

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique

Université Blida-1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des Populations et des Organismes

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Phytothérapie et santé

Thème

Extraction de l'huile essentielle de *Fortunella margarita L.* (Kumquat) et étude de son activité antibactérienne et antiproliférative.

Présenté par :

M^{elle} EL FARES Sakina

Date de soutenance :

28/10/2015

Devant le jury :

- | | | | |
|-------------------------------------|----------|------|----------------|
| ➤ M ^{me} MAKHLOUF Ch. | MAB/BPO | UDB1 | Présidente. |
| ➤ M ^{me} BENSALAH L. | MAA /BPC | UDB1 | Examinatrice. |
| ➤ M ^{me} BRADEA M, S. | MCA/BPO | UDB1 | Promotrice. |
| ➤ M ^{me} BRAHIM RAHMANI D. | MAB/BPO | UDB1 | Co-Promotrice. |

Année universitaire : 2014-2015

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mon pays.

A ma grand'mère "Mémé" ALLOUCHE-KOUIDRI Aicha pour sa bonté, son dévouement, son courage, sa patience et surtout ses encouragements.

A Papa et Maman, pour leur amour qu'ils m'ont apporté et tous leurs sacrifices.

A mon fiancé Alioui Younes.

A mes sœurs Zahra et Hasna.

A mon oncle ALLOUCHE Mohamed "ZINO", mes tantes Lamia, Amal, Louiza, Hanane, Sabra.

A mes cousins, cousines.

A toute ma famille.

A mes amies.

Sakina (Israa)

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail.

Qu'il me soit permis d'évoquer Madame M.S BRADEA (MCA au niveau du département BPO) dont j'ai eu le privilège d'être son étudiante, qu'elle trouve ici toute mon admiration pour sa compétence, son enthousiasme communicatif et aussi son dévouement tant à ses étudiants qu'à ses collaborateurs, je la remercie pour l'intérêt et toute l'aide qu'elle a accordé à cette étude, permettant ainsi l'achèvement et l'édition de ce travail, et m'a prodigué constamment conseils et encouragements tout au long de cette première tentative de recherches.

Je remercie également ma co-promotrice, Madame D. BRAHIM RAHMANI (MAB/BPC au niveau de l'UDB1), d'avoir bien voulu diriger et encadrer ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ses conseils précieux, ses orientations judicieuses et ses directives efficaces, ainsi que pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses.

L'occasion m'est offerte de témoigner ma vive gratitude à Madame Ch. MAKHLOUF (MAB/BPO au niveau de l'UDB1), pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury

Je tiens à remercier Madame L. BENSALAH (MAA/BPC au niveau de l'UDB1) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime mon respect le plus profond, mes vifs remerciements à l'encadreur du projet de fin d'étude de mon ingéniorat Madame F. ROUAKI (MAA/BPC au niveau de l'UDB1), pour tous ses conseils qui sont restés incrustés dans ma mémoire.

Je remercie également Monsieur BELKHBEZ D. directeur de l'établissement mère-enfant de Tipaza ainsi que tous les membres du laboratoire des projets de fin d'étude (PFE) de l'UDB1.

Je remercie Madame BRIKI du département d'agronomie de L'université Blida -1-

Mes vifs remerciements s'adressent également à Madame CHERIF qui a accepté mon intégration en master ainsi qu'à tous les professeurs qui m'ont accompagné pendant mes années d'étude.

Enfin, je remercie gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

N°: numéro

G ×: grossissement

AFNOR : Association Française de Normalisation

APG: Angiosperm Phylogeny Group

ATB: Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines

E.H.S : Etablissement Hospitalier Spécialisé

ENSA: Ecole Nationale des Sciences Agronomiques

HE : Huile Essentielle

NCCLS: national committee for clinical laboratory standards

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ISO: International Organization for Standardization

Liste des tableaux

Tableau I : situation géographique de la région de récolte des fruits de <i>Fortunella margarita</i>	15
Tableau II : les souches cliniques testées pour leurs sensibilités aux antibiotiques et à l'HE <i>Fortunella margarita</i>	15
Tableau III : Les souches de référence utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Fortunella margarita</i>	16
Tableau IV : Matériel, fournitures et équipements de base utilisés pour effectuer notre étude.....	(Annexe)
Tableau V : conditions opératoires de l'hydrodistillation.....	(Annexe)
Tableau VI : identification biochimique de la galerie Api 20E.....	(Annexe)
Tableau VII : La liste des antibiotiques à tester en fonction des espèces bactériennes sont présentés.....	(Annexe)
Tableau VIII : résultat de l'étude macroscopique des différents échantillons.....	31
Tableau IX : résultats de l'étude microscopiques des différents échantillons d'urine.....	32
Tableau X : Caractères morphologiques des souches bactériennes isolées cliniquement.....	33
Tableau XI : Caractères biochimiques des souches bactériennes testées.....	34
Tableau XII : Résultats de l'antibiogramme des souches cliniques isolées.....	37
Tableau XIII : diamètre d'inhibition des souches bactériennes étudiées.....	39
Tableau XIV : taux de croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en présence d'HE de <i>Fortunella margarita</i>	(Annexe)

Liste des figures

Figure N° 01 : Schéma représentatif de la technique d'hydrodistillation	6
Figure N° 02 : Principales régions productrices d'agrumes dans le monde	10
Figure N° 03 : Aspect de l'arbre de <i>Fortunella margarita</i>	12
Figure N° 04 : Feuilles caractéristiques de <i>Fortunella margarita</i>	12
Figure N° 05 : Fleur caractéristique de l'espèce <i>Fortunella margarita</i>	13
Figure N° 06 : Coupe longitudinale du fruit de <i>Fortunella margarita</i>	13
Figure N° 07 : Souche fongique commerciale, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Annexe)	
Figure N° 08 : Dispositif d'extraction par hydrodistillation	18
Figure N° 09 : Illustration de la méthode d'aromatogramme	25
Figure N° 10 : illustration des zones d'inhibition de la croissance des bactéries.....	26
Figure N° 11 : Cellules sécrétrices d'huile essentielle de <i>Fortunella margarita</i> observées sous microscope photonique G : 40 x.....	30
Figure N° 12 : Caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i> par la galerie API 20 E	34
Figure N° 13 : Caractères biochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i> par la galerie API 20 E.....	35
Figure N° 14 : Caractères biochimiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie API 20 E.....	35
Figure N° 15 : Caractères biochimiques d' <i>Enterobacter cloacae</i> par la galerie API 20 E.....	36
Figure N° 16 : Diamètres d'inhibition de quelques souches bactériennes obtenues par la méthode de diffusion sur gélose..... (Annexe)	
Figure N° 17 : Evolution des concentrations cellulaires des différents essais en fonction du temps....	41

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : partie bibliographique	
I.1. Généralité sur les huiles essentielles.....	3
I.1.1. historique.....	3
I.1.2. Définition.....	3
I.1.3. Composition des huiles essentielles.....	3
I.1.4. Domaine d'utilisation	3
I.1.5. Répartition et localisation.....	4
I.1.6. Procédés d'extraction.....	5
I.1.7. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	7
I.1.8. Activités biologiques des huiles essentielles.....	8
I.1.9. Conservation des huiles essentielles.....	9
I.2. Généralités sur la plante.....	10
I.2.1. Répartition géographique.....	10
I.2.2. Appellations et synonymes.....	10
I.2.3. Etymologie.....	11
I.2.4. Place dans la systématique.....	11
I.2.5. Présentation de la plante.....	12
I.2.6. Composition de l'essence de <i>Fortunella margarita</i>	14
I.2.7. domaine d'utilisation.....	14
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1. Matériel.....	15
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Identification de la plante.....	16
II.2.2. Technique d'étude histologique.....	17
II.2.3. Extraction de l'huile essentielle.....	17

II.2.4. Rendement de l'extraction.....	18
II.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Fortunella margarit</i>	19
II.2.5.1. Etude cyto bactériologique des urines (ECBU).....	19
II.2.5.2. Identification des souches bactériennes.....	21
II.2.5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques: antibiogramme par méthode de diffusion en disques.....	24
II.2.5.4. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'HE.....	25
II.2.6. Etude de l'activité antiproliférative de l'HE de <i>Fortunella margarita</i>	28
II.2.6.1. Evaluation de l'activité antiproliférative.....	29
II.2.6.1. Paramètres cinétique de la croissance cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
Chapitre III : Résultats et discussions	
III.1. Résultat de l'étude histologique de la plante.....	30
III.2. Rendement de l'extraction.....	30
III.3. Résultat de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Fortunella margarita</i>	31
III.3.1. Résultat de l'étude cyto bactériologique des urines (ECBU).....	31
III.3.2. Résultat de l'identification des souches bactériennes prélevées.....	33
III.3.3. Résultat de l'antibiogramme.....	37
III.3.4. Résultat de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Fortunella margarita</i>	39
III.4. Résultat de l'étude de l'activité antiproliférative de l'HE de <i>Fortunella margarita</i>	39
III.4.1. Evaluation des paramètres cinétique l'activité antiproliférative de l'HE de <i>Fortunella margarita</i>	41
Conclusion.....	44
Liste des références	45
Annexes.....	53

Introduction

Depuis l'antiquité, et certainement bien avant, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'homme. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques (**Schauenberg et Paris, 2010**).

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques qui dominent, c'est pour cela que la pharmacologie mais aussi la nutrition et l'agroalimentaire redécouvrent les vertus des plantes dites médicinales. Elles sont de plus en plus considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. Mais leurs usages traditionnels n'ont jamais disparus, bien au contraire. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2008, 80 % de la population mondiale reposaient sur la médecine traditionnelle pour leurs soins primaires (**Pierangeli et al., 2009**).

Dans le bagage chimique des plantes, les huiles essentielles, les alcaloïdes et autres composés phénoliques, représentent des molécules très utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires (**Bouzouita et al., 2008**). Une huile essentielle est un produit odorant, de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation simple, soit par un procédé mécanique sans chauffage (**Bruneton, 2009**). Les végétaux riches en essences dotés de diverses activités biologiques se trouvent surtout chez les Conifères, Myrtacées, Labiées, Ombellifères et Rutacées au niveau de différents organes de la plante (**Mautrait et Raoult, 2009**).

Les agrumes ont un poids économique sur la scène internationale de par leurs bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénolique (par exemple, les flavonoïdes), la vitamine C, et les caroténoïdes. Bien que les fruits soient utilisés principalement pour le dessert, ces derniers sont aussi des sources d'huiles essentielles de leurs composés aromatiques (**Minh et al., 2002**), de nombreux auteurs ont rapporté des activités biologiques très diversifiées d'huiles essentielles d'agrumes (**Sacchetti et al., 2005**).

L'Algérie de par sa situation géographique et climatique, possède une flore particulièrement riche et diversifiée depuis longtemps exploitée par la médecine traditionnelle et ses habitants, susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (parfumerie, pharmacie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes. Ces plantes aromatiques sont donc, la source de produit à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...), par ailleurs, on ne peut que se réjouir du fait que l'Algérie est un bon exemple de pays en développement qui a pris conscience de sa richesse et de l'importance de sa médecine traditionnelle puisque tout en s'efforçant de moderniser son système de santé sur le modèle occidental, elle rend prioritaire l'étude des plantes médicinales par les laboratoires de recherche universitaire, dans le but de rationaliser leurs utilisations encore très répandues dans

ce pays, dans ce contexte nous avons fait le choix d'étudier la plante *Fortunella margarita* appartenant à la famille des Rutaceae car un nombre très restreint de recherches lui ont été consacrées, visant un triple objectif :

- Extraction de l'huile essentielle de *Fortunella margarita* par hydrodistillation ;
- Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Fortunella margarita* ;
- Evaluation de l'activité antiproliférative sur un model de levure : *Saccharomyces cerevisiae*.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Partie bibliographique

I.1. Généralité sur les huiles essentielles

I.1.1. historique

Le règne végétal, offre à l'homme l'aliment, l'hygiène et la santé. Depuis longtemps, les parfums de ces végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques. Les Egyptiens, sont les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres développant le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'art de distillation. Hermann Boerhave (1668- 1738) fut l'un des premiers à décrire les huiles essentielles d'un point de vue chimique (**Lucchesi, 2005**).

L'aromathérapie est ensuite tombée dans l'oubli ; il a fallu attendre le XXème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En 1928 René-Maurice Gatte Fossé, chimiste Français publia l'ouvrage "aromathérapie" décrivant la relation entre la structure biochimique des huiles essentielles et ses activités antimicrobiennes. En 1929, le pharmacien Français Sevelinge, étudia les huiles essentielles en médecine vétérinaire en confirmant le potentiel antimicrobien élevé de ces substances aromatiques. En 1975, l'aromatologue Français, Franchomme, a mis en évidence l'importance du chémotype (**Fouche et al., 2000**).

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans différents domaines (**Zhiri, 2006**).

I.1.2. Définition

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques »

Depuis sa 9ème édition, la pharmacopée n'utilise que le terme « *huile essentielle* » pour désigner ces substances appelées aussi dans le langage courant par « essences naturelles », ou encore « extraits aromatiques » de plante. Le terme « *huile* » se rapporte au caractère visqueux et hydrophobe de ces substances, et le terme « *essentiel* » se comprenant comme étant la caractéristique principale de la plante, odorante (**Reynaud, 2006**)

I.1.3. Composition des huiles essentielles

Pour une même espèce, la composition varie en fonction du climat, de l'origine géographique, du mode de culture, de la saison de la récolte, de la partie de la plante utilisée, du matériel et des techniques employées pour la séparation, etc...

Partie bibliographique

Les composants des huiles essentielles peuvent être regroupés en six classes, selon **(Duraffourd., 2006)**:

- Les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile essentielle de kumquat;
- Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo;
- Les esters, tel que le salicylate de méthylique dans l'huile de wintergreen;
- Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères;
- Les cétones, telle que le menthol dans l'huile de menthe poivrée ;
- Les lactones et oxydes, telle que la coumarine des haricots de Tonka.

I.1.4. Domaine d'utilisation

Les huiles essentielles sont utilisées comme suit :

- En aromathérapie : branche de la phytothérapie basée sur l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques, contrairement à la phytothérapie où on utilise le totum de la plante, en aromathérapie on utilise des parties bien précises à cause des grands risques de toxicité que peuvent présenter les huiles essentielles **(Festy, 2011)**.

- En Parfumerie et cosmétologie : L'utilisation des huiles essentielles, à l'état dilué, sont utilisées dans les parfums, les crèmes et les gels permettant de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable, elles entrent également dans la composition très complexe et confidentielle mise au point par les grands parfumeurs **(Kaloustian, et al., 2012)**.

- En Industrie agro-alimentaire : comme rehausseurs de goût et pour améliorer la saveur des produits alimentaires élaborés. Depuis peu, les industriels ont souhaité l'utilisation d'huiles essentielles comme conservateur, au détriment des molécules de synthèse classique couramment utilisées **(Kaloustian, et al., 2012)**.

- En industrie chimique : l'huile essentielle est un mélange complexe. Il est possible d'isoler des molécules d'intérêt, soit pour un usage ultérieur en tant que produit naturel présent sous une seule forme énantiomorphe, soit pour la réalisation d'hémisynthèse avec l'obtention finale de nouvelles molécules **(Kaloustian, et al., 2012)**.

I.1.5. Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans diverses familles botaniques, elles peuvent se localiser dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées **(Vagi et al., 2005)** :

❖ Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y a 17500 espèces aromatiques.

Partie bibliographique

Les familles botaniques capable d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité des familles, exemple : Mytaceae (Girofle), Lauraceae (laurier), Rutaceae (kumquat), Apiaceae (coriandre),... etc. (**Bellakhdar, 1997**).

❖ Localisation

Il est bien connu que la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes. Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux. Il existe trois types de structures sécrétrices dans les plantes (**Schauemberg et Paris, 2010**):

- Les poils glandulaires épidermiques : les plantes possédant ces poils font partie des familles des Lamiacées, des Géraniacées, des Verbénacées.
- Les poches sphériques schizogènes : les glandes de type poche se retrouvent chez des plantes des familles des Astéracées, Hypéricacées, Rosacées, Rubiacées, Rutacées.
- Les canaux glandulaires lysi-gènes : on retrouve des canaux glandulaires dans tous les bois résineux, en particulier chez les Abiétacées et les Cupressacées; le pin maritime en est un exemple. Les familles suivantes contiennent aussi des espèces avec ce type de glande : les Apiacées (les fruits), les Dipterocarpacees, les Burséracées et les Anacardiacees.

Les huiles essentielles peuvent être stockées, dans tous les organes végétaux : fleurs (origan), feuilles (citronnelles), fruits (kumquat), écorce (cannelier), bois (bois de rose), racine (vétiver), rhizome (acore) ou graines (carvi). Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes, la composition pouvant varier d'un organe à l'autre (**leon et al., 2005**).

I.1.6. Procédés d'extraction

Il existe différentes techniques d'exploitation des plantes aromatiques, le choix du procédé influe directement sur la qualité des produits et sur le rendement de l'extraction. Il est orienté par la localisation histologique et la composition chimique de ces essences. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...).

Parmi les divers procédés d'extraction des huiles essentielles deux seulement sont admis par la pharmacopée française ainsi par l'A.F.N.O.R et l'I.S.O (**Padma, 2004**) :

- l'extraction par entraînement à la vapeur ;
- l'extraction par expression (pressage).

Néanmoins, le procédé le plus employé reste l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau. Les principales raisons de cette préférence sont (**Wenqtang et al., 2007**):

- la facilité de mise en œuvre du procédé.
- le procédé ne nécessite pas de dispositifs particuliers de sécurité.

- la rentabilité et la qualité du produit obtenu.

A. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, trois variantes sont possibles selon la texture et la fragilité de la matière première à traiter.

a) hydrodistillation simple

C'est la méthode la plus employée pour l'extraction des huiles essentielles (figure 1), dans ce système, le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. L'ensemble est porté à ébullition. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont entraînées par la vapeur d'eau créée. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolat. Le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le « Clevenger » (Lucchesi, 2005).

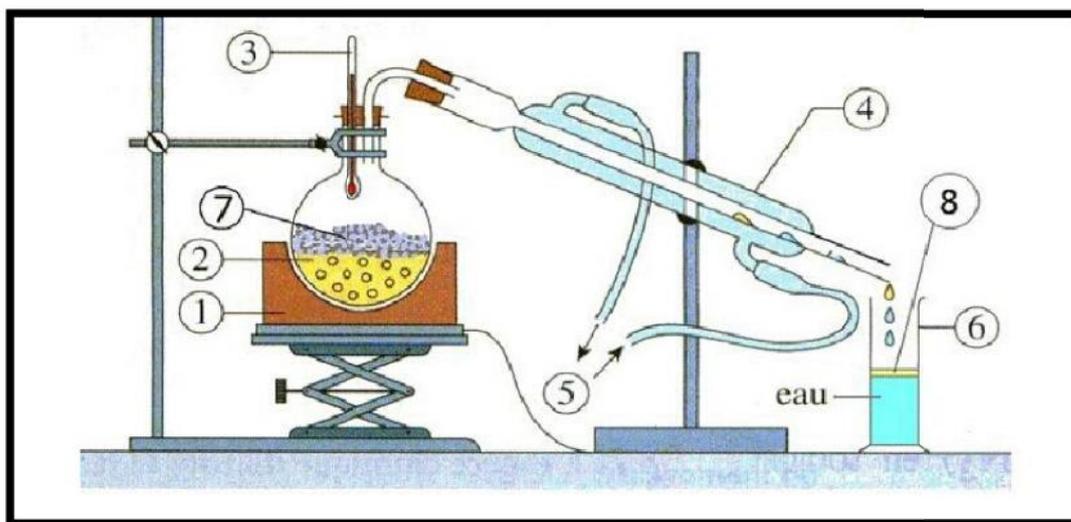


Figure N° 01 : Schéma représentatif de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)

- 1) Chauffe ballon
- 2) Ballon
- 3) Thermomètre
- 4) Réfrigérant
- 5) Entrée et sortie d'eau
- 6) Erlenmeyer
- 7) Matière à extraire l'huile essentielle
- 8) La couche d'huile essentielle

b) Entraînement à la vapeur d'eau

A la différence de l'hydrodistillation simple, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche d'eau est pulsée, les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent, les composés d'huile volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi (**Semen et Hiziroglu, 2005**).

c) Hydrodiffusion

Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétal. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes (**Sousa et al., 2002**).

B. Extraction par expression

C'est une technique simple où le matériel végétal est pressé mécaniquement à froid pour extraire son huile essentielle, cette méthode est essentiellement utilisée pour recueillir les huiles essentielles des épicarpes de citrus (citrons, orange, mandarines et pamplemousses) (**Dugo et Digiacomo, 2002**).

Autres procédés

D'autres procédés sont utilisés le plus souvent pour les plantes délicates qui ne supportent pas la chaleur comme l'enfleurage, l'extraction par solvants volatils ou l'extraction au CO₂ supercritique.

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

I.1.7. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène, Les principales caractéristiques sont (**Zabeiro et Hachimo, 2005**) :

- Liquides à température ambiante ;
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Volatiles et très rarement colorées ;
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;

Partie bibliographique

- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;

- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;

- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité.

I.1.8. Activités biologiques des huiles essentielles

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les effets synergiques possibles entre ses composants (**Lahlou, 2004**), Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés anti-oxydantes, antibactériennes, antivirales, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (**Vialard, 2008**). Parmi les différentes propriétés des huiles essentielles, on peut citer, les activités suivantes:

a) Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire (**Caillet et Lacroix, 2007**).

b) Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique ou la perturbation du contenu protéique des cellules. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leurs propriétés hydrophobes qui leur permettent de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**Cox et al., 2000**).

c) Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**).

d) Activité antiproliférative :

sur un organisme model, *Saccharomyces cerevisiae*, largement utilisé comme modèle pour étudier les mécanismes cellulaires fondamentaux et considéré comme l'organisme

Partie bibliographique

eucaryote le mieux étudié (**Otéro et al., 2010**). Cette levure présente une forte homologie avec les humains (**Foury, 1997**), c'est une cellule moins complexe que les cellules cancéreuse, elle représente un outil rapide, peu couteux et efficace pour l'étude de certains mécanisme à effet anticancéreux (**Matuo et al., 2012**).

I.1.9. Conservation des huiles essentielles

Selon **REYNAUD, (2006)**, Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions, jusqu'à cinq ans. Seules les essences de *Citrus* se gardent un peu moins longtemps (trois ans).

Les huiles essentielles sont volatiles, il faut les conserver dans des flacons fermés hermétiquement en aluminium ou en verre teinté (brun, vert ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière, à température ambiante.

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (normes AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des huiles essentielles (norme NF 75-002,1996).

I.2. Généralités sur la plante

I.2.1. Répartition géographique

Les agrumes (*Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*), dans leur ensemble appartiennent à la famille des rutacées sont en principe cultivés approximativement autour de l'équateur, du 40° Nord au 40° Sud (figure N° 02), on les rencontre par conséquent en priorité dans les climats de type méditerranéen.

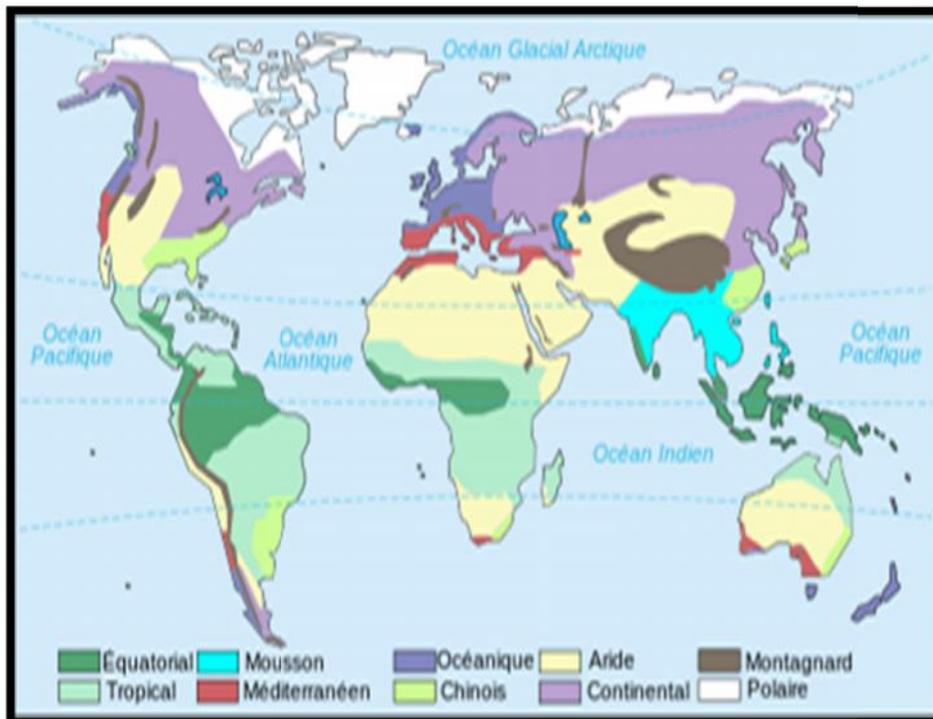


Figure N° 02 : Principales régions productrices d'agrumes dans le monde (Guimaraes et al., 2010)

En Algérie, les agrumes occupent le second rang après l'olivier en nombre d'arbres, mais leur importance économique les classe nettement en tête des productions fruitière, comme la figure l'indique, la culture commerciale est localisée dans la partie nord du pays (Rebourd, 2005).

I.2.2. Appellations et synonymes

Nom scientifique : *Fortunella margarita*

Ancienne appellation : *Citrus fortunella*

Nom vernaculaire Français : Kumquat

Nom vernaculaire Algérien : tchwina

I.2.3. Etymologie

Agrume également appelé mot « Kumquat » mot venant du chinois cantonais «gamgwat » signifiant « orange dorée » , arbre originaire de Chine et cultivé également en Californie, en Floride, dans le Bassin méditerranéen, au Japon, en Chine, en Indochine, en Indonésie, au Pérou et au Brésil, cet agrume fut au début intégré dans le genre Citrus puis, en 1915, la communauté botaniste lui attribua le genre Fortunella en hommage à celui qui l'apporta en occident, le botaniste écossais, Robert Fortune (**Tonelli et Gallouin, 2013**). C'est un genre d'agrume dont les espèces et les fruits sont généralement appelés Kumquat, les branches parfois épineuses portent des petites feuilles persistantes, ovales, et des fleurs blanches, suivis de petits fruits globuleux (**Martin, 2014**).

I.2.4. Place dans la systématique (Guinard, 2000)

La classification de Cronquist (1981) sur le genre Fortunella a permis de déterminer la systématique :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Fortunella*

Espèce : *Fortunella margarita*

Selon la classification APG III., (2009) :

Règne : Angiosperme

Sous règne : Dicotylédones vraies

Division : Noyau des Dicotylédones vraies

Classe : Rosidées

Sous classe : Malvidées

Ordre : *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Fortunella*

Espèce: *Fortunella margarita*

I.2.5. Présentation de la plante

Selon **POLESE., (2008)**, cette plante se présente comme suit :

-Arbuste fruitier avec de nombreuses branches qui lui confère une silhouette compacte.



Figure N° 03: Aspect de l'arbre de *Fortunella margarita* (Polese, 2008)

- Feuilletage : les feuilles sont persistantes, de couleur verte sombre lancéolée, à limbe nettement articulé, démontré sur la figure N° 04.

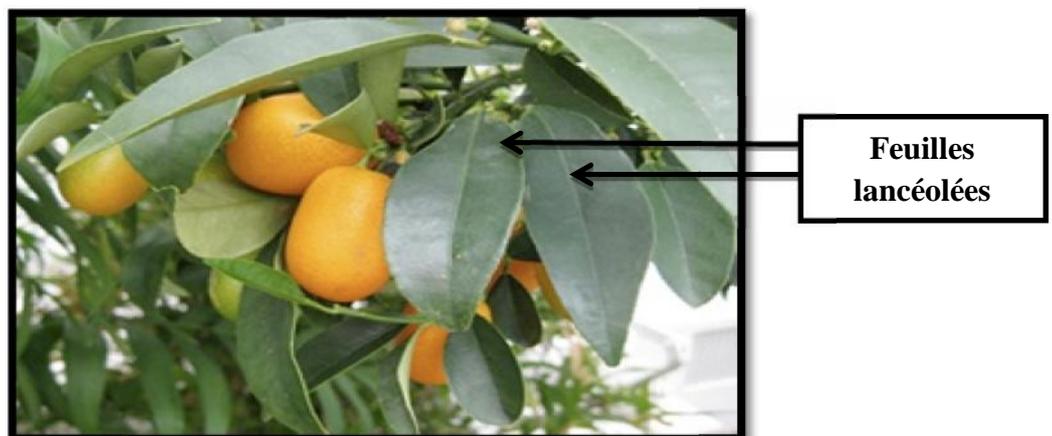


Figure N° 04: Feuilles caractéristiques de *Fortunella margarita* (Polese, 2008)

Partie bibliographique

-Les fleurs : nombreuses, de couleurs blanches vives, petites et très odorantes, sont solitaires ou en cymes. Elles ont peu d'étamines, démontées sur la figure N° 05.



Figure N° 05: Fleur caractéristique de l'espèce *Fortunella margarita* (Polese, 2008)

-Les fruits : après la fécondation la fleur donne une Hespéride de couleur jaune d'or cuivré à oronge à maturité. Forme ovoïde de 3 à 4 cm, renfermant de 3 à 6 quartiers, avec une peau fine qu'il est illusoire de vouloir séparer de la chair, plus au moins acide et parfumés renfermant peu de jus, l'aspect du fruit est indiqué dans la figure N° 06.

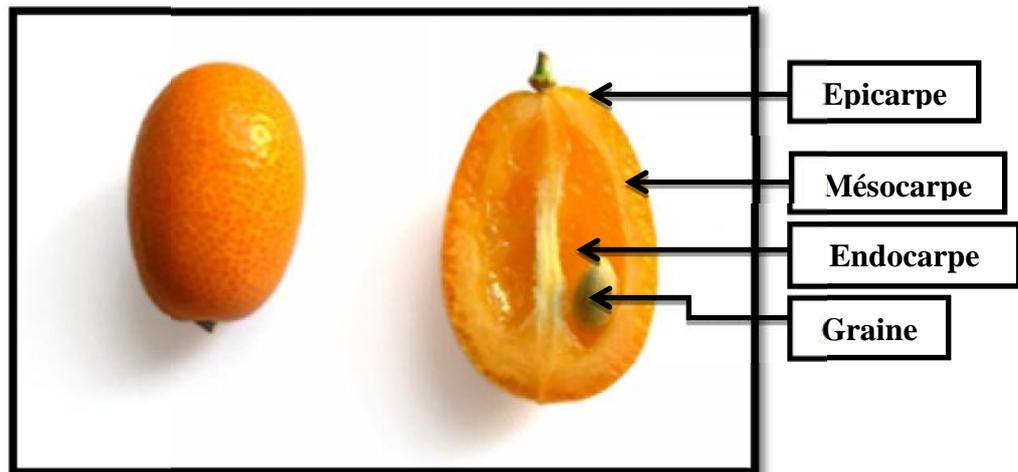


Figure N° 06: Coupe longitudinale du fruit de *Fortunella margarita* (Polese, 2008)

Graine : les graines sont nombreuses (6 à 10) contenant un seul embryon chlorophyllien.

I.2.6. Composition de l'essence de *Fortunella margarita*

Partie bibliographique

Selon **CHOI., (2005)**, l'huile essentielle du fruit de *Fortunella margarita* obtenues par hydrodistillation est composé principalement de monoterpènes hydrocarbonés, le limonène (90 %) et de myrcène (12,9%) et minoritairement de α -pinène (0,3%), trans-carvéol (0,6 %), d'acétate de géranyle (0,2%), de germacrène D (2,4%), et de composés oxygènes (trans-carveol et α -terpineol) (1,4%).

I.2.7. domaine d'utilisation

Grace à sa composition chimique et à son principe actif qui est le limonène, l'huile essentielle de kumquat possède des vertus considérables, très recherchée pour son action antimicrobienne, antioxydante et inhibitrice de la prolifération cancéreuse et, utilisée en aromathérapie ainsi qu'un grand pouvoir odorant permettant la production de parfum de haute gamme, de savons, en industries alimentaires comme aromatisants, en confiseries, en aromathérapie, pour l'entretien et soins de la peau (**Bardeau, 2009**).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

II.1. Matériel

A. Matériel biologique

a) Matériel végétale

Notre étude a porté sur les fruits de *Fortunella margarita* récoltés dans la région de Sidi rached de la wilaya de Tipaza (Algérie) durant le mois de février de l'année 2015, après la récolte, les fruits ont été vidé de l'endocarpe et conservé au congélateur dans des sacs fermés hermétiquement à la température de -18°C.

Les coordonnées géographiques ainsi que l'état bioclimatique de la région de récolte des fruits sont illustrés dans le tableau I.

Tableau I : situation géographique de la région de récolte des fruits de *Fortunella margarita*

Région	Altitude	latitude	longitude	Etat bioclimatique
Sidi rached	122m	36,55 °	2,533 °	Climat qui se caractérise par des étés chauds et secs et des hivers doux et humide

b) Matériel microbiologique

• Les souches bactériennes

Des souches cliniques et de référence ont été utilisé pour l'étude de l'activité antibactérienne de l'HE (huile essentielle) de *Fortunella margarita*, pour cela, 14 souches pathogènes ont été isolé des urines provenant de malades hospitalisés et non hospitalisés et 4 souches de référence provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie sont représentées dans le tableau II et pIII.

Tableau II : Les souches cliniques testées pour leurs sensibilités aux antibiotiques et à l'HE *Fortunella margarita*

Souches bactériennes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Entérobacter coloacae</i>
Nombre de souche	3	4	4	3
origine	Infection urinaire/laboratoire de microbiologie (E.H.S)			

Matériel et méthodes

Tableau III: Les souches de référence utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Fortunella margarita*

Souches bactériennes	Référence ATCC
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC 10536
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 1053

• Souche fongique :

Une souche fongique commerciale sous forme lyophilysée, *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée pour l'étude de l'activité antiproliférative de l'HE de *Fortunella margarita* N° de lot : 737758, Figure N° 07 (voir annexe 3).

B. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel utilisé au laboratoire (milieux de culture, réactifs et appareillages) sera cité au sein des techniques au fur et à mesure de leur réalisation, les différents équipements de base de la réalisation de notre étude sont mentionnés sur le tableau IV (voir annexe 1).

II.2. Méthodes

La première partie de notre travail portant sur une extraction de l'HE du fruit de *Fortunella margarita* a été réalisée au niveau du laboratoire de projet de fin d'étude de l'université Blida -1- sur une période de 15 jours, la deuxième partie a concerné l'étude de l'activité antimicrobienne et antiproliférative qui ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de l'E.H.S (Etablissement hospitalier spécialisé) de Tipaza durant une période de 3 mois.

II.2.1. Identification de la plante

L'identification de la plante a été effectuée au niveau :

•De l'école nationale d'agronomie (ENSA) d'El Harrach, confirmé par le département d'agronomie de l'université de Blida 1.

II.2.2. Technique d'étude histologique

❖ Principe

La technique d'étude histologique révèle une vue d'ensemble sur les tissus sécréteurs d'huile essentielle après coloration par la méthode de double coloration (rouge Congo - vert de méthyle) (Gabe, 1963).

❖ Mode opératoire

Plusieurs coupes transversales fines ont été réalisées à l'aide d'une lame de rasoir à main levée.

Les coupes récupérées sont trempées successivement dans :

- L'eau de javel pendant 10 à 15 min pour éliminer le contenu cellulaire.
- Rinçage à l'eau pendant 10 à 20 min.
- L'acide acétique à 1% pendant 1 min pour éliminer totalement l'eau de javel et assurer la fixation du colorant sur la paroi.
- L'eau pendant 10 à 20min pour le rinçage.
- Le vert de méthyle pendant 5 à 10 min pour la coloration des parois lignifiées et /ou suberifiées.
- Rinçage à l'eau pendant 10 à 20 min.
- Le rouge Congo pendant 10 à 20 min pour la coloration des parois pectocellulosiques.
- L'eau pour le dernier rinçage des coupes.

❖ Lecture

Les meilleures coupes sont sélectionnées et mises entre lame et lamelle pour l'observation sous microscope photonique grossissement $G \times 40$.

II.2.3. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'HE de l'épicarpe du fruit de *Fortunella margarita* a été effectuée par hydrodistillation simple.

❖ Principe

Le principe de l'hydrodistillation est déjà cité dans le chapitre I page 6.

❖ mode opératoire

Pour chaque extraction, on introduit une quantité de l'épicarpe de fruit dans un ballon d'une capacité nominale de 500 ml contenant de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition. Le chauffage est assuré par un chauffe-ballon électrique d'une puissance de 500 w, l'opération est conduite à pression atmosphérique. Le système de cohobation permet de maintenir constant le volume d'eau présent initialement, durant tout le processus de distillation. Les vapeurs chargées d'huile essentielle se condensent dès leur arrivée au réfrigérant, elles retombent sous forme de gouttelettes dans l'essencier et forment avec l'eau un mélange hétérogène qu'on récupère à l'aide d'une seringue. Les conditions opératoires liées à l'hydrodistillation sont regroupées dans le tableau V (voir annexe 2) et la figure N° 08.

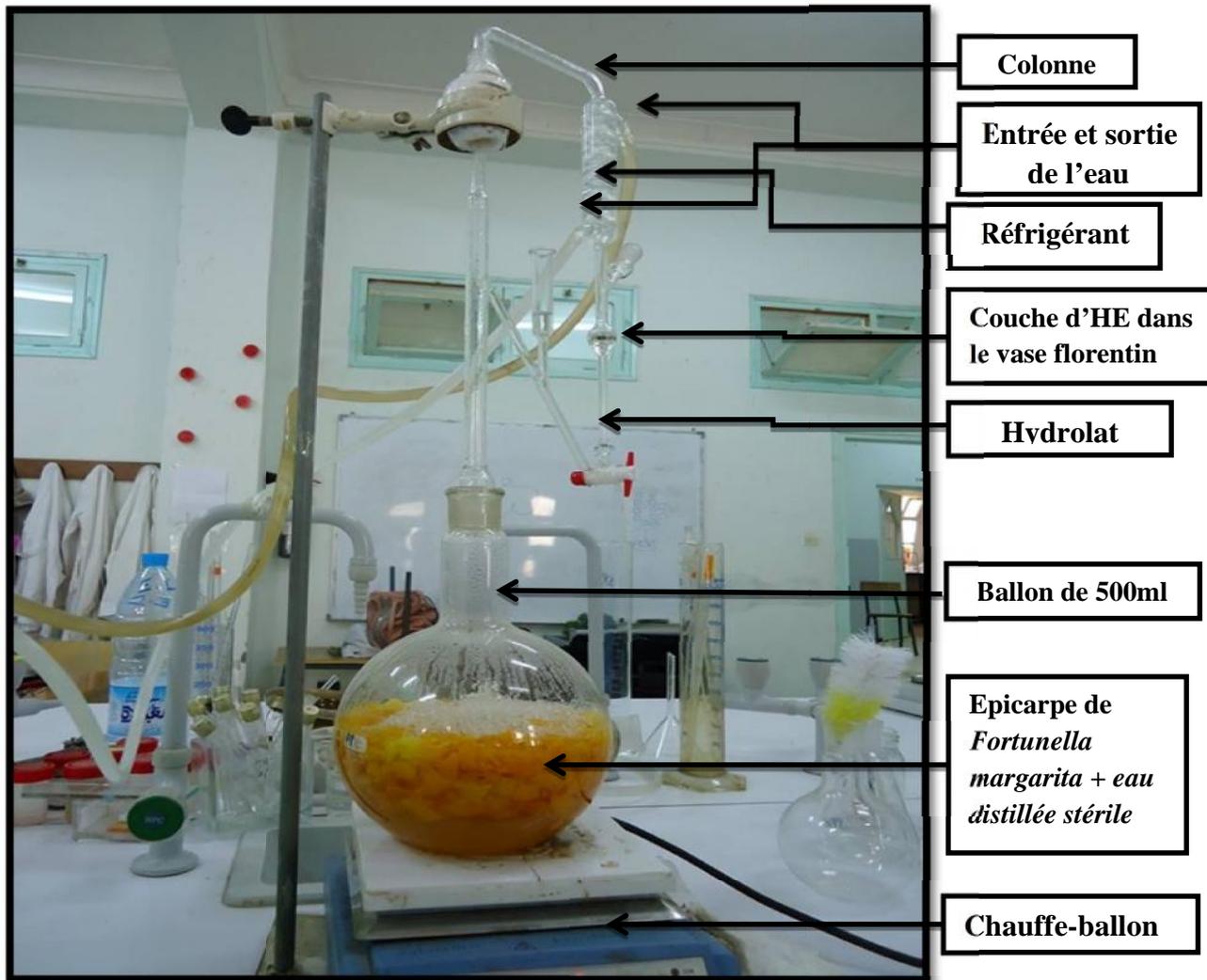


Figure N° 08: Dispositif d'extraction par hydrodistillation (Originale, 2015)

II.2.4. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule donnée par FALLEH et al., (2008) :

$$R \% = 100 \times \frac{Mb}{Ma} \text{ où :}$$

R : rendement de l'huile essentielle en pourcentage.

Mb : quantité de l'huile essentielle en g.

Ma : quantité de plante en g.

II.2.5. Etude de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Fortunella margarita*

L'étude de l'activité antimicrobienne a été précédée par une étude cyto bactériologique des urines afin de sélectionner les prélèvements contenant des bactéries pathogènes pour ensuite les identifier.

II.2.5.1. Etude cyto bactériologique des urines (ECBU)

C'est un examen (macroscopique et microscopique) sur lequel repose le diagnostic des maladies urologiques en particulier les infections urinaires, cet examen a comme objectifs de :

- mettre en évidence la présence de bactérie dans les urines (bactériurie).
- mettre en évidence et quantifier les leucocytes et les éléments urinaires anormaux.

Les prélèvements d'urine ont été effectués par des infirmiers sur des sujets de sexe et d'âge différents, accompagné d'une fiche de renseignement (voir l'annexe 3).

A) Examen macroscopique

L'examen macroscopique des urines à travers l'œil nu consiste à faire une observation des urines fraîchement émises et à contrôler certains paramètres tel que la couleur, l'odeur, ainsi que la viscosité.

B) Examen microscopique

L'examen microscopique des urines consiste en un examen cytologique

❖ Principe :

L'examen cytologique consiste en un examen direct de l'urine pure en utilisant une cellule de type Mallassez, l'état frais permet l'étude des éléments cellulaires (**camille, 1998**).

Cet examen permet de reconnaître les éléments suivants :

1) Eléments organisés

• Leucocytes

Les leucocytes peuvent se présenter sous différents aspects : isolés ou agglutinés en paquet, il s'agit en générale de polynucléaires, lymphocytes et même de monocytes. Signe d'une lithiase urinaire ou de la prise des Antibiotiques.

• Hématies

Les hématies peuvent présenter des aspects intacts, en oursin ou aspect fantomatique. Normalement l'urine ne contient pas d'hématies, ou seulement en petite quantité, leur présence en grand nombre ; c'est un témoignage d'une lésion des muqueuses des tissus de l'appareil urinaire.

• Cellules épithéliales

Les plus fréquentes est les calls de la vessie, elles se présentent en forme de plaques transparentes, rectangulaires, avec toujours un noyau au centre. Leur présence signifie que le prélèvement n'a pas été réalisé dans de bonne condition.

• Les cylindres

Ce sont des éléments protéiques, figurés, peuvent précipiter ou s'agglutiner dans les tubules. On distingue les homogène et les cylindres organisés.

2) Eléments Inorganisés

• Cristaux

Leur présence est banale s'ils sont en nombre limité, mais si leur nombre est assez élevé, ils peuvent être signe d'une lithiase urinaire ou prise des antibiotiques (Cristaux d'oxalate de calcium ; ils se présentent sous forme de petites granulation dans une urine acide (PH<7)).

Autre éléments

On observe dans l'urine des spermatozoïdes, du mucus, des corps étrangers (poils, fibre), les levures et les parasites.

❖ Mode opératoire

- 1) On dépose, sur une lame propre, une goutte d'eau physiologique.
- 2) A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève 1 à 2 gouttes d'urine, bien homogénéisées bien étaler la goutte sur la lame.
- 3) laisser sécher à l'air, à température ambiante.
- 4) On colore le frottis au bleu de méthylène en laissant agir pendant 3 minutes.
- 5) Fixation à la chaleur.

❖ Lecture

On recouvre la lame d'huile à immersion et on observe à l'objectif 100.

C) Détermination de la bactériurie

❖ Principe

Il s'agit de mettre en évidence les bactéries présentes dans les urines de façon à les dénombrer, pour cela différentes techniques existent, mais la technique de référence est celle dite « technique, par dilution »

❖ Mode opératoire

- 1) On dépose 0,1 ml (2gouttes de 50 µl avec une pipette Pasteur) d'urine bien homogénéisé dans un tube contenant 10 ml d'eau distillé stérile ;
- 2) déposer à l'aide d'une pipette pasteur 2 gouttes (0,1ml) de la dilution à 10^{-1} dans une gélose nutritive ;
- 3) étaler les gouttes d'urines sur toute la surface de la boîte de Pétri à l'aide d'un râteau, On incube la culture à l'étuve pendant 18 heures à 37°C.

❖ **Interprétation des résultats**

- ✓ $N < 10^2$ bactéries/ ml : absence d'infection urinaire.
- ✓ $10^3 < N < 10^4$ bactéries/ ml : prélèvement douteux, un autre prélèvement est recommandé.
- ✓ $N > 10^5$ bactéries/ ml : présence d'infection urinaire.

II.2.5.2. Identification des souches bactériennes

L'identification des souches bactériennes comprend une étude des caractères morphologiques et une étude des caractères biochimiques

A) Etude des caractères morphologiques

❖ **Principe**

La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme et leur paroi un colorant primaire qui est le violet de Gentiane. Cette différence de perméabilité est liée à une différence de structure chimique des parois cellulaire entre deux grands groupes de bactéries: bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif; celles qui retiennent le violet de Gentiane après l'action de l'alcool sont dites à Gram positif, celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant qui est la fuschine sont dites à Gram négatif (**camille et bernard, 2003**).

❖ **Mode opératoire**

• **Préparation du frottis**

- 1) Sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile ;
- 2) Ajouter à l'aide de l'anse de platine stérile de la colonie bien isolée ;
- 3) Étaler et fixer à chaleur d'environ 40°C pendant 10 à 15 minutes ;
- 4) Poser la lame sur le bac de coloration.

• **Coloration**

La coloration de Gram est réalisée selon la méthode décrite par **DELARRAS., (2007)** :

- 1) Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- 2) Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- 3) Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- 4) Recolorer avec de la fuschine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée;
- 5) Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Benzène.

❖ **Lecture**

Observation au microscope optique à l'objectif x 100 à l'huile d'immersion, selon la couleur observée on distingue :

- ✓ Bactérie à Gram positif : coloration en violet.
- ✓ Bactérie à Gram négatif : coloration en rose.

B) Etude des caractères biochimiques

Une identification biochimique a été réalisée dans laquelle nous avons effectué :

- Une recherche de l'enzyme respiratoire (Oxydase) et de l'enzyme (catalase) ;
- Une étude des caractères biochimiques par la galerie API 20 E.

a) Test de la catalase

❖ principe

Ce test permet de différencier les bactéries à Gram positif de la famille Microcoques qui sont catalase positive, des familles staphylocoques qui sont catalase négative. La catalase agit en dégradant le H_2O_2 (eau oxygénée) en H_2O et oxygène qui se manifeste par un dégagement gazeux.

❖ Mode opératoire

Sur une lame de verre propre, déposer une goutte de H_2O_2 , puis la mettre en contact avec une colonie isolée prélevée directement avec une pipette Pasteur boutonnée à usage unique ou une anse de platine.

❖ lecture

- ✓ Si des bulles se forment, la bactérie possède la catalase.
- ✓ Si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

b) Test de l'oxydase

❖ Principe :

L'oxydase est une enzyme qui intervient dans la chaîne respiratoire des bactéries aérobies. Le test d'oxydase permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

❖ Mode opératoire

- 1) Déposer sur une lame porte objet propre un disque d'oxydase " ox " et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile ;
- 2) Prélever une partie de la colonie à étudier à partir d'une culture jeune sur gélose à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

❖ Lecture

Une coloration violet foncé puis noire apparaît immédiatement ou en quelques secondes (oxydase+)

C) Etude des caractères biochimiques par la galerie API 20 E

L'étude des caractères biochimiques des souches a été réalisée par la galerie API 20 E qui est un système standardisé pour l'identification des bactéries.

❖ Principe

L'API 20 E est un système miniaturisé qui comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, la suspension bactérienne répartie dans les microtubes dissout les substrats. Après incubation, les réactions sont mises en évidence par des virages colorés spontanés ou révélés après l'addition de réactif.

❖ Mode opératoire (préparation de la galerie)

- 1) Répartir environ 5 ml d'eau dans les alvéoles, pour créer une atmosphère humide ;
- 2) Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte ;
- 3) Déposer la galerie dans la boîte d'incubation ;
- 4) Prélever à l'aide d'une pipette pasteur, une seule colonie bien isolée sur un milieu gélosé ;
- 5) Réaliser à partir de la colonie bactérienne une dilution en eau physiologique stérile à 0,9% (suspension bactérienne).

Cette étape oriente le biologiste à déterminer le germe à partir de ses caractères biochimiques.

❖ Incubation de la galerie :

- 1) Remplir les tube et cupules des tests : CIT, VP, GEL. Avec la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur ;
- 2) Remplir uniquement les tubes des autres tests ;
- 3) Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDH, ODC, H₂S, en remplissant les cupules d'huile de vaseline stérile ;
- 4) Refermer la boîte d'incubation, et placer dans l'étuve à 37°C, pendant 18 à 24 heures.

❖ Lecteur de la galerie :

Après 24 heures à 37°C, On utilise les additifs suivants :

- ✓ Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 ET VP2, attendre 10 minutes,
- ✓ si la couleur devient rose ou rouge → réaction positive.
- ✓ Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA,
- ✓ si la couleur devient verte ou marron foncé → réaction positive.
- ✓ Test IND : ajouter une goutte de réactif de KOVACS, attendre 2 minutes,
- ✓ s'il y a apparition d'un anneau rouge → réaction positive.

Noter les réactions de la galerie et les résultats des tests complémentaires, sur la fiche de résultat. La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau VI (voir annexe 2)

❖ Interprétation des résultats

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultats avec celles du tableau d'identification et le catalogue analytique.

II.2.5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques: antibiogramme par méthode de diffusion en disque

❖ Principe

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise. Selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé on préconise d'adopter la méthode de disques selon la NCCLS.

❖ Mode opératoire

•Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18h sur milieu gélose nutritive racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%, bien homogénéiser la suspension bactérienne.

Note: L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

• Ensemencement

Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.4mm, après la solidification de la gélose tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en stries serrées. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60 à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

• Application des disques d'antibiotiques

Le choix des antibiotiques est relatif à la souche bactérienne, les différents antibiotiques sont représentés dans le tableau VII (voir annexe 2). Pour cela, les disques ont été placés dans les boîtes à l'aide d'une pince stérile. Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm centre à centre. L'incubation dure 18h à 30°C.

❖ Lecture

Mesurer en millimètre avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, classer la bactérie dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire et résistante (**Andrews, 2001**).

II.2.5.4. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'HE

La recherche de l'activité antimicrobienne in vitro consiste à estimer l'inhibition la croissance des micro-organismes soumis à l'HE de *Fortunella margarita*. Dans ce test, une technique en milieu solide (Aromatogramme) a été effectuée.

❖ Principe

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des bactéries par les huiles essentielles par la mesure de diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier buvard ou de cellulose imprégné d'huile essentielle ou de produit à base d'huiles essentielle (Satrani et al., 2007). L'étude du pouvoir antimicrobien par cette technique illustré sur la figure N° 09 et 10 est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques.

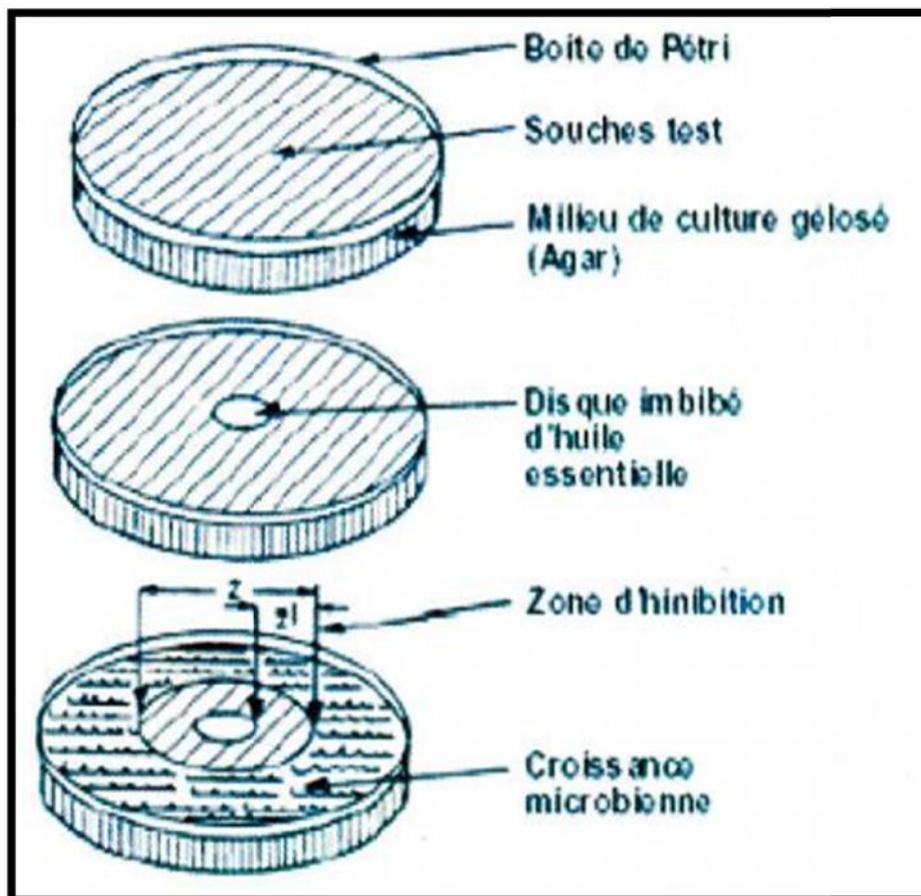


Figure N° 09: illustration de la méthode d'aromatogramme (Zaiki, 1988)

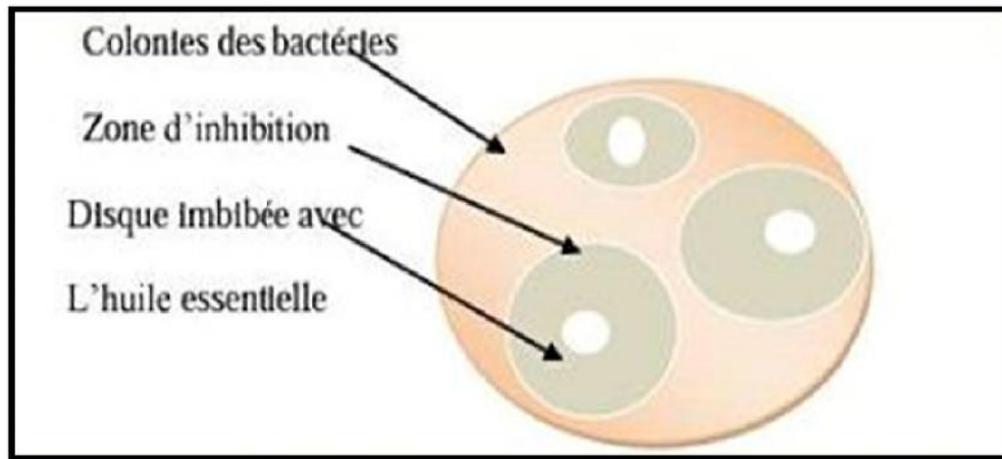


Figure N° 10: illustration des zones d'inhibition de la croissance des bactéries
(Caillet *et al.*, 2007)

❖ Mode opératoire

• Préparation de l'inoculum

- 1) A partir d'une culture pure et récente de germes à tester sur un milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques colonies bien isolés et parfaitement identiques ;
- 2) Décharger la pipette Pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% ;
- 3) Agiter la suspension bactérienne (bien homogénéiser) à l'aide d'un agitateur (Heidolph, Germany) ;
- 4) l'ensemencement doit se faire moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

• Ensemencement

Pour les bactéries, le milieu de culture utilisé est le milieu Muller-Hinton

- 1) tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ;
- 2) L'essorer en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum ;
- 3) Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées ;
- 4) Répéter l'opération quatre fois, en tournant la boîte de Pétri de 45 ° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même ;
- 5) Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

• Dépôt des disques

- 1) A l'aide d'une pince stérile, prélever à chaque fois un disque stérile de 9 mm de diamètre (Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel, Germany). Ce dernier est imbibé en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'HE, celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- 2) déposer le disque sur la surface du milieu de culture ;
- 3) les boîtes sont ensuite mises à incuber à l'étuve à 37 ° C pendant 24 h.

❖ Lecture

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse la zone d'inhibition. Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boîte fermée.

❖ Interprétation des résultats

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Berche et al., (2003)**. Cet auteur a classé les diamètres (\emptyset) de zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes :

- ✓ Très fortement inhibitrice : \emptyset 30mm. +++
- ✓ Fortement inhibitrice : 21mm \emptyset 29mm. ++
- ✓ Modérément inhibitrice : 16 mm \emptyset 20mm. +
- ✓ Légèrement inhibitrice : 11 mm \emptyset 16mm. (+ ou -)
- ✓ Non inhibitrice : \emptyset 10mm. (-)

Expression des résultats

Les résultats sont représentés sous formule : Moyenne \pm écart type.

II.2.6. Etude de l'activité antiproliférative de l'HE de *Fortunella margarita*

II.2.6.1. Evaluation de l'activité antiproliférative

❖ Principe

L'activité antiproliférative est déterminée par le test de dénombrement de la prolifération effectué sur un organisme model : la levure *Saccharomyces cerevisiae* par une coloration au bleu de méthylène (Housseinpour et al., 2013 ; Periyamayagam et al., 2013).

❖ Mode opératoire

L'évaluation de cette action est réalisée en deux étapes :

• Préparation de l'inoculum de *Saccharomyces cerevisiae* :

La culture de levure de *Saccharomyces cerevisiae* peut se faire en milieu solide ou liquide, il est préférable d'opérer en milieu liquide car les cellules sont dispersées. Si elles s'agrègent par sédimentation, il est possible de les remettre en suspension par agitation, ce qui permet le prélèvement d'échantillon.

Réactivation de la levure de commerce : Cette étape est effectuée dans un Erlen Meyer contenant 120 ml de milieu de culture liquide (bouillon Sabouraud) et 2 g de levure lyophilisée de commerce. Cette réactivation se fait à 25 °C pendant 24h.

Il est important de vérifier l'état des cellules au microscope photonique G× 40.

• évaluation de la population cellulaire :

La détermination de la population cellulaire dans le milieu de culture est faite par la technique de coloration au bleu de méthylène pour les trois cultures :

- La culture témoin : 0,5ml de la solution mère pour lequel on rajoute 5 ml de bouillon dextrose à la pomme de terre

- La culture de référence : préparer une solution à 5 mg/ml du médicament hydroxycarbamide (500mg) (voir annexe 1), prendre 1 ml de cette solution à laquelle on rajoute à 0,5 ml l'inoculum de la souche de *Saccharomyces cerevisiae*

- La culture en présence de l'extrait : rajouter a 0,5 ml de la culture de *Saccharomyces cerevisiae*, 1ml de l'huile essentielle de *Fortunella margarita*

Incuber des trois cultures à 25°C pendant 24h.

❖ Lecture

Il faut suivre la cinétique de croissance des différents essais pendant 8 heures au microscope optique G : 100 x.

II.2.6.1. Paramètres cinétique de la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*

Les paramètres cinétiques étudiés au cours des cultures cellulaires témoins et expérimentales sont :

- Le facteur de multiplication ;
- Le temps de génération ;
- Le taux de croissance.

❖ Méthodes de calcul des paramètres cinétiques

•La durée moyenne du cycle ou temps de génération (G) exprime le temps nécessaire à une population cellulaire pour passer du simple au double.

Sa valeur est donnée par la relation :

$$G = t \frac{\text{Log}2}{\text{Log}(\text{facteur de multiplication})}$$

•Facteur de multiplication = $\frac{\text{nombre de cellule à t final}}{\text{nombre de cellule à t initial}}$

•Taux de croissance

$$\mu = \frac{1}{G}$$

❖ Courbe de croissance cellulaire :

On construit les courbes relatives aux milieux contenant l'hydroxycarbamide, les différents essais contenant l'huile essentielle de *Fortunella margarita* sur un même graphe en vue de comparer l'effet de l'huile essentielle testée avec la courbe de croissance dans le milieu de culture témoin.

❖ L'étude statistique de comparaison entre témoin et les traités est réalisée par le logiciel statistique (Open Epi)

Les résultats sont représentés sous formule : Moyenne \pm écart type.

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussions

III.1. Résultat de l'étude histologique de la plante

Les coupes histologiques au niveau de l'épiderme du fruit de la plante *Fortunellamargarita* sont observées sous microscope photonique grossissement X 40 puis prises en photos. Voir ci-dessous :

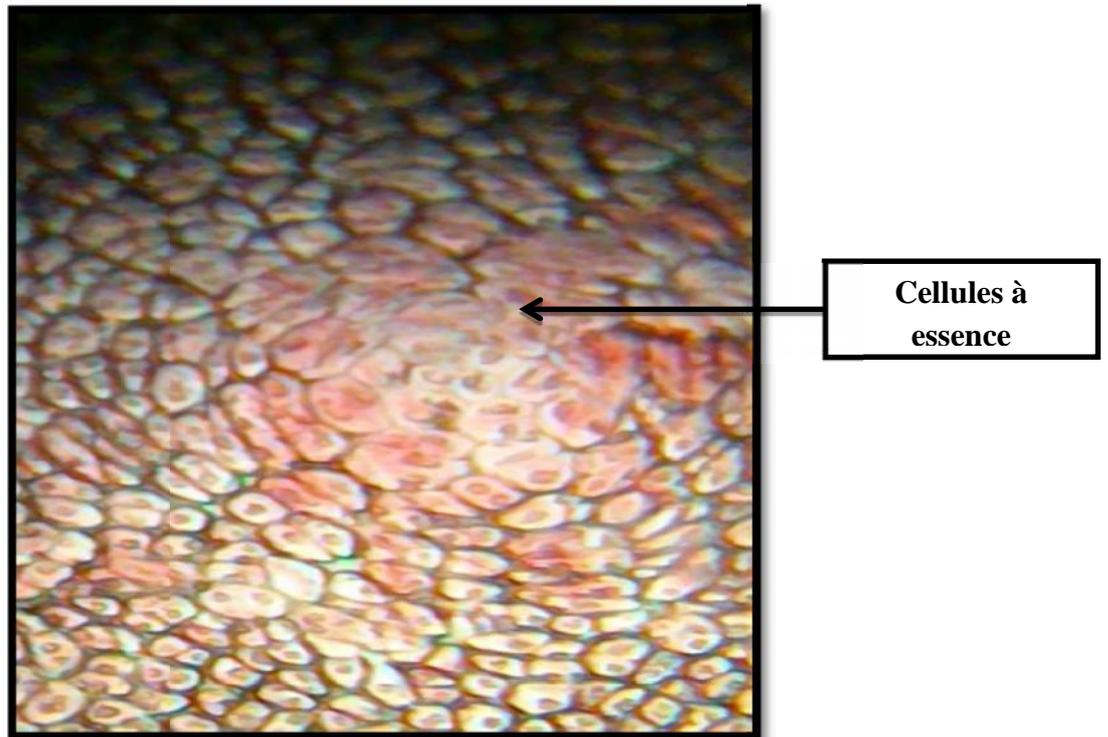


Figure N° 11 : Cellules sécrétrices d'huile essentielle de *Fortunellamargarita* observées sous microscope photonique G : 40 x. (Original, 2015)

Selon la Figure N° 10, nous on observe des cellules à essence : cellules spécialisées dans la sécrétion d'huile essentielle.

Selon **BRUNETON, (2009)**, chez les Rutaceae, la synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structure histologique spécialisée, localisée sur ou à proximité de la plante : cellules à huile essentielle.

III.2. Rendement de l'extraction

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite de l'épiderme de fruits frais de Kumquat par un hydrodistillateur de type Clevenger. Nous avons obtenus une huile de couleur jaune pâle avec une odeur âcre. Une quantité d'huile assez importante a été récupérée, le rendement est de 1.625%.

Selon **ROBERT et LOBSTEIN, (2005)**, L'intervention de la chaleur dans l'extraction par hydrodistillation a facilité l'éclatement des poches sécrétrices ce qui explique ce rendement.

Résultats et discussions

La richesse de l'épicarpe du fruit de *Fortunellamargarita* en cellules sécrétrices d'huile essentielle par rapport aux autres parties de la plante étudiée représente un facteur déterminant dans la quantité d'huile essentielle obtenue (**Bachelot et al., 2006**).

Selon **SMITH et al., (2005)**, Le rendement de l'extraction d'une plante peut être attribué à un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc...) ou technologique (mode de culture ou d'extraction de l'huile essentielle).

III.3. Résultat de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Fortunellamargarita*

III.3.1. Résultat de l'étude cytobactériologique des urines (ECBU)

L'aspect ainsi que les différents éléments qui peuvent être présents dans les urines des différents échantillons recueillis au niveau du laboratoire sont rapportés dans le tableau VIII ET IX :

Tableau VIII : Résultat de l'étude macroscopique des différents échantillons

Echantillon	Etude macroscopique
200	Urine claire et trouble
206	Urine claire et limpide
208	Urine brune et trouble
260	Urine orangée et trouble
320	Urine pâle et limpide
338	Urine jaune foncé et trouble
341	Urine brune et trouble
346	Urine pale et trouble
401	Urine claire et trouble
439	Urine brune et trouble
446	Urine pale et limpide
654	Urine claire et trouble
655	Urine brune et trouble
720	Urine jaune foncée et claire

Résultats et discussions

Tableau IX : Résultats de l'étude microscopiques des différents échantillons d'urine

Echantillon	Etude microscopique					
	leucocytes	hématies	Cellules épithéliales	cristaux	Bactériurie	Autres éléments
200	1	Abs	Abs	P	>10 ⁵	Abs
206	1	Abs	2	P	>10 ⁵	Abs
208	3	2	1	P	>10 ⁵	Abs
260	1	1	Abs	P	>10 ⁵	mucus
320	2	Abs	Abs	Abs	>10 ⁵	Abs
338	0	Abs	3	Abs	>10 ⁵	Abs
341	1	1	2	P	>10 ⁵	Abs
346	3	Abs	1	Abs	>10 ⁵	Abs
401	0	Abs	1	Abs	>10 ⁵	Abs
439	2	1	Abs	Abs	>10 ⁵	Abs
446	2	Abs	3	Abs	>10 ⁵	Abs
654	2	Abs	Abs	Abs	>10 ⁵	Abs
655	2	1	Abs	P	>10 ⁵	Abs
720	1	Abs	Abs	P	>10 ⁵	Abs

(Abs=absence) (P=présence)

Selon **DARBAS et al., (2007)**, L'urine est normalement un liquide stérile, limpide et de couleur jaune claire, les changements de sa couleur (plus claire ou plus foncée) ou de son aspect peuvent être des indications d'anomalies ou maladies de l'organisme.

Résultats et discussions

III.3.2. Résultat de l'identification des souches bactériennes prélevées

En comparant l'ensemble des caractères morphologiques et biochimiques issus de l'identification des souches bactériennes isolées avec le catalogue analytique nous avons sélectionné 4 échantillons contenant *Escherichia coli*, 4 échantillons contenant *Staphylococcus aureus*, 3 échantillons contenant *Pseudomonas aeruginosa* et 3 échantillons contenant *Enterobacteriaceae*.

A. Caractères morphologique des souches bactériennes

La coloration de Gram nous a permis de connaître à la fois les propriétés de la paroi ainsi que l'aspect des colonies bactériennes comportant les différents échantillons analysés, ces différents paramètres sont rapportés dans le tableau X :

Tableau X : Caractères morphologiques des souches bactériennes isolées cliniquement

Espèces bactériennes	Gram	Forme des cellules
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	Coccobacille
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	Coccus en grappe de raisin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	Bacilles
<i>Enterobacteriaceae</i>	Négatif	Bacilles

Résultats et discussions

B. Caractères biochimiques des souches bactériennes

Les résultats des tests de catalase et d'oxydase effectués sont mentionnés dans le tableau XI :

Tableau XI :Caractères biochimiques des souches bactériennes testées

Espèces bactériennes	Catalase	Oxydase
<i>Escherichia coli</i>	NR	NR
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	NR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR	Positive
<i>Enterobactercolacea</i>	NR	Négative

NR : non recherché

Les propriétés biochimiques issus de la galerie API 20 E des souches bactériennes isolées cliniquement sont représentées sur les figures N° 11, 12, 13,14 respectivement

- *Escherichia coli*



Figure N° 12 : Caractères biochimiques d'*Escherichia coli* par la galerie API 20 E.

- *Staphylococcus aureus*



Figure N° 13 : Caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* par la galerie API 20 E.

- *Pseudomonas aeruginosa*



Figure N° 14: Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* par la galerie API 20 E.

- *Enterobacteriaceae*



Figure N° 15 :Caractères biochimiques d'*Enterobacteriaceae* par la galerie API 20 E.

Résultats et discussions

III.3.3. Résultat de l'antibiogramme

La résistance ou la sensibilité des souches bactériennes étudiées sont démontrées dans le tableau XII

Tableau XII : Résultats de l'antibiogramme des souches cliniques isolées

Les souches cliniques	Numéro de l'échantillon	Disques ATB (R)	Disques ATB (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	341	AMP, Cz, CTX, AMX	GEN, AK, Cs, Cip, C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	439	AMP, Cz, CTX, AMX, C	GEN AK CsCip
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	260	AMP, Cz, CTX, AMX.	GEN AK Cs Cip, C
<i>Staphylococcus aureus</i>	346	E, P	GEN, TE, C, DA, FOX, AK, K, OX
<i>Staphylococcus aureus</i>	206	OX, E, P	GEN, TE, C, DA, FOX, AK, K
<i>Staphylococcus aureus</i>	720	E, P, OX	GEN, TE, C, DA, FOX, AK, K
<i>Staphylococcus aureus</i>	401	OX, E, P	GEN, TE, C, DA, FOX, AK, K
<i>Eschérichia coli</i>	338	AMP, AUG, Cz, Cs	NA, AK, F
<i>Eschérichia coli</i>	320	AMP, AMX, AUG, Cz, Cs	NA, AK, F
<i>Eschérichia coli</i>	200	AMP, AMX, AUG, Cz	NA, AK, F, Cs
<i>Eschérichia coli</i>	655	AMP, AMX, AUG, NA, Cs	AK, F, Cz
<i>Entérobactercoloaecae</i>	208	AMP, AMX, AUG, Cz	NA, AK, F, Cs
<i>Entérobactercoloaecae</i>	446	AMP, AUG,	NA, AK, F, Cs, Cz
<i>Entérobactercoloaecae</i>	654	AMP, AMX, AUG, Cz	NA, AK, F, Cs, AMX

Résultats et discussions

L'ensemble des entérobactéries ont présenté une résistance à la NA et aux ampicillines et l'amoxiciline (sauf *Entérobactercoloaca*654) et une sensibilité à l'amikasine (AK), nitrefurane (F) et à l'acide nalidixique (NA) sauf la souche (*Eschérichia coli*655) qui présente une résistance à la NA.

Les souches de *Staphylococcus aureus* sont sensibles aux GEN, TE, C, DA, FOX, AK, K. et résistante aux E, P, OX, la souche 346 ne présente pas de résistance à l'OX.

Les souches de *Pseudomonasaeruginosa* sont sensibles aux gentamycine, amikacine, Cs, et Cip Et résistante aux Chlramphénicol, AMP, Cz, CTX, AMX, la souche 260 ne présente pas de résistance au C.

Selon **SOTTO et al., (2001)**, en ce qui concerne les infections urinaires, Les germes les plus fréquents sont les entérobactéries. *Escherichia coli* est le membre de la famille des entérobactéries le plus fréquemment impliqué en pathologie humaine et tout particulièrement dans les infections du tractus urinaire.

D'après **CHOMARAT en (2000)**, la situation de la sensibilité des germes est contrastée entre pays développés et pays en voie de développement. Les résultats publiés par les réseaux de surveillance de la sensibilité aux antibiotiques en Europe (ECO*SENS, SENTRY-Europe, ESGAR) ou en Amérique du Nord (The Surveillance Network) démontrent que la résistance à l'ampicilline et cotrimoxazole est très fréquente chez les bactéries. La résistance, pour le cotrimoxazole est en augmentation (**Sorberg et al., 2002**). Cette co-résistance aux molécules de première intention (ampicilline, cotrimoxazole) devient préoccupante (**Karlowsky et al., 2002**). Parallèlement la circulation de souches résistantes aux colistines est en augmentation (**Kahlmeter, 2000**).

Dans les pays en voie de développement, en plus des molécules de première intention, on observe une résistance à la pénicilline (**Dromigny et al., 2002**). On y observe également la circulation de bactéries multi résistantes (**Mansouri et Shareifi, 2002**).

Selon **SORBERG et al., (2002)**, les facteurs de l'augmentation de la résistance sont mal définis, La consommation d'antibiotiques inappropriés est un des risques majeurs de résistance. Cependant, les mécanismes d'acquisition des résistances ne sont pas toujours liés au niveau de consommation des antibiotiques. Les antécédents d'antibiothérapie d'hospitalisation constituent également des facteurs de risque reconnus.

III.3.4. Résultat de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HEde *Fortunellamargarita*

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle étudiée, effectuée par la méthode de l'aromatogramme testée sur des souches microbiennes isolées cliniquement et de références, après une durée d'incubation de 24 heures à 37°C. On constate que :

- Les diamètres des zones d'inhibitions sont variables et bien délimitées.
- L'aspect des bordures est net, et parfaitement symétriques.

Cependant, les variations de diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes apparues en présence de l'extrait sont illustrées dans le tableau XIII et figure N° 16 (voir annexe 3)

Tableau XIII: Diamètre d'inhibition des souches bactériennes étudiées

Les souches étudiées	Diamètre d'inhibition	Sensibilité
Les souches de référence		
<i>Bacillus subtilis</i>	19 ± 2,64	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	19±3,92	+
<i>Sarcinalutea</i>	18±2,83	+
<i>Eschérichia coli</i>	20 ±1,52	+
Les souches cliniques		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ± 2,26	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 ± 3,63	(+ ou -)
<i>Eschérichia coli</i>	11± 1,26	(+ ou -)
<i>Entérobactercoloacae</i>	13 ± 2,54	(+ ou -)

(- : absence de zone d'inhibition)

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antimicrobienne « in vitro » obtenue par la méthode de diffusion sur gélose de l'huile essentielle de *Fortunellamargarita* qui est basée sur l'apparition de zone d'inhibition de la croissance des germes autour du disque imprégné de l'HE par un frein du développement des souches testées. Cependant, les diamètres d'inhibition varient de souches résistantes à modérément sensibles.

Résultats et discussions

En prenant en considération les diamètres d'inhibition, Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce microbe possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antimicrobienne de l'HE de *Fortunellamargarita*. En revanche les souches de références de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcinallutea*, *Eschérichia coli* ont manifesté d'une sensibilité relative vis-à-vis de l'extrait malgré les faibles zones d'inhibitions observées (18 à 20 mm). Par contre les souches cliniques ont montré des diamètres moins importants.

l'HE de l'épicarpe de *Fortunellamargarita* n'a pas démontré une activité antimicrobienne intéressante, cette faible efficacité est due probablement aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle durant le stockage et/ou l'extraction comme ça pourrait être due au fait qu'au cours de la période d'incubation quelques composants volatils d'huile peuvent s'évaporer des milieux de culture, ce qui diminuerait sa concentration, et par la suite son activité antimicrobienne.

Dans la présente étude nous n'avons testé que l'huile essentielle pure, parce que, d'après **MANOU et al., (1988)**, **BAGAMBOULA et al., (2004)**, il n'y a aucun rapport entre la concentration d'huile essentielle ou du composé actif et la zone d'inhibition, cette dernière semble dépendre de la capacité des huiles essentielles à diffuser uniformément sur l'agar.

Dans le même sillage, nous avons remarqué qu'il y'a une différence de sensibilité entre les bactéries à Gram positif (+) et Gram négatif (-) ; Ceci est en accord avec la majorité des travaux antérieurs (**Bakkali, 2008**, **Belhamel, 2009**, **De Souza, 2005**). Ces derniers confirment que les bactéries Gram + montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles. En effet, les bactéries Gram - possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides relatif à la nature de leur paroi bactérienne.

Chez les bactéries Gram +, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acide teichoïques,...). Par contre, chez les bactéries Gram -, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides. L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds,...). Donc cette résistance est due ou à une incapacité de franchir la membrane ou à une dégradation au niveau de l'espace périplasmique (**Cummins et Harris, 1956**).

Selon **HOGAN et KOLTERN, (2003)**, Il est probable que ces résultats soient dus à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans les huiles essentielles. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace, le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion de molécules hydrophobes, les bactéries à gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des poids moléculaire très élevés (**Nikaido, 2003**).

III.4. Résultat de l'étude de l'activité antiproliférative de l'HE de *Fortunellamargarita*

III.4.1. Evaluation des paramètres cinétique l'activité antiproliférative de l'HE de *Fortunellamargarita*

Le tableau N° XIV (voir annexe 2) et figure N° 17 montrent l'évolution des concentrations cellulaires moyennes en fonction du temps déduites après dénombrement.

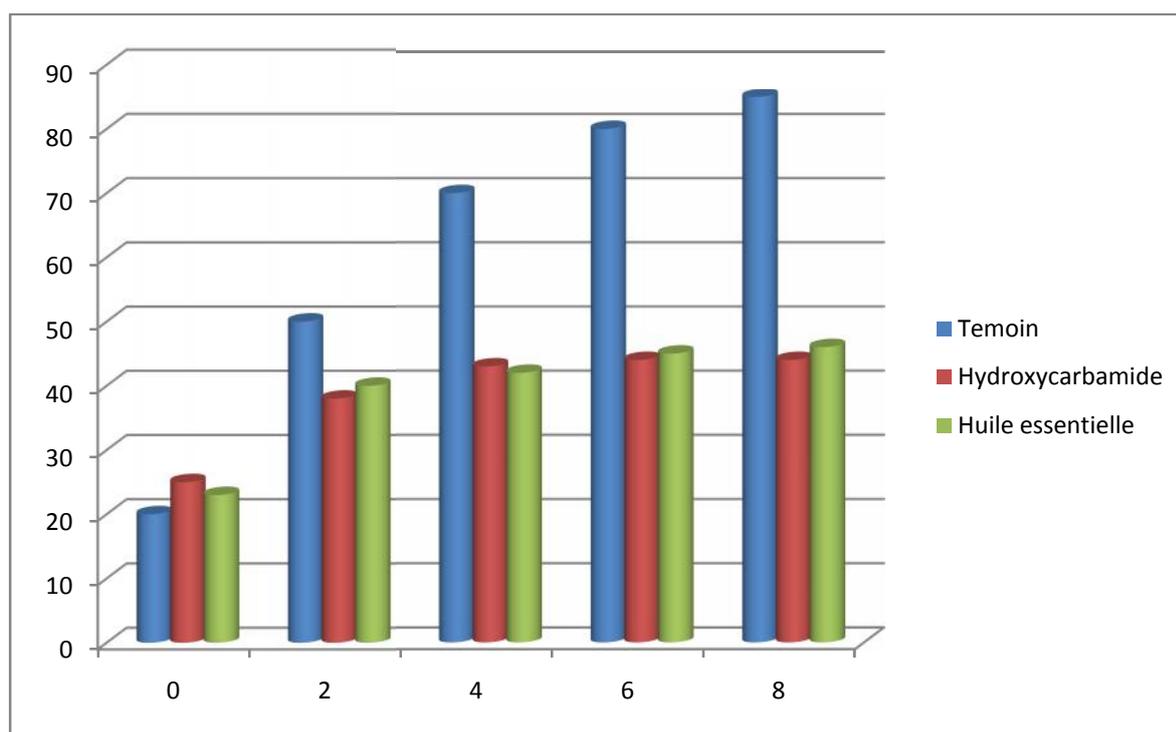


Figure N° 17 : Evolution des concentrations cellulaires des différents essais en fonction du temps

Comme la figure l'indique, les cultures contenant l'hydroxycarbamide et l'huile essentielle respectivement sont ralenties par rapport au témoin,

La levure est un modèle de choix dans la compréhension des processus biologiques les plus complexes. Grâce à elle, Paul Nurse, Lee Hartwell et Tim Hunt ont pu découvrir les molécules clés de la régulation de la division cellulaire ; ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 2001 (**Schwob, 2001**). Il découle de ces travaux que les mécanismes fondamentaux de régulation du cycle cellulaire ont été conservés chez tous les eucaryotes. Nous avons donc utilisé cette levure (*Saccharomyces cerevisiae*) pour la mise en évidence de l'activité antiproliférative de l'huile essentielle de *Fortunellamargarita* (**Drissi et al., 2006**).

Résultats et discussions

En faisant l'analyse de la suspension cellulaire entre l'état initiale $(20, 25,23) \times 10^5$ cellules/ml et l'état final au bout de 8h $(85, 44, 46) \times 10^5$ cellule/ml respectivement dans la culture témoin, la culture contenant le médicament et la culture contenant l'huile essentielle testée, on constate que :

Le facteur de multiplication est de :

- 4,25 pour la culture témoin ;
- 1,76 pour la culture en présence de l'hydroxycarbamide ;
- 2 pour la culture en présence de l'huile essentielle.

La multiplication de *saccharomyces cerevisiae* est ralentie en présence de l'huile essentielle testée.

Le temps de génération est de :

- 3h83min pour la culture témoin ;
- 9h8min pour la culture en présence de l'hydroxycarbamide ;
- 8h pour la culture en présence de l'huile essentielle.

Par rapport à la population cellulaire témoin, on constate qu'il faut plus de temps à la population de *saccharomyces cerevisiae* pour passer du simple au double en présence de l'huile essentielle, De plus, au cours de l'expérience l'évolution de la population cellulaire en présence l'hydroxycarbamide et de l'huile essentielle montre des différences significatives par rapport à la culture témoin.

Il est important de signaler que dans les conditions optimales de culture le temps de génération de *saccharomyces cerevisiae* en phase exponentielle de croissance est normalement de 1h, et le taux de croissance est d'une division par heure (Pilet, 1994), Dans nos conditions de travail, l'absence d'agitation de nos cultures a affecté manifestement le temps de génération et le taux de croissance. En effet, ce manque d'agitation a favorisé la sédimentation des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* ; le contact inter cellulaire est un facteur d'inhibition des divisions cellulaires normales. Il est donc normal dans nos conditions que le temps de génération soit supérieur au temps normal. C'est pourquoi nous n'avons tenu compte que de l'état initial ($t=0$) et l'état final ($t=8$) pour estimer le taux de croissance des différentes cultures.

Le taux de croissance dans nos conditions de travail est de :

- 0,26 division/h pour la culture témoin ;
- 0,10 division/h pour la culture en présence de l'hydroxycarbamide ;
- 0,12 division/h pour la culture en présence de l'huile essentielle.

Résultats et discussions

Le taux de croissance avec l'huile essentielle testée se situe entre la référence et le témoin.

Ces résultats plaident en faveur d'une activité antiproliférative de l'huile essentielle de l'épicarpe du fruit de *Fortunellamargarita* sur les cellules eucaryotes de *Saccharomyces cerevisiae*. Nos résultats montrent que la population est ralentie dans sa croissance en présence de l'huile essentielle de *Fortunellamargarita* par rapport à la population de la culture témoin. Bien que plus efficace, l'hydroxycarbamide produit le même effet sur *Saccharomyces cerevisiae*. C'est un produit desynthèse agissant comme antimétabolite. L'huile essentielle testée présente le même effet que la molécule de référence. Il pourrait alors agir par le même mécanisme que l'hydroxycarbamide. Cependant nos travaux nous ne permettent pas de le confirmer. Il est probable que l'action antiproliférative soit due au composant majoritaire de l'huile essentielle, le limonène et le myrcène car ces deux derniers ont montré des avantages considérables dans les études animales contre un grand nombre de cancers (**Miller et al., 2013**), plusieurs études animales démontrent l'efficacité du limonène contre la progression du cancer du pancréas, de l'estomac, du colon, de la peau et du foie (**Rabi et Bishayee, 2009**).

Selon **DORMAN et DEAINS, (2000)**, il est probable que cette activité antiproliférative ne soit pas due à la présence de substance particulière seulement mais, c'est le résultat de l'interaction entre diverses structures aromatiques. D'après **HOLLEY et al., (2005)**, ces molécules agiraient le plus souvent par une action synergique, car de plus des composés majoritaires, les composés mineurs peuvent contribuer significativement à l'activité des huiles essentielles.

Conclusion générale

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés biologiques différentes. Plusieurs travaux de recherches ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Cependant, les travaux de recherches sur les propriétés antimicrobiennes et antiprolifératives de certaines plantes sont très rares. Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeurent une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources de molécules antimicrobienne et anticancéreuse. Dans ce contexte nous avons essayé d'évaluer *in vitro* des activités antimicrobiennes et antiproliférative de l'huile essentielle de *Fortunella margarita*.

L'extraction de l'huile essentielle de l'épicarpe du fruit de *Fortunella margarita* a été réalisée par hydrodistillation, le rendement a été voisin de 1.625%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne, par la méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Fortunella margarita* vis-à-vis de cinq souches bactériennes. Ce pouvoir est relativement faible, avec des zones d'inhibition variant entre 10 et 20mm. Par conséquent l'activité antiproliférative de l'huile essentielle testée sur les cellules eucaryotes de *Saccharomyces cerevisiae* semble produire le même effet que la molécule de référence.

En fin, nos résultats indiquent que l'huile essentielle de l'épicarpe des fruits de *Fortunella margarita* n'a pas une très grande activité antibactérienne et une bonne activité antiproliférative.

Perspectives

A l'essor de cette étude il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur l'huile essentielle des fruits de *Fortunella margarita* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne et antiproliférative.

Il serait intéressant aussi d'utiliser d'autres techniques telles que la méthode de micro-atmosphère pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, ou les œufs d'oursin pour l'étude de l'activité antiproliférative.

Références bibliographiques

AFNOR, (2000)

Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse, 471 pages. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles, 323 pages. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles, 663 pages.

Association Française de Normalisation, (1986)

Recueil de normes française 'huiles essentielles', AFNOR, Paris AFNOR NF T 75-006

Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A., (2006).

Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne : 1-18 pages.

Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., (2004),

Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *higella sonnei* and *S. flexneri*, Food Microbiology, 33-42 pages.

Bakkali F., Averbek, K. and Idaomar, M., (2008)

Biological effects of essential oils, Food and chemical toxicology. 446-475 pages.

Barclay N G., Spurrell J C., Bruno T F., Storey D G., Cardinal P., (2003)

Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire

Bardeau F., (2009)

Les huiles essentielles : découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. édition Lanore, 315 pages.

Belakhdar, J., (1997)

La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS (Ed). Paris, 764 pages.

Belhamel, K. Abderahim, A. Ludwig, R., (2009)

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of schinus molle L. grown in Algeria, International Journal of essential Oil Therapeutics 2, 175-177

Berthier, (1980) ; Möller, (2008)

BERTHIER A., (1980) : Epices-aromates leurs huiles essentielles et oléorésines. parfums, cosmétiques, arômes n°34- août/septembre 1980 ; pp 39-44. MÖLLER K., (2008) : La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO, 152 pages.

Besombes C., (2008)

Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle, 41-45 pages.

Bruneton J., (2009)

Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales, 4e édition, Lavoisier, Paris, 1269 pages.

Caillet S. et Lacroix M., (2007)

Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire, INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA, 1-8 pages.

Camille D. (1998)

Microbiologie, 90 heures de travaux pratique, enseignement.

Camille D., Bernard T. (2003)

Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux, réglementation - Prélèvement - Analyse.

Carret G., Cavallo J D. (2004)

Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Chamot E., Boffi El amari E., Rohner P., Van Delden C. (2003)

Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*; 47 (9) : 2756-64 pages.

Choi H.S, (2005)

Characteristic odor components of kumquat peel oil. *Food chem.*53: 1642-1647 pages.

Chomarat M., (2000)

Resistance of bacteria in urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2000 Dec ;16: 483-7 pages

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R. et Wyllie S.G., (2000)

The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil), *Journal of Applied Microbiology*, 170-175 pages.

Cummins et Harris, (1956)

The chemical composition of the cell wall in some Gram- bacteria and in possible value as a taxonomic character. *Journal of general microbiology* 14 (3), 583-600 pages.

De Souza, E.L., Stamford, Lima, (2005)

Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems.48 (2005), 1516-8913 pages.

Duraffourd C., Lapraz J.C

Traité de phytothérapie clinique, Médecine et endobiogénie , edition Masson,paris, 2002, 6 pages.

Dorman, H.G.D. and Deans, S.G., (2000)

Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology 308-316 pages.

Dugo G. et DI Giacomo A., (2002)

Citrus. The genus Citrus. Taylor & Francis Publishing, London. 638 pages.

Drissi A., Bennani H., Giton F., Charrouf Z., Fiet J., Adlouni A. (2006).

Tocopherols and Saponins Derived From *Argania spinosa* Exert,an Antiproliferative effect on Human Prostate Cancer. Cancer Investig; 24: 588-592 pages.

Dromigny JA, Nabeth P, Perrier-Gros-Claude JD., (2002)

Distribution and susceptibility of bacterial urinary tract infection in Dakar, Senegal. Int J Antimicrob Agents. 2002, Iqbal J, Rahman M, Kabir MS, Rahman M. Increasing ciprofloxacin resistance among prevalent urinary tract bacterial isolates in Bangladesh. Jpn J Med Sci Biol 1997, 50: 241-50 pages.

Euzeby J P. (2005)

Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-bouraoui N., Boulaaba M et Abdelly C., (2008)

Phenolic composition and biological activities, compt. Rend. Biol, vol : 331. 372-379 pages.

Festy Daniele, (2011)

L'aromathérapie, tous les bons gestes pour se soigner autrement, édition LEDUC.S 2011, 18 (311) pages.

Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J., (2000)

Antimicrobial resistance among urinary tract infection (UTI) isolates in Europe : results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997. Antonie Van Leeuwenhoek 2000, 147-52 pages.

Fouche J.G, Marquet A. et Hambuckers A. (2000)

Les plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du monde des plantes Sart Tilman

Funk & Wagnalls, (2004)

Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls. URL :<http://www.Funkandwagnalls.com>.

Gabe M, (1968)

Technique histologique .Ed : Masson.1113 pages.

Gamier J., (1981)

Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil, 1179-1185 pages.

Guimaraes R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa M. J., Carvallho A.M. et Ferreira I.C.F.R., (2010)

Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food Chem. Toxicol., Vol. 48, 99 –106 pages.

Gupta K, Scholes D, Stamm WE., (1999)

Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. JAMA 1999 Feb 24 ;281:736-8 pages.

Hogan, D. and Koltern L., (2003)

Why are bacteria refractory to antimicrobials? current opinion in microbiology 472-477 pages.

Holley, R. A. and Patel , D., (2005)

Improvement in shelf-life and safety of perishable compounds from leaf essential oil and smoke antimicrobials. Food microbiol. 273-292 pages.

Hurtel J-M. (2006)

Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé.

Kaloustian J., Hadji-Minaglou Francis, Pr. Patrice vanelle, (2012)

La connaissance des huiles essentielles, qualilogie et aromathérapie, entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, edition Springer 2012, 5 (193) pages.

Kahlmeter G., (2000)

The ECO*SENS Project : a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens-interim report. J Antimicrob Chemother 2000 Aug ;46 Suppl A:15-22 pages.

Karlowsky JA, Kelly LJ, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF.

Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of Escherichia coli from Female Outpatients in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2002 Aug ;46:2540-5 page

Kim N.S et Lee D.S., (2002)

Comparaison od different extraction methods for the analysis. 31-47 pages.

Lahlou M., (2004)

Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, Phytotherapy Research, 435-448 pages.

Laurent A. et Delerme C., (2008)

Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. AFSSAPS : 1-17 pages.

Legrand G., (1993)

Manuel de préparateur en Pharmacie, Masson, Paris.

Herandez Léon Raul , (2005)

Ochoa octobre 2005 substitution de solvant et de matières actives de synthèse de combine d'origine végétale thèse de l'Institut Nationale Polytechnique. Toulouse, France

Lis-Balchin M., (2002)

Lavender: the genus Lavandula, Taylor and Francis, London, 37- 40 pages.

Lucchesi M.E., (2005)

Extraction sans solvant assistée par micro-onde conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en science, discipline : chimie : Université de Reunion, Faculté des sciences et technologies.

Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M.J. and Barel A.O., (1998)

Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. J. Appl. Microbiol. 84, 368-376 pages.

Miller J.A, Lang L ., Ley M, et al., (2013)

La disposition du tissu mammaire humain et la bioactivité de limonène chez les femmes avec un cancer du sein au stade précoce. Cancer Prev Res (Phila). 2013 juin; 6 (6): 577-84 pages.

Mansouri S, Shareifi S., (2002)

Antimicrobial resistance pattern of Escherichia coli causing urinary tract infections, and that of human fecal flora, in the southeast of Iran. Microb Drug Resist 2002 Summer, 123-8 pages.

Philippe Martin, (2014)

La famille des plantes à fleurs d'Europe, botanique systématique et utilitaire, édition presses universitaires de Namur, 240 pages

MARIE ELISABETH LUCCHESI, (2005)

Extraction Sans Solvant Assistée par micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, 17 ; 23, 52 pages.

Masango P., (2005)

Cleaner production of essential oils by steam distillation. Journal of cleaner production. Vol. 13 (8): 833-893 pages.

Michel Botineau,

Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs édition Lavoisier 2010, 778 (1324) pages.

MINH TU N.T., THANH L.X., UNE A., UKEDA H. et SAWAMURA M., (2002)

Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. Flavour Fragrance J. Vol. 17, 169 – 174 pages.

Nicole Tonelli, Francois Gallouin, (2013)

Des fruits et des graines comestibles du monde entier, édition Lavoisier 2013, 380-385 (725) pages.

Nikaido, H., (2003)

Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and molecular biology reviews. 593-656 pages.

Oussou, K.R., (2004)

Activité antimicrobienne des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte d'Ivoire. C.R. chimie. 1081-1086 pages.

Polese Jean-marie , (2008)

La culture des agrumes, édition Artemis de Mars 2008, 33 (93) pages.

P.BERCHE et al (P.C.E.M.2) (2002/2003).

Bactériologie générale, faculté de médecine Necker – enfants malades. 16 pages.

Padma S Vankar, (2004)

Essential Oils and Fragrances from Natural Sources. 31-34 pages.

Philippe Martin, (2014)

La famille des plantes à fleurs d'Europe, botanique systématique et utilitaire, édition presses universitaires de Namur, 2014, 240 (290) pages.

Pilet. P.E. (1964).

La Cellule structure et fonctions. Masson, Paris, 404 pages

Pierangeli, G., Vital, G. and Windell, R., (2009)

Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f). King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. J. Medicinal Plants Res. 3(7), 511-518 pages.

Rahal K., Belouni R., Aboun A., Bait S. (2005)

Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaires à l'échelle nationale, république algérienne démocratique et populaire, ministère de l'agriculture, ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière.

REYNAUD, J., (2006)

Prescription et conseil en aromathérapie Editions Lavoisier 2006.

Richard F., (1992)

Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, tec et doc., 1228-1242 pages.

RAO A.V. et RAO L.G.,(2007)

Carotenoids and human health. Pharmacol. Res. Vol. 55, 207 – 216 pages.

Rebourd, (2005)

La culture des agrumes en Algérie, 4page –n°49

Schauenberg P. et Paris F., (2010)

Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé, 396 pages.

Scimeca D. et Tétou M., (2005)

Votre santé par les huiles essentielles, Guide pratique pour prévenir et guérir tout les maux quotidiens, Ed. Alpen, 12,13 pages.

Semen E., Hiziroglu S., (2005)

Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar(*Juniperus Virginiana* L.) . American Journal of Environmental Sciences; 1 (2): 133-138 pages.

Smith, R., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, (2005)

Procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food : essential oils. Food chemistry. Toxicol 43(2005) 345-363 pages.

Sorberg M, Farra A, Ransjo U, Gardlund B, Rylander M, Wallen L, Kalin M, Kronvall G., (2002)

Long-term antibiotic resistance surveillance of gram-negative pathogens suggests that temporal trends can be used as a resistance warning system. Scand J Infect Dis (2002), 34, 372-378 pages.

Sotto A, De Boever CM, Fabbro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J., (2001)

Risk factors for antibiotic-resistant - *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections : a prospective study. J Clin Microbiol 2001 Feb ; 438-44 pages.

Sousa EMBD., Chiavone –Filho O., Moreno MT., Silva DN., Marques M.O.M., Meireles MAA. (2002)

Experimental Results for extraction of essential oil from *Lippia sidoides* cham. Using pressurised carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* ; 19(02): 229-241 pages.

Srinivasa H, Parija SC, Bhattacharya S, Sehgal R., (1999)

A high incidence of ciprofloxacin resistance in urinary isolates in eastern Nepal. *J Commun Dis* 1999 Mar ;31:45-7 pages.

SACCHETTI G., MAIETTI S., MUZZOLI M., SCAGLIANTI M., MANFREDINI S. et RADICE M., (2005)

Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632 pages.

Vialard N., (2008)

Remèdes et recettes à la lavande, Ed. Rustica.

Vagi E., B. SIMANDI, A. SUHAJDA, E., (2005)

Hethelyi. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum marjorana* L. Extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *J.*, 38, 51-57 pages.

Wenqtang, Shufen, Ruixiang, Shaokun, Can., (2007)

Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001, 1558-1564 pages

ZABEIROU ; HACHIMOU, (2005)

Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata* L) et de la Poivree (*Mentha Piperita* L) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah _Ouargla .16 pages.

Zhiri A. (2006)

Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News. Science, Nutrition, Prévention et santé.* Edité par la Fondation pour le libre choix.

Résumé

Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques, Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques, néanmoins un nombre très restreint d'étude a été consacré à la plante de *Fortunella margarita*. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer in vitro l'activité antibactérienne et antiproliférative de l'huile essentielle extraite de la plante citée précédemment.

Une extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation de l'épicarpe du fruit de la plante a été effectué, avec un rendement de 1.625 %, cet extrait a été testé par aromatogramme sur des bactéries isolées cliniquement après un examen cyto bactériologique des urines provenant de malades hospitaliers de l'Etablissement Hospitalier Spécialisé mère-enfant de Tipaza et de malades non hospitaliers et des bactérie de référence (ATCC) provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie, des diamètres de 10 à 20 mm ont été mesuré. Par la suite une étude de l'activité antiproliférative sur le model de levure *Saccharomyces cerevisiae* a été effectué par l'inhibition de la croissance de cette levure en présence de l'extrait et du médicament utilisé dans le traitement de certains cancers (hydroxycarbamide 500 mg), ces derniers présentent des résultats semblables.

Mots clés : *Fortunella margarita*, hydrodistillation, *Saccharomyces cerevisiae*.

تم إنجاز العديد من الأبحاث حول الزيوت الأساسية المستخلصة من النباتات العطرية. حيث أشارت مختلف الدراسات المنشورة إلى أن هذه الأخيرة تتمتع بعدة مزايا بيولوجية. غير أن قلة منها تناولت موضوع نبتة "فورتون لامارغرينا". وفي هذا الصدد، حاولنا تسليط الضوء على نشاط المقاومة البكتيرية – الإخلاقية للزيت الأساسي المستخلص من النبتة سالفة الذكر عن طريق التقطير المائي لهذا الزيت من القشرة الخارجية لثمرتها، إذ قارب عطاؤها نسبة 1.625 بالمائة. وحسب النتائج المتوصل إليها بعد التقطير العطري و كبح النمو الخلوي لساكارومييس سيرفيسيائي فإن نشاط المقاومة البكتيرية للزيت الأساسي محل الدراسة ضعيف، لكن نشاط مقاومتها الإخلاقية جيد.

كلمات مفتاحية:

فورتون لامارغرينا، التقطير المائي، ساكارومييس سيرفيسيائي، التقطير العطري.

Abstract

Several research studies have focused on the essential oils extracted from aromatic plants, the different results published indicate that they are endowed with several biological properties, however, a very limited number of studies has been devoted to plant *Fortunellamargarita*. In this context, we tried to evaluate the in vitro antibacterial and antiproliferative activity of the essential oil extracted from the plant mentioned above, preceded by extraction of the essential oil by steam distillation of the fruit of the epicarp plant, the yield was perhaps 1.625% . the results obtained by the chromatogram and inhibition of cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* deduced that investigated essential oil has a low antibacterial activity and good antiproliferative activity.

Keywords:

Fortunellamargarita, steam distillation, chromatogram, *Saccharomyces cerevisiae*.

Annexes

Annexe 1

1-Composition des différents milieux de culture utilisés dans cette étude

1-1-milieux de cultures solides

1-1-1– Gélose nutritive

- Composition

- Extrait de viande de bœuf.....	5 à 10g
- Peptone.....	10g
- Chlorure de sodium.....	5g
- Agar.....	15g
- Eau distillée.....	1000 ml

- Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,4 et stériliser à 120°C pendant 20 min.

1-1-2-Milieu King A

- Composition

- Agar.....	12g
- Peptone bactériologique « A ».....	20g.
- Glycérol.....	10g
- K ₂ H ₂ SO ₄	10g
- Mg Cl ₂	1,4g
- Eau distillée.....	1000ml.

- Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 et stériliser à 120°C pendant 20mn.

1-1-3– Milieu King B

- Composition

- Agar.....	12g.
- Peptone bactériologique « B ».....	20g
- Glycérol.....	10g
- K ₂ HPO ₄ (anhydre).....	1,5g
- Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	1,5g
- Eau distillée.....	1000ml

- Préparation

Après dissolution de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 et stériliser à 120°C pendant 20mn.

1-1-4- Milieu Mueller Hinton

- Composition

Hydrolysate de viande	5.0g/l
Hydrolysate de caséine	17.5g/l
Amidon	1.5g/l
Agar-Agar	12.5g/l
Ajuster à pH	7.4

- Préparation

Ce milieu est disponible en milieu déshydraté, pour préparer 1 L, dissoudre 38 g dans 1L d'eau distillée, ensuite répartir dans des flacons de 250 ml hermétiquement fermés, puis autoclaver à 121° C pendant 15 mn.

1-2-milieus de culture liquide

1-2-1– Bouillon dextrose à la pomme de terre

- Composition

- Pomme de terre.....	400g
- Eau distillée.....	600ml
-dextrose	40 g

- Préparation

L'infusion de pomme de terre se prépare en faisant bouillir dans l'eau 400 g de pommes de terre tranchées (lavées mais non pelées) pendant 30 minutes à 1h puis en laissant décanter le bouillon obtenu ou en le filtrant à travers une gaze. On dilue ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre. Puis on ajoute 40 g de dextrose et autant avec une stérilisation par autoclave à 100 kPa pendant 15 minutes.

1-2-2- bouillon Sabouraud

- Composition

- Tryptone.....5,0 g
- Peptone pepsique de viande5,0 g
- Glucose.....20,0 g

- Préparation

- Mettre en solution 30,0 g de milieu déshydraté (BK026) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2-Réactifs utilisés

2-1-Réactifs Kovacs

- Diméthylamino 4- benzaldéhyde..... 50g
- Pentanol 750ml
- Acide chlorhydrique concentré..... 250ml

2-2-Solution du lugol

- Iode..... 10g
- Iodure de potassium..... 20g

2-3-Réactifs de VogesProskauer (VP)

2-3-1-VP I

- hydroxyde de potassium.....40g
- eau distillée.....100ml

2-3-2-VP II

- Alpha-naphtol..... 6g
- Ethanol.....100ml
- eau distillée 1000ml

2-4-Réactif TDA

- Perchlorure de fer.....3,4g
- Eau distillée.....100ml

3-Composition des différentes colorations utilisées

3-1-Solution de violet de gentiane

- Ethanol..... 2g
- Oxalate d'ammonium.....0,8g
- Eau distillée.....80ml.

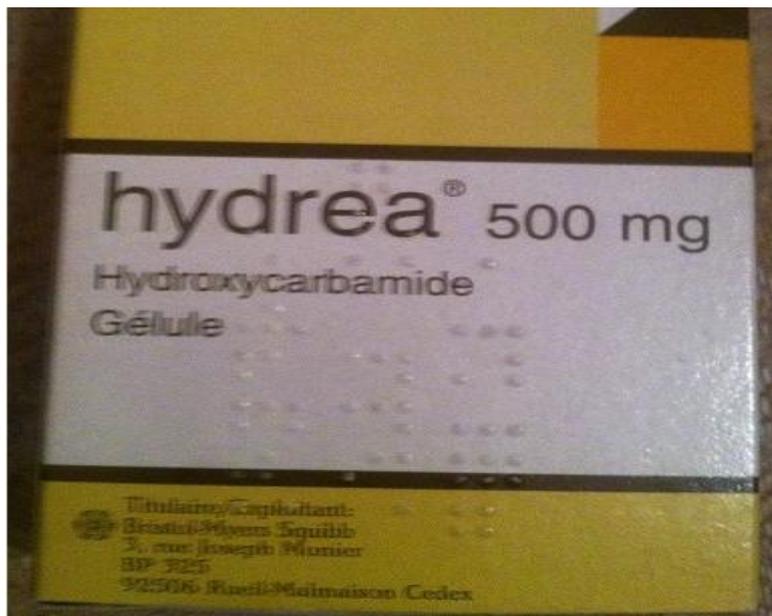
3-2-fuschine phénique de ziehl

- fuschine basique.....1g
- Acide phénique cristallisé.....5g
- Alcool à 90°.....10ml

4-Fiche technique qui accompagne les prélèvements :

- le nom et le prénom ;
- L'âge et le sexe ;
- Mode de prélèvement ;
- Heure et date de prélèvement ;
- Manifestations cliniques.

5-Le médicament de référence dans l'étude de l'activité antiproliférative



Medicament Hydrea 500 mg (hydroxycarbamide)

Classe thérapeutique : Cancérologie et hématologie

Principes actifs : Hydroxycarbamide

Excipients : Sodium hydrogénophosphate, Citrique acide (E330), Lactose, Magnésium stéarate (E572), Enveloppe de la gélule : Erythrosine (E127), Titane dioxyde (E171), Fer oxyde (E172), Indigotine (E132), Sodium laurylsulfate (E487), Gélatine

Annexe 2

Tableau IV : Matériel, fournitures et équipements de base utilisés pour effectuer notre étude

Matériel	Fournitures	Équipement de base
<ul style="list-style-type: none"> - Agitateur - Autoclave - Bain-marie - Balance de précision - Bec benzène - Microscope optique avec l'objectif à immersion - Réfrigérateur 	<ul style="list-style-type: none"> - Blouse de laboratoire - Bécher - Gants - Liquide désinfectant - boîtes de pétri stériles à usage unique - Burette graduée - Disques stériles - Distributeur de disques d'ATB - Ecouvillons stériles à usage unique - Entonnoir - Erlenmeyer - Etiquette et marqueur - Flacons - Huile à immersion - Lames et lamelles - Milieux de culture - Nettoyant pour lentilles optiques - Papier aluminium - Papier buvard et filtre - Pipettes graduées - Pipettes Pasteur 	<ul style="list-style-type: none"> - Paillasse - Bon éclairage électrique - eau courante - Eau distillée - Eau physiologique

Tableau V : conditions opératoires de l'hydrodistillation

Nombre d'extraction	Quantité de matière végétale (g)	Quantité d'eau (ml)	Temps de l'hydrodistillation
1	280	500	3h00
2	300		
3	350		
4	400		
5	430		

Tableau VI : identification biochimique de la galerie Api 20E

Teste	Substrats	Réactions /enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-B-D-galactopyranaside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	Organine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pale/Jaune	Bleu/bleu-vert
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Incolore/Grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron rougeâtre
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore Vert pale/Jaune	Rose
VP	Créatine pyruvate de sodium	Production d'acétoine	Incolore	Rose Rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune/Jaune gris
MAN	Mannitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
IND	Inositol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/Oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
OX	Oxydase	Fermentation/Oxydation	Incolore	Violet

Tableau VII : La liste des antibiotiques à tester en fonction des espèces bactériennes sont présentés

Entérobactérie	AMP : ampicilline, AMX : amoxilline, CZ :céfazoline, CTX : céfotaxime, GEN : gentamycine, AK : amikacine, CS : colistine, AUG : Amoxiciline+Acideclaulanique, NA : Acide nalidixique, F : Nitrefurane.
Staphylocoque	TIC: ticarcilline, GEN: gentamycine, AK : amikacine, GEN : gentamycine, K :kanamycine, E :Erythromycin, DA : clindamycine, TE :Tetracycline, C : Chleramphénicol.
Pseudomonas	GEN: gentamycine, CFP: céfopérazone, CTX : céfotaxime, TE : tetracycliine, AN : amikacine, AMP : ampicilline, AMX : amoxilline, CZ : cefazoline, CIP : ciprofloxacine, CS : colistine, NI : nitroxaline, SXT : triméthoprimine, OFX : ofloxacine.

Tableau XIV : Taux de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en présence d'HE de *Fortunella margarita*

Temps (h)	Nombre de cellule $\times 10^5$		
	Témoin	Hydroxycarbamide	Huile essentielle
0	20±26,55	25±8,10	23 ±9,36
2	50 ±26,55	38 ±8,10	40 ±9,36
4	70 ±26,55	43 ±8,10	42 ±9,36
6	80 ±26,55	44 ±8,10	45 ±9,36
8	85 ±26,55	44 ±8,10	46 ±9,36

P 0,001, P 0,001 différences significatives par rapport au témoin Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type

Annexe 3



Figure N° 07 : Souche fongique commerciale, *Saccharomyces cerevisiae*

<p><i>Sarcina lutea</i> (Institut Pasteur)</p>	
<p><i>Enterobacter</i> <i>coloacea</i> (souche clinique)</p>	
<p><i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (Institut Pasteur)</p>	
<p>E. coli (Institut Pasteur)</p>	

Figure N° 16: Diamètres d'inhibition de quelques souches bactériennes obtenue par la méthode de diffusion sur gélose