de la matière organique. Certaines huiles essentielles dépourvues de phénols présentent des propriétés antioxydantes, cela s'explique par la chimie radicalaire de certains terpénoïdes et d'autres constituants volatils (Amorati et *al.*, 2013).

Les huiles essentielles sont utilisées en tant qu'agents de conservation alimentaire en raison de leurs propriétés antioxydantes, approuvées comme additifs alimentaires. Leur utilisation est judicieuse pour réduire, voire remplacer, les conservateurs chimiques ou synthétiques (Laib et *al.*, 2011).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce chapitre décrit le matériel et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude expérimentale étalée sur une période de trois mois allant du mois de février jusqu'au mois de mai 2024.

L'étude consiste à évaluer l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia* sur douze souches bactériennes. Ce travail a été réalisé sur plusieurs étapes :

- Extraction de l'huile essentielle des pelures de *Citrus aurantiifolia* au niveau du laboratoire « physiologie végétale » de l'université Djilali Bounaama.
- Caractérisation phytochimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia* au niveau du laboratoire de recherche « valorisation des substances naturelles » de l'université Djilali Bounaama.
- Etude de l'activité antimicrobienne effectuée dans le laboratoire d'analyses médicales de Dr Zibouche à Ain Defla et dans le laboratoire des pathogènes de l'université Djilali Bounaama.
- Etude de l'activité antioxydante effectuée au niveau du laboratoire des analyse et de chromatographe en phase gazeuse de département des sciences et de la technologie de l'université Djilali Bounaama.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel non biologique

Le matériel et les produits utilisés dans notre étude sont présentés dans le tableau 1 dans l'annexe 01.

II.1.2. Matériel végétal

Les fruits de lime, *Citrus aurantiifolia* ont été récoltés au mois de février 2024 dans une ferme dans la région de Boumedfaa, Wilaya Ain Defla (Figure II.1).



Figure II.1 : *Citrus aurantiifolia* (Original, 2024)

II.1.2.1. Présentation de la zone de récolte

Boumedfaa est une commune de la Wilaya de Ain Defla (Figure II.2). Elle est située à l'intersection de quatre Wilayas : Ain Defla, Médéa, Blida et Tipaza. Elle se situe à 100 Km à l'ouest d'Alger, à 60 Km au Nord-Est d'Ain Defla, à 35 km au nord-ouest de Médéa, à 45 km à l'ouest de Blida et à 45 km au sud de Tipaza (ONS, 2008).

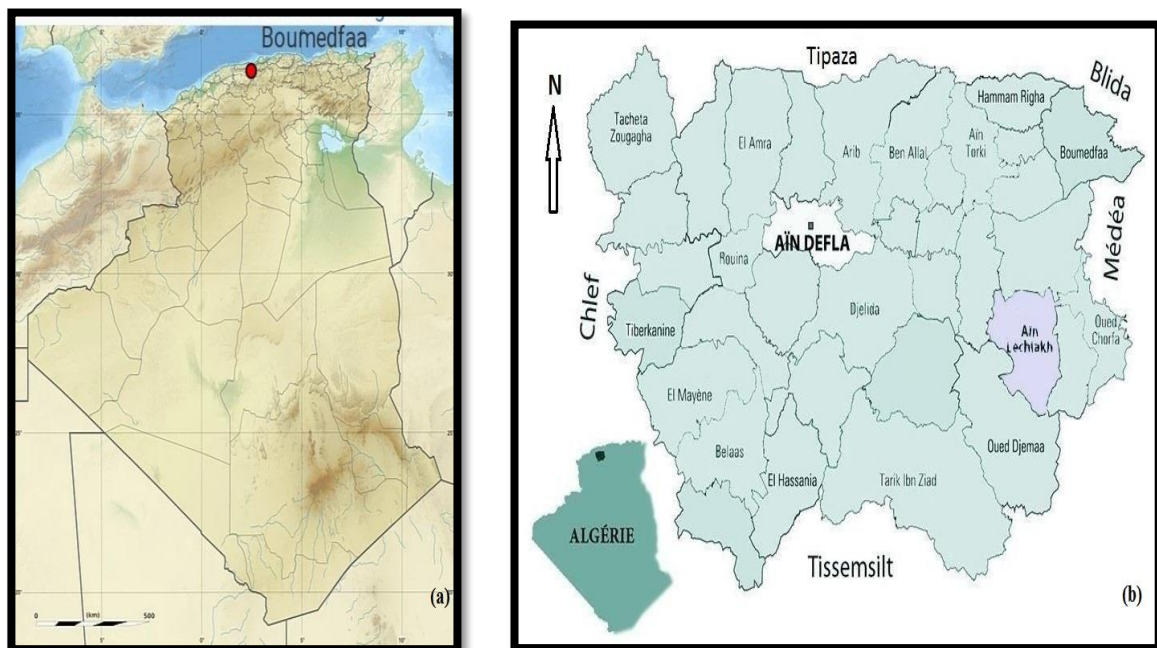


Figure II.2 : Carte géographique de la zone de récolte, Boumedfaa en Algérie

(ONS, 2008), (b) : Boumedfaa à la Wilaya de Ain Defla (DSA, 2014).

II.1.3. Matériel microbien

Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia* sont des souches cliniques fournies gracieusement par le 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 (Tableau II.1).

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

	Souches cliniques	Souches ATCC	
		Souche	Code
Gram positif	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2035
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	9372
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352

ATCC: American Type Culture Collection

II.2. Méthodes

Les différentes étapes de notre étude sont résumées dans le plan ci-dessous :

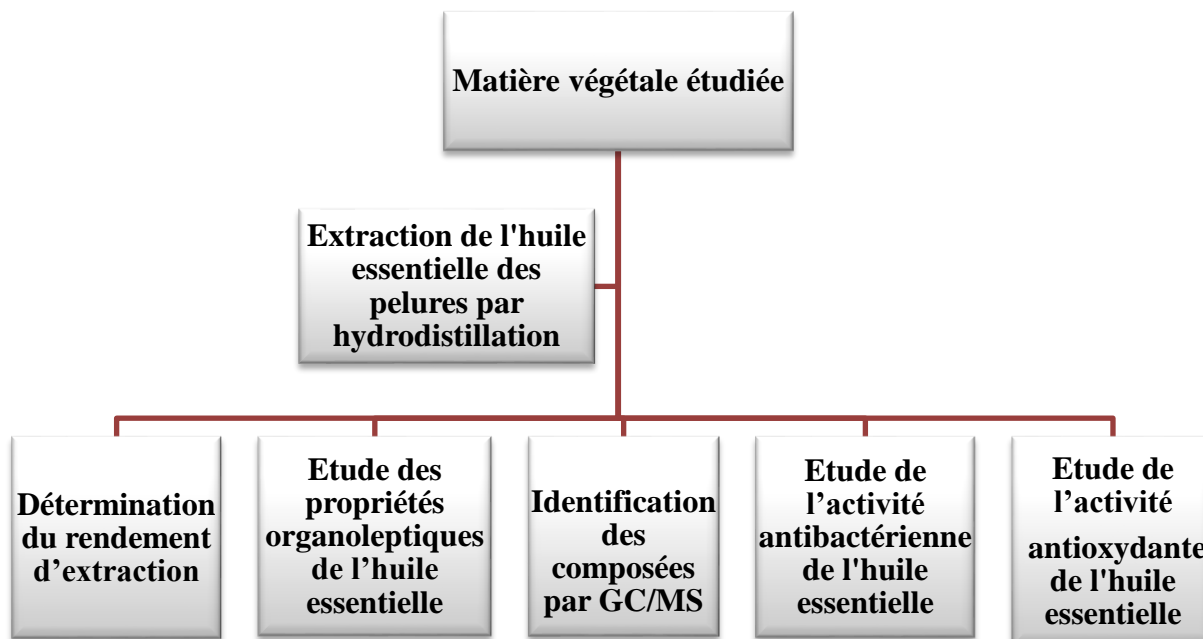


Figure II.3 : Schéma représentatif des différentes étapes de l'expérimentation

II.2.1. Extraction de l'huile essentielle

Les fruits nouvellement récoltés sont soigneusement nettoyés, puis épluchés manuellement pour obtenir les pelures.

L'extraction par hydrodistillation a été réalisée en utilisant un dispositif de type Clevenger pendant 4h selon le mode d'extraction suivant :

- Une quantité de 500 grammes des pelures de *Citrus aurantiifolia* sont placées en contact direct avec 1000 ml d'eau distillée dans un ballon de 2 L.
- Le ballon a été positionné sur un chauffe-ballon et la température a été réglée à 100°C.
- Les vapeurs produites sont condensées sur la surface froide du réfrigérant.
- Les extraits de distillation sont récupérés dans une ampoule à décanter en verre et au même temps la phase aqueuse est séparée de la phase huileuse par décantation (Figure II.4).



Figure II.4 : Dispositif d'hydrodistillation Clevenger (Original, 2024).

II.2.2. Conservation de l'huile essentielle

L'huile essentielle extraite est stockée dans un flacon en verre opaque hermétiquement fermé, et conservé au réfrigérateur à une température de $+4^{\circ}\text{C}$. Cela permet de la protéger de l'air, de la lumière et des variations de température (Figure II.5).



Figure II.5 : Conservation de l'huile essentielle (Original, 2024)

II.2.3. Teneur en eau

La détermination de la teneur en eau a été réalisée par séchage de trois échantillons de 10g des pelures de *Citrus aurantiifolia* à l'étuve à 60°C pendant 48 à 60 heures. Les échantillons ont été pesés, à des intervalles de temps réguliers, jusqu'à l'obtention de poids constants (Ghanmi et *al.*, 2010).

La teneur en eau est évaluée selon la formule suivante :

$$\text{TE}\% = \frac{m_f - m_s}{m_f} \times 100$$

Avec :

m_f : Masse des pelures utilisées à l'état frais en gramme

m_s : Masse des pelures à l'état sec en gramme

TE% : Teneur en eau en pourcentage

II.2.4. Détermination du rendement en huile essentielle

Selon la norme AFNOR, (1986), Le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la relation suivante :

$$R_{HE} = (M'/M) \times 100$$

Avec :

R_{HE} : Rendement en huile essentielle en pourcentage

M' : Masse de l'huile essentielle recueillie en gramme

M : Masse des pelures utilisées en gramme

II.2.5. Analyse de l'huile essentielle

II.2.5.1. Détermination des propriétés organoleptiques

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

II.2.5.2. Potentiel d'Hydrogène pH

Pour cette mesure, quelques gouttes de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* ont été introduites sur papier pH. Après le changement de couleur, la couleur du papier est comparée avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH.

II.2.5.3. Densité relative

Selon ISO 279, (1981), La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C. La formule est la suivante :

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

Avec :

m_0 : Masse du pycnomètre vide (en gramme)

m_1 : Masse du pycnomètre rempli d'eau distillée (en gramme)

m_2 : Masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle (en gramme)

a. Mode opératoire

Pour déterminer la densité relative en suivant la méthode pycnométrique de référence ISO 279, (1981), Tout d'abord, le pycnomètre vide est pesé. Ensuite, il est successivement rempli avec des volumes égaux (1 ml) d'huile essentielle et d'eau distillée, puis pesé à nouveau (Figure II.6).

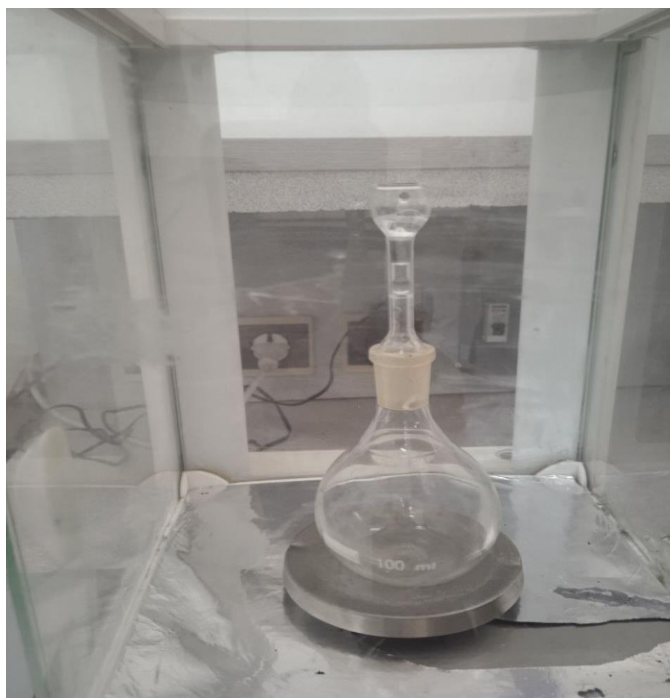


Figure II.6 : Pycnomètre (Original, 2024).

II.2.5.4. Analyse chromatographique de l'huile essentielle

Cette étape a été réalisée pour la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia*. L'analyse a été effectuée par couplage CG-MS qui est une technique de séparation chromatographique et d'identification qui résulte de l'alliance entre la chromatographie phase gazeuse (CG) et la spectrophotométrie de masse (MS) (Alili et *al.*, 2022) (Figure II.7).

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrophotométrie de masse est une technique analytique puissante qui possède plusieurs atouts : la chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les composants d'un mélange, tandis que la spectrophotométrie de masse fournit le spectre de masse de chacun des constituants en facilitant souvent leur identification (Aissaoui et *al.*, 2018).

Les constituants de l'huile essentielle sont identifiés en comparant les spectres de masse de chaque pic séparé par CG à ceux disponibles sur une bibliothèque de standards. Les indices de rétention calculés pour chaque composé sont comparés aux indices cités dans la littérature (Adams, 2001).

L'analyse a été menée selon les conditions opératoires suivantes :

Tableau II.2: Conditions opératoires de la CG-MS

Injecteur AOC-20i	Colonne GC-2010	Détecteur de masse
-Température : 250°C -Mode d'injection : Splitless	- Débit de GV : 1 ml/ min -Température de four : 40°C Pendant 1 min, 6°C/ min jusqu'à 250°C isotherme pendant 3min - Durée d'analyse : 35 min - Gaz vecteur : Hélium	- Mode d'analyse Q3 Scan (45 à 400) - Solvant utilisé : méthanol - Délai du solvant : 3 min - Température de l'interface : 250 °C - Température de la source : 200°C -Type d'ionisation : impact électronique - Intensité de filament : +0.20 KV



Figure II. 7 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrophotométrie de masse (Original, 2024).

II.2.6. Etude de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des deux phases, de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia*, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme pour la phase liquide et la méthode en phase vapeur (micro- atmosphère) pour la phase gazeuse (Bouchenak et *al.*, 2020).

II.2.6.1. Préparation des souches et ajustement de la charge bactérienne

Les espèces bactériennes à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu GN (gélose nutritif) puis incubées à 37°C pendant 24 heures au maximum.

A partir de ces boîtes, 2 à 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et mises dans 5 ml d'eau physiologique. La suspension bactérienne est homogénéisée au vortex. L'inoculum est ensuite ajusté avec un spectrophotomètre à 0.5 Mc Farland (10^8 UFC.ml) par lecture de densité optique à une longueur d'onde de 625nm (Chebaibi et *al.*, 2015).

II.2.6.2. Antibiogramme

Ce test a été effectué afin d'analyser l'antibiogramme des souches utilisées et le comparer avec l'effet de l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia*.

La technique employée était celle de la diffusion sur gélose, en utilisant le milieu de culture Mueller Hinton Agar. Après l'introduction de chaque culture bactérienne par ensemencement en stries sur la surface de la gélose, des disques d'antibiotique ont été déposés. Puis les boîtes ont été placées à l'incubateur à 37°C pendant 24 heures. Après la période d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque contenant l'antibiotique sont mesurés (Bouaoun et *al.*, 2007).

Tableau II.3 : Antibiotiques testés et leurs diamètres critiques (CASFM, 2011).

Souche	Antibiotique	Signes	Charge de disque (μg)	Diamètre critique (mm)		
				S (\geq)	I	R ($<$)
<i>Escherichia coli</i>	Gentamicine	GMN	10	18	16-17	16
	Ertapénène	ETP	10	28	26-27	26
	Amikacine	AKN	30	17	15-16	15
	Nitrofurantine	FTN	300	15	-	15
	Ciprofloxacine	CIP	5	25	22-24	22
	Cefazoline	CZN	30	18	12-17	12
	Amoxicilline+ Ac. clavulanique	AMC	30	23	16-22	16
	Amoxicilline	AX	25	23	16-22	16
	Céfoxitine	FOX	30	22	15-21	15
	Kanamycine	K	30	17	15-16	15
	Nétililmicine	NET	30	21	19-2	21
	Ticarcilline	TIC	75	24	22-23	22
	Pénicilline G	P	10	29	18-28	18
	Fosfomycine	FF	50	14	-	14
Céfotaxime	CT	10	26	23-25	23	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Amikacine	AKN	30	17	15-16	15
	Gentamicine	GMN	10	18	16-17	16
	Pénicilline	P	10	29	18-28	18
	Vancamycine	VAN	30	17	-	-
	Kanamycine	K	30	17	15-16	15
	Ticarcilline	TIC	75	24	22-23	22
	Nétililmicine	NET	30	21	19-20	19
	Céfoxitine	FOX	30	22	15-21	15
	Fosfomycine	FF	50	14	-	14
	Céfotaxime	CT	10	26	23-25	23
	Ticarcilline+ acide clavulanique	TCC	75/10	24	22-23	22

<i>Enterococcus faecalis</i>	Nitrofurantine	FTN	300	15	-	15
	Rifampicine	RIF	5	19	14-18	14
	Erythromycine	E	15	22	17-21	17
	Lévofloxicine	LVX	5	20	17-19	17
	Fosfomycine	FOS	200	14	-	14
	Ticarcilline	TIC	75	24	22-23	22
	Nétilmicine	NET	30	21	19-20	19
	Céfoxitine	FOX	30	22	15-21	15
	Imipénème	IMP	10	24	17-23	17
	Céfotaxime	CT	10	26	23-25	23
	Fosfomycine	FF	50	14	-	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ticarcilline	TIC	75	24	22-23	22
	Ticarcilline+ Ac.clavulanique	TCC	75	24	22-23	22
	Piperacilline G	P	10	29	18-28	18
	Céfoxitine	FOX	30	22	15-21	15
	Kanamycine	K	30	17	15-16	15
	Nétilmicine	NET	30	21	19-20	19
	Céfotaxime	CT	10	26	23-25	23
<i>Bacillus subtilis</i>	Kanamycine	K	10	29	18-28	18
	Céfotaxime	CT	10	22	15-21	15
	Pénicilline G	P	10	29	18-28	18
	Ticarcilline+ Ac clavulanique	TCC	75/10	24	22-23	22
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Imipénème	IMP	10	24	17-23	17
	Fosfomycine	FF	50	14	-	14
	Pénicilline G	P	10	29	18-28	18
	Céfoxitine	FOX	30	22	15-21	15
	Céfotaxime	CT	10	26	23-25	23

II.2.6.3. Méthode d'aromatogramme

L'évaluation de l'activité antimicrobienne se fait par la méthode d'aromatogramme, qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes à une huile essentielle donnée. Cette technique consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé approprié déjà solidifié et inoculé avec la souche microbienne à tester. Des disques absorbants stériles de 6mm de diamètre, préalablement imprégnés d'une quantité définie d'huile essentielle (10 μ l), sont ensuite placés à la surface de la gélose.

En fonction de la zone d'inhibition, les microorganismes sont généralement classés comme sensibles, intermédiaires ou résistants (Wilkinson, 2006).

La méthode repose sur l'inhibition de la croissance des microorganismes dans la boîte de Pétri après un laps des temps spécifique de contact entre le produit et le microorganisme cible (Himed et *al.*, 2016) (Figure II.8).

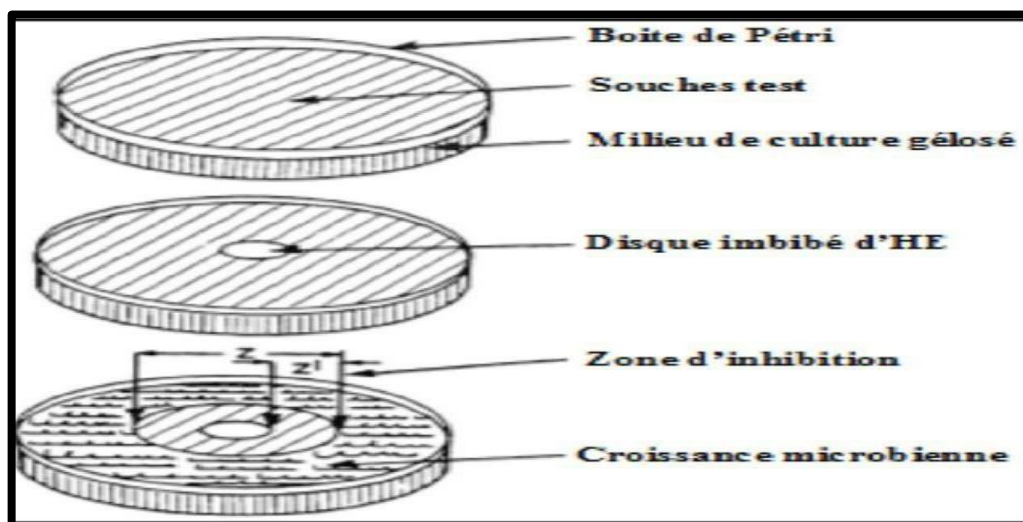


Figure II.8: Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Tyagi et *al.*, 2011).

Mode opératoire

Dans des conditions aseptiques, A partir d'une culture pure de 24 heures cultivée sur gélose nutritif, des suspensions contenant une concentration équivalente à 0.5 de l'unité Mc Farland (10^8 UFC/ml) de chacune des souches bactériennes à tester ont été préparées (Bachiri et *al.*, 2017).

Une quantité de 20 ml du milieu gélose Mueller- Hinton est versée dans chacun des boîtes de Pétri et laissée se solidifier. Après la solidification du milieu de culture, En utilisant un écouvillon stérile, des stries parallèles serrées ont été réalisées à la surface de la boîte de pétri. Cette opération a été répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque répétition. Ces stries ont été obtenues en introduisant l'écouvillon dans la suspension bactérienne et en l'essorant contre la paroi interne du tube.

A l'aide d'une pince stérile, un disque en papier de 6 mm est déposé sur l'agar, précédemment inoculé avec la souche choisie. Le disque avait déjà été imbibé par l'huile essentielle étudiée (10 μ l). Ensuite, chaque boîte a été fermée et incubée dans l'étuve à une température de 37°C pendant 24 à 48 heures (Benouaklil et *al.*, 2020),

L'activité antimicrobienne se traduit par la présence d'un halo d'inhibition autour du disque. La mesure du diamètre de ce halo fournit une indication qualitative de l'efficacité de l'inhibition selon la règle suivante :« plus le diamètre d'inhibition est grand, plus l'activité antimicrobienne de l'échantillon testé est significative » (Fontanay et *al.*, 2020).

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) mesuré à l'aide d'un pied à coulisse et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20 mm (Ouelhadj et *al.*, 2019).

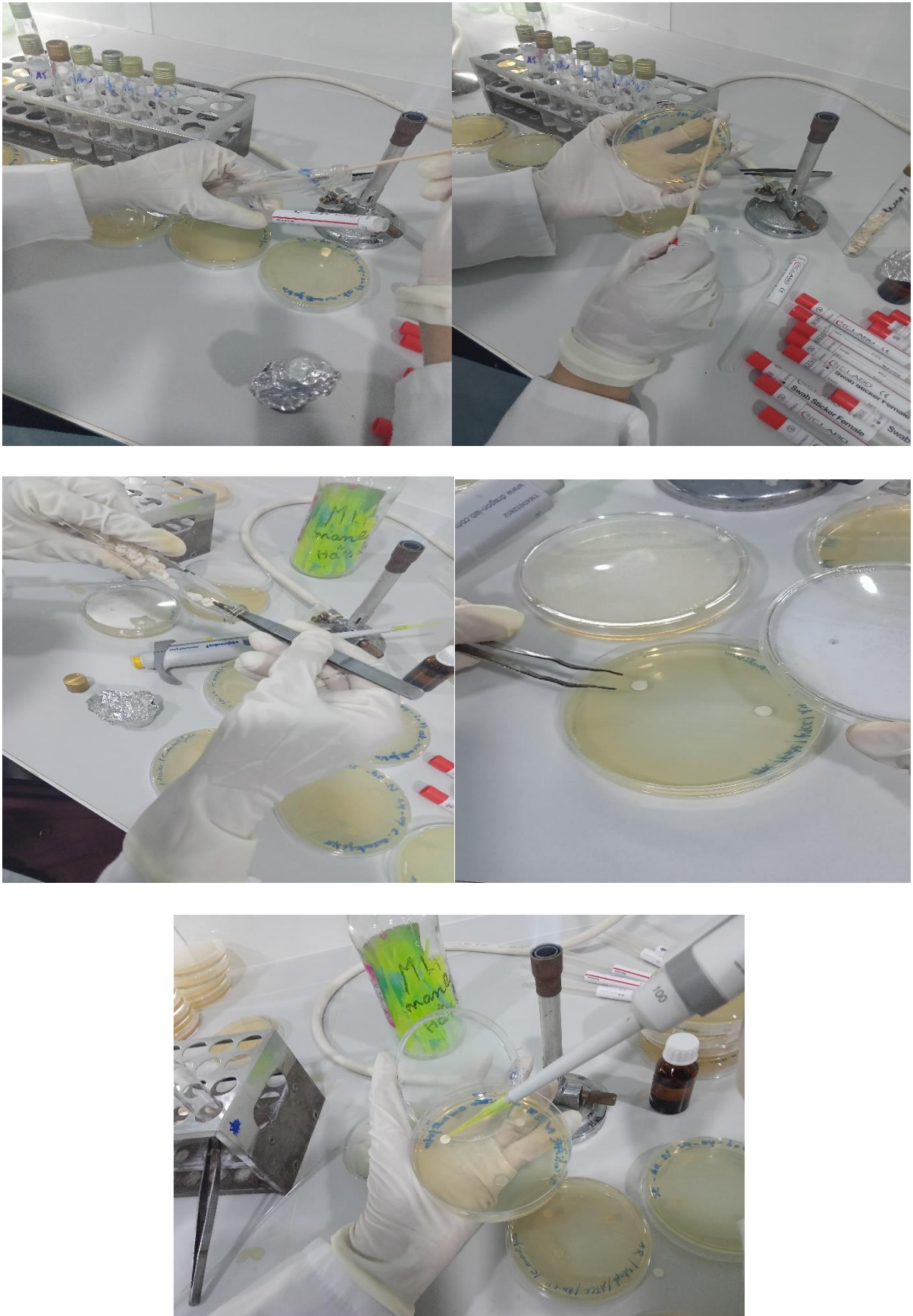


Figure II.9 : Aromatogramme (Original, 2024)

II.2.6.4. Méthode de micro- atmosphère

Contrairement à la première technique d'aromatogramme qui est basée sur le contact direct de l'huile essentielle dans sa globalité avec les cultures bactériennes étudiées, la méthode de micro-atmosphère repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de la fraction volatile de cette huile, à une température d'incubation donnée, sur la croissance bactérienne (Laghchimi et *al.*, 2014) (Figure II.10).

Une quantité de 20 ml d'Agar Muller Hinton est versée dans des boîtes de Pétri, puis la suspension bactérienne à tester est étalée en surface après solidification du milieu par des stries parallèles serrées. Un disque stérile de papier filtre (6 mm) imbibé de 10 μ l d'huile essentielle de pelure de *Citrus aurantiifolia* est placé au centre du couvercle de chaque boîte. Les boîtes sont ensuite scellées avec du parafilm, avec les dépôts positionnés de manière inversée sur le couvercle. Elles sont incubées à 37 °C pendant 24 heures dans une étuve, permettant aux composés volatils d'atteindre les souches bactériennes (Bouguerra et *al.*, 2014).

Le test de micro-atmosphère a été répété avec un disque de papier de 12 mm imprégné par 50 μ l de l'huile essentielle étudiée (Adjovi et *al.*, 2022).

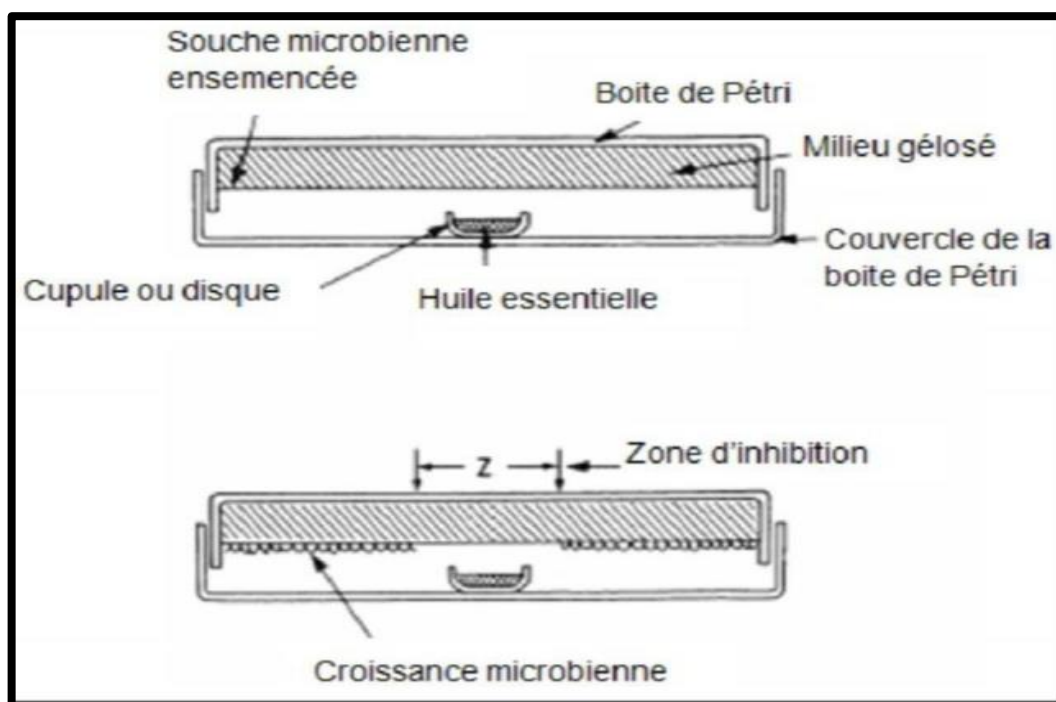


Figure II.10 : Illustration de la méthode de micro-atmosphère (Tyagi et *al.*, 2011).

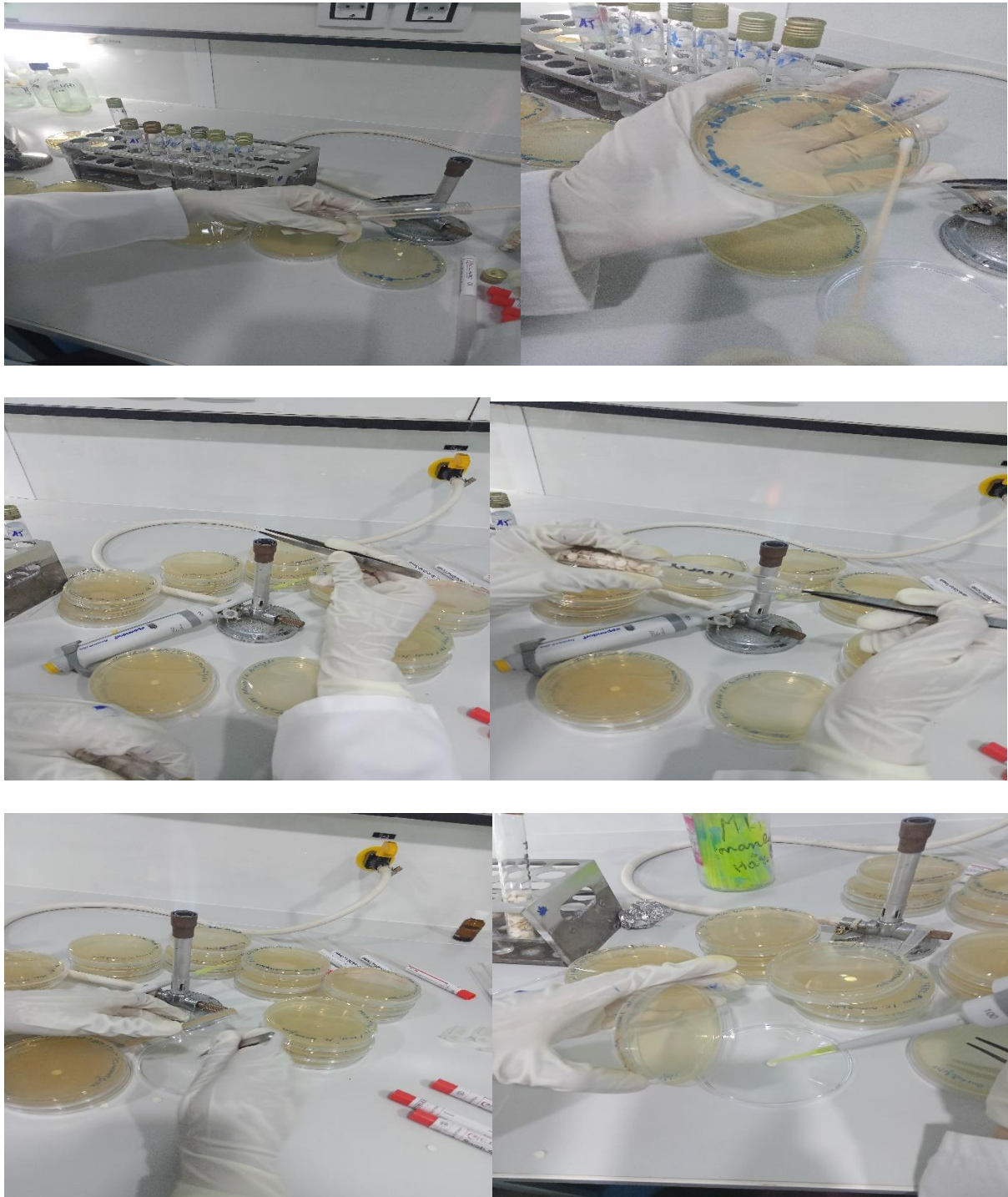


Figure II.11 : Micro-atmosphère (Original, 2024)

II.2.7. Etude de l'activité antioxydante

II.2.7.1. Test de DPPH

a. Principe

La méthode de la mesure du pouvoir antioxydant par DPPH repose sur la capacité d'un composé à réduire le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picarylhydrazyl). La réduction se traduit par le changement de couleur de la solution du violet foncée au jaune. La réaction est alors quantifiée en mesurant l'absorbance de la solution par la spectrophotométrie à 517 nm (Merouane *et al.*, 2014) (Figure II.12).

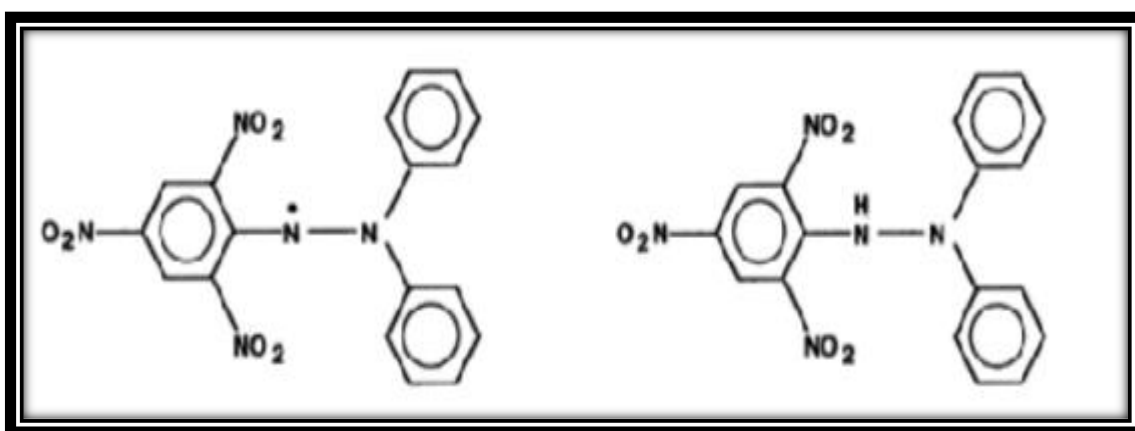


Figure II.12 : Structure du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle de sa forme réduite, la 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (Molyneux, 2004)

b. Mode opératoire

La méthode utilisée pour l'évaluation de pouvoir antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* est celle décrite par SHARMA *et al.*, (2013) avec quelques modifications.

Une solution de 0.004% (0.004g/100 ml) de DPPH dilué dans l'éthanol a été préparée et utilisée juste après sa préparation.

Un volume de 500 µl de notre huile essentielle est dissout dans 1 ml d'éthanol (CH₃OH), à partir de ce mélange sept tubes de différentes concentrations (10 µg /ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 125 µg/ml) ont été préparés, puis 1 ml d'éthanol et 1ml de solution éthanolique de DPPH (0,004 g/ 100ml) ont été ajoutés dans chaque concentration des solutions à l'huile essentielle. Le contrôle négatif (banc) est ensuite préparé en mélangeant 1 ml de l'éthanol avec 1 ml de solution éthanolique de DPPH.

Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est présenté par l'acide ascorbique (antioxydant standard) et le BHT dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH (%) est calculé par la formule suivante (Khoudali et al., 2014) :

$$PI\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}$$

Avec :

A_{blanc} : Absorbance du blanc

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon

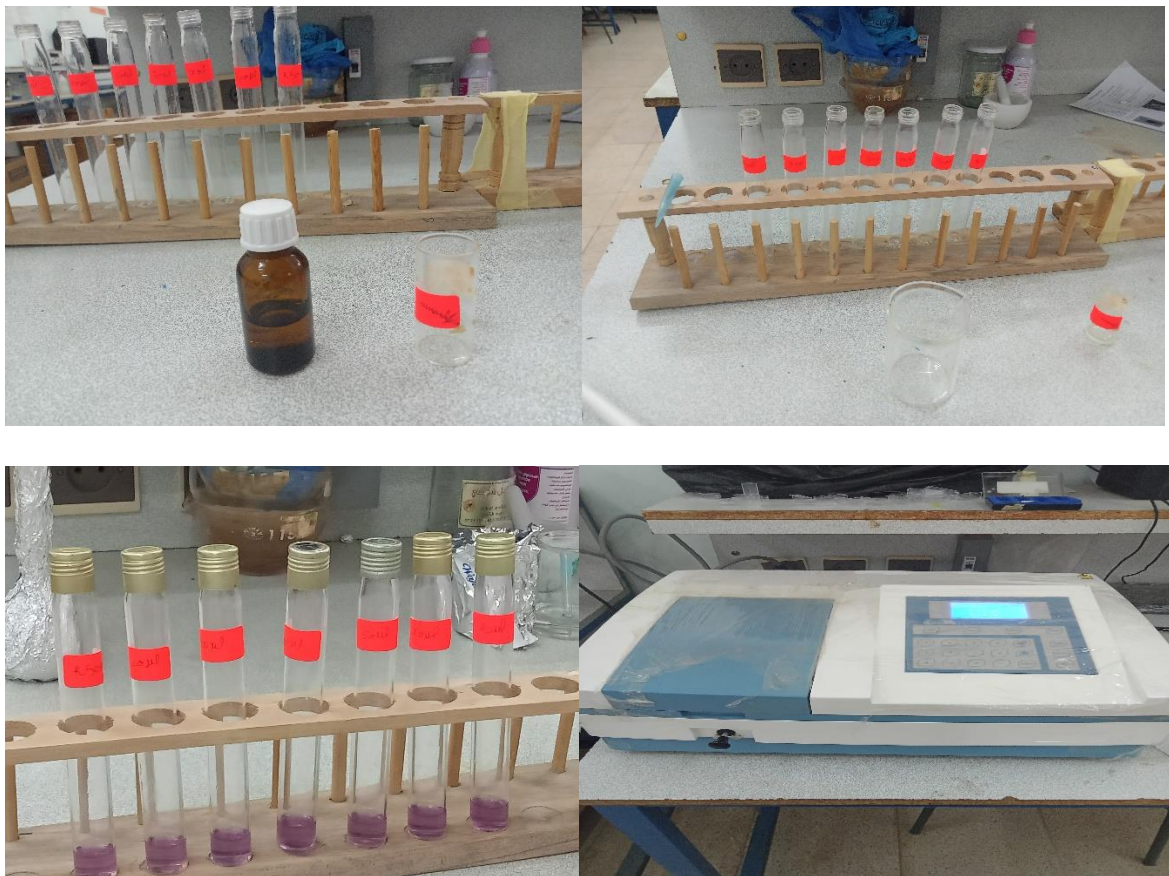


Figure II.13 : Test de DPPH (Original, 2024).

A- Détermination de la concentration efficace à 50% (CE₅₀)

La CE₅₀ est la concentration correspondante à l'inhibition de 50% des radicaux de DPPH (DIOP et *al.*, 2021). Ce paramètre est déterminé graphiquement par la régression linéaire (Bougandoura et *al.*, 2013).

II.2.7.2. Test de FRAP

a. Principe

Le pouvoir réducteur est basé sur la capacité d'un composé à réduire le Fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe (CN)₆ en Fer ferreux (Fe²⁺). Le Fer ferrique initialement jaune, se réduit et devient bleu ou vert en présence d'un atome d'électron. Le changement de couleur de jaune à bleu ou vert est proportionnel à l'activité antioxydante (Habibou et *al.*, 2019).



b. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur du Fer (Fe³⁺) de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* est déterminé selon la méthode décrite par OYAIZU, (1986) :

Un volume de 1 ml de chacune des solutions éthanoliques d'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* préparées précédemment 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 d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH=6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe (CN)₆ à 1%. L'ensemble est incubé à 50°C pendant 20 min, ensuite 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Puis, 2.5 ml de surnageant est mélangé avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution FeCl₃ à 0.1%. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 700 nm, le blanc est semblablement préparé, en remplaçant l'échantillon d'huile essentielle par l'eau distillée.

Le contrôle positif est présenté par l'acide ascorbique (antioxydant standard) et le BHT dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Etude analytique

III.1.1. Teneur en eau

Les pelures de *Citrus aurantifolia* ont présenté une teneur en eau moyenne de 81,13% \pm 0,68 (annexe 2), ceci signifie que la teneur en matière sèche représente 1/4 seulement du poids total des pelures. Ces résultats sont présentés sur la figure III.1.

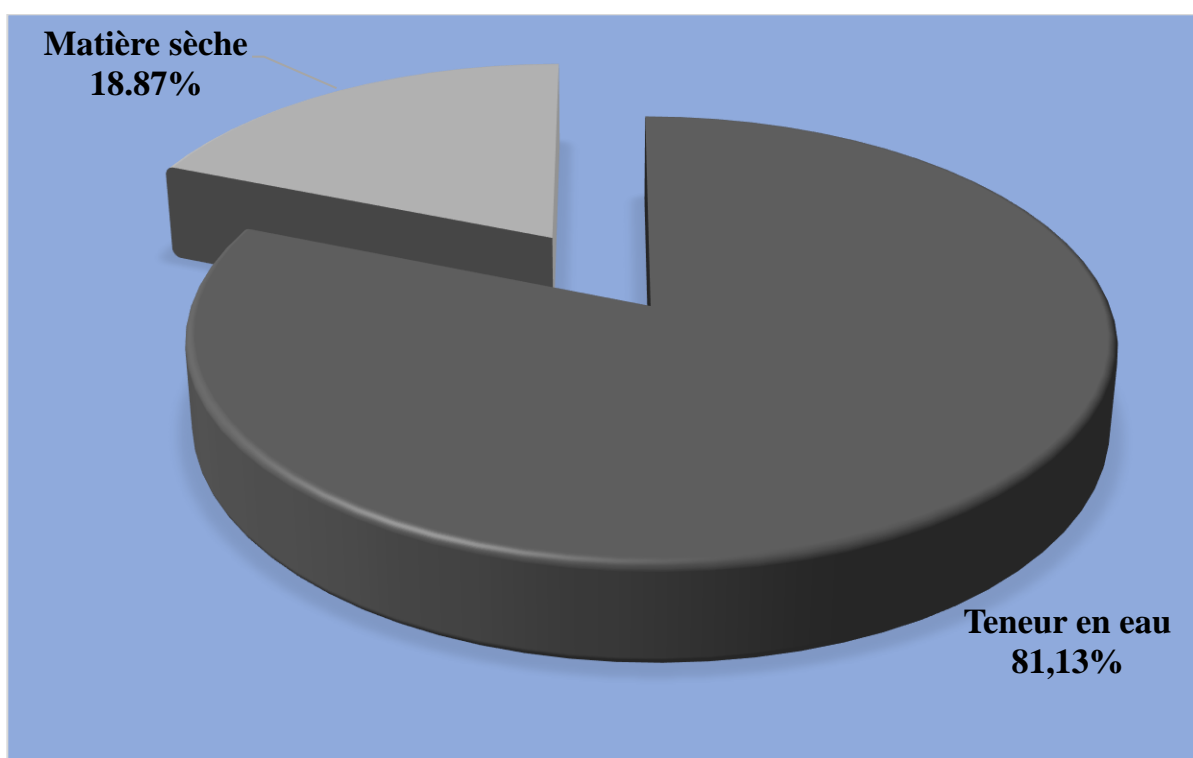


Figure III.1: Teneur en eau et en matière sèche de *Citrus aurantifolia*

III.1.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyenne en huile essentielle étudiée obtenue par hydrodistillation est calculé à partir de la matière sèche des pelures de *Citrus aurantifolia*. Ce rendement est en moyenne de 2,74% \pm 0,39 (annexe 03).

Comparant avec d'autres travaux, notre rendement a été légèrement plus important par rapport à celui obtenu par OUSSOU et *al.*, (2017) au Côte d'Ivoire et par JANTAN et *al.*, (1996) au Malaisie qui ont fait une étude sur l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* extraite par la méthode d'hydrodistillation, où le rendement était de 1.5%.

Une autre étude de AKONO-NTONGA et *al.*, (2016) sur l'huile essentielle des péricarpes de *Citrus aurantifolia* du sud de Cameroun extraite par hydrodistillation a dévoilé un rendement de 0.32%. Ce rendement est très inférieur au notre résultat.

Notre résultat est proche de celui obtenu par LEMES et *al.*, (2018) au Brazil, qui ont travaillé sur l'huile essentielle des écorces de *Citrus aurantifolia* extraite par hydrodistillation, et dont le rendement était de 3%.

Ces différences sont dû à plusieurs facteurs, dont l'interaction de la plante avec l'environnement (climat, sols...etc), la période de récolte, les pratiques culturelles et l'âge du matériel végétal (Sammama et *al.*, 2021).

III.1.3. Caractères organoleptiques de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* obtenue par hydrodistillation par un appareil de type Clevenger, est d'un aspect liquide, de couleur jaune très pâle avec une odeur forte, aromatique, fraîche et citronnée (Figure III.2).

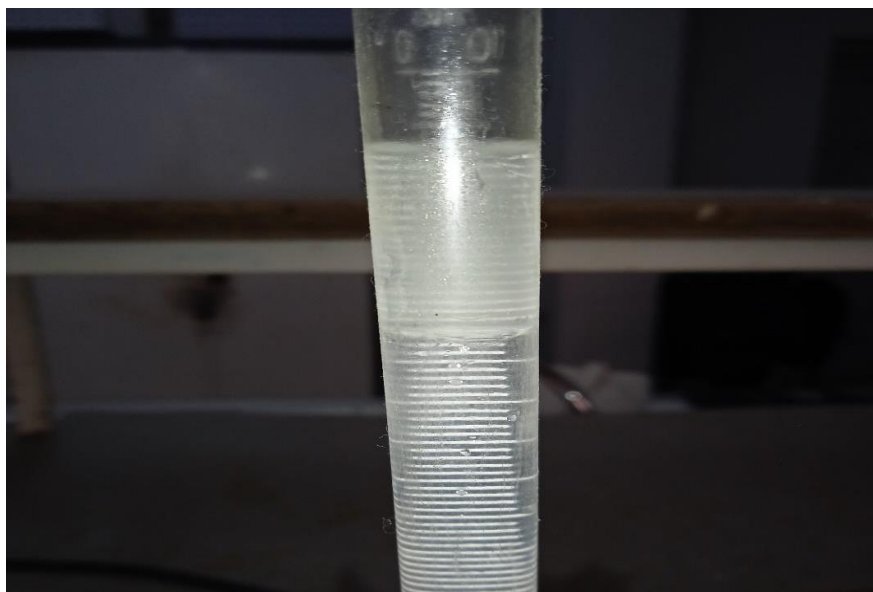


Figure III.2: Huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (Originale, 2024).

Tous les caractères organoleptiques (aspect, couleur, odeur) sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III.1: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

	Aspect	Couleur	Odeur
Huile essentielle de notre étude	Liquide, mobile	Jaune très pâle	Forte, aromatique, fraîche, Citronnée
Norme AFNOR	Liquide, mobile	Jaune pâle a jaune verdâtre	Fraiche caractéristique de lime, agréable et persistante

D'après les résultats présentés dans le tableau III.1, l'aspect, le couleur et l'odeur de l'huile essentielle étudiée sont conforme aux normes AFNOR, (2005).

Ces caractéristiques sont plus ou moins en accord avec celles rapportées par plusieurs auteurs :

Selon PUSPITA et *al.*, (2020), l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* Indonésien obtenu par hydrodistillation est caractérisée par une odeur aromatique et fraîche avec une couleur jaune pâle.

Les travaux effectués par GAMARA et *al.*, (2006) au Brésil sur l'huile essentielle de la même partie et par la même méthode, ont dévoilé une huile cristalline, de couleur jaune et d'odeur fraîche et piquante.

III.1.4. Détermination du pH

Le potentiel d'Hydrogène de l'huile essentielle étudiée est de 5.5.

D'après le résultat, nous déduisons que le pH de l'huile essentielle des pelures de *Citrus aurantifolia* est acide (PH < 7).

Ce résultat concorde avec celui obtenu par OUSSOU et *al.*, (2017) sur l'huile essentielle des zestes *Citrus aurantifolia* obtenue par la méthode d'hydrodistillation au Code d'Ivoire (pH=5.5).

III.1.5. Densité relative

La densité relative de notre huile essentielle est de 0.7953 (Figure III.3) (annexe 4).

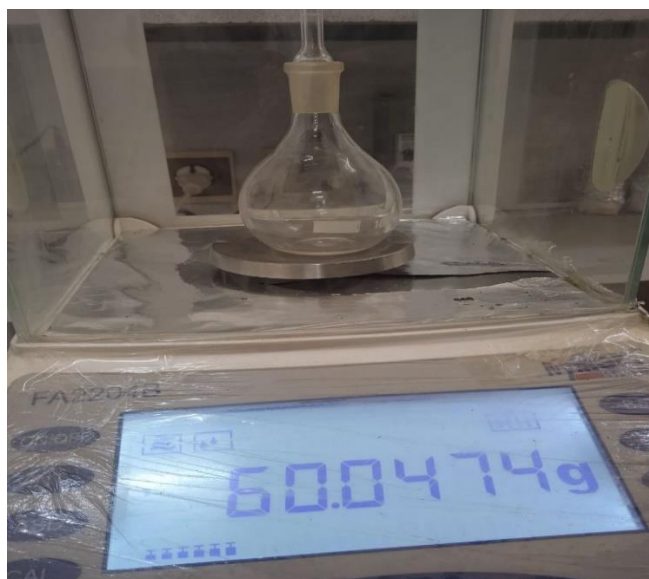


Figure III.3 : Pycnomètre rempli d'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (Originale, 2024).

Selon ISO 3519, (1997), notre résultat est légèrement inférieur au seuil minimal de l'intervalle estimé de 0.856. Cette différence peut être expliquée par la maturité des fruits de *Citrus aurantifolia* étudiés et les conditions climatiques.

III.2. Composition chimique

La composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a été déterminée en utilisant la CG/MS. Les pourcentages (%) et les indices de rétention (IR) des composants de l'huile identifiée sont présentés dans le tableau III.2 et la figure III.5.

Tableau III.2: Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

N°	Composé	Formule chimique	Classe chimique	Huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	
				TR (min)	(%)
1	Limonène	C ₁₀ H ₁₆	Hydrocarbure monoterpénique	10.338	33.26
2	β-pinène	C ₁₀ H ₁₆	Hydrocarbure monoterpénique	8.487	12.27
3	γ-terpinène	C ₁₀ H ₁₆	Hydrocarbure monoterpénique	10.823	8.44
4	α-pinène	C ₁₀ H ₁₆	Hydrocarbure monoterpénique	7.263	4.36
5	β-myrcène	C ₁₀ H ₁₆	Hydrocarbure monoterpénique	8.704	4.20
6	α-Bisabolène	C ₁₅ H ₂₄	Hydrocarbure sesquiterpénique	21.473	2.87

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a révélé la présence de 100 composés avec un taux de reconnaissance de 100%. Ces composés ont été divisés en cinq classes : hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, phénols et cétones), hydrocarbures sesquiterpéniques, sesquiterpènes oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, cétones) et d'autres composés.

Comme le montre le tableau précédent, les constituants majoritaires de l'huile essentielle des pelures de *Citrus aurantifolia* sont : le limonène (32.26%), le β-pinène (12.27%), le γ-terpinène (8.44%), le α-pinène (4.36%), le β-myrcène (4.20%), le α-Bisabolène (2.87%), le β-citronellol (2.60%), le Nérol (2.36%), le Citral (2.35%) et le α-bergamotène (2.02%).

Cette huile est caractérisée par un pourcentage très élevé d'hydrocarbures monoterpéniques qui représente la classe prédominante avec un pourcentage de 66.05% suivi

par les monoterpènes oxygénés (19.38%). Par ailleurs, les hydrocarbures sesquiterpéniques ne représentent que 10.23%.

Selon VENKATESHWARLU *et al.*, (2000), l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* récoltée de l'Inde obtenue par hydrodistillation se compose principalement d'hydrocarbures monoterpéniques (57.5%). Elle contient environ 16.9% d'alcool et 8.2% d'aldéhydes. Le composant le plus abondant était le limonène (33%) suivi par le β -pinène (13.5%) et le α -terpinène (7.9%).

D'après les travaux de SAPADRO *et al.*, (2012) en Italie, l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* extraite par hydrodistillation est un mélange complexe d'hydrocarbures monoterpéniques, d'hydrocarbures sesquiterpéniques, des monoterpènes oxygénés, de sesquiterpènes oxygénés, d'aldéhydes monoterpéniques, d'alcools monoterpéniques, de cétones monoterpéniques, d'esters monoterpéniques, d'alcools sesquiterpéniques et d'aldéhydes aliphatiques avec une prédominance des hydrocarbures monoterpéniques (89.3%).

D'autre part, l'huile essentielle des zestes *Citrus aurantifolia* obtenue par la méthode d'hydrodistillation au Côte d'Ivoire analysée par OUSSOU *et al.*, (2017) se compose principalement de monoterpènes hydrocarbonés (90,06%). Elle contient environ 8,34% de monoterpènes oxygénés, 0,35% de sesquiterpènes oxygénés et 0,22% des hydrocarbures sesquiterpénique. Les principaux constituants de l'huile étaient le limonène (79.5%), le cis-hydrate de sabinène (8.5%) et le α -terpinéol (5.1%).

Beaucoup de travaux ont révélé la prédominance de limonène. Selon GHISHOLM *et al.*, (2003), l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* isolée du sud de Floride (USA) se compose principalement de limonène (32.6%), d' α -terpineol (12.5%) et de β -pinène (6.3%). Tandis que, PERMADI *et al.*, (2024) ont trouvé que la composition de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* indonésien obtenue par hydrodistillation est représentée principalement par le limonène dont le taux est de 29.69%, suivi par le β -pinène à 26.31% et le Citral à 9.94%.

D'après HAZRULRIZAWATI *et al.*, (2020), les trois constituants principaux de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* en Malaisie extraite par la méthode d'hydrodistillation sont : le limonène (19.58%) suivi de β -pinnène (17.12%) et de géraniol (13.23%).

III.2. Activité antibactérienne

III.2.1. Antibiogramme

Les souches bactériennes utilisées dans notre étude expérimentale ont été soumises à un test d'antibiogramme afin de déterminer leurs sensibilités et leurs résistances à différents antibiotiques, comme le montre la figure (III.5) et le tableau (III.3) et l'annexe 05 :

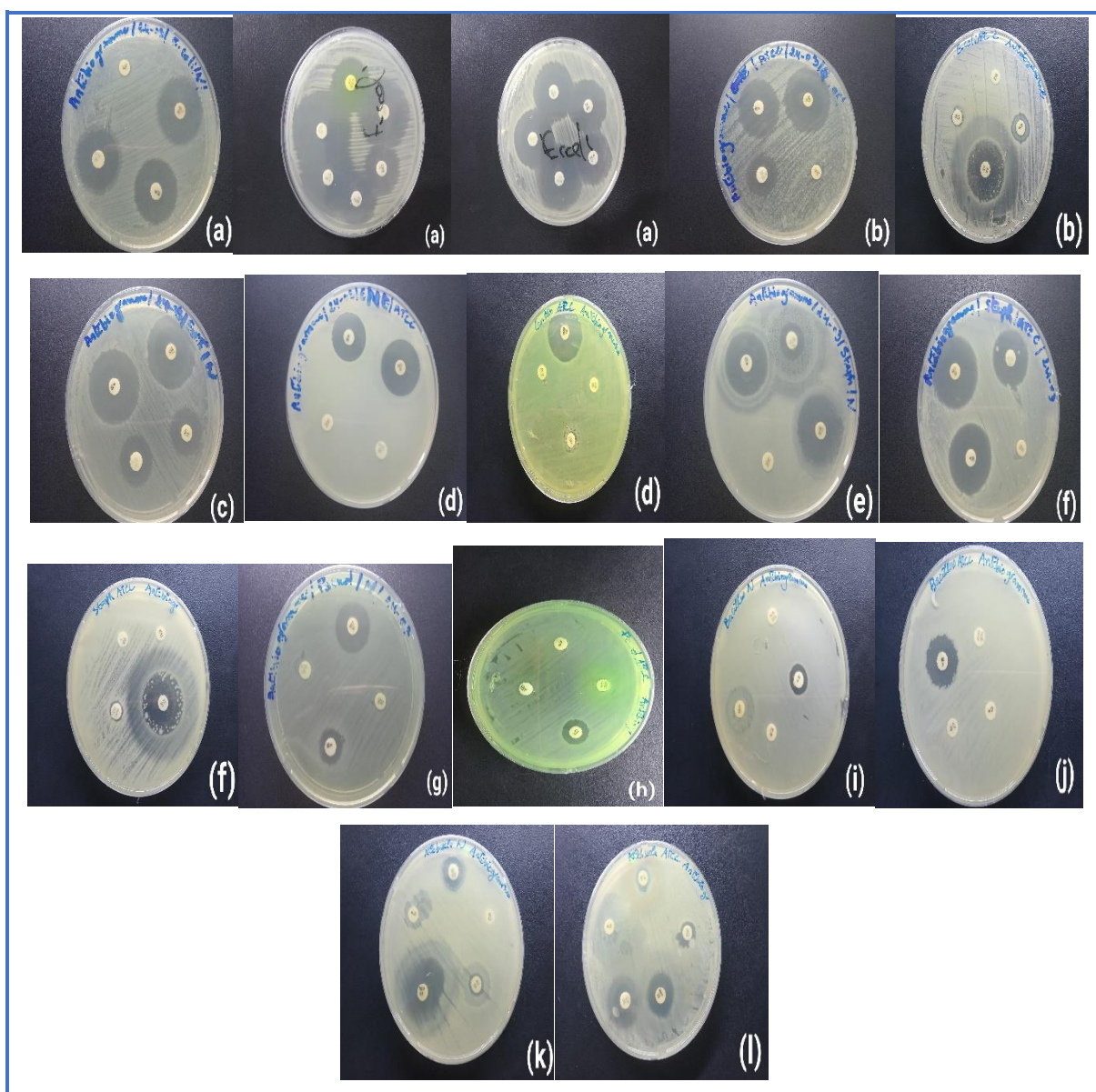


Figure III.5 : Résultats d'antibiogramme (Originale, 2024).

Souches bactériennes : (a) : *Escherichia coli* (souche clinique) ; (b) : *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; (c) : *Enterococcus faecalis* (souche clinique); (d) : *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) ; (e) : *Staphylococcus aureus* (souche clinique) ; (f) : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; (g) : *Pseudomonas aeruginosa* (souche clinique) ; (h) : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; (i) : *Bacillus subtilis* (souche clinique) ; (j) : *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) ; *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) ; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352).

Le guide utilisé pour déterminer la sensibilité ou la résistance des bactéries aux antibiotiques, est celui de la Société Française de la Microbiologie qui a grâce au comité de l'antibiogramme (CA-SFM), définit les valeurs critiques permettant de classer les antibiotiques en différentes catégories chimiques en 2011.

Tableau III.3: Sensibilité des souches bactériennes testées aux antibiotiques

	Souches ATCC	Antibiotique	Sensibilité	Souches cliniques	Antibiotique	Sensibilité
Bactéries à Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 2035)	TIC	R	<i>Enterococcus faecalis</i>	TIC	R
		K	S		K	S
		FOX	R		FOX	I
		NET	S		NET	S
		FF	R		FOS	S
		CT	R		FTN	S
		IMP	S		RIF	S
		CX	I		E	S
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	TIC	R	<i>Staphylococcus aureus</i>	LVX	S
		K	S		TIC	R
		FOX	S		K	S
		NET	S		FOX	I
		TCC	R		NET	S
		CT	R		P	I
		FF	S		GMN	S
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 9372)	TCC	R	<i>Bacillus subtilis</i>	AKN	S
		CT	R		VAN	S
		P	R		TCC	R
K		I	CT		R	
Bactéries à Gram-	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	TIC	R	<i>Escherichia coli</i>	K	R
		FOX	I		NET	S
		K	S		FTN	S
		NET	S		GMN	S
		CT	R		AKN	S
		P	R		ETP	S
		FF	S		CIP	S
					CZN	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352)	CT	R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMC	S
		P	R		AX	S
		FF	R		CT	R
		IMP	R		P	R
		CX	I		FF	R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	TIC	R	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP	I
		TCC	R		CX	I
		P	R		TIC	R
		CT	R		FOX	R
					K	R
				NET	S	

R : résistant ; I : intermédiaire ; S : sensible ; TIC :Ticarcilline ; K : Kanamycine ; FOX :Céfoxitine ;TCC :Ticarcilline+ Acide clavulanique; NET : Nétilmicine; CT : Céfotaxime; FF :Fosfomycine; P :Pénicilline; AKN : Amikacine; IMP : Imipénème; CX : Céfoxitine ; FOS : Fosfomycine; FTN : Nitrofurantine ; RIF: Rifampicine ; E : Erythromycine; LVX : Lévofloxicine ;GMN : Gentamicine ; VAN :Vancamycine; ETP : Ertapénème; CIP :Ciprofloxacine; CZN : Céfazoline; AMC : Amoxicilline+ Acide calvulanique ; AX :Amoxicilline.

Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches présentent des zones d'inhibitions très importantes suite à l'effet de la plupart des antibiotiques, avec des diamètres variants entre 20 mm et 35 mm.

Les antibiotiques qui ont donnés les zones d'inhibition les plus grandes sont les suivants : Ertapénème (ETP) et Ciprofloxacine (CIP) contre *Escherichia coli* clinique (35 mm, 31mm respectivement), Amikacine contre *Staphylococcus aureus* clinique (32 mm). Par ailleurs, l'antibiotique de Ticarcilline (TIC) exerce un effet presque nul contre toutes les souches bactériennes testées.

Nous constatons d'après les résultats du tableau III.3 que les bactéries à Gram positif testées ont présentées une sensibilité plus importante que les bactéries à Gram négatif. Ceci est due à la membrane externe de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif qui semble agir comme une barrière contre de nombreuses substances, notamment les antibiotiques (Akthar et *al.*, 2014).

Selon SYLVIE, (2009), l'apparition et la diffusion de la résistance aux antibiotiques résultent d'un usage non sélectif des agents antimicrobiens ainsi que la transmission des microorganismes résistants.

La résistance des souches bactériennes est soit naturelle soit acquise, et la résistance aux antibiotiques varie d'une bactérie à l'autre et n'est pas identique non plus pour la même bactérie face à tous les antibiotiques. Par exemple, *Staphylococcus aureus* a rapidement développé une résistance à la pénicilline dès son introduction autant que médicament en 1943, et aujourd'hui, près de 90% des souches sont résistantes à la Pénicilline. De plus, le taux de résistance peut varier d'un pays à l'autre (Daniel et *al.*, 2023).

III.2.2. Aromatogramme

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle de *Citrus aurantifolia* sur douze souches bactériennes a été faite par la méthode d'aromatogramme et les résultats obtenus par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (mm) des disques imprégnés d'huile essentielle étudiée après 24 heures d'incubation à 37°C sont résumés dans le tableau 04, le tableau de l'annexe 06 et la figure (III.6).

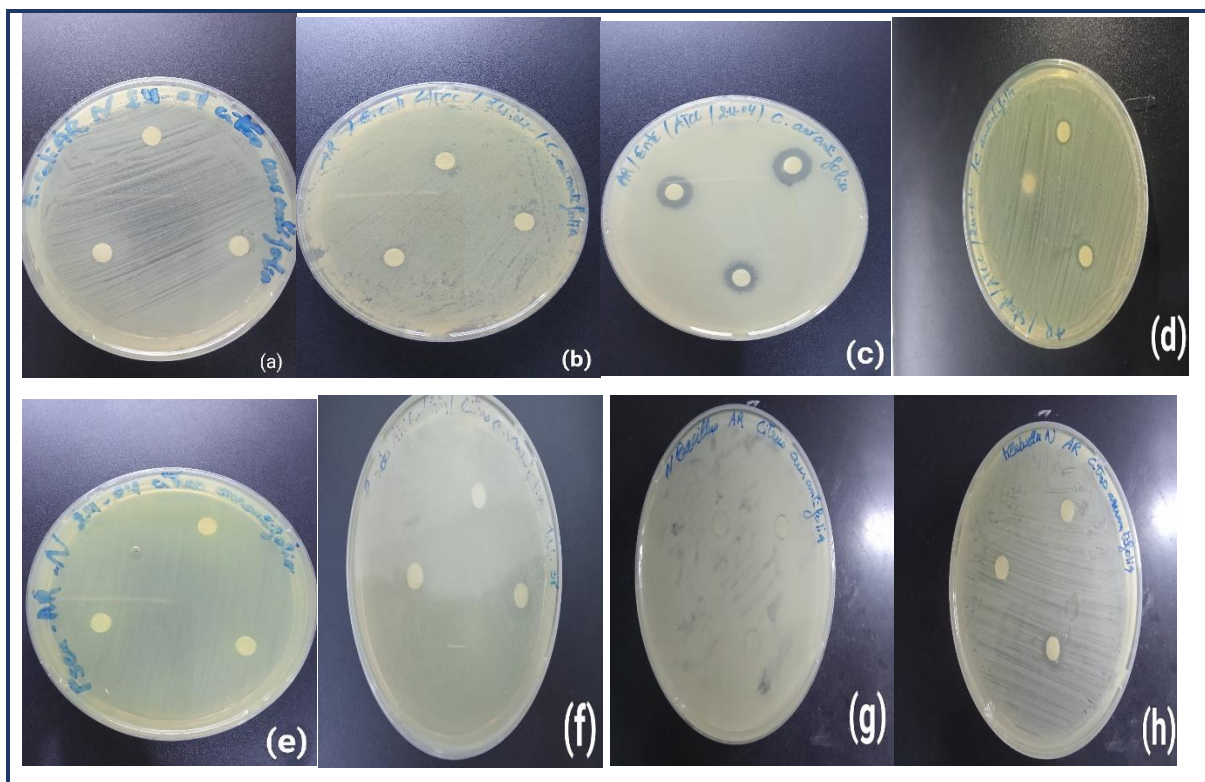


Figure III.6: Résultats d'aromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (Originale, 2024).

Souches bactériennes : (a) : *Escherichia coli* (souche clinique) ; (b) : *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; (c) : *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) ; (d) : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; (e) : *Pseudomonas aeruginosa* (souche clinique) ; (f) : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; (g) : *Bacillus subtilis* (souche clinique) ; (h) : *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique).

Selon PONCE et *al.*, (2018), l'huile essentielle est classée respectivement en fonction du diamètre de la zone d'inhibition comme : non inhibitrice (-) pour un diamètre < 8 mm, sensible (+) lorsque le diamètre est compris entre 9 à 14 mm, très sensible (++) pour un diamètre compris entre 15 à 19 et extrêmement sensible (+++) pour un diamètre > 20 mm. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III.4: Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

	Souches ATCC	Zone d'inhibition	Sensibilité	Souches cliniques	Zone d'inhibition	Sensibilité
Bactéries à Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 2035)	12,83 mm ± 1,04	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	10,66 mm ± 1,25	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	8 mm ± 0	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	9 mm ± 0,82	+
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 9372)	20,33 mm ± 3,46	+++	<i>Bacillus subtilis</i>	7,33 mm ± 0,47	-
Bactéries à Gram-	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	7,33 mm ± 0,47	-	<i>Escherichia coli</i>	6,5 mm ± 0	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352)	12,67 mm ± 0,94	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,17 mm ± 3,08	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	7,17 mm ± 0,623	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,5 mm ± 0	-

Les résultats ci-dessus de l'activité antimicrobienne in vitro de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* obtenue par la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) a été la souche la plus sensible à cette huile avec un DZI égale à 20,33 mm ± 3,46 suivi par *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Entérocooccus faecalis* (souche clinique) et *Staphylococcus aureus* (souche clinique) avec des DZI égales à 12,83 mm ± 1,04 ; 12,67 mm ± 0,94 ; 10,66 mm ± 1,25 et 9 mm ± 0,82 respectivement.

En revanche, les souches : *Escherichia coli* (souche clinique), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (souche clinique), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (souche clinique) et *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) ont manifesté un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (6,5 mm ± 0 ; 7,33 mm ± 0,47 ; 8 mm ± 0 ; 6,5 mm ± 0 ; 7,17 ± 0,623 ; 7,33 mm ± 0,47 et 8,17 mm ± 3,08 respectivement).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle est attribuée à leur composition chimique et principalement aux molécules oxygénées qui sont plus efficaces que les molécules hydrocarbonées (Kalemba et al., 2003), Selon SYAFRI et al., (2022) et QIAN et al., (2020), l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* est due à la présence des composés du groupe monoterpénique oxygéné tels que le terpinéol et le citral.

Cette sensibilité plus marquée pour les bactéries Gram positif par rapport aux Gram négatif vis-à-vis l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* concorde avec plusieurs études :

D'après CHI et al., (2019), l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantifolia* en Vietnam obtenue par hydrodistillation variait d'une souche à une autre. Ils ont remarqué que *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (Gram positif) est la souche la plus sensible à cette huile par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (Gram négatif) avec des diamètres de 20,1 mm \pm 0,1 et 14,7 mm \pm 0,1 respectivement.

En Italie, COSTA et al., (2014) ont montré que l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* extraite par hydrodistillation induit une zone d'inhibition variant de 14,5 mm à 26,5 mm pour les bactéries Gram positif et de 7,2 mm à 14,5 mm pour les bactéries Gram négatif. Parmi les bactéries Gram positif, une zone d'inhibition plus élevée a été observée chez *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (26,7 mm) suivi par *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (24,7 mm). En revanche, la zone d'inhibition la plus élevée observée pour les Gram négatif était celle d'*Escherichia coli* (ATCC 10536) (13.3 mm).

Les travaux de SAFAEIAN LAEIN et al., (2021) en Iran., montrent que les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles que les bactéries Gram négatif et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) était la plus sensible à l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* avec un diamètre de 17 mm par rapport aux *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1430) qui sont les plus résistantes avec des diamètres de zone d'inhibition de 14 mm et 15 mm.

D'autres travaux sur l'huile essentielle de *Citrus aurantiifolia* contre les bactéries, comme ceux de GALOVICOVA et al., (2022) en Slovaquie sur l'effet de l'huile essentielle des péricarpes de *Citrus aurantifolia* obtenue par la méthode de pression à froid, montrent que l'efficacité est plus prononcée contre les bactéries à Gram négatif.

KPADONOU et *al.*, (2022) en Bénin, ont étudié le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*. Ces auteurs ont indiqué que cette huile a montré une activité variable contre les bactéries ciblées. En effet, ils ont dévoilé une importante activité contre *Escherichia coli* (ATCC25922) avec un diamètre de 31,5 mm \pm 0,71 suivi par *Pseudomonas aeruginosa* (27853) avec un diamètre de 23 mm \pm 2,94, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) avec un diamètre de 21,25 mm \pm 0,71 et *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) avec un diamètre de 17 mm \pm 1,83.

L'étude de MOHAMMED et *al.*, (2024) en Soudan sur l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* extraite par hydrodistillation, montre que l'espèce de *Bacillus subtilis* est la plus sensible avec une zone de 16 mm \pm 3,08 suivi par *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 15 mm \pm 3,08 ; 15 mm \pm 1,79 et 12 mm \pm 0,98 respectives. Selon cette étude, ceci est due à sa teneur élevée en composés organiques oxygénés.

AIBINU et *al.*, (2007), ont étudié l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des écorces de *Citrus aurantifolia* nigérien obtenue par distillation à la vapeur d'eau et testée par la méthode de diffusion dans des puits de gélose. Ils ont trouvé que l'huile présente un effet inhibiteur élevé contre tous les organismes testés, notamment *Staphylococcus aureus* (ATCC 25921), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Les différences de sensibilité entre les bactéries à Gram négatif et Gram positif peuvent être dues aux différences structurelles de la paroi cellulaire entre ces classes de bactéries (Akthar et *al.*, 2014).

IZAH et *al.*, (2023), ont rapporté que la biochimie, la physiologie, le métabolisme et les stratégies d'adaptation des micro-organismes, ainsi que la composition biochimique des plantes, âge, parties, espèces, facteurs environnementaux du lieu de culture, concentration de l'huile essentielle de plante, le type et la concentration des composés bioactifs présents dans les plantes influencent son potentiel antimicrobien.

III.2.3. Micro-atmosphère

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase vapeur d'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, nous avons utilisé la technique de la micro-atmosphère. Les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau (III.5) et le tableau de l'annexe 07.

Tableau III.5 : Résultats de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* par la méthode de micro-atmosphère

	Doses		Doses		Doses	
	10 µl	50 µl	10 µl	50 µl	10 µl	50 µl
	Souches ATCC		Souches cliniques			
Bactéries à Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 2035)	0 mm	0 mm	<i>Enterococcus faecalis</i>	0 mm	0 mm
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0 mm	0 mm	<i>Staphylococcus aureus</i>	0 mm	0 mm
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 9372)	0 mm	8,5 mm ±2,12	<i>Bacillus subtilis</i>	0 mm	9,17 mm ±1,08
Bactéries à Gram-	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0 mm	0 mm	<i>Escherichia coli</i>	0 mm	0 mm
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352)	0 mm	0 mm	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 mm	14,5 mm ±3,54
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0 mm	0 mm	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 mm	0 mm

Le tableau ci-dessus présente les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne de la phase gazeuse de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* avec deux doses (10 µl et 50 µl) vis-à-vis douze souches bactériennes testées par la technique de micro-atmosphère. Cette méthode n'a pas été concluante avec le volume de 10 µl de l'huile essentielle étudiée pour toutes les souches testées car aucune zone d'inhibition n'a été observée (Figure III.7).

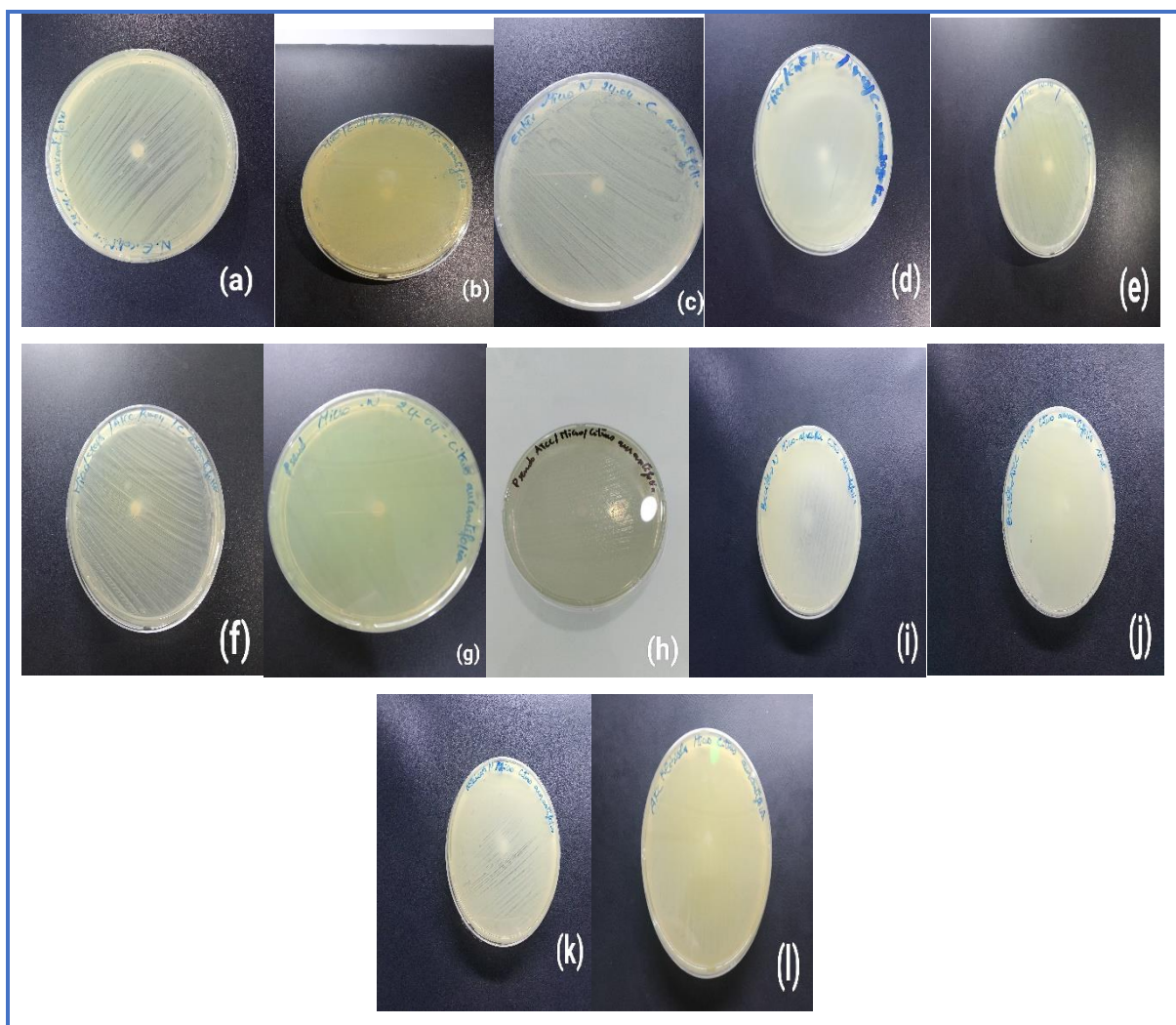


Figure III.7 : Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère à une dose de 10 μ l de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (Originale, 2024).

Souches bactériennes : (a) : *Escherichia coli* (souche clinique) ; (b) : *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; (c) : *Enterococcus faecalis* (souche clinique) ; (d) : *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) ; (e) : *Staphylococcus aureus* (souche clinique) ; (f) : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; (g) : *Pseudomonas aeruginosa* (souche clinique) ; (h) : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; (i) : *Bacillus subtilis* (souche clinique) ; (j) : *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) ; *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) ; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352).

Tandis que la phase volatile à la dose 50 μ l de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a montré une efficacité antibactérienne seulement contre les souches de *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Bacillus subtilis* (souche clinique) et *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) avec des zones de $8,5 \pm 2,12$; $9,17 \pm 1,08$ et $14,5 \pm 3,54$ (Figure III.8). Ce pouvoir antimicrobien est remarquable pour la dernière souche.

D'après l'étude de BENDALI et *al.*, (2019), l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus* s'explique probablement par la présence des composés monoterpéniques tels que : le limonène, le caryophyllène oxide, l' α -pinène, le β -pénène, l' α -terpénol et le citral.

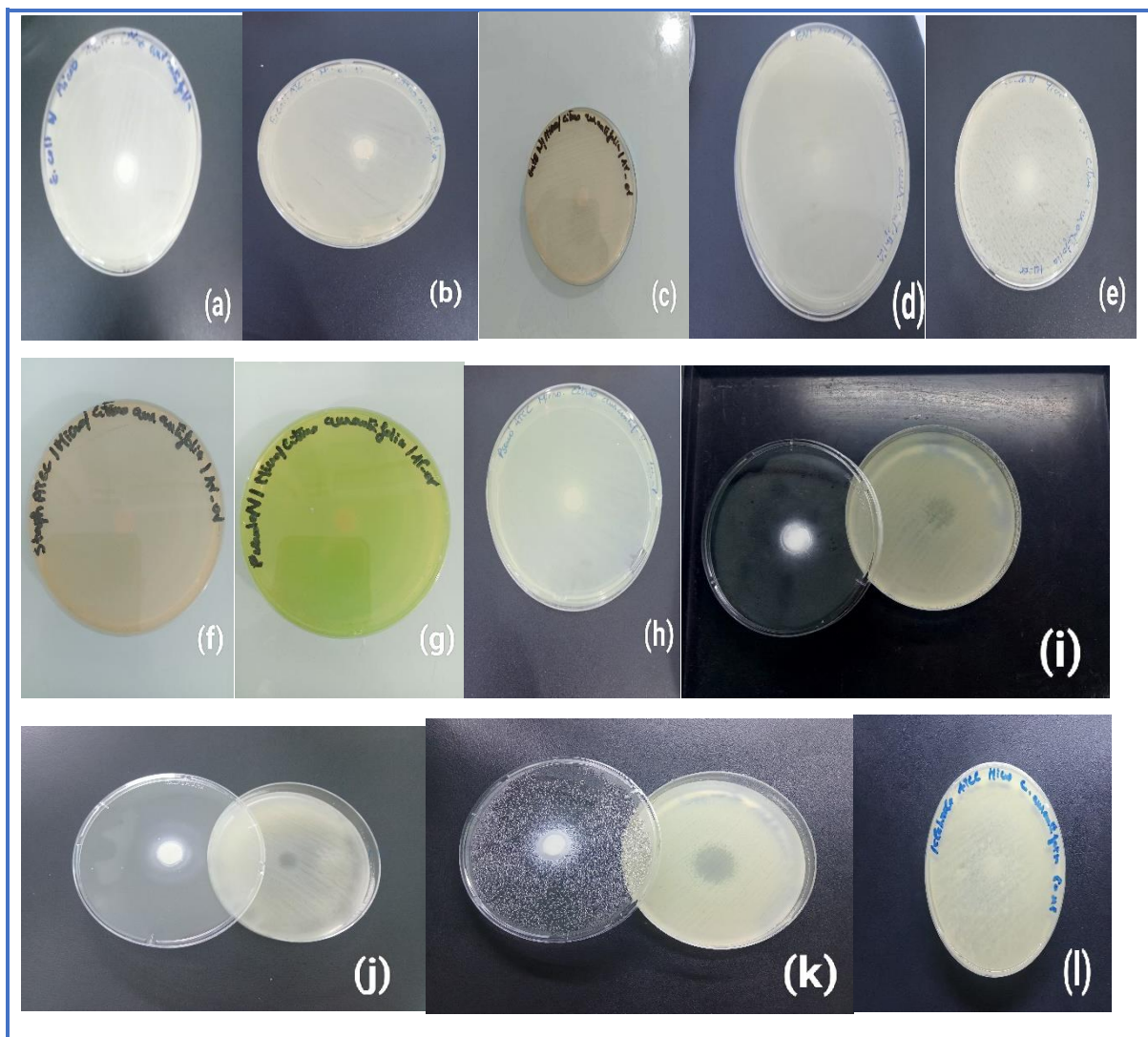


Figure III.8: Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère à une dose de 50 μ l de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (Originale, 2024).

Souches bactériennes : (a) : *Escherichia coli* (souche clinique) ; (b) : *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; (c) : *Enterococcus faecalis* (souche clinique) ; (d) : *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) ; (e) : *Staphylococcus aureus* (souche clinique) ; (f) : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; (g) : *Pseudomonas aeruginosa* (souche clinique) ; (h) : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ; (i) : *Bacillus subtilis* (souche clinique) ; (j) : *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) ; *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique) ; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352).

Bien que de nombreux rapports existent sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* par la méthode de contact direct (aromatogramme), les informations concernant l'activité antibactérienne de la phase volatile de la même huile sont rares.

Dans des travaux similaires, BOUGERRA et *al.*, (2014) en Algérie, ont découvert que les composés volatiles de l'huile des écorces de *Citrus reticulata* extraite par hydrodistillation étaient dépourvus d'activité antibactérienne contre *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) à une dose de 5µl /boite.

L'étude réalisée par KENGNE et *al.*, (2019) en Cameroun sur la phase vapeur de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* L. extraite par hydrodistillation, ont montré que cette huile présente une activité antimicrobienne vis-à-vis *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

III.2.4. Comparaison de la sensibilité des souches

En comparant les résultats des deux méthodes utilisées à savoir l'aromatogramme et la micro-atmosphère, nous avons observé que la méthode de micro-atmosphère présentait une activité antibactérienne plus faible par rapport à l'aromatogramme pour l'huile essentielle testée. Cela s'applique à toutes les souches, à l'exception de *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique), où les résultats de la méthode de micro-atmosphère étaient meilleurs que ceux de l'aromatogramme. Cette différence s'explique probablement par le type de contact et l'effet combiné de l'adsorption direct des vapeurs par les bactéries et de l'effet indirect à travers le milieu ayant absorbé les vapeurs (Kengne et *al.*, 2019).

Selon MOUNCHID et *al.*, (2004), la méthode de micro-atmosphère empêche tout contact direct entre le micro-organisme et l'huile essentielle à tester, ne permettant ainsi d'évaluer qu'une partie de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Par contre, la technique de contact direct en milieu solide permet de tester l'huile essentielle dans son intégralité.

En comparant aussi entre l'activité antibactérienne des antibiotiques et celle de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, le pourcentage de sensibilité des souches étudiées (bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif) aux antibiotiques est calculée et comparée avec le pourcentage de sensibilité des souches testées (bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif) vis-à-vis l'huile étudiée (Figure III.9).

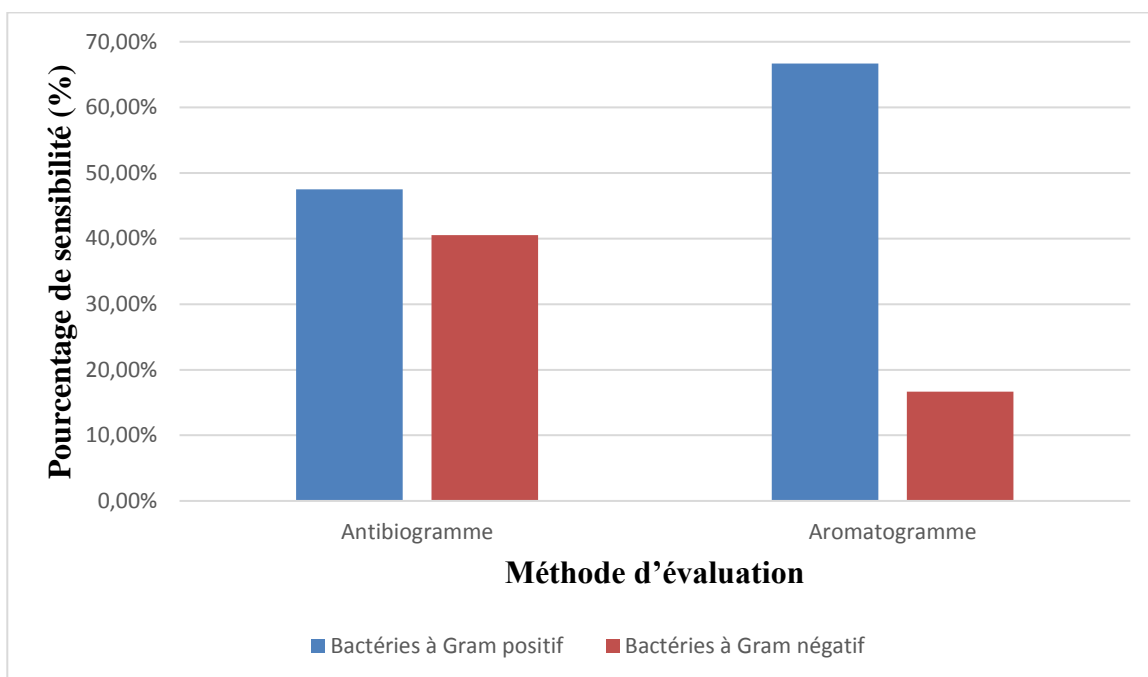


Figure III.9: Pourcentage de sensibilité des souches bactériennes étudiées à l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* et aux antibiotiques testés

La figure III.9 montre que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a exercé une activité antibactérienne très élevée par rapport aux antibiotiques testés contre les souches bactériennes à Gram positif étudiées. Ainsi, les bactéries à Gram positif ont présenté une sensibilité de 66,66% vis-à-vis l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* et seulement 47,5% contre les antibiotiques testés. Concernant les bactéries à Gram négatif, nous avons noté une sensibilité de 16,66% pour l'huile essentielle étudiée et 40,54% pour les antibiotiques.

CHEBAIBI et *al.*, (2015) dans leur étude, indiquent que les huiles essentielles peuvent être un bon alternatif antibactérien contre les souches résistantes aux antibiotiques. Par exemple, selon nos résultats, l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a manifesté un potentiel de sensibilité très élevé contre *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), contrairement aux antibiotiques Céfotaxime, Pénicilline et Ticarcilline+ Acide clavulanique qui exercent un effet presque nul sur la même souche.

III.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes : test de DPPH et de FRAP, les résultats obtenus ont été comparés à ceux de l'acide ascorbique et du BHT qui sont des antioxydants de références.

III.3.1. Test de DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, a été mesurée par le dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) réduit. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures III.10, III.11, III.12 et III.13 et le tableau de l'annexe 08.

La figure III.10 montre une augmentation des pourcentages d'inhibition (%) du pouvoir oxydant des radicaux libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle étudiée. A la plus faible concentration (10 $\mu\text{g/ml}$), le pourcentage d'inhibition est de 6,59%. Tandis que, la plus grande concentration (125 $\mu\text{g/ml}$) donne un pourcentage d'inhibition du DPPH qui a atteint 83,87%.

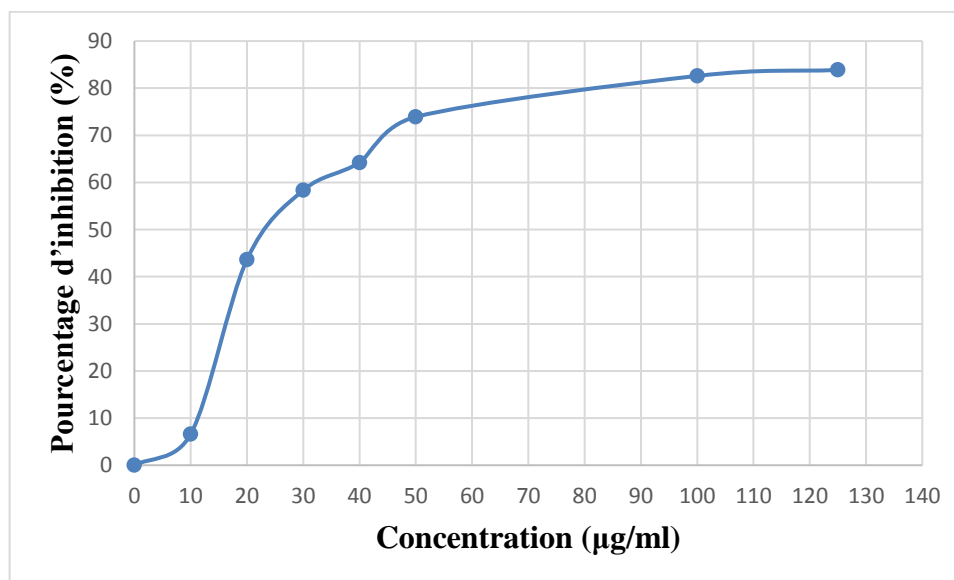


Figure III.10: Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

Les résultats de la figure III.11 montrent que le pourcentage d'inhibition (%) du pouvoir oxydant du radical libre DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique (antioxydant standard). A la plus faible concentration (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le pourcentage d'inhibition est de 39,45 %. Tandis que, la plus grande concentration (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) donne un pourcentage d'inhibition du DPPH qui a atteint 83,19%.

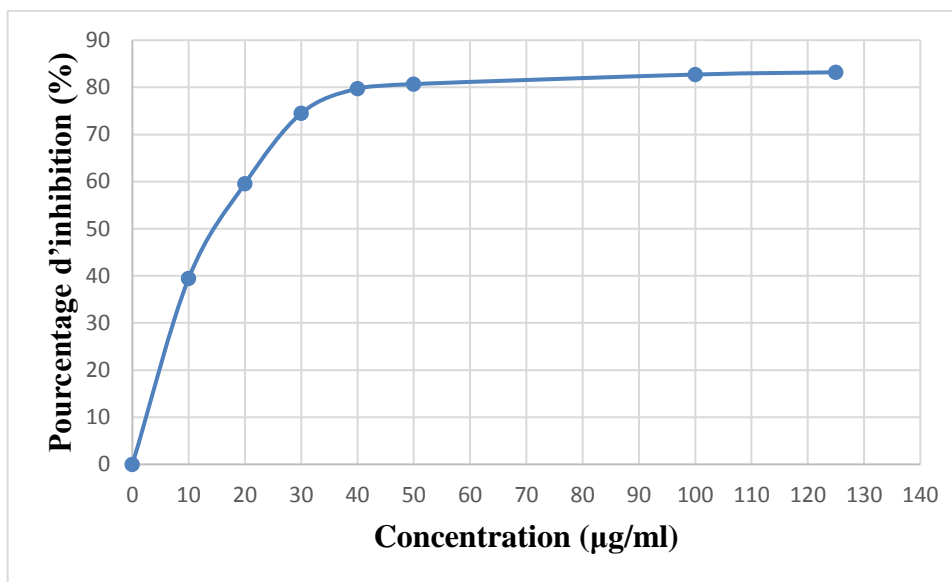


Figure III.11: Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique

La figure III.12 indique une augmentation des pourcentages d'inhibition (%) du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction des concentrations de BHT (antioxydant standard). A la plus faible concentration (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le BHT a présenté un pourcentage d'inhibition de 24,13%. Tandis que, à la plus grande concentration (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$), le pourcentage d'inhibition a atteint 84,68%.

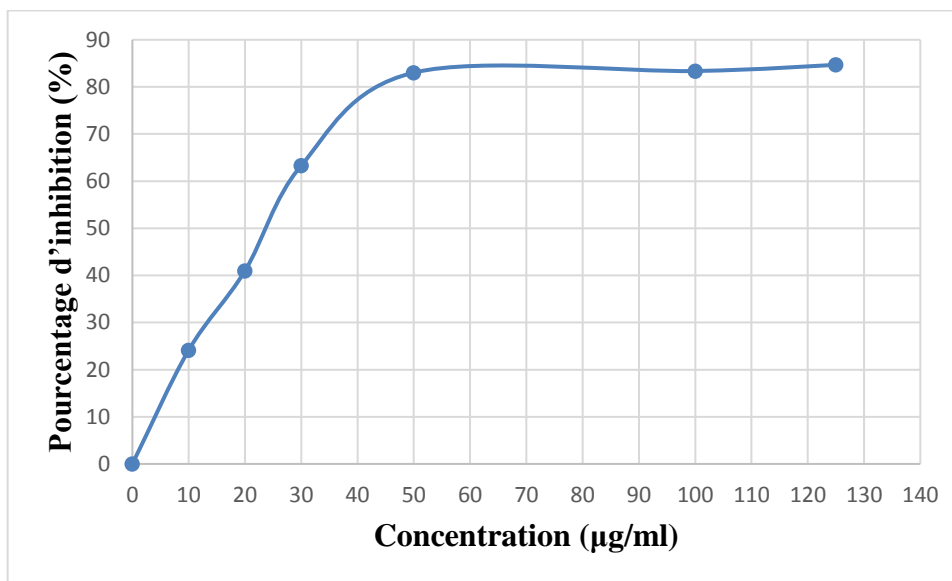


Figure III.12 : Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de BHT

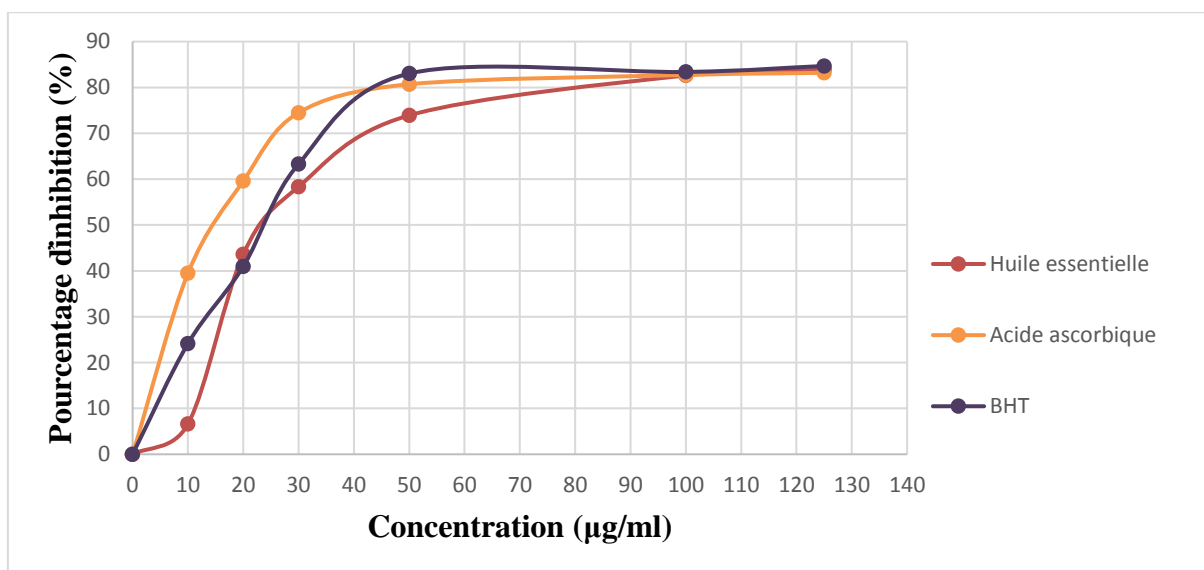


Figure III.13: Pourcentage d'inhibition du pouvoir oxydant du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, d'acide ascorbique et de BHT

Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle a été comparé à celui de l'acide ascorbique et de BHT (antioxydants standards). Les figure III.10, III.11 et III.12 indiquent que le pouvoir anti-radicalaire des deux antioxydants standards et de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

augmente en fonction de leur concentration de façon exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire.

Le pouvoir antioxydant total d'une huile essentielle ne peut pas être attribué uniquement aux quelques composés actifs mais aussi aux composés mineurs (Chen et *al.*, 2017). Cette activité est liée à la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. Lorsqu'elle est en présence d'un radical libre DPPH, l'atome H est transféré sur ce dernier, le transformant ainsi en une molécule stable de DPPH. Cette réaction entraîne une diminution de la concentration du radical libre et également de l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité antioxydante donneur d'hydrogène (Villano et *al.*, 2007).

CHOI et *al.*, (2000) ont étudiés l'activité antioxydante des huiles essentielles de trente-quatre types d'huile essentielle de *Citrus* obtenues de Japon, de Corée et d'Italie et de leurs composants, parmi eux l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*. Dans leurs travaux, ils ont rapporté que le géraniol, le terpinolène et le γ -terpinène ont montrés un pouvoir anti-radicalaire plus marquées sur le DPPH par rapport à d'autres composés.

III.3.1.1. Détermination des CE₅₀

La valeur de CE₅₀ est liée à l'efficacité d'un composé à piéger les radicaux DPPH. Elle correspond à la concentration d'antioxydant requise pour réduire 50% de la concentration initiale des radicaux libres présents. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est importante (Ouibrahim et *al.*, 2015). Les IC₅₀ de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, d'acide ascorbique et de BHT sont calculées à partir des courbes des figure III.10, III.11, III.12 et III.13 et les résultats sont représentés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : CE₅₀ de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, d'acide ascorbique et de BHT obtenues par le test de DPPH

Composé	CE ₅₀
Huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	24,33 µg/ml
Acide ascorbique	15,23 µg/ml
BHT	24,04 µg/ml

Les résultats du tableau III.6, montrent que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* présente un CE_{50} (24,33 $\mu\text{g/ml}$) presque identique à celui du BHT (24,04 $\mu\text{g/ml}$) suivi par l'acide ascorbique (15,23 $\mu\text{g/ml}$) qui présente le meilleur CE_{50} . D'après ces résultats, nous pouvons constater que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* possède une activité antioxydante presque la même que le BHT et moins efficace que celle de l'acide ascorbique.

Les travaux effectués sur l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* confirment que cette dernière possède des propriétés anti-radicalaires comme il est indiqué :

L'activité antioxydante de l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* collectés dans le nord de l'Égypte a été évaluée par ELANSARY et al., (2018). Ils ont trouvé un IC_{50} égale à $7,2 \pm 0,3$ mg/ml.

JULAEHA et al., (2020), ont trouvé une valeur d' IC_{50} de 12,85 $\mu\text{l/ml} \pm 0,20$ en étudiant l'effet antioxydant de l'huile essentielle des zestes de *Citrus aurantifolia* de Indonésie.

En effet, THONGLEM et al., (2023), ont trouvé que l'huile essentielle des écorces de *Citrus aurantifolia* de Thaïlande, présente des pourcentages d'inhibition respectives de 15,99% à 76,74% à 10 -100 mg/ml et avaient une valeur d' IC_{50} de 57,90 mg/ml.

D'autre part, TUNDIS et al., (2012) travaillant sur l'huile essentielle des écorces de *Citrus aurantifolia* d'Italie ont dévoilé une activité antioxydante avec un IC_{50} de 201,3 $\mu\text{g/ml} \pm 3,2$.

Une autre étude réalisée par AL-AAMRI et al., (2018) sur l'huile essentielle des fleurs de *Citrus aurantifolia* de Sultanate Oman a montré que l'huile testée a bien réduit le DPPH à une concentration de 21,87 $\mu\text{g/ml}$.

III.3.2. Test de FRAP

L'évaluation de la capacité de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* à réduire le Fer ferrique (Fe^{3+}) en Fer ferreux (Fe^{2+}) a permis d'obtenir les résultats présentés dans les figures (III.14, III.15, III.16 et III.17) et le tableau dans l'annexe 09.

A partir des résultats obtenus dans la figure III.14, nous remarquons que la capacité réductrice du Fer par l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* exprimé par l'absorbance à 700 nm augmente avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle testée. Une

absorbance de 0,125 a été obtenu à la plus faible concentration (10 $\mu\text{g/ml}$). Tandis que, la plus grande concentration (125 $\mu\text{g/ml}$) a présenté une absorbance de 0,556.

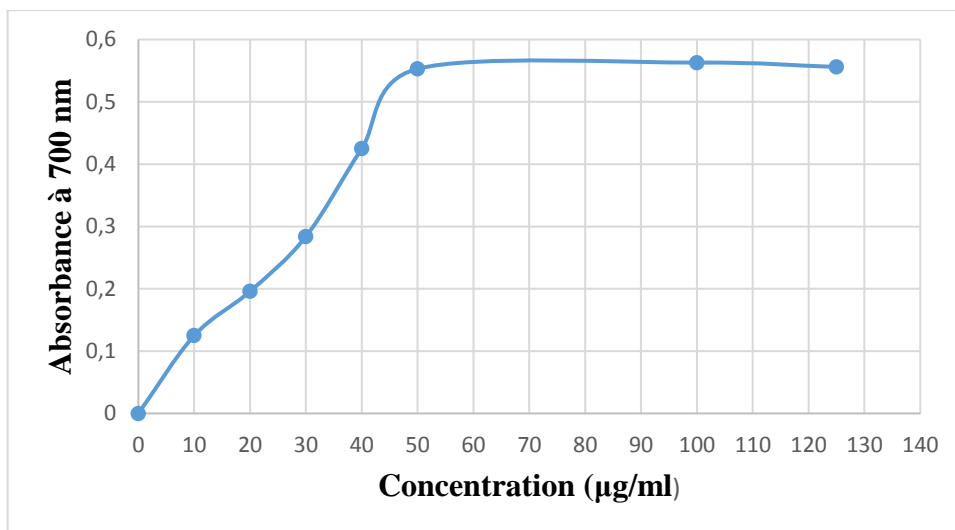


Figure III.14 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

D'après les résultats présentés dans la figure III.15, il est évident que le pouvoir réducteur du Fer exprimé par l'absorbance augmente avec l'augmentation des concentrations de l'acide ascorbique (antioxydant standard). A faible concentration qui est de 10 $\mu\text{g/ml}$, l'absorbance est de 0,139. Puis, à la plus grande concentration (125 $\mu\text{g/ml}$), l'acide ascorbique a présenté un pouvoir réducteur qui a atteint 0,43.

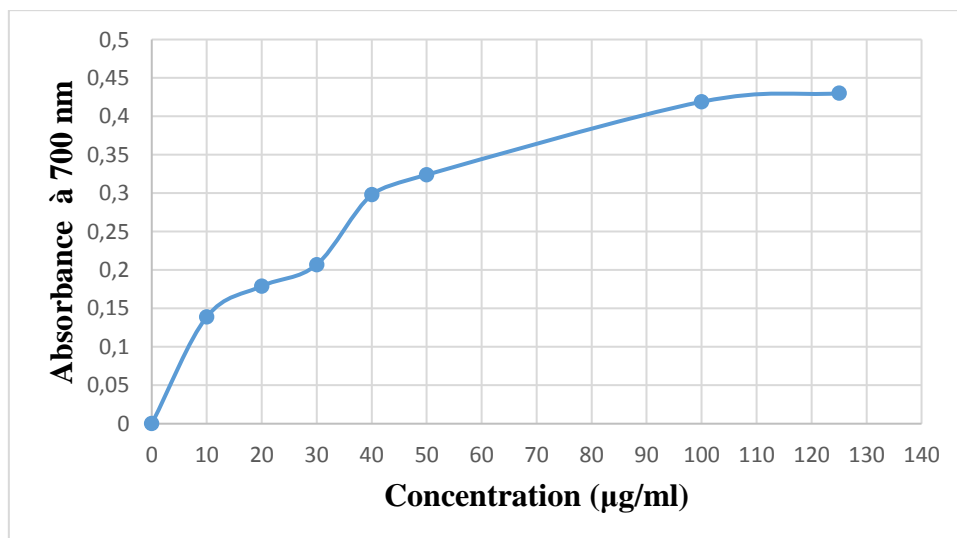


Figure III.15 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

La figure III.16 montre une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur de Fer en fonction de la concentration du BHT (antioxydant standard). A la plus faible concentration (10 $\mu\text{g/ml}$), l'absorbance est de 0,136. Tandis que, la plus grande concentration (125 $\mu\text{g/ml}$) donne une absorbance qui a atteint 0,484.

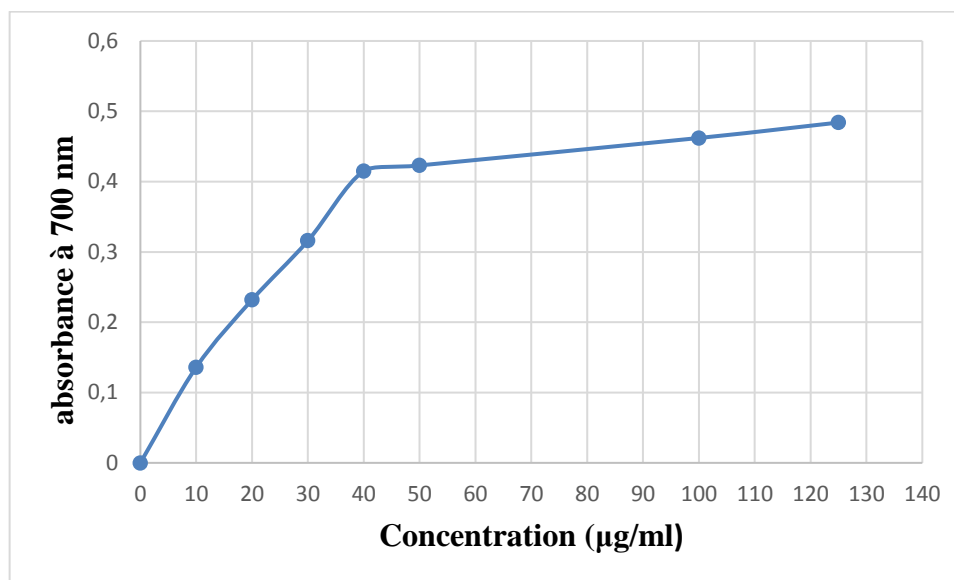


Figure III.16: Pouvoir réducteur du BHT

Sachant que l'augmentation de l'absorbance (FRAP) signifie l'augmentation du pouvoir réducteur (Haddoudi et *al.*, 2014). Et en comparant le pouvoir réducteur de notre huile qui est exprimé par l'absorbance à 700 nm à celui de l'acide ascorbique et du BHT, nous remarquons que l'huile essentielle des pelures de *Citrus aurantifolia* a montré une meilleure activité réductrice du Fer par rapport à l'acide ascorbique et au BHT. Dans laquelle, à 125 $\mu\text{g/ml}$, qui est la plus grande concentration, l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a enregistré la plus grande absorbance de 0,556 suivi par celle du BHT (0,484) et de l'acide ascorbique (0,43) (figure III.17).

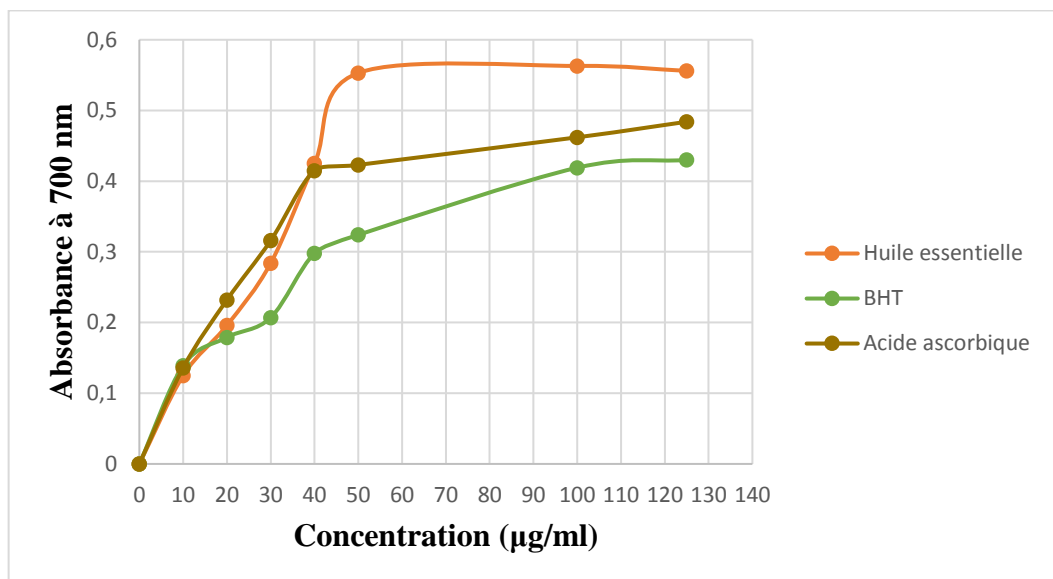


Figure III.17 : Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, de l'acide ascorbique et du BHT

Les pourcentages de réduction ont été calculés et les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pourcentage de réduction de fer en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, de l'acide ascorbique et du BHT (figure III.18 ; III.19 ; III.20 et III.21).

Les résultats de la figure III.18 montrent que le pourcentage de réduction de Fer augmente avec l'augmentation des concentrations de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*. Nous constatons que pour la concentration la plus faible de 10 µg/ml, le pourcentage de réduction est de 20,29% et pour la concentration la plus grande de 125 µg/ml, le pourcentage de réduction a atteint 90,26%.

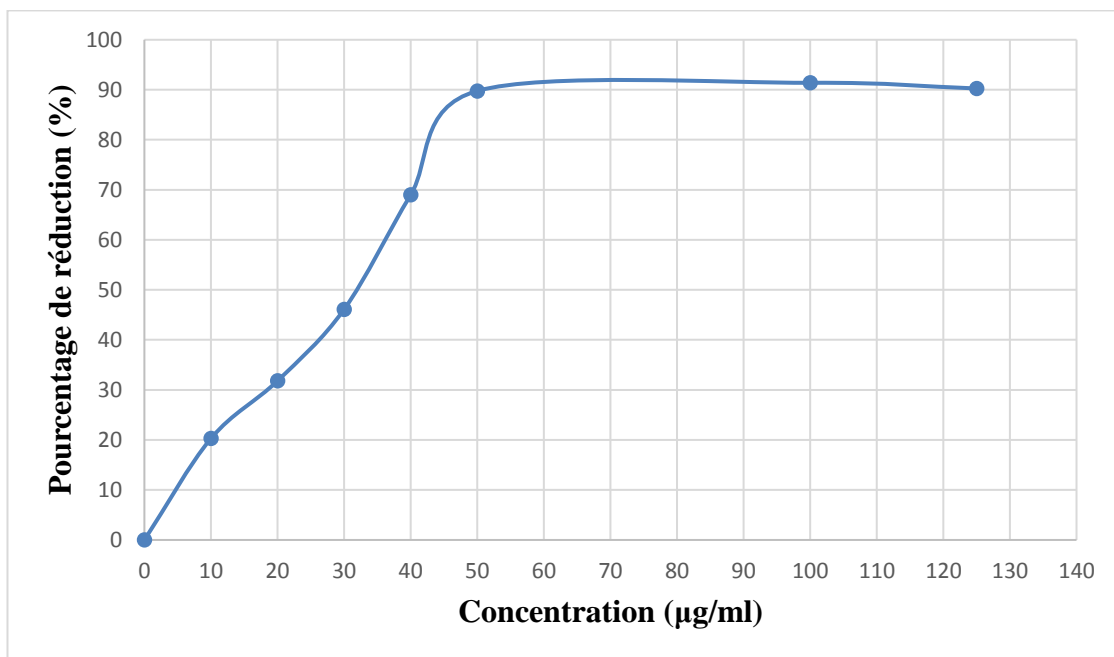


Figure III.18: Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour l’huile essentielle de *Citrus aurantifolia*

La figure III.19 montre une augmentation des taux de réduction de Fer en fonction des concentrations de l’acide ascorbique, une capacité réductrice de 22,86% a été enregistrée à la concentration la plus faible de 10 µg/ml, tandis que, la concentration la plus élevée (125 µg/ml) donne un pourcentage de réduction qui a atteint 70,72%.

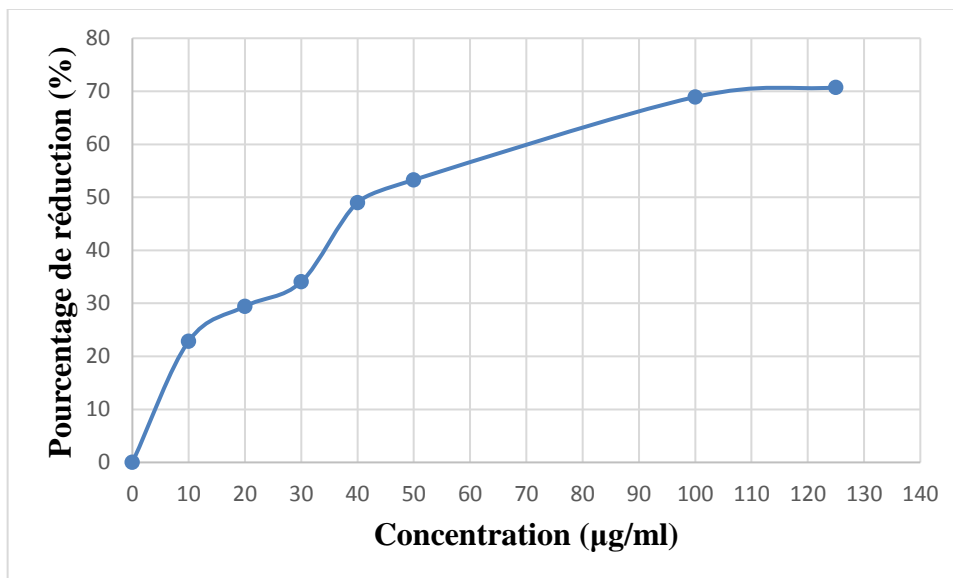


Figure III.19: Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour l’acide ascorbique

La figure III.20 illustre les résultats du pouvoir réducteur de Fer, où on observe que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de BHT, à la plus faible concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$, le pourcentage de réduction est de 22,34%. Tandis que, la plus grande concentration (125 $\mu\text{g/ml}$) donne un pourcentage de réduction de Fer qui a atteint 79,60%.

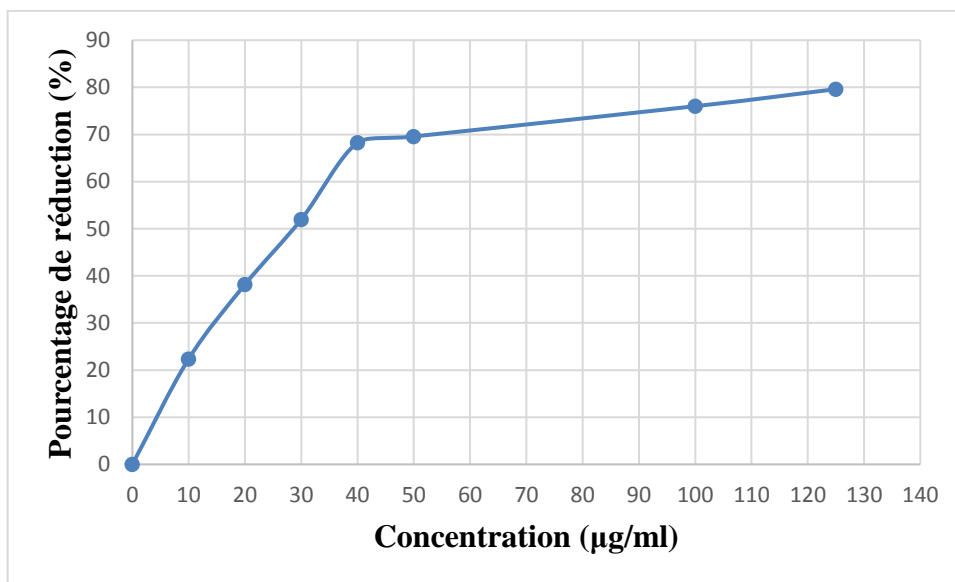


Figure III.20 : Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHT

Le pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a été comparé à celui de l'acide ascorbique et du BHT (antioxydants standards), D'après les résultats de la figure III.21, nous pouvons constater que la capacité de l'huile essentielle à réduire le Fer ferrique en fer ferreux a été bien plus importante que celle du BHT et de l'acide ascorbique.

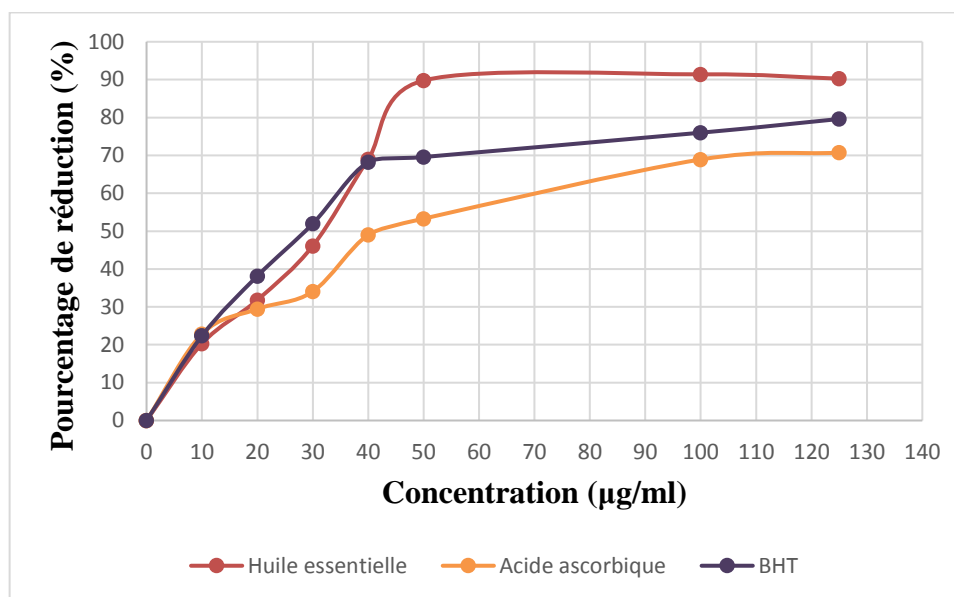


Figure III.21: Pourcentage de réduction de Fer en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, l'acide ascorbique et le BHT

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* pourrait être liée à la présence de monoterpènes, en particulier le γ -terpinène, qui est parmi les principaux composés de l'huile essentielle testée (Conforti et *al.*, 2007).

Selon SAFAEIAN LAEIN et *al.*, (2021), qui ont travaillé sur l'huile essentielle des écorces de *Citrus aurantifolia* en Iran, cette huile essentielle présente un potentiel réducteur de Fer très fort qui a atteint $92,25 \pm 2,45 \mu\text{M}$ équivalents trolox /g.

WU et *al.*, (2013), ont étudié le pouvoir réducteur de Fer des huiles essentielles de *Citrus medica L.* de la Chine en trois stades de maturation de fruit : stade immature de couleur verte, stade intermédiaire de couleur jaune verte et stade mature de couleur jaune. Ils ont trouvé que l'huile essentielle du stade immature de couleur verte montre un pouvoir réducteur très élevé par rapport aux autres stades. Dans laquelle, l'absorbance a atteint 0,65 à la plus grande concentration de 15 $\mu\text{g/ml}$, par contre, l'absorbance a été seulement de 0,5 et de 0,55 pour le stade mature et intermédiaire à la même concentration.

III.3.2.1. Détermination des CE_{50}

La CE_{50} offre une meilleure compréhension de la puissance et de l'efficacité d'un composé à réduire le Fer ferrique (Fe^{3+}) en Fer ferreux (Fe^{2+}). Les valeurs de CE_{50} de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, du BHT et de l'acide ascorbique sont calculées à partir des

courbes des figures III.18 ; III.19 ; III.20 et III.21 et les résultats sont résumés dans le tableau III.7.

Tableau III.7: CE₅₀ de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, d'acide ascorbique et de BHT obtenues par le test de FRAP

Composé	CE ₅₀
Huile essentielle de <i>Citrus aurantifolia</i>	31,70 µg/ml
Acide ascorbique	42,31 µg/ml
BHT	28,57 µg/ml

Selon le tableau III.7, le BHT présente la valeur de CE₅₀ la plus faible (28,57 µg/ml) par rapport à celle de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* (31,70 µg/ml) et de l'acide ascorbique (42,31 µg/ml). Ces valeurs indiquent que le BHT exerce la meilleure capacité réductrice de Fer ferrique en Fer ferreux suivi par l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* et finalement celle de l'acide ascorbique.

III.3.3. Comparaison de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP

L'activité antioxydante a été mesurée par diverses méthodes, qui se basent exclusivement sur la capacité de piégeage des radicaux libres ou de réduction de Fer en tant qu'indicateurs de ce potentiel. L'évaluation in vitro de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a été effectuée en utilisant deux méthodes : le test de DPPH et le test de FRAP. Les résultats de la comparaison entre ces deux méthodes ont été représentés dans le tableau III. 8 et la figure III.22.

Tableau III.8: Résultats de la comparaison des valeurs des CE₅₀ 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 aurantifolia</i>	24,33 µg/ml	31,70 µg/ml
Acide ascorbique	15,23 µg/ml	42,30 µg/ml
BHT	24,04 µg/ml	28,57 µg/ml

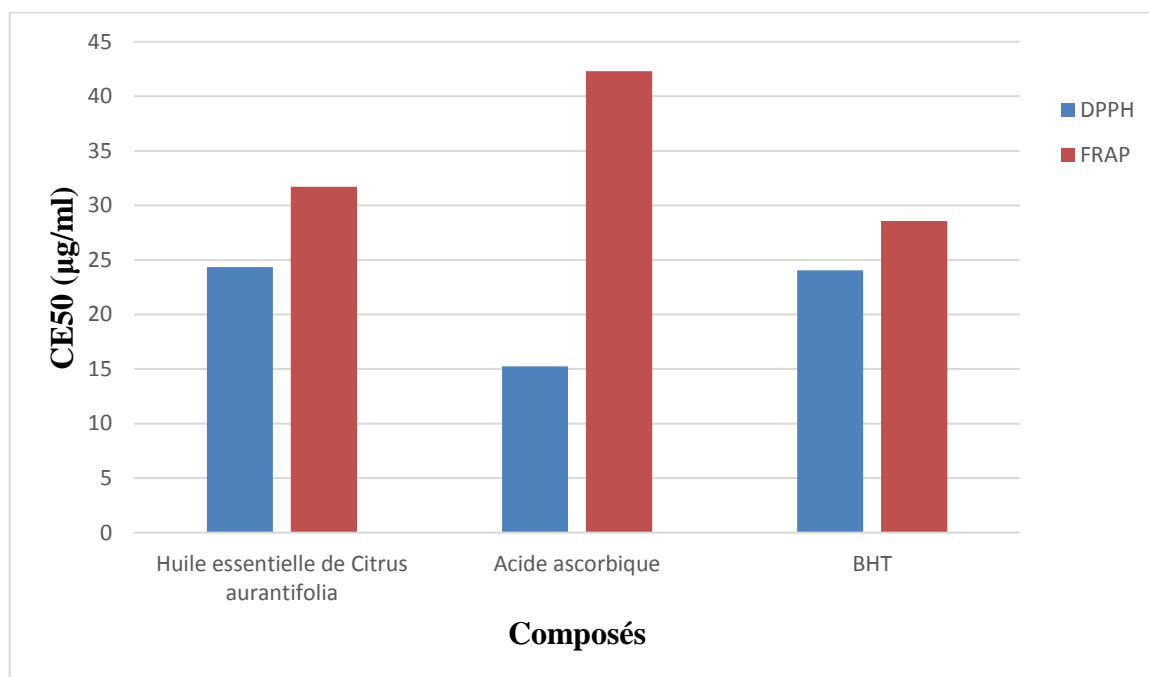


Figure III.22: Résultats de la comparaison des valeurs de CE_{50} obtenues par la méthode de DPPH et la méthode de FRAP

L'histogramme de la figure III.22 et le tableau III.8 montrent une comparaison entre les valeurs de CE_{50} du test de DPPH et de FRAP pour l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, l'acide ascorbique et le BHT. La méthode de DPPH repose sur la réaction de transfert électronique, tandis que, la méthode de FRAP est basée sur une réaction de transfert d'un atome d'hydrogène (Badalamenti et al., 2022), Nous remarquons d'après nos résultats que la méthode de FRAP a donné les valeurs les plus élevées par rapport au test de FRAP. Cela signifie que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* possède une activité de piégeage des radicaux libre DPPH plus importante que son activité réductrice de Fer.

Conclusion

CONCLUSION

La position géographique privilégiée de l'Algérie lui confère une biodiversité exceptionnelle. Le présent travail a été mené dans le cadre de l'étude de la flore Algérienne en particulier l'huile essentielle des pelures de *Citrus aurantifolia* récoltées de la Wilaya de Ain Defla (Boumedfaa), en menant une étude analytique, en déterminant leur composition chimique et en évaluant quelques activités biologiques telles que l'activité antibactérienne et antioxydante.

L'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle des pelures de *Citrus aurantifolia* a donné un bon rendement qui a atteint $2,74\% \pm 0,39$.

L'étude analytique de l'huile essentielle étudiée, en l'occurrence, les caractéristiques organoleptiques montre que cette dernière est d'aspect liquide mobile, de couleur jaune pâle avec une odeur forte, aromatique, fraîche et citronnée. Elle se caractérise aussi par un pH acide (pH= 5,5) et une faible densité relative (0,7953).

L'analyse chromatographique CG/MS de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* a révélé une abondance des hydrocarbures monoterpéniques (66,05%) dominés par la présence du limonène (33,26%), le β -pinène (12,27%) et l' γ -terpinène (8,44 %).

L'étude de l'activité antimicrobienne des antibiotiques vis-à-vis les douze souches bactériennes testées montre que toutes les souches présentent des zones d'inhibitions très importantes variant entre 20 mm et 35 mm. Le plus grand diamètre d'halo d'inhibition a été enregistré par le Ertapénème (ETP) contre *Escherichia coli* clinique (35 mm).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* vis-à-vis douze souches bactériennes dont six sont de référence ATCC et six d'origine clinique a été faite par la méthode d'aromatogramme et la méthode de micro-atmosphère. La méthode d'aromatogramme indique que ce pouvoir est plus important pour les bactéries à Gram positif. Les plus sensibles sont *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 2035) avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre $20,33 \text{ mm} \pm 3,46$ et $12,83 \text{ mm} \pm 1,04$ respectivement.

La technique de micro-atmosphère a été utilisée pour tester l'activité antibactérienne de la phase vapeur de l'huile essentielle étudiée sur les douze souches pathogènes. Les résultats ont montré que la phase volatile de l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* présente une

activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Bacillus subtilis* (souche clinique). Celle-ci a été remarquable contre *Klebsiella pneumoniae* (souche clinique).

L'étude de pouvoir antioxydant par le test de DPPH et le test de FRAP a montré que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* possède un grand potentiel. Les valeurs de CE₅₀ sont respectivement de 24,33 µg/ml ; 15,23 µg/ml et 24,04 µg/ml pour l'huile essentielle, l'acide ascorbique et le BHT. Ces valeurs nous ont permis de déduire que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* exerce un effet antioxydant presque le même que celui du BHT et faible par rapport l'acide ascorbique.

En ce qui concerne le test de FRAP, les valeurs de CE₅₀ sont respectivement de 31,70 µg/ml ; 42,30 µg/ml et 28,57 µg/ml pour l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia*, l'acide ascorbique et le BHT. Ces valeurs nous ont permis de conclure que l'huile essentielle de *Citrus aurantifolia* exerce un effet réducteur de Fer faible par rapport au BHT et plus important que celui de l'acide ascorbique.

En perspectives, nous recommandons d'effectuer d'autres recherches supplémentaires sur les propriétés biologiques telles que l'activité antifongique, anti-inflammatoire, antivirale et insecticide. Nous suggérons également de tester d'autres méthodes d'extraction et d'étudier leur influence sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle, ainsi que d'extraire l'huile d'autres parties de l'espèce et de les étudier.

Références bibliographiques

Références

Abou- Baker, D. H., Amarowicz, R., Kandeil, A., Ali, M. A. et Ibrahim, E. A., Antiviral activity of *Lavandula angustifolia* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against avian influenza H5N1 virus, Journal of agriculture and food research, V. 4, (2021), 1-7.

Adams, R. P., Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured publishing corporation : Carol stream, USA, (2001), 456p.

AFNOR (Association Française de Normalisation)., « publication huiles essentielles », Paris, (2005), 18p.

AFNOR (Association Française de Normalisation)., Recueil des Normes Françaises « Huiles essentielles », AFNOR, (1986), Paris, 57p.

Adjovi, Y. C. S., Fossou, P. J., Tahirou, A. et Ahehehinou, H. U., Evaluation de l'utilisation des huiles essentielles de six plantes aromatiques collectées au Bénin dans la lutte alternative contre les aflatoxines, European Science Journal, V.18 (11), (2022), 207-221

Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T. et Odugbemi, T., Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (Lime fruit) as used locally, African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine: AJTCAM, V.4 (2), (2007), 185-190.

Aissaoui, A. B., El Amrani, A., Zantar, S. et Toukour, L., Activité acaricide des huiles essentielles du *Mentha pulegium*, *Origanum compactum* et *thymus capitatus* sur l'acarien phytophage *Tetranychus urticae* koch (Acari : tetranychidae). European Scientific Journal, V. 14(3), (2018),118-139.

Akono-Ntonga P., Tonga, C., Kekeunou, S., Jazet, D. P.M., Magne, T. G., Koutou, S., Lopedji, T, N. et Lehman, L, G., Activités larvicide et nymphocide des huiles essentielles des péricarpes des fruits murs de quelques espèces de *Citrus* sur *Culex pipiens* Linnaeus 1758, vecteur de la filariose de Bancroft au Cameroun, Cameroun Journal of biological and biochemical sciences, V.24, (2016), 18-25.

Akthar, M., Degaga, B. et Azam, T., Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review, Biological Sciences and pharmaceutical research, V. 2(1), (2014), 1-7.

Al-Aamri, M. S., Al- Abousi, N. M., Al-Jabri, S.S., Alam, T. et Khan, S. A., Chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in Eastern Oman, Journal of Taibah University Medical Sciences, V. 13 (2), (2018), 108-112.

Al-Harrasi, A., Bhatia, S., Behl, T., Kaushik, D., Anwer, M. K., Muqtadar Ahmed, M., Sharma, P. B., Sharma, A., Kabir, M. T. et Mittal, V., Role of essential oils in the management of COVID-19 (1^{ère} ed.), Presse CRC edition, Etats- Unis, (2022), 416p.

Alili, D., Brahimi, O., Doumandji, A. et Serier Bouchenak, N., 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.

Amorati, R., Foti, M. C. et Valgimigli, L., Antioxidant Activity of essential oils, Journal of Agricultural and food Chemistry, V.61, (2013), 10835-10847.

Arbonnier, M., Arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest, deuxième édition, Editions CIRAD (centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) et MNHN (Muséum national d'histoire naturelle), France, (2002), 573p.

Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils, Evidence- Based complementary and alternative medicine, V. 2011, (2011), 1-8.

Aziz, Z. A, Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M, Lokhat, D. et Ashraf, G. M., Huiles essentielles : techniques d'extraction, potentiel pharmaceutique et thérapeutique - une revue, Métabolisme actuel des médicaments, V. 19 (13), (2018), 1100-1110.

Bachiri, L., Bammou, M., Echch- egadda, G., Ibjibjen, J., El Rhaf- fari, L., Haloui, Z. et Nassiri, L., « Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Deux Espèces De Lavande : *Lavandula dentata* et *Lavandula pedunculata* », European Scientific Journal, V.13, (2017), 293- 311.

Badalamenti, N., Bruno, M., Schicchi, R., Geraci, A., Leporini, M., Gervasi, L., Tundis, R. et Loizzo, M. R., Chemical compositions and antioxidant activities of essential oils, and their combinations, obtained from flavedo by -product of seven cultivaras of sicilian *Citrus aurantium* L., Journal of Molecules, V. 27 (1580), (2022), 1-13.

Bajpai, S., Les huiles essentielles comme pesticides verts, *Pensez à l'Inde Journal*, V. 22 (14), (2019), 11957-11976.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. et Idaomar, M., Effets biologiques des huiles essentielles – une revue, *Toxicologie alimentaire et chimique*, V. 46 (2), (2008), 446-475.

Başer, K. H. C. et Demirci, F., Chimie des huiles essentielles dans les arômes et parfums : chimie, bioprocédés et durabilité, *Journal de Ralf Guntur Berger*, (2007), 43-86.

Baudoux, D., *Aromathérapie*, Dunod édition, France, (2017), 534p.

Belsito, E. L., Carbone, C., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Liguori, A., Perri, F., Siciliano, C. et Viscomi, M. C., Comparison of the volatile constituents in cold-pressed bergamot oil and a volatile oil isolated by vacuum distillation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 55 (19), (2007), 7847-7851.

Bendali, A., Oulebsir, C., El-Hadi, D. et Djazouli, Z. E., Impact de la formulation sur le potentiel antifongique de l'huile essentielle du bigaradier *Citrus aurantium* L., *Revue Agrobiologia*, V.9 (2), (2019), 1677-1693.

Benouaklil, F., Hamaidi-Chergui., Hamaidi, M.-S. et Saidi, F., Valorisation d'une adventice poussant en Algérie : *Chrysanthemum coronarium* L, *Phytothérapie*, (2020), 1-8.

Bonomo, M.G., Russo, D., Cristiano, C., Calaborne, L., Di Tamaso, K, Milella, L. et Salzano, G., Antimicrobial activity, antioxidant properties and phytochemical screening of *echinacea angustifolia*, *fraxinus excelsior* and *crataegus oxyacantha* mother tinctures against food-borne bacteria, *EC Microbiol*, (2017), V. 7(5), 173- 181.

Bouaoun, D., Hilan, C., Garabeth, F. et Sfeir, R., Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss, *Phytothérapie*, V. 5(3), (2007), 129-134.

Bouchenak, O., Yahiaoui K., Laoufi, R., Benhabyles, N., El Haddad, D. et Arab, K., Caractérisation phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*, *Revue Agriculture*, V. 11(1), (2020), 51-57.

Bougandoura, N. et Bendimerad., Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* spp. *Nepeta* (L.) Briq, Revue Nature et technologie. B-Sciences Agronomiques et biologiques, V. 9, (2013), 14-19.

Bouguerra, A., Himed, L. et Barkat, M., Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*, Journal de Société Algérienne de Nutrition. Santé, V. 3 (1), (2014), 32-39.

Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F. et Chefrof., A., Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région Hammamet (Tébessa-Algérie), Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, V. 85, (2016), 174-189.

Brahimi, F., Achat, S., Guendouze-Bouchefa, N., Benazzouz-Smail, L., Elsebai, M. F. et Madani, K., Recent advances in the identification and the study of composition and activities of medicinal plants, Journal. Coast Life Med, V. 4, (2016), 983-999.

Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L. et Roques, C., Effets antibactériens, antifongiques et antiviraux de trois mélanges d'huiles essentielles, Microbiologie ouverte, V. 6(4), (2017), 1-6.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. Technique et Documentation Lavoisier. Paris, (1999), 1120p.

CASFM., Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, (2011), 67p.

Chabenat, H. et Couic-Marinier, F., L'aromathérapie en infectiologie, un complément de l'antibiothérapie. Actualités Pharmaceutiques, V. 60(606), (2021), 37-39.

Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., Ed-Dra., Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc, Phytothérapie, V. 14 (6), (2015), 1-8.

Chemat, F., Albert- Vian, M. et Fernandez, X., Microwave- assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, Springer science Edition, New-York, (2012)., 231p.

Chen, M. H., Yang, K. M., Huang, T. C. et Wu, M. L., Traditional small- size *Citrus* from Taiwan: essential oils, bioactive compounds and antioxidant capacity, Journal of Medicines, V.4 (28), (2017), 1-11.

Chenni, M. et El Abed, D., Processus for extracting bioactive products (procédés d'extraction des produits bioactifs, phytochemistry and bioactives substances journal, V.11(1), (2017), 1-29.

Chi, P. T. L., Van Hung, P., Le Thanh, H. et Phi, N. T. L., Valorization of *Citrus* eaves: Chemical composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of essential oils, Waste and Biomass valorization, V.11, (2019), 4849-4857.

Chisholm, M. G., Wilson, M. A. et Gaskey, G. M., Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle), Flavour and fragrance journal, V. 18, (2003), 106-115.

Choi, H. S., Song, H. S., U, H. et Sawamura, M., Radical-Scavenging activities of *Citrus* essential oils and their components: detection using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Journal of Agricultural and Food Chemistry, V. 48 (9), (2000), 4156-4161

Conforti, F., Statti, G. A., Tundis, R., Loizzo, M. R. et Menichini, F., In vitro activities of *Citrus medica* L. cv. Diamante (diamante citron) relevant to treatment of diabetes and alzheimer's disease, Phytotherapy Research, V. 21, (2007), 427-433.

Costa, R., Bisignano, C., Filocamo, A., Grasso, E., Occhiuto, F. et Spadro, F., Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle essential oil from Italian organic corps, Journal of essential oil research, V.26 (6), (2014), 1-24.

Croteau, R., Kutchan, T. M. et Lewis, N. G., Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant physiologists Edition, USA, (2000),1367p.

Daniel, G. et Hans, H. S., De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique, Journal Suisse Médical Forum, V.20, (2023a), 464-468.

Dhifi., W., Belli, S., Jazi, S., Bahloul, N. et Mnif, W., Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines, (2016), V. 3(4), 25.

Diop, S. M., Gueye, M. T., Ndiaye, E. H. B., Thiam, A., Cissokho, P. S., Sanghare, C. H. et Fauconnier, M. L., Activités antioxydante et insecticide d'huiles essentielles de *Mentha arvensis* L. du Sénégal, International Journal of biological and chemical sciences, V.15 (3), (2021), 966-975.

Doukani, K. et Tabak, S., Profil phytochimique de quelques espèces de *Citrus* (*C. aurantium*, *C. sinensis* et *C. limonum*), *Revue Ecologie -Environnement*, V. 13, (2017), 1-4.

DSA (direction des prestations de service agricoles)., *Rapport annuelle des services Agricoles*, (2014).

Elansary, H. O., Abdelgaleil, S. A. M., Mahmoud, E. A., Yessoufou, K., Elhindi, K. et El-Hendawy, S., Effective antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of essential oils of horticultural aromatic crops in northern Egypt, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, V. 18 (214), (2018), 1-10.

Enejoh, O. S., Ogunyemie, I. O., Bala, M. S., Oruene, I. S., Suleiman, M. M. et Ambali, S. F., Ethnomedical importance of *Citrus aurantifolia* (Christm) swingle, *The Pharma Innovation Journal*, V. 4(8), (2015), 1-6.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)., *Citrus fruit statistics, Market and Policy Analyses of Raw Materials, Horticulture and Topical (RAHMOT) products Team, Trade and Markets Division*, (2015), 47p.

Ferhat, M. -A, Boukhatem, M., Hazzit, M. et Cemat, F., Rapid extraction of volatile compounds from *Citrus* fruits using a microwave dry distillation. *Journal of Fundamental and Applied Science*, V. 8(3), (2016), 753-781.

Fontanay, S., Mougnot, M. E. et Duval, R. E., Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires, *Hegel la revue de santé intégrative*, V. 5(2), (2015), 109-118.

Fourmentin, S. et Kfoury, M., Les huiles essentielles : renaissance d'ingrédients naturels et durables Essential oils: the renaissance of natural and sustainable ingredients, *Technologie et innovation*, V. 24(9), (2024), 1-21.

Fyad, K., Cherifi, A., Bourmita, Y. et Belboukhari, N., Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Coriandrum sativum* L et *Pimpinella anisum* L au cours de développement végétatif, *Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory Journal*, V. 7 (1), (2013), 35-39.

Galovičová, L., Borotová, P., Vukovic, N. L, Vukic, M., Kunová, S., Hanus, P., Kowalczewski, P. L., Bakay, L. et Kačániová, M., L'utilisation potentielle des huiles essentielles de *Citrus*

aurantifolia L. pour le contrôle de la pourriture, la préservation de la qualité des produits agricoles et l'activité anti-insectes, *Agronomie*, V. 12, (2022), 1-12.

Gamarra, F., Sakanaka, L., Tambourgi, E. et Cabral, F., Influence on the quality of essential oil against food-borne pathogens isolated from cream -filled caked and pastries. *International Journal of Biological chemistry*, V. 5(4), (2006), 1-8.

Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Isamili, M. R., Houti, H., El Monfalouti, H., Benchakroun, K. H., Aberchane, M., Harki, L., Boukir, A., Chaouch, A. et Charrouf, 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 Guercif (Maroc oriental), *Phytothérapie*, V. 8(5), (2010), 295-301.

Ghomari, F. N., Kouache, B., Arous, A. et Cherchali, S., Effet de traitement par fumigation du thym (*Thymus vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la varroase des abeilles, *Revue Nature et Technologie. B-Sciences Agronomiques et Biologiques*, V. 10, (2014), 34-38.

Habibou, H. H., Idrissa, M., Ikhiri Khalid, P., Benjamin, O., Rabani, A., Activité antioxydante des extraits méthanoliques de différents organes des *Detarium microcarpum* Guill. & Perr, *European scientific Journal*, V.15(12), (2019), 159-171.

Haddoudi, M., Mellouk, H., Bejjany, B., Dani, A. et Digua, K., Valorisation du marc de café : extraction de l'huile et évaluation de son activité antioxydante, *Les technologies de laboratoire*, V.8 (36), (2014), 29-37.

Hazrulrizawati, A. B., Silvarajoo, N. et Nurulhusna, A. B. H, Chemical composition and repellent activity against mosquito *Aedes aegypti* of *Pelargonium radula*, *Syzygium aromaticum* and *Citrus aaurantifolia* essential oils, *Materials science forum*, V. 981, (2020), 253-257.

Himed, L., Merniz, S. et Barkat, M., Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation, *Algerian Journal of Natural Products*. V. 4(1), (2016), 252-260.

INRAA., Rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture en Algérie, (2006), 67p.

ISO 279 (International Organization for Standardization)., Huile essentielles- détermination de la densité relative à 20°C (méthode de référence), (1981), 2p.

ISO 9235 (international Organization for standardization)., Aromatic natural raw materials – Vocabulary, iTeh STANDARD PREVIEW, Suisse, (2021),7p.

ISO 3519 (International Organization for Standardization)., Huile essentielle de lime [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle], obtenue par distillation, Deuxième édition, (1997),5p.

Izah, S. C. et Odubo, T. C., Effects of *Citrus aurantifolia* fruit Juice on selected pathogens of public health importance, Journal of ES food and Agroforestry, V.11 (829), (2023), 1-14.

Jantan, I., Ahmed, A. S., Ahmed, A. R., Ali, N. A. M. et Ayop, N., Chemical composition of some *Citrus* oils from Malaysia, Journal of essential oil research, V. 8(6), (1996), 627-632.

Julaeha, E., Dewi, K. S., Nurzaman, M., Wahyudi, T., Herlina, T. et Hardianto, A., Chemical compositions and antioxidant activities of Indonesian *Citrus* essential oils and their elucidation using principal component analysis, Journal of Chemistry and Materials Science, V.1, (2020), 1-12.

Kalemba, D. et Kunicka, A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils, Current medicinal chemistry, V. 10 (10), (2003), 813-829.

Kataki, C., Dutta, K., Bhattacharjee, M., Sharma, D., Agarwala, S., Sarma, U. K. et Baruah, M., Analysis of nutritional components, antioxidant activity and antimicrobial activity of *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle of Assam, India, Journal of Advanced Zoology, V. 44, (2023), 788-793.

Katekar, V. P., Rao, A. B. et Sardeshpande, V. R., Bilan de l'extraction de l'huile essentielle de rose par hydrodistillation : Une enquête pour les conditions opératoires optimales pour un rendement maximum, Chimie et Pharmacie Durables, V. 29, (2022), 100783.

Kengne, L. G., Nyegue, M. A., Ndedi, E. D. F. M. et Etoa, X., Antibacterial activity of selected plant essential oils on airborne bacteria and mode of action on membrane integrity, American Journal of essential oils and natural products, V. 7 (1), (2019), 28-35.

Kerboua, M., L'agrumiculture en Algérie. Option méditerranéenne : série B. Etudes et recherches, n. 43, Ed. CIHEAM, (2002), 21-26.

Ketaam, Y. et Shamsi, S., Comparative analysis of antioxidant properties and phenolic contents in aqueous and ethanolic extracts of *Citrus aurantifolia* using DPPH and ABTS radical scavenging assays, Fezzan University scientific Journal, V. 3(1), (2024), 414-422.

Khoudali, S., Benmessaoud left, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M. et Benaissa, M., Etude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier main (*Chamaerops humilis.L*) du Maroc, *Journal of materials and environmental science*, V.5(3), (2014), 887-898.

Kpadonou, K., Kpadonou-Kpoviessi, B., Glinma, B., Orou, A. A. S., Agbani, P., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Baba-Moussa, L. et Kpoviessi, S., Effects of the chemical composition of essential oils from seven plants used in traditional medicine in Benin on the growth of eleven pathogenic bacteria in antimicrobial control, *Journal of pharmacognosy and Phytochemistry*, V. 11 (1), (2022), 23-31.

Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E. et Shok, M., «Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract», *Phytomedicine*, V. 10, (2003), 59-61.

Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci, F., El Harrak, A. et Costa, J., Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme, *Journal of materials and environmental science*, V. 5(6), (2014), 1770-1780.

Laib, I. et Barkat, M., Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*, *Agriculture*, V.2 (2), (2011), 89-101.

Lee, M. S., Choi, J., Posadzki, P. et Emst, E., Aromatherapy for health care: an overview of systematic review, *Maturitas*, V. 71(3), (2012), 257-260.

Lemes, R. S., Alves, C.C.F., Estevam, E. B.B., Santiago, M. B., Martins, C. H. G., Dos Santos, T. C. L., Crotti, A. E. M. et Miranda, M. L. D., chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria, *Annals of the Brazilian Academy of sciences*, V. 90 (2), (2018), 1285-1292.

Lichtfouse, E., *Sustainable Agriculture Reviews*, springer science Edition, (2013), V.12, 1-361.

Loupy, A., *Microwaves in Organic Synthesis*, 2^{ème} édition (2 Volumes), Wiley- VCH Weinheim Edition, (2006), Allemagne, 986p.

Lv, X, Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Xiao, C., Lu, C. et Liu, Y., *Citrus* fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health, *Chemistry Central journal*, V. 9(68), (2015), 1-14.

Manner, H. I., Buker, R. S., Smith, V. E., Ward, D. et Elevitch, C. R., *Citrus* (Citrus) and *Fortunella* (Kumquat), Species profiles for pacific Island agroforestry, V. 2, (2006), 1-35.

Merouane, A., Noui, A., Medjahed, H., Nadjari Benhadj Ali, K. et Saadi, A., Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle, International Journal of Biologie and Chemical Sciences, V. 8(4), (2014), 1865-1870.

Mohammed, I. O., Alrasheid, A. A. et Hussein Ayoub., GC-MS analysis and study of the antimicrobial activity of *Citrus paradisi*, *Citrus aurantifolia*, and *Citrus sinensis* Peel essential oils as hand sanitizer, International Journal of microbiology, V. (2024). (2024), 1-11.

Mouchid, K., Dersi, N., Belik, A., Aboussouira, T., Rachidai, A., Zarrouck, A., Tantaoui-Elaraki, A. et Alaoui- Ismail, M., Caractérisation chimique et recherche de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus* et *Mentha pulegium* du sud marocain, Congrès international de Biochimie, (2004), 525-527.

Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH° for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of science and technology, V.26(2), (2004), 211-219.

Morais, L. A. S., Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais, Horticultura Brasileira, V. 27(2), (2009), 4050-4063.

Narang, N. et Jiraungkoorskul, W., Anticancer Activity of key lime, *Citrus aurantifolia*, Plant review, V. 10, (2016), 118-122.

Nikita, R. et Bhanushree, G., Extraction, caractérisation, propriétés biologiques et applications des huiles essentielles : une revue, Journal de l'Université Ravishankar (*Partie B*), V. 36(2), (2023), 72-93.

Osanloo, M., Yousefpoor, Y., Alipanah, H., Ghanbariasad, A., Jalilvand, M. et Amani, A., In vitro assessment of essential oils as anticancer therapeutic agents: a systematic literature review, Jordan journal of pharmaceutical sciences, V. 15(2), (2022), 173-203.

ONS (Office National des Statistiques)., Office national des statistiques, Algérie, (2008).

Ouelhadj, A., Salem, L. A. et Djenane, D., Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pelargonium asperum* et son potentiel synergique avec la nisine. *Phytothérapie*, V.17(3), (2019), 140-8.

Ouibrahim, A., Tlili-Ait Kaki, Y., Bennadja, S., Mansouri, R., Ait Kaki, S., Khbizi, S. et Djebar, M. R., Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis L.* provenant de la région d'El Kala (Nord-Est Algérien), *Algerian Journal of Nature Products*, V.3 (3), (2015), 209-216.

Oussou, K. R., Kanko, C., Philomène, K. A., Guessennd, K. N. et Boti, J. B., Chemical composition and inhibitory effects of essential oils of two Rutaceae of Côte d'Ivoire: *Clausena anisate* and *Citrus aurantifolia*, *International Journal of engineering and Applied sciences (IJEAS)*, V.4 (12), (2017), 8-12.

Oyaizo, M., Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, V.44, (1986), 307-315.

Pandey, M., Debnath, M., Gupta, S. et Chikara, S., *Phytomedicine: An ancient approach timing into future potential source of therapeutic*. *Journal of Pharmacognosy and Phototherapy*, V. 3, (2011), 27-37.

Parthasarathy, V. A., Chempakam, B. et Zachariah, T. J., *Chemistry of spices*, Édition CABI, Londres, Royaume-Uni. (2008), 435p.

Permadi, N., Nurzaman, M., Doni, F. et Julaeha, E., Elucidation of the composition, antioxidant, and antimicrobial properties of essential oil and extrat from *Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle peel*, *Saudi Journal of biological Sciences*, V. 31, (2024), 1-11.

Pharmacopée européenne, 9^e édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe, (2016).

Pisseri, F., Bertoli, A. et Pistelli, L., *Essential oils in medicine: principles of therapy*, *Parasitologia*, V.50 (1-2), (2008), 89-91.

Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C. et Roura, S. I., Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *LWT- Food Science and Technology*, V. 36, (2003), 679-684.

Puspita, S., Eddy, D. R., Wahyudi, T. et Julaeaha, E., Microencapsulation of lime peel essential oils (*Citrus aurantifolia*) with complex coacervation methods using Gelatin/ sodium alginate coating, *Journal Kimia Valensi*, V. 6 (1), (2020), 104-110.

Qian, W., Liu, M., Fu, Y., Wang, T., Zhang, J., Yang, M., Sun, Z. et Li, X., Antimicrobial and antibiofilm activities of citral against carbapenem-resistant *Enterobacter cloacea*, *Foodborne Pathogens and Disease*, V. 17 (7), (2020), 459-465.

Rout, S., Tambe, S., Deshmukh, R. K., Mali, S., Cruz, J., Srivastava, P. P., Amin, P., Gaikwad, K. K., Andrade, E. et Oliveira, M. S., Recent trends in the application of essential oils: The next generation of food preservation and food packaging, *Trends in Food Science & Technology*. V. 129, (2022), 421-439.

Safaeian Laein, S., Salari, A., Shahsavani, D. et Haghishani, H., Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential oil lime (*Citrus aurantifolia*) Pomace Powder, *Iranian Journal of chemistry and chemical engineering*, V. 40(3), (2021), 832-840.

Sammama, A., Kerrouri, S., El yahyaoui, O., Bouabid, B., Ould Abdellahi, L., Lrhorfi L, A. et Bengueddour, R., Variability of the antibacterial activity of *Citrus limon*, *Citrus limetta* and *Citrus aurantifolia* depending on solvents, extraction methods and conventional growth of multi-resistant strains, *Research Journal of Chemistry and Environment*, V. 25 (2), (2021), 7-19.

Sapadro, F., Costa, R., Circosta, C. et Occhiuto, F., Volatile composition and biological activity of Key lime *Citrus aurantifolia* essential oil, *Natural product communications*, V. 7(11), (2012),1523-1526.

Selmi, S., Rtibi, K., Hosni, K. et Sebai, H., Essential oil, chemical compositions, and therapeutic potential. *Essential Oils: Advances in Extractions and Biological Applications*, IntechOpen, V.32(228),(2022),163-176.

Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L. et Ciarallo, G., Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. Leaves, and chemical analysis of the essential oil, *Annals of botany*, V. 79, (1997), 329-336.

Sharma, R. K., Sharma, N., Samant, S. S., Nandi, S. K. et Palni, L. M. S., Antioxidant activities in methanolic extracts of *Olea Ferruginea* Royale fruits, *International Journal of bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, V. 3 (2), (2013), 154-156.

Souiy, Zoubeida., Huiles essentielles : Avancées récentes, nouvelles perspectives et applications, IntechOpen Edition, London, (2023), 186p.

Souza, S.V., Ionta, M., Borges, C., Ferreira, V. R. F., Caetano, A. R. S., Campolina, G. A., Horvath, R. D.O., R, D., Nelson. et Cardoso, M. D. G., Antioxidant and antitumoral Potential of terpenes and phenylpropanoids against MCF7, A549 and HT144 cancer cell lines, Australian Journal of Crop science, V. 16(3), (2022), 372-380

Syafri, S., Husni, E., Wafiqah, N., Ramadani, S. et Hamidi, D., Evaluation of antimicrobial and proliferation of fibroblast cells activities of *Citrus* essential oils, Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, V. 10 (10), (2022), 1051-1057.

Sylvie, C., La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! , Pharmactuel, V. 42, (2009), 6-21.

Tagne, A, Zollo, P. A, Fontem, D., Mathiur, S. et Neergaad, E., Fungicides and essential oils for controlling maize seed- borne Fusariummmoriliforme andits transmission into seedings, Word Journal of Agricultural Science, V. 9(3), (2013), 290-297.

Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H. et Rather, M. A., A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens, Microbial pathogenesis. V. 134, (2019), 1-20.

Thonglem, S., Khumweera, P. et Lahpun, N., GC-MS analysis, Antioxidant activity and antimicrobial activity of *Kaffir lime (Citrus hystrix DC.)* and *key lime (Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle.)* Peel essential oils, Journal of Current Science and Technology, V. 13 (3), (2023), 620-629.

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A. et Nazemi, J., Effet antibacterien des huiles essentielles de deux plantes médicinales contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), Phytomédecine, V. 17(2), (2010), 142-145.

Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. et Colica, C., Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia Swingle*, *C. aurantium L.*, *bergamia Risso* and *Poit.* Peel essential..., Journal of Food Science, V. 71 (1), (2012), 40-46.

Tyagi, A. K. et Malik, A., Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms, *Food Control*, V. 22(11), (2011), 1707–1714.

Ultee, A., Bennik, MHJ. et Moezelaar, R., The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Application Environ Microbiol*, V. 68(4), (2002), 1561-1568.

Venkateshwarlu, G. et Selvaraj, Y., Changes in the peel oil composition of kagzi lime (*Citrus aurantifolia Swingle*) during Ripening, *Journal of essential oil research*, V.12, (2000a), 50-52.

Villano, D., Fernandez-Panchon, M. S., Moya, M. L., Troncoso, A. M. et Garcia-Parilla, M. C., Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*, V.71, (2007), 230-235.

Whiley, H., Gaskin, S., Schroder, T. et Ross, K., Propriétés antifongiques des huiles essentielles pour l'amélioration de la qualité de l'air intérieur : une revue, *Revue sur la santé environnementale*, V. 33(1), (2018), 63-76.

Wilkinson, J. M., *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*, Wiley-VCH Edition, Allemagne, (2006), 384p.

Wu, Z., Li, H., Yang, Y., Zhan, Y. et Tu, D., Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica L. var. sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity, *Journal of Industrial Corps and Products*, V. 46, (2013), 311-316.

Yichen, Hu., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G. et Yang, M., Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa L.*) on *Aspergillus flavus*, *Food chemistry*, V. 220, (2017). 1-8.

Zabka, M., Pavela, R. et Prokinova, E., Antifungal Activity and composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor and aeroallergenic fungi, *Chemosphere*, V. 112, (2014), 443-448.