

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



## **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER EN GENIE DES PROCEDES**

**Spécialité : Matériaux et produits organiques industriels**

Impact de la composition des huiles essentielles de  
*Citrus sinensis*(Orange) et *Citrus limonum* (Citron) sur  
l'activité microbiologique

Présenté par :  
Mlle. SAADOUNE Zineb  
Mlle. MEGUENNI Fadhila

Encadré par :  
Mr. BOUTOUMI Hocine

Année universitaire 2015/2016

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
DEDICACE	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABBREVIATIONS	
RESUME	
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	

## **CHAPITRE I : Les huiles essentielles**

I.1.	Définition des huiles essentielles	1
I.1.1.	Huiles essentielles d'agrumes	1
I.1.1.1.	Huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	3
I.1.1.2.	Huile essentielle de <i>Citrus limonum</i>	4
I.2.	Méthodes d'extraction des huiles essentielles	5
I.2.1.	Distillation	6
I.2.1.1.	Hydrodistillation	6
I.2.1.2.	Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	6
I.2.1.3.	Hydro diffusion	6
I.2.2.	Extraction à froid (Expression)	6
I.3.	Composition chimique	7
I.3.1.	Notion de chémotype	8
I.3.1.1.	Le Limonène	8
I.3.1.2.	Propriétés physiques du Limonène	9
I.3.1.3.	Propriétés chimiques du Limonène	10
I.3.1.4.	Usages du limonène	10
I.3.1.5.	Application en synthèse totale	13

## **CHAPITRE II :Les activités biologiques des huiles essentielles**

II.1.	Activités biologiques des huiles essentielles	17
II.2.	Activité liée à la composition chimique	17
II.3.	Les huiles essentielles comme agents antimicrobiens	18
II.3.1.	Généralités	18
II.3.2.	Activité antimicrobienne	18

II.3.2.1.	Activité antibactérienne .....	18
II.3.2.2.	Activité antifongique .....	19
II.4.	Morphologie et Structure des bactéries .....	19
II.5.	Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries .....	20
II.6.	Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne .....	22
II.6.1.	Aromatogramme .....	22
II.6.2.	Méthode de micro-atmosphère .....	23

## **CHAPITRE III : Techniques d'études et conditions expérimentales**

III.1.	Matériels .....	25
III.1.1.	Matériel végétale .....	25
III.1.2.	Matériel biologique .....	25
III.1.2.1.	Souches microbiennes .....	25
III.1.3.	Produits utilisés .....	26
III.1.3.1.	Produits chimiques .....	26
III.1.3.2.	Milieu de culture .....	26
III.2.	Méthodes .....	26
III.2.1.	Procédé d'extraction .....	27
III.2.1.1.	Calcul du rendement .....	27
III.3.	Caractéristiques des huiles essentielles .....	28
III.3.1.	Indices physique.....	28
III.3.1.1.	Mesure de l'indice de réfraction .....	28
III.3.1.2.	Mesure du pouvoir rotatoire .....	28
III.4.	Analyse de la composition chimique .....	29
III.4.1.	Chromatographie en Phase Gazeuse .....	29
III.4.2.	Spectroscopie UV-VISIBLE .....	30
III.5.	Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle .....	30
III.5.1.	Technique en milieu solide (Aromatogramme) .....	30
III.5.1.1.	Préparation des dilutions des huiles essentielles .....	30
III.5.1.2.	Préparation de préculture .....	31
III.5.1.3.	Préparation de l'inoculum .....	31
III.5.1.4.	Ensemencement .....	31
III.5.1.5.	Dépôts des disques .....	31
III.5.1.6.	Lecture .....	32
III.5.2.	Méthode en phase vapeur ( Micro atmosphère ).....	32

## CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

IV.1.	Rendement des huiles essentielles.....	34
IV.2.	Caractéristiques physiques des huiles essentielles .....	35
IV.2.1.	Résultats des analyses physiques .....	35
IV.3.	Analyses de la composition chimique des huiles essentielles .....	36
IV.3.1.	Spectroscopie ultraviolet visible (UV-VIS) .....	36
IV.3.2.	Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) .....	37
IV.3.3.	Chromatographie en phase vapeur (CPG).....	39
IV.4.	Activité biologique des huiles essentielles .....	42
IV.4.1.	Aromatogramme .....	42
IV.4.1.1.	Essai avec l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> .....	42
IV.4.1.1.1.	Etude de l'activité antibactérienne .....	42
IV.4.1.1.2.	Etude de l'activité antifongique .....	45
IV.4.1.2.	Essai avec l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> .....	47
IV.4.1.2.1.	Etude de l'activité antibactérienne .....	47
IV.4.1.2.2.	Etude de l'activité antifongique .....	50
IV.4.2.	Micro atmosphère .....	52
IV.4.2.1.	Essai avec l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure .....	52
IV.4.2.1.1.	Etude de l'activité antibactérienne .....	52
IV.4.2.1.2.	Etude de l'activité antifongique .....	54
IV.4.2.2.	Essai avec l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure .....	55
IV.4.2.2.1.	Etude de l'activité antibactérienne .....	55
IV.4.2.2.2.	Etude de l'activité antifongique .....	56
IV.4.3.	Etude comparative entre l'Aromatogramme et Micro-atmosphère .....	58

## CONCLUSION GENERALE

## *Remerciements*

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

Nous tenons à remercier profondément notre encadreur Mr. BOUTOUMI Hocine, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour la confiance qu'il nous a accordé, merci pour avoir toujours été disponible pour être à notre écoute, pour nous avoir guidée tout en nous laissant libre dans notre choix. Nous tenons à vous exprimer également toute notre gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

Nous tenons également à remercier vivement Madame HAMITOUCHE Houria pour sa contribution et son aide.

Notre gratitude va également à Mr. DJAMEL TEFAHI le chef de service de laboratoire d'hygiène à Blida pour son collaboration.

Nos vifs remerciements vont également à Madame NAKKAB SELMA docteur au laboratoire d'hygiène à Blida pour son aide et la mise à notre disposition du matériel de son laboratoire.

Nous voudrions remercier l'ensemble du personnel du laboratoire; Mme.Zahia, Mme.Zahira, Mme.Amel, Mr.Rachid et Mr.Maasakri. Nos collègues surtout Asma, Yasmina, Amina, Meriem, Nassima, Zora, et Badro pour leur aide, leur encouragement et leur disponibilité.

Nous ne terminerons pas sans remercier nos familles ainsi que tous ceux qui nous ont apporté l'aide de près ou de loin afin d'accomplir au mieux cette étude.

# Dédicace

*En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce travail avec une grande fierté  
aux êtres les plus chers : Mes parents,*

*A mon père,*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant  
et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies  
valeurs de la vie et pour ses précieuses conseils.*

*J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit  
l'accomplissement de tous tes efforts.*

*A ma mère,*

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute  
permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.*

*Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous mes chères parents que je le dois,  
Que Dieu vous garde.*

*A mon chère petit frère : Mahfouadh  
Je te souhaite tout le succès et le bonheur*

*A mes fidèles amies: Nawel, Amina*

*A toute la promotion de master 2016  
Pour leur sympathie, leur humeur et leur solidarité envers moi.*

# Dédicace

*Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont cher :*

*A ma très chère mère qu'elle m'a soutenue tout au long de mes études et pour son amour et bonheur qu'elle me donne, j'ai vraiment une chance fabuleuse d'avoir une mère comme toi.*

*A mes très chers frères : Ali ; Abdelouahabe ; Med Yacine.*

*A mes oncles et mes tantes paternel.*

*A mes oncles et mes tantes maternel.*

*A mon binôme Zineb et sa famille*

*A mes cousins et mes cousines surtout à mes très chère sœurs : Zhour, Khadidja Chaimaa, Fatma, Ahlam.*

*Et à mes amies : Fatma Zehra ; Manel ; Soumaia avec qui j'ai passé de bon moments.*

## Fadhila



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure I.1.</b> Le (L)-limonène et le (D)-limonène.....	9
<b>Figure I.2.</b> Formation du Limonène à partir de pyrophosphate de géranyle. ....	9
<b>Figure I.3.</b> Acide périllique. Esther méthylique de l'acide périllique.....	11
<b>Figure I.4.</b> Dérivé du limonène actif sur certaines lignées tumorales.....	12
<b>Figure I.5.</b> Carvone. ....	13
<b>Figure I.6.</b> Les alcaloïdes à partir du limonène.....	14
<b>Figure I.7.</b> (+)-aphanamol I.....	15
<b>Figure I.8.</b> Araliopsine ; Analogue de la molécule naturelle. ....	15
<b>Figure II.1.</b> Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne. ....	21
<b>Figure II.2.</b> Principe de la méthode de diffusion par disque.....	22
<b>Figure II.3.</b> Principe de la méthode de micro-atmosphère. ....	23
<b>Figure III.1.</b> Dispositif d'extraction des huiles essentielle par hydrodistillation. ....	27
<b>Figure IV.1.</b> Pourcentage en huiles essentielles obtenus pour <i>Citrus limonum</i> (citron), et <i>Citrus sinensis</i> (l'orange douce). ....	34
<b>Figure IV.2.</b> Spectre UV-VIS des deux huiles essentielles de <i>Citrus</i> .....	36
<b>Figure IV.3.</b> Spectre IR de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> . ....	37
<b>Figure IV.4.</b> Spectre IR de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> . ....	38
<b>Figure IV.5.</b> Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> . ....	39
<b>Figure IV.6.</b> Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> . ....	39
Nous avons injecté des étalons pour pouvoir identifier les composés des deux H.E ,les résultats sont regroupés dans les Tableaux suivants :.....	40
<b>Figure IV.7.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure et à différentes dilutions contre les bactéries à Gram-. ....	43
<b>Figure IV.8.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure et à différentes dilutions contre les bactéries à Gram+. ....	44
<b>Figure IV.9.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure sur les souches bactériennes à Gram+.....	44

<b>Figure IV.10.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> diluée (solution mère).....	45
<b>Figure IV.11.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure et à différentes dilutions contre les souches fongiques.....	46
<b>Figure IV.12.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure sur les souches fongiques. ....	46
<b>Figure IV.13.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> diluée sur les souches fongiques( <i>Sacar</i> ). ....	47
<b>Figure IV.14.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure et à différentes dilutions. ....	48
<b>Figure IV.15.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure et à différentes dilutions. ....	49
<b>Figure IV.16.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure sur quelques bactéries. ....	49
<b>Figure IV.17.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure et à différentes dilutions. ....	50
<b>Figure IV.18.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure sur.....	51
<b>Figure IV.19.</b> Effet inhibitrice des dilutions de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> sur les souches fongiques.....	51
<b>Figure IV.20.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure sur <i>Candida albicans</i> .(Micro-atmosphère) .....	54
<b>Figure IV.21.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure sur <i>Sacar</i> .(Micro-atmosphère) .....	55
<b>Figure IV.22.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure à différentes doses. (Micro-atmosphère) .....	55
<b>Figure IV.23.</b> Effet inhibitrice de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure sur <i>Candida albicans</i> . (Micro-atmosphère) .....	57
<b>Figure IV.24.</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure à différentes doses. (Micro-atmosphère).....	57

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.1 :</b> Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'Agrumes [4].	2
<b>Tableau I.2 :</b> Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> .	3
<b>Tableau I.3 :</b> Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> .	4
<b>Tableau I.4.</b> Les principales caractéristiques physiques du limonène.	10
<b>Tableau III.1. :</b> Provenance des germes utilisés.	26
<b>Tableau IV.1.</b> Rendements en huiles essentielles de <i>Citrus</i> en (%)	34
<b>Tableau IV.2:</b> Composition physico-chimique des deux huiles essentielles de <i>Citrus</i> .	35
<b>Tableau IV.3.</b> Compositions des huiles essentielles avec leurs temps de rétention.	40
<b>Tableau IV.4.</b> Identification des composés dans l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> .	40
<b>Tableau IV.5.</b> Identification des composés dans l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> .	41
<b>Tableau IV.6.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> contre les souches bactériennes à Gram-.	42
<b>Tableau IV.7.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> contre les souches bactériennes à Gram+.	43
<b>Tableau IV.8.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> contre les souches fongiques.	45
<b>Tableau IV.9.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> contre les souches bactériennes à Gram-.	47
<b>Tableau IV.10.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> contre les souches bactériennes à Gram+.	48
<b>Tableau IV.11.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> contre les souches fongiques.	50
<b>Tableau IV.12.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure contre les souches bactériennes à Gram-.	53

<b>Tableau IV.13.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure contre les souches bactériennes à Gram+.	53
<b>Tableau IV.14.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> pure contre les souches fongiques. (Micro-atmosphère)	54
<b>Tableau IV.15.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure contre les souches bactériennes à Gram-.	56
<b>Tableau IV.16.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure contre les souches bactériennes à Gram+. (Micro-atmosphère)	56
<b>Tableau IV.17.</b> Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i> pure contre les souches fongiques. (Micro-atmosphère)	57

# LISTE DES ABREVIATIONS

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**ASP** : *Aspergillus flavus*.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**Bacillus** : *Bacillus ceureus*.

**Candida** : *Candida albicans*.

**Citrus limonum** : Citron.

**Citrus sinensis** : Orange douce.

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.

**DMSO** : Diméthyle Sulfoxyde.

**E.coli** : *Escherichia coli*.

**Gram+** : Gram positive.

**Gram-** : Gram négative.

**H.E** : Huile essentielle.

**IPA-Alger** : Institut Pasteur d'Algérie.

**IRTF** : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

**P. aeruginosa** : *Pseudomonas aeruginosa*.

**S.aureus** : *Staphylococcus aureus*.

**S.S** : *Sacar*.

**UV-VIS** : Spectroscopie ultraviolet visible.

## Résumé

L'objectif assigné à notre travail consiste à évaluer l'impact de la composition des huiles essentielles de *Citrus sinensis*(Orange) et *Citrus limonum* (Citron) sur l'activité microbiologique.

Les H.E extraites par hydrodistillation à partir des écorces d'agrumes de *Citrus sinensis*, *Citrus limonum*, ont présenté un faible rendement allant de 0,12 à 0,24%. La composition chimique de ces H.E est déterminée par la chromatographie en phase gazeuse (CPG), spectroscopie infrarouge (IR) et spectroscopie UV-visible.

L'activité antibactérienne des deux H.E a été déterminée in vitro par deux méthodes différentes (Aromatogramme et Micro-atmosphère) sur 07 souches (04 bactéries, 02 levures et 01 champignon). Le screening a mis en évidence que les deux H.E soit pure ou diluée possèdent une activité bactériostatique remarquable sur la croissance de certaines souches bactériennes. En outre, ces deux H.E présente un fort pouvoir antifongique. Il ressort de cette étude que l'HE de *Citrus limonum* présente une activité antibactérienne plus élevée que l'HE de *Citrus sinensis* contre les mêmes bactéries.

**Mots clés :** Huiles essentielles, *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, Activité microbiologique.

## Abstract

The objective set for our work is to assess the impact of the composition of essential oils of *Citrus sinensis* (Orange) and *Citrus limonum* (Lemon) on microbiological activity.

Essential oils extracted by steam distillation from the citrus fruit of *Citrus sinensis* peel, *Citrus limonum*, presented a low yield from 0.12 to 0.24%. The chemical composition of these essential oils is determined by gas chromatography (GC), infrared spectroscopy (IR), and UV-spectroscopy visible.

The antibacterial activity of the two essential oils was determined in vitro by two different methods (Aromatogram and Micro-atmosphere) on 07 strains (04 bacteria, 02 yeasts and 01 fungus). The screening showed that both essential oils either pure or diluted possess a remarkable bacteriostatic activity on the growth of some bacterial strains in addition, both essential oils has great antifungal power. It appears from this study that the *Citrus limonum* essential oil has a higher antibacterial activity than the *Citrus sinensis* essential oil against the same bacteria.

**Keywords:** Essential oils, *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, microbiological activity.

## ملخص

الهدف المحدد لعملنا هو تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات لاثنتين من الزيوت الأساسية من الحمضيات: *Citrus limonum* (الليمون) و *Citrus sinensis* (البرتقال الحلو) تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير بالبخار من فواكه الحمضيات لقشور الليمون و البرتقال الحلو وقد قدم عائد منخفض 12،0-24،0٪. وقد تم تحليل هذه الزيوت الأساسية بواسطة الفصل الكروماتوغرافي الغازي ، مطياف الأشعة تحت الحمراء و التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية مرئية. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية في المختبر بطريقتين مختلفتين (النشر على الوسط الصلب و النشر على الوسط الغازي) في 07 سلالات (04 بكتيريا 02 خمائر و 01 فطريات) . أظهر الفحص أن كلا الزيوت الأساسية سواء نقية او مخففة لديها نشاط جرثومي ملحوظ على نمو بعض أنواع من البكتيريا . بالإضافة الى ذلك ، فان الزيوت الأساسية لديها قدرة قوية مضادة. نستنتج من هذه الدراسة أن زيت الليمون لديه نشاط مضاد للجراثيم أعلى من زيت البرتقال ضد نفس البكتيريا.

الكلمات المفتاحية: زيوت اساسية، *Citrus limonum, Citrus sinensis* ، النشاط الميكروبيولوجي

# INTRODUCTION GENERALE

Les huiles essentielles occupent une place importante dans la vie quotidienne des hommes. Elles possèdent des propriétés très intéressantes, qui trouvent leur application dans divers domaines : médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. L'usage des huiles essentielles remonte à fort longtemps, puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà à sa manière l'extraction des principes odorants des plantes.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne et de l'oxydation des aliments [1]. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (Bruneton, 1999; Teuscher *et al*, 2005). Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (Chalchat *et al*, 1997; Baser *et al*, 2001).

Les huiles essentielles comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes aromatiques, elles possèdent des propriétés plus ou moins connues dont leur vertu anti infectieuse est de loin celle qui est la mieux établie, cependant leur activité antibactérienne demeure une tâche très intéressante et utile .L'activité thérapeutique des huiles essentielles dépend principalement de leur composition chimique.

Les plantes aromatiques sources de ces substances sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable. Ce travail a pour objet l'extraction et l'analyse chimique puis l'activité biologique des huiles essentielles de deux espèces appartenant à la même famille botanique ; la famille des Rutaceae représentée par les espèces : *Citrus limonum* et *Citrus sinensis*.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres. Le

premier chapitre est consacré à l'étude des huiles essentielles. Le second chapitre traite la valorisation des ressources végétales par une meilleure connaissance de la composition chimique et de l'activité biologique des huiles essentielles.

Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de son activité biologique. Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, et la liste des références bibliographiques.

# **CHAPITRE I**

## **LES HUILES ESSENTIELLE**

## **I.1. Définition des huiles essentielles :**

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeurs et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques. Les huiles essentielles sont des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme: «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (Garnero, 1996). [2]

### **I.1.1. Huiles essentielles d'agrumes :**

Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus.

Ces huiles volatiles sont associées aux saveurs et arômes caractéristiques des agrumes, il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils.

Ces huiles sont généralement présentes dans l'écorce au flavedo mais se trouvent aussi dans les sacs d'huiles intégrés dans les vésicules de jus. Cependant, la quantité présente dans les vésicules à jus est plus faible que la quantité présente dans le flavedo; de même, leur composition diffère de l'un à l'autre.

L'hydrocarbure monoterpénique (+)-limonène (D-limonène) représente une teneur de 80 à 95 % de toutes les huiles d'agrumes. Les terpènes oxygénés, environ 5 % de l'huile, fournissent des arômes propres à chaque espèce. Il existe une variation significative de la composition des substances volatiles des espèces d'agrumes sur le plan qualitatif et quantitatif.

Quantitativement, les esters ne représentent qu'une petite fraction d'huiles d'agrumes, mais ils donnent un arôme caractéristique. Les importants esters identifiés sont: le formate d'éthyle, le caprylate d'éthyle, l'acétate de linalyle, l'acétate d'octyle, l'acétate de nonyle, l'acétate de décyle, l'acétate de terpinyle, l'acétate de géranyle, l'éthyl-3-

hydroxyhexasanoate, le butyrate de citronellyle, le butyrate de géranyle, l'antranilate de méthyle, et le méthyl-N-méthylantranilate. Le butyrate d'éthyle est présent en quantité importante dans l'essence d'orange [3]. Les composés carbonylés (aldéhydes et cétones) apportent une contribution importante aux arômes d'agrumes.

**Tableau I.1** : Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'Agrumes [4].

Constituants	Orange	Mandarine	Pamplemousse	Citron
<b>Monoterpènes</b> (Total)	89 – 91 (% de l'huile)	98 (% de l'huile)	88 (% de l'huile)	81 – 85 (% de l'huile)
Limonène	83 – 90	65 – 68	88 – 90	72 – 80
<b>Hydrocarbures</b>				
$\alpha$ -pinène	0,5	0,8	1,6	2,0
$\beta$ -pinène	1,0	-	-	7 – 13
Myrcène	2,0	2,0	1,9	2,0
$\gamma$ -terpinène	0,1	-	0,5	10,0
p-cymène	-	2,8	0,4	-
Aldéhydes	1,8 (% de l'huile)	-	1,2 – 1,8 (% de l'huile)	-
Heptanal	3,0 % des aldéhydes	-	4,0 % des aldéhydes	1,0 % des aldéhydes
Octanal	39,0	-	16 – 35	4,0
Nonanal	5,0	-	7,0	6,0
Décanal	42,0	5,0	43 – 53	3,0
Citral	0,05 – 0,2 (% de l'huile)	-	0,06 (% de l'huile)	1,9 – 2,6 (% de l'huile)
<b>Alcools</b>	0,9 (% de l'huile)		0,3 – 1,3 (% de l'huile) -	
Octanol	2,8	-	-	1
Linalol	$\leq 1\%$	2	0 – 3 (% fraction déterpénées)	$\leq 0,2\%$
<b>Esters</b>	2,9 (% de l'huile)	-	3 – 4 (% de l'huile)	-

### I.1.1.1. Huile essentielle de *Citrus sinensis* :

Les Spécificités biochimiques et les caractéristiques de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau I.2 :** Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

<b>Huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i></b>		
<b>Spécificités biochimiques</b>	Limonène	83 à 90%
	Myrcène	≤ 5%
	Citral	≤ 0,5%
	Linalol	≤ 1%
	Géraniol	≤ 0, 1%
	Farnésol	≤ 0, 1%
	Monoterpénols	2 à 6%
	Cétones (Carvone)	2 à 3%
	Aldéhydes terpéniques	1 à 3%
<b>Caractéristiques</b>	Pouvoir rotatoire à 20°C	+94° à +99°
	Densité à 20°C	0,842 à 0,850
	Indice de réfraction	1,470 à 1,476
	Point éclair	+49° C

#### **Caractéristiques organoleptiques :**

Aspect : liquide pouvant devenir trouble par abaissement de la température.

Couleur : jaune à orangée.

Odeur : douce, fruitée et zestée. [5]

#### **Propriétés :**

##### **Antiseptique atmosphérique ++ :**

Le limonène, présent à plus de 80% dans l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, est bactéricide, antifongique et antiviral. Il agit notamment sur des champignons

responsables d'infections pulmonaires et il désinfecte l'air ambiant. Une utilisation en diffusion atmosphérique est donc particulièrement recommandée.

**Calmante et sédative ++ :**

L'huile essentielle de *Citrus sinensis* calme le stress, et aide à se détendre, grâce à son action spasmolytique, anxiolytique et favorisant le sommeil.

**Stomachique et carminative ++ :**

Le limonène stimule la digestion : il agit sur la motilité gastrique, soulage les nausées, empêche l'hyperacidité gastrique en neutralisant certains acides. Il a également une activité cholérétique et cholagogue : il favorise la production de bile par le foie et son expulsion dans l'intestin, ce qui permet de digérer les graisses et favorise la détoxification du foie (la bile neutralise certaines toxines).

**Enfin :** le limonène favorise l'expulsion des gaz intestinaux. [6]

➤ (++ = moyen)

**I.1.1.2. Huile essentielle de *Citrus limonum* :**

Les Spécificités biochimiques et les caractéristiques de l'huile essentielle de *Citrus limonum* sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau I.3 :** Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de *Citrus limonum*.

<b>Huile essentielle de <i>Citrus limonum</i></b>		
<b>Spécificités biochimiques</b>	Limonène	72 à 80%
	β-pinène	7 à 13%
	γ-terpinène	6 à 10%
	Linalol	≤ 0, 2%
	Géraniol	≤ 0, 1%
	Aldéhydes	2 à 3 %
	Sesquiterpènes	2 à 5 %
<b>Caractéristiques</b>	Pouvoir rotatoire à 20°C	+55° à +75°
	Densité à 20°C	0,845 à 0,858
	Indice de réfraction	1,470 à 1,480
	Point éclair	+49° C

**Caractéristiques organoleptiques :**

Aspect : liquide (trouble à basse température).

Couleur : jaune clair à verdâtre.

Odeur : fraîche, zestée. [5]

**Propriétés :**

**Antibactérienne** +++ (limonène,  $\beta$ -pinène et citrals) :

L'huile essentielle de *Citrus limonum* exerce une action anti-infectieuse et antibactérienne par son activité sur les germes Gram- et Gram+.

**Anti nauséuse** ++ (limonène) :

L'huile essentielle de *Citrus limonum* aide contre les nausées ou le mal de transport grâce au limonène qui agit sur la motilité gastrique.

**Vitamine-P et fluidifiante sanguine** ++ (limonène,  $\beta$ - pinène et  $\gamma$ - terpinène) :

L'imitation de la vitamine P par certaines molécules diminue la perméabilité des capillaires et augmente leur résistance. L'huile essentielle de Citron provoque ainsi une action positive sur la prévention des accidents d'origine hypertensive et diabétique ainsi qu'une action favorable sur la fluidité sanguine qui calme notre système nerveux, créant ainsi un effet "coupe-faim" sur notre cerveau. L'huile essentielle de Citron présente aussi des caractéristiques stomachiques favorisant la digestion.

**Cholérétique et cholagogue** ++ (limonène) :

L'huile essentielle de *Citrus limonum* favorise la cholorèse, autrement dit la production de bile par le foie ainsi que son évacuation vers l'intestin.

**Elle est aussi :**

Hypolipémiante (favorise la dégradation des lipides). Anxiolytique. Carminative et anti-infectieuse. [6]

➤ ( ++ = moyen ; +++ = élève)

**I.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :**

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes,

les huiles essentielles, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

### **I.2.1. Distillation :**

Trois différents procédés utilisant le principe de la distillation (Piochon, 2008) sont possibles :

#### **I.2.1.1. Hydrodistillation :**

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité.

L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au dessus de l'hydrolysât. Cependant, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005).

#### **I.2.1.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :**

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques.

#### **I.2.1.3. Hydro diffusion :**

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils.

### **I.2.2. Extraction à froid (Expression) :**

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes (orange, citron, bergamote) dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour

détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

#### ❖ **Autres procédés :**

D'autres procédés sont utilisés :

- Extraction assistée par micro-ondes ;
- Enfleurage ;
- Extraction par solvants volatils ;
- Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique.

### **I.3. Composition chimique :**

Sur le plan chimique, les H.E sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène,  $\beta$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène etc.) (CROTEAU *et al.*, 2000).

#### **Les terpènes :**

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en :

**Monoterpènes** formés de deux isoprènes (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>),

**Sesquiterpènes** formés de trois isoprènes (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>),

**Diterpènes** formés de quatre isoprènes (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>).

**Tétraterpènes** huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes.

**Polyterpènes** (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> ou n peut-être de 9 à 30 (HERNANDEZ-OCHOA, 2005).

#### **Les terpénoïdes :**

Sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide, etc.).

### **I.3.1. Notion de chémotype :**

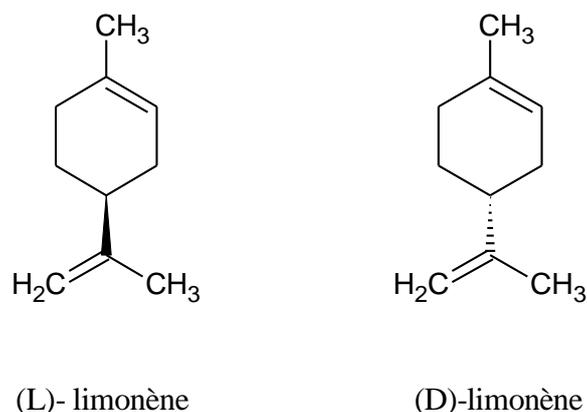
Le chémotype d'une H.E est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer des H.E extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les H.E pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Il est important de noter que les H.E à chémotype différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (PIBIRI, 2005).

#### **I.3.1.1. Le Limonène :**

Le limonène est le constituant majoritaire de toutes les huiles issues des peaux d'agrumes. Il est responsable de leur odeur caractéristique (arôme de base), l'odeur finale dépendant ensuite des autres composés minoritaires qui l'accompagnent [7].

Le limonène appartient à la famille des terpènes (molécules composées d'unités dérivant de l'isoprène). Ces derniers sont des médiateurs chimiques pour les plantes : ils jouent un rôle dans la communication des plantes avec d'autres espèces comme les insectes qu'ils attirent, repoussent ou paralysent. Ils exhalent aussi une variété de goûts et d'odeurs : beaucoup sont utilisés en cuisine comme saveurs ou en parfumerie [8].

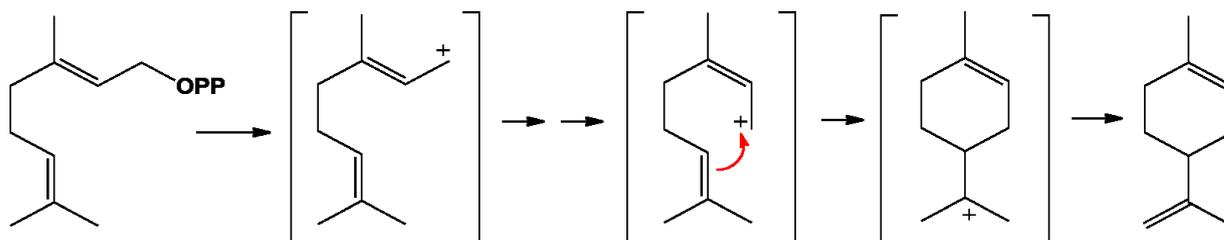
Comme de très nombreux produits naturels, le limonène,  $C_{10}H_{16}$ , est une molécule chirale et comme pour beaucoup de molécules chirales, les sources biologiques produisent un énantiomère spécifique. La principale source industrielle, l'orange, contient du *D*-limonène (ou *R*(+)-limonène), qui est l'énantiomère *R*, dextrogyre, porteur d'un atome de carbone chiral au pied du groupement isopropényle. Le citron, quant à lui, contient du *L*-limonène, qui est l'énantiomère *S*(-), lévogyre, image dans un miroir du *D*-limonène (Figure I.1). C'est la liaison de la molécule odorante chirale avec le récepteur chirale qui déclenchera la série d'événements moléculaires qui constituent la transduction du signal sensitif par la cellule sensorielle et la reconnaissance par le cerveau de l'odeur caractéristique. Ces récepteurs moléculaires sont des protéines à sept segments transmembranaires, associés à une catégorie de protéines dites « protéines G ».



**Figure I.1.** Le (L)-limonène et le (D)-limonène.

Ces deux molécules ont la même structure (même dessin) mais les atomes ne sont pas positionnés de la même façon dans l'espace puisque le groupement isopropényl à gauche va être soit vers l'avant, soit vers l'arrière. Ces deux composés vont ainsi interagir différemment avec leur environnement, en particulier, ils présentent des odeurs différentes [9].

Le limonène est formé à partir de pyrophosphate de géranyle, via la perte du groupement pyrophosphate suivie de la cyclisation d'un carbocation néryle puis de la perte d'un proton par le cation pour former le limonène (Figure I.2).



**Figure I.2.** Formation du Limonène à partir de pyrophosphate de géranyle.

### I.3.1.2. Propriétés physiques du Limonène :

Le limonène est un liquide incolore d'odeur citronné, relativement agréable, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol et l'éther.

Le dipentène est un mélange de deux isomères optiques : le (D)-limonène et le (L)-limonène, qui existe naturellement dans de nombreuses huiles essentielles et dans la peau des oranges et des citrons [10].

Les principales caractéristiques physiques du limonène sont mentionnées dans le tableau suivant :

**Tableau I.4.** Les principales caractéristiques physiques du limonène.

Masse molaire	136,24
Point de fusion	-95,5°C
Point d'ébullition	175 à 178 °C
Densité (D20)	0,84
Densité de vapeur (air=1)	4,70
Pression de vapeur	0,2KPa à 20°C 0,36KPa à 30°C 1,12KPa à 50°C
Point d'éclair en coupelle fermée	45°C
Température d'auto-inflammation	237°C
Limite d'explosivité dans l'air (% en volume)	
limite inférieur	0,7% à 150°C
limite supérieur	6,1 % à 150°C

### I.3.1.3. Propriétés chimiques du Limonène :

Famille : carbures monoterpénique.

Nom UICPA : 1-méthyl-4-prop-1-èn-2-yl-cyclohexène.

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>.

Dans les conditions normales d'emploi, le limonène est un produit stable, il peut cependant s'oxyder lentement en présence d'air et se polymériser (formation d'un film), Il peut réagir vivement avec les agents oxydants forts, les métaux sont insensibles à son action [11].

### I.3.1.4. Usages du limonène :

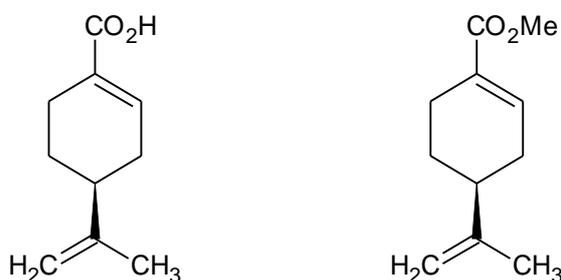
Depuis quelques dizaines d'années, il a pu être trouvé de nombreuses utilisations au limonène. En effet, cette molécule est obtenue comme sous-produit par « l'industrie des jus de fruit » à plus de 5000 tonnes par an [12]. L'industrie ne pouvait laisser ce

perdre une telle quantité de matière première et diverses applications ont été envisagées, du domaine médical à la fabrication de plastiques.

a. La thérapie anticancéreuse :

Il a été montré que certains terpènes, tel le limonène possède une activité anticancéreuse, à la fois *in-vitro* et *in-vivo* [13]. Les mécanismes à la base de cette action ne sont pas encore clairs mais des pistes ont cependant été explorées.

Ainsi il semble que le limonène ou son produit de dégradation majoritaire – l'acide périllique – ne soient pas en eux-mêmes actifs. En revanche, Gould a identifié l'ester méthylique de l'acide périllique comme un possible inhibiteur de l'isoprénnylation de certaines protéines cellulaires [14] (Figure I.3).

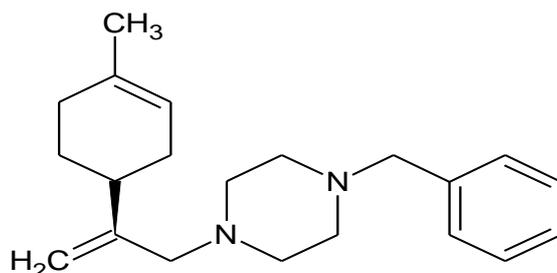


**Figure I.3.** Acide périllique. Esther méthylique de l'acide périllique.

L'isoprénnylation consiste à ajouter un groupe farsényl ou géranyl à l'extrémité libre d'un acide carboxylique d'une protéine. La protéine ainsi dénaturée ne va plus assurer son rôle biologique, pouvant entraîner la formation de tumeurs. Inhiber cette dénaturation permet de stopper l'évolution d'un cancer et de réduire la proportion de cellules tumorales. La mise en évidence de ce mécanisme d'action du limonène a ouvert la voie à la préparation d'inhibiteur de cette transformation [15]

Ainsi le limonène a été engagé dans des essais en phase clinique I sur des patients atteint de cancers et semble bien toléré [16].

Certains dérivés du limonène ont prouvés leur activité anticancéreuse sur des tumeurs de la prostate (Figure I.4). En effet, sur ce type de cellules, là où le limonène n'est que peu actif ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ), un dérivé du limonène s'est montré près de 4 fois plus actif ( $IC_{50} = 24 \mu M$ ) en test *in-vitro*.



**Figure I.4.** Dérivé du limonène actif sur certaines lignées tumorales.

b .Les insecticides :

Il a été montré que certaines huiles essentielles extraites de plantes poussant au Chili possèdent une activité anti-moustique très probablement due à la présence de limonène et/ou de camphre dans ces huiles [17].

Ces travaux permettent d'envisager le remplacement des répulsifs classiquement utilisés (tel le N,N-diéthyl-*m*-méthylbenzamide – DEET –) parfois nocif pour l'homme et pouvant endommager certains plastiques et peintures.

Des compositions à base de limonène présentant une activité insecticide contre les fourmis, les araignées, les mouches, les chenilles... ont été mises au point [18].

Ces insecticides d'un nouveau type sont non toxiques pour les animaux et l'homme pouvant même être utilisés à proximité de nourriture. Ils sont de plus biodégradables.

Il est supposé que dans ces compositions, le limonène possède une action sur la carapace (en chitine) des insectes, entraînant son ramollissement et ainsi la mort de l'insecte.

Une composition type pouvant être utilisé dans les habitations comprend du limonène (6 % en poids), un émulsifiant (Alkamuls EL620 – 10 %), un conservateur (benzoate de sodium – 0,1 %) et de l'eau (83,9 %).

c. Le limonène est tant que solvant de nettoyage :

Le limonène a trouvé un important débouché en tant que solvant industriel.

En effet, les solvants industriels classiquement utilisés sont souvent des dérivés du pétrole (essences, éther de pétrole, white spirit) ou des solvants halogénés (trichloroéthylène) présentant une nocivité certaine pour l'utilisateur ainsi que des

risques d'inflammation. De plus, le retraitement de ces solvants par des organismes spécialisés représente un coût important.

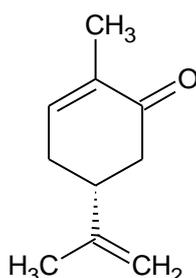
Le limonène, le plus souvent en mélange avec de l'eau et un surfactant ne présente pas ces problèmes de nocivité et de retraitement et constitue ainsi un solvant vert.

Un solvant industriel peut ainsi être préparé par le mélange de : limonène (35,1 %), eau (44,8 %), sel de potassium de l'acide dodécylbenzène sulfonique (11,4 %), pyrophosphate de potassium (2,2 %), carbitol butyle (6 %), métasilicate de sodium (0,5 %) [19].

#### d. Préparation de la Carvone :

Les industriels spécialisés dans les arômes ne pouvaient laisser perdre les tonnes de limonène obtenues comme sous-produit lors du pressage d'oranges. En 1951, il est rapporté la préparation de L-Carvone (à odeur de menthe) à partir du D-limonène avec un rendement de 35 % sur trois étapes [20].

La Carvone (Figure I.5) est un additif alimentaire couramment utilisé, notamment dans l'industrie du chewing-gum par la compagnie Wrigley [21].



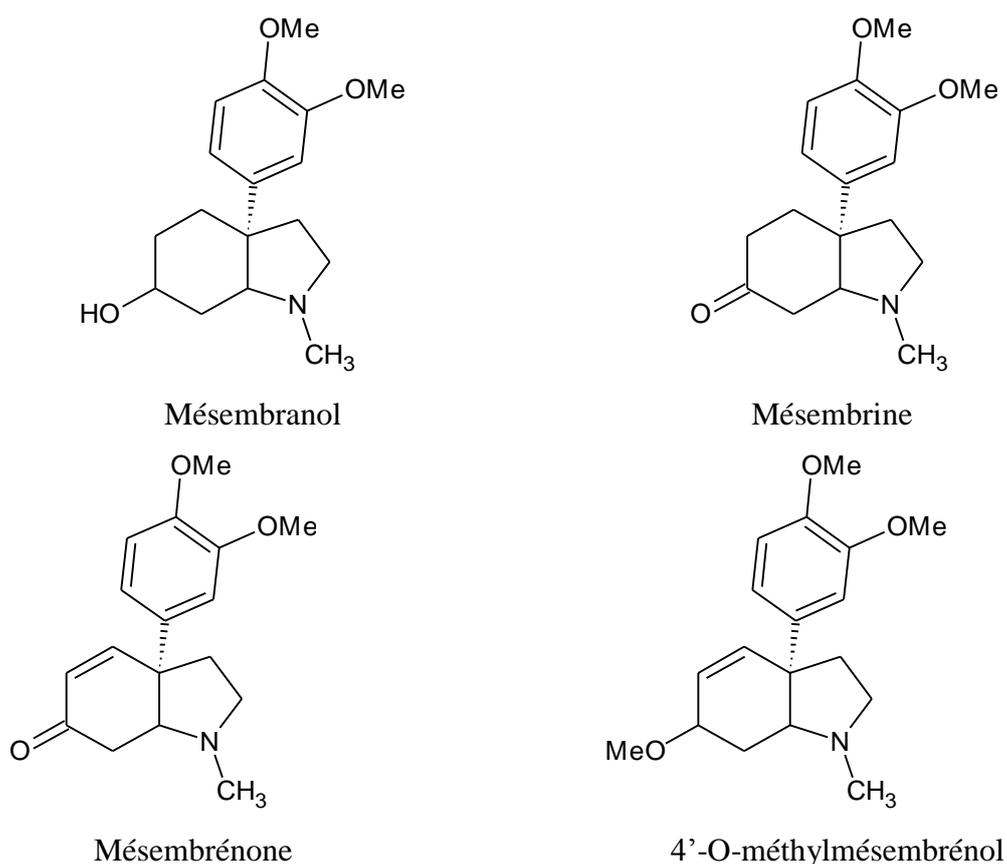
**Figure I.5.** Carvone.

#### I.3.1.5. Application en synthèse totale :

Le limonène est une molécule simple, abondante et peu coûteuse pouvant être utilisée pour la synthèse totale de molécules naturelles complexes. De plus, la chiralité du limonène peut permettre de synthétiser d'autres molécules chirales.

Nous verrons ici quelques exemples de ces synthèses.

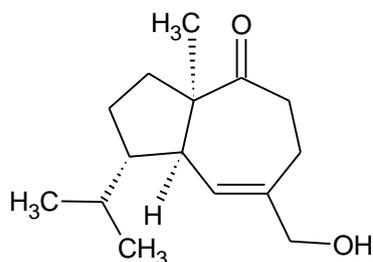
- A partir de l'oxyde de limonène (commercial et facilement accessible par oxydation du limonène), Fuchs et son équipe ont pu préparer le mésebranol [22]. Il s'agit d'un alcaloïde présent dans les plantes de l'espèce *Sceletium tortuosom* à partir duquel il est possible d'accéder aux autres alcaloïdes de la même famille : la mésebrine, la mésebrénone et la 4'-O-méthylmésebrénol. Ces alcaloïdes possèdent une activité biologique sur le système nerveux central.



**Figure I.6.** Les alcaloïdes à partir du limonène.

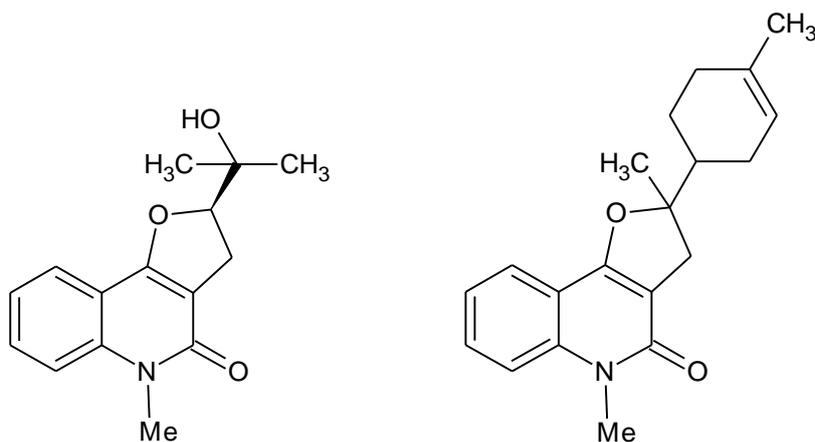
- En 2003, l'équipe de Joseph-Nathan, en se basant sur les travaux de Crawford [23], publie la première synthèse totale de l'hétérocurvistone en partant du limonène, avec un rendement global de 12 % [24]. Cette molécule a été isolée d'*Heterotropa curvistigma* en 1981 par Niwa [25].

- Le (+)-aphanamol I est un sesquiterpène toxique extrait des fruits de *Aphanamixis grandifolia*. En 1992 Wickberg et Hansson valident sa structure en le synthétisant à partir du limonène[26].



**Figure I.7.** (+)-aphanamol I.

- Les quinolines sont des structures retrouvées régulièrement dans les composés naturels et dans ceux présentant une activité biologique. Parmi celles-ci, nous pouvons trouver des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales. Un analogue de l'araliopsine a été préparé par Parsons à partir du limonène en utilisant une réaction radicalaire comme étape clé [27].



**Figure I.8.** Araliopsine ; Analogue de la molécule naturelle.

# **CHAPITRE II**

## **Les activités biologiques des huiles essentielles**

## **II.1. Activités biologiques des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles ont été jadis utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l’Egypte ancienne, les techniques de l’embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l’huile essentielle, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les anciens ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l’huile essentielle étaient les principes actifs qu’on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives [28].

Les huiles essentielles possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer:

- Fongistatique ;
- Insecticide ;
- Nématicide ;
- Herbicide ;
- Antioxydante ;
- Bactériostatique.

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d’origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu’agents antimicrobiens.

## **II.2. Activité liée à la composition chimique :**

L’efficacité d’une huile essentielle dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l’huile essentielle est riche en substances actives, plus son activité est importante.

L’activité biologique d’une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques et cétoniques). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l’activité des huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composés principaux [29].

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones [30].

### **II.3. Les huiles essentielles comme agents antimicrobiens :**

#### **II.3.1. Généralités :**

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie. Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans ces plantes.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes.

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.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs [31].

#### **II.3.2. Activité antimicrobienne :**

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne. Les constituants des huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

##### **II.3.2.1. Activité antibactérienne :**

Les H.E les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à H.E riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de

conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (PAULI, 2001).

Belletti et al. (2004) et Fisher et al. (2007), ont démontré que les huiles essentielles de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157 :H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Thyphimurium*, et *Acrobacter butzleri*.

### II.3.2.2. Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes [32] contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *aspergillus fumigatus* [33]

PIACENTINI a noté pour la première fois les propriétés antimicrobiennes des H.E de *Citrus* en 1949 in (FISHER & PHILLIPS, 2008) que les essences de *Citrus* en solution étaient plus puissantes que les phénols comme désinfectants.

Selon les travaux de PRUDENT *et al.* (1995) ; SHARMA-TRIPATHI, (2006) ; et VIUDA-MARTOS *et al.* (2008), les H.E de *Citrus* : d'orange douce, de citron, de mandarine et pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*.

Il a été établi d'après COX *et al.* (2000) que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

## II.4. Morphologie et Structure des bactéries :

Durant de longues années, la bactérie a été considérée comme "un sac d'enzymes" car le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de structure. L'observation des bactéries, permet seulement de reconnaître la forme des cellules (sphérique ou coccoïde, cylindrique ou bâtonnet, spiralee ou hélicoïdale), leurs dimensions (qui varient selon les espèces de 0.1µm à 600µm) et les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles (en grappe, en

chaînette, en paire ou diplocoque). Ce sont les caractéristiques qui définissent la morphologie bactérienne, et qui étaient les critères essentiels de reconnaissance et d'identification, et qui ont un rôle très important dans le diagnostic.

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est "la coloration de GRAM". Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs:

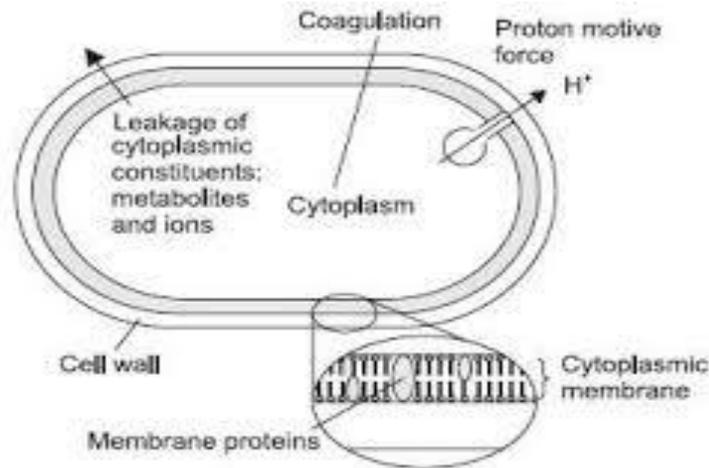
- ❖ Bactéries à GRAM positif (colorées en violet)
- ❖ Bactéries à GRAM négatif (colorées en rose).

Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à GRAM négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à GRAM positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir.

La cellule est enveloppée par une paroi rigide, qui lui donne sa forme et sa résistance. Epaisse chez les bactéries à GRAM positif et plus mince chez les bactéries à GRAM négatif; la paroi entoure une membrane cytoplasmique, plus fine et plus délicate. Les bactéries à GRAM négatif possèdent une seconde membrane, qui est la membrane externe pour la distinguer de la membrane cytoplasmique, dite interne.

## **II.5. Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries :**

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. Compte tenu de la diversité des molécules et la complexité de leur composition chimique présentes dans ces huiles, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action impliquant différentes cibles cellulaires.



**Figure II.1.** Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires [34].

Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Le mode d'action des huiles essentielles dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries GRAM négatifs sont plus résistantes que les bactéries GRAM positifs grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des GRAM négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer [35].

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

## II.6. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne :

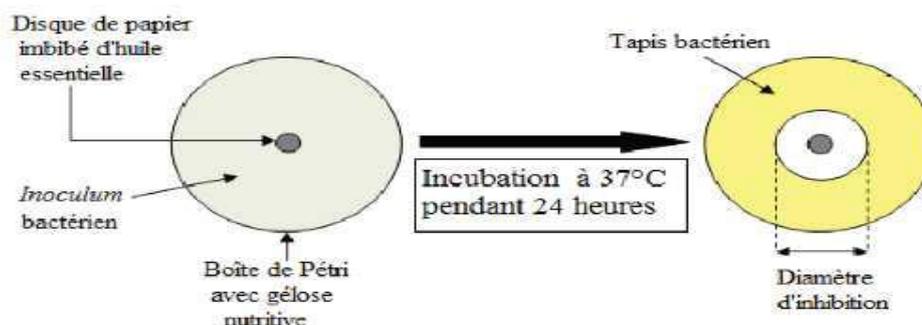
La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

### II.6.1. Aromatogramme :

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. Cette méthode permet d'évaluer l'activité anti-bactérienne d'une huile essentielle. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs.

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'huile essentielle sur le germe testé.

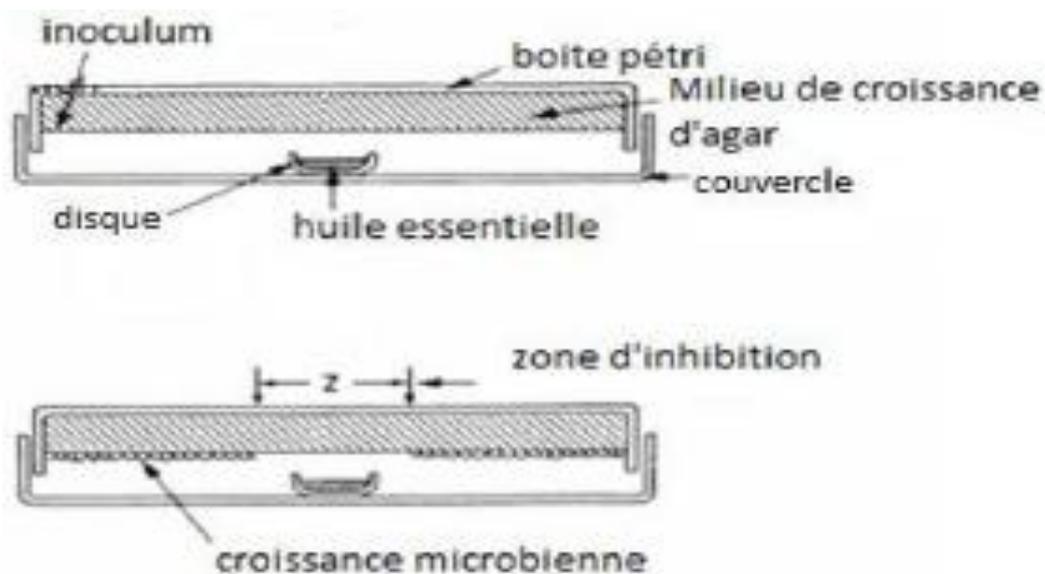
On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité.



**Figure II.2.** Principe de la méthode de diffusion par disque.

### II.6.2. Méthode de micro-atmosphère :

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprègne d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélose. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés.



**Figure II.3.** Principe de la méthode de micro-atmosphère.

# **CHAPITRE III**

## **Techniques d'études et conditions expérimentales**

Ce présent travail a pour objectif la valorisation des huiles essentielles d'agrumes des deux espèces *Citrus limonum* (citron), et *Citrus sinensis* (l'orange douce).

L'extraction a été réalisée au Laboratoire de la Faculté des Technologie, Département de Génie des procédés, Université de Blida, l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au laboratoire d'hygiène de wilaya de BLIDA.

Dans cette partie expérimentale nous avons présenté les deux axes de recherche ;

Le premier axe est consacré à :

- L'extraction des huiles essentielles des espèces végétales.
- L'étude de composition chimique de l'huile essentielle extraite.
- Caractérisation des huiles essentielles et mesure des indices physique.

Dans le deuxième axe, l'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* vis-à-vis des souches bactériennes à Gram(+) et à Gram(-) et vis-à-vis des levures et des champignons.

### **III.1. Matériels :**

#### **III.1.1. Matériel végétale :**

Les fruits d'agrumes utilisés sont : *Citrus limonum* (citron), et *Citrus sinensis* (l'orange douce).

Les fruits fraîchement récoltés, sont nettoyés, lavés, leurs écorces sont coupées en petites morceaux.

#### **III.1.2. Matériel biologique :**

##### **III.1.2.1. Souches microbiennes:**

Lors de cette étude, les deux huiles essentielles ont été testée in vitro sur :

- 04 souches bactériennes (02 Gram+ et 02 Gram-) ;
- 02 levures ;
- 01 champignon.

Ces germes pathogène font partie de la collection ATCC et ont été délivrées par l'institut Pasteur d'Alger (Tableau III.1). Ces espèces sont souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens. Les souches bactériennes sont des souches hospitalières isolées à

partir des prélèvements sur des malades. Les souches bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches hospitalières et celle de *Staphylococcus aureus* est d'origine alimentaire.

**Tableau III.1. : Provenance des germes utilisés.**

<b>Souches utilisées</b>	<b>Code de la souche</b>	<b>Provenance</b>
<b>Bactéries</b>		
<b>Bactéries à Gram(+)</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	IPA-Alger
<i>Bacillus ceureus</i>	ATCC 10876	
<b>Bactéries à Gram(-)</b>		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	
<b>Levures</b>		
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	
<i>Aspergillus flavus</i>		
<b>Champignon</b>		
<i>Sacar</i>	ATCC4006	

### **III.1.3. Produits utilisés :**

#### **III.1.3.1. Produits chimiques :**

On a utilisé le Diméthyle Sulfoxyde comme solvant pour solubiliser nos huiles essentielles puisqu'ils sont insolubles dans l'eau. On a opté pour le DMSO pour son innocuité vis-à-vis des microorganismes, et pour l'absence d'interférence avec l'H.E.

#### **III.1.3.2. Milieu de culture :**

Dans cette étude, nous avons utilisé les milieux de cultures suivant :

- Gélose de Mueller Hinton: pour l'étude de la sensibilité des bactéries à nos H.E.
- Gélose de Sabauraud : pour l'étude de la sensibilité des levures et champignons à nos H.E.
- Eau physiologique : pour la préparation des suspensions bactériennes.

### **III.2. Méthodes :**

### III.2.1. Procédé d'extraction :

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation avec un Clevenger, Le dispositif d'extraction de l'HE de *Citrus limonum* et de *Citrus sinensis* par hydrodistillation est illustré dans la Figure (III.1), 300 g de l'écorce d'agrumes frais sont introduits dans un ballon de 1 litre imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1 heure à 1 heures30. Les vapeurs chargées de substances volatiles sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité en deux phases:

- Phase organique: huileuse et très odorante appelée " huile essentielle" contenant la majorité des composés odorants.
- Phase aqueuse: odorante appelée " eaux aromatiques" contenant que très peu des composés odorants.

Les H.E extraites sont conservées à une température voisine de  $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , dans des flacons en verre opaque, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont des principaux agents de dégradation.



**Figure III.1.** Dispositif d'extraction des huiles essentielle par hydrodistillation.

#### III.2.1.1. Calcul du rendement :

Le rendement en H.E est le rapport entre de poids de H.E extraite et le poids de la biomasse végétale à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{m_h}{m_v} \times 100$$

**R** = rendement en huile essentielle en %.

**m<sub>h</sub>** = masse de l'huile essentielle en gramme.

**m<sub>v</sub>** = masse de la matière végétale en gramme.

### **III.3. Caractéristiques des huiles essentielles :**

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur).
- Déterminer ses indices physiques (indice de réfraction et pouvoir rotatoire).

#### **III.3.1. Indices physique:**

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

##### **III.3.1.1. Mesure de l'indice de réfraction (norme NF T 75 – 112) :**

L'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique, plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable.

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre de type CARL ZEISS JENA. On place une goutte d'huile essentielle sur le prisme de refractomètre et on attend que la température se stabilise et on effectue le mesurage.

Quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule :

$$\eta_D^{20} = \eta_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

$\eta_D^{20}$  = Indice à 20°C.

$\eta_t$  = Indice à la température ambiante ou de mesure.

**T** = Température ambiante.

##### **III.3.1.2. Mesure du pouvoir rotatoire (norme NF T 75-113) :**

Le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle est un critère important de la pureté de l'huile essentielle et permet d'indiquer si elle possède une activité optique dextrogyre ou lévogyre.

Elle est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type BIOBLOCK SCIENTIFIC (réglé de façon à donner 0° et 180° avec l'eau).

Pour ce faire on doit d'abord diluer l'huiles essentielles : 1g/ 20 mL d'éthanol, ensuite, on remplit le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée. On place le tube dans le polarimètre et on lit l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil.

Le pouvoir rotatoire est donné par la formule suivante :

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{(L \times C)}$$

$\alpha$  = La valeur lue sur l'appareil en degrés d'angle.

L = L'épaisseur du film (cellule) en dm.

C = La concentration de l'essence exprimé en (g/100mL).

### **III.4. Analyse de la composition chimique :**

#### **III.4.1. Chromatographie en Phase Gazeuse :**

La composition chimique de notre huile essentielle a été déterminée par la technique de Chromatographie en Phase Gazeuse. Cette analyse a été effectuée au niveau du Laboratoire des méthodes physiques des analyses au Département de Génie des procédés à l'Université de Blida 1.

L'analyse a été faite à l'aide d'un chromatographe de type Shimadzu équipé d'une colonne capillaire SE30.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Solvant : Méthanol.
- Gaze vecteur : Azote.
- Température de l'injection : 200°C.
- Programmation de température : 60 à 245°C.
- Mode d'injection : Split.
- Débit : 8ml/min.
- La pression : 40MP.
- La vitesse : 6°C/min.
- Le volume : 0,5µl.

- Le temps de programmation : 38 min.

### **III.4.2. Spectroscopie UV-VISIBLE :**

Cette analyse a été effectuée au niveau du Laboratoire de Technologie des matériaux au Département de Génie des procédés à l'Université de Blida 1.

L'analyse a été faite à l'aide d'un UV-VIS Spectrophotomètre 1800 de type Shimadzu avec un double faisceau.

UV-1800 utilise le support Czerny-turner pour son monochromateur et possède la plus haute résolution de sa catégorie, un système optique lumineux et un design compact.

UV-1800 est PC contrôlé, il a une mémoire USB prête, ce qui permet aux utilisateurs d'enregistrer les données de mesure et d'effectuer l'analyse des données et l'impression en utilisant un PC.

- Spécification :

- Gamme de longueurs d'onde : 190 à 1100nm

- Largeur de bande spectrale : 1nm (190 à 1100nm)

### **III.5. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :**

La recherche de l'activité antimicrobienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'H.E du Citron et de l'orange. Dans ce test, deux méthodes ont été effectuées : Aromatogramme (Technique en milieu solide) et Micro atmosphère (Méthode en phase vapeur).

#### **III.5.1. Technique en milieu solide (Aromatogramme) :**

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale ; l'antibiogramme. Dans cette méthode nous utilisons des disques de 8mm de diamètre imprégnés d'une quantité de l'H.E. Le disque déposé au centre d'une boîte Pétrie contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne.

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques.

##### **III.5.1.1. Préparation des dilutions des huiles essentielles :**

Une série de dilution d'HE a été réalisée de 1/2, 1/4, 1/8 avec un solvant organique (Diméthyle Sulfoxyde (DMSO)).

#### **III.5.1.2. Préparation de préculture :**

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de 18 à 24 heures. Le repiquage des souches est effectué par ensemencement de la souche microbienne dans un milieu liquide. Les germes utilisés ont été cultivés sur gélose nutritive, les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les champignons.

#### **III.5.1.3. Préparation de l'inoculum :**

A l'aide d'une pipette Pasteur, on racle 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture pure de 24 heures d'incubation sur milieu d'isolement. On dilue dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Il faut noter que l'inoculum bactérie peut être ajustée en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort et il doit être ensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

#### **III.5.1.4. Ensemencement :**

On trempe un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée et on l'essore en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne de tube afin de le décharger au maximum.

On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

On répète l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétrie 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, à la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur périphérique de la boîte de pétrie.

Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois, dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes.

#### **III.5.1.5. Dépôts des disques :**

A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles de papier de Wathman 8 mm de diamètre sont imbibés avec l'H.E en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'H.E. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque, ensuite ces disques contenant l'HE sont déposés sur la surface gélosée.

Après diffusion de l'H.E dans la gélose pendant 4 heures à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 25°C pendant 48 heures pour les champignons et les levures.

Des témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés, les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C.

#### **III.5.1.6. Lecture :**

La lecture s'effectue après l'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (le diamètre du disque inclus), les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des H.E sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes.

- Non sensible(-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Peu sensible(+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- sensible (++) ou intermédiaire : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

La lecture résultats consiste à observer :

- La présence d'une zone claire autour du disque : Présence d'une activité inhibitrice.
- L'absence d'une zone claire autour du disque : Absence d'une activité inhibitrice.

#### **III.5.2. Méthode en phase vapeur : Micro atmosphère :**

Cette technique permet d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase volatile de l'HE. Le mode opératoire consiste àensemencer un milieu gélosé avec une souche microbienne, des disques de diamètre 4mm, 6mm, 8mm sont déposés au centre du couvercle et à l'aide d'une micropipette on prélève une quantité de l'H.E 20 µl, 40 µl, 60 µl.

La boîte est incubée couvercle en bas, il se produit une évaporation des substances volatiles. En se volatilissant, l'H.E va inhiber la croissance du germe en créant une zone d'inhibition.

# **CHAPITRE IV**

## **Résultats et Discussion**

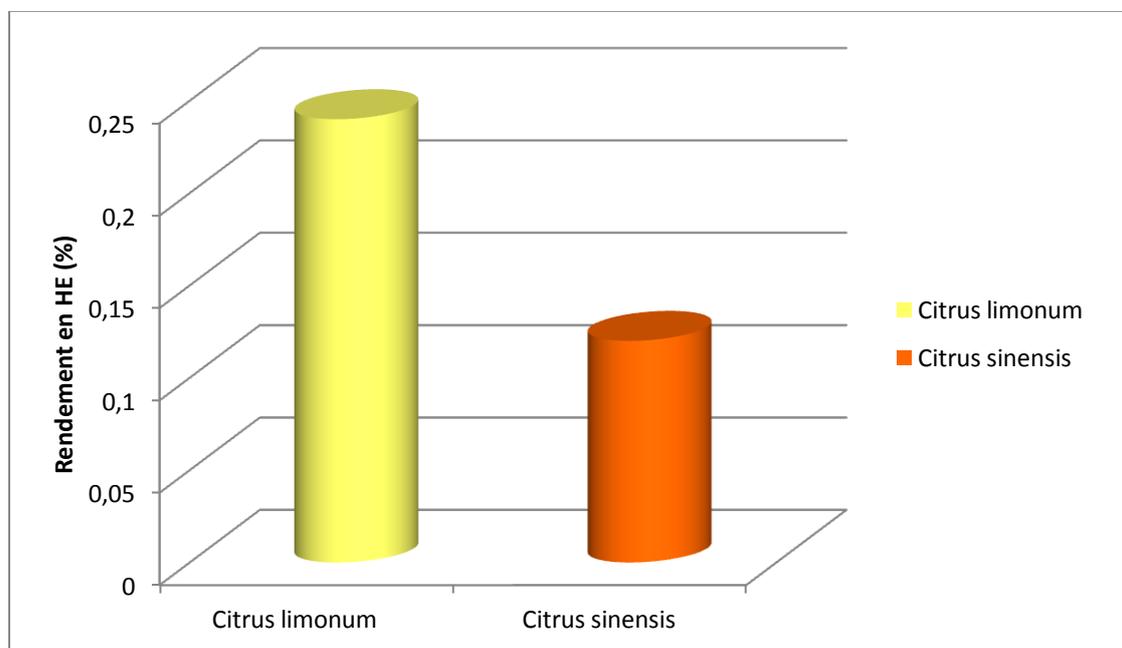
#### IV.1. Rendement des huiles essentielles:

L'hydrodistillation est réalisée sur les écorces d'agrumes de deux espèces : *Citrus limonum* (citron), et *Citrus sinensis* (l'orange douce).

Le tableau suivant résume les rendements moyens en H.E extraite.

**Tableau IV.1.** Rendements en huiles essentielles de *Citrus* en (%)

Huile essentielle	<i>Citrus limonum</i>	<i>Citrus sinensis</i>
R (%)	0,24	0,12



**Figure IV.1.** Pourcentage en huiles essentielles obtenus pour *Citrus limonum* (citron), et *Citrus sinensis* (l'orange douce).

Les résultats représentés sur la Figure (IV.1) montrent que les rendements moyens en H.E de *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* obtenus à l'aide d'une extraction par hydrodistillation à l'échelle du laboratoire sont de l'ordre de 0,24 et 0,12% respectivement.

D'après les résultats cités dans la littérature, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'H.E. Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités. En effet, JEANNOT *et al.* (2005) et FUSELLI *et al.* (2008) ont observé des rendements allant de 0,25 à 0,57% pour l'H.E de *C. aurantium*; 0,1 à 0,6% pour l'H.E de *C. sinensis* et 0,2 à 0,9% pour l'H.E de *C. limonum*. Cependant, REGA *et al.* (2003) ont rapporté que les rendements en H.Es chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%. Cette différence pourrait être expliquée selon KELEN & TEPE (2008) par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'H.E, le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc... Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en H.E (VEKIARI *et al.*, 2002).

#### IV.2. Caractéristiques physiques des huiles essentielles:

Les H.E des espèces de *Citrus* présentent un aspect liquide, limpide et jaune pâle pour le citron et jaune-orangé pour l'orange. Elles sont caractérisées par une odeur du zeste d'orange et du citron.

##### IV.2.1. Résultats des analyses physiques :

Les propriétés physiques tels que : l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire etc...constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par (A.F.N.O.R).Les résultats obtenus sont portés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.2:** Composition physico-chimique des deux huiles essentielles de *Citrus*.

Huile essentielle	$n_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$ (g <sup>-1</sup> dm <sup>-1</sup> ml)
<i>Citrus limonum</i>	1,474	+65
<i>Citrus sinensis</i>	1,471	+90

Les indices de réfractifs de l'orange et du citron sont sensiblement identiques. Les valeurs des indices de réfraction reflètent la richesse des huiles essentielles en composés.

Les valeurs de l'indice de réfraction de nos échantillons correspondent aux normes d'AFNOR (1,470 - 1,478).

Les valeurs du pouvoir rotatoire de l'orange et du citron sont positifs, il dévie le plan de la lumière polarisé dans le sens des aiguilles d'une montre donc elles sont dextrogyres.

La valeur du pouvoir rotatoire de l'H.E du citron est supérieure à celle de l'H.E de l'orange reflétant ainsi la richesse de l'H.E du citron en composés chiraux.

### IV.3. Analyses de la composition chimique des huiles essentielles :

La détermination des propriétés physicochimiques est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques.

#### IV.3.1. Spectroscopie ultraviolet visible (UV-VIS) :

L'analyse par l'UV-VIS des deux H.E nous a donné le spectre suivant :

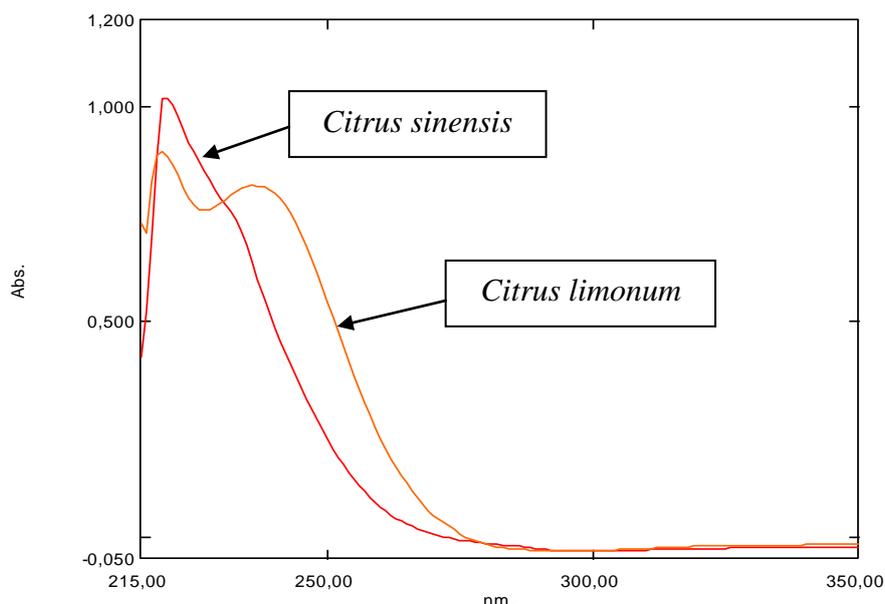


Figure IV.2. Spectre UV-VIS des deux huiles essentielles de *Citrus*.

Les huiles essentielles de *Citrus sinensis* et de *Citrus limonum* absorbent dans l'ultraviolet entre 205 et 240 nm. Sur le spectre UV, deux bandes d'absorption sont

visibles, la première bande à 236 nm et la seconde située à 205 nm. Celle identifiée à 236 nm est importante dans le cas de l'huile essentielle de *Citrus limonum* mais par contre dans le cas de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* est faiblement visible par un épaulement. Cette bande est attribuée aux transitions électroniques  $n-\pi^*$  du groupement carbonyle. L'autre bande de 205 nm est présente dans les deux huiles permettant de justifier la présence des composés de même transition électronique de type  $\pi-\pi^*$  caractéristique d'existence de double liaison dans la structure chimique des composés de l'huile essentielle.

#### IV.3.2. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) :

L'analyse par l'IR des deux H.E nous a donné les spectres suivants :

##### Huile essentielle de *Citrus limonum* :

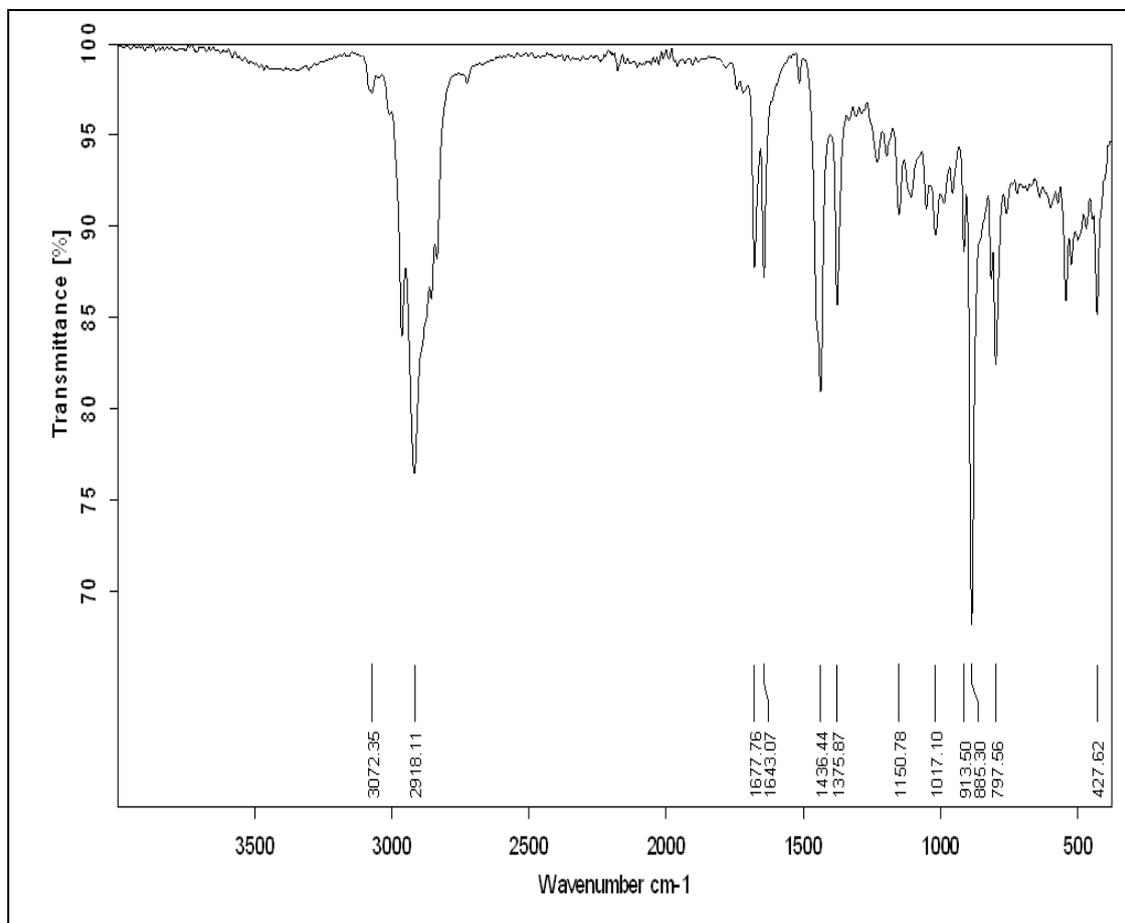
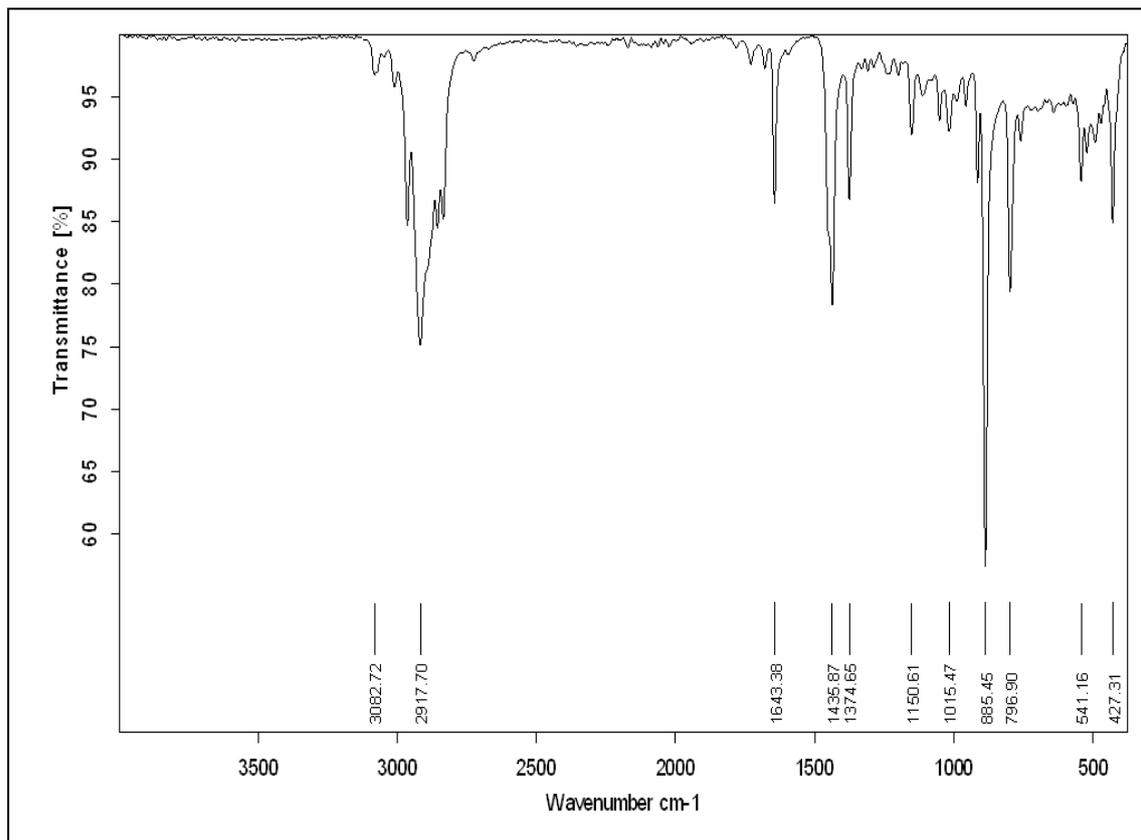


Figure IV.3. Spectre IR de l'huile essentielle de *Citrus limonum*.

### Huile essentielle de *Citrus sinensis* :



**Figure IV.4.** Spectre IR de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

L'analyse ATR des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et de *Citrus limonum* a permis d'obtenir des spectres IR très intéressants du point de vue qualitatif.

Dans la région 2850-3100 cm<sup>-1</sup>, pour les deux huiles, on observe la présence de la vibration C-H des alcènes à 3082-3072 cm<sup>-1</sup> et la vibration C-H des groupes -CH<sub>2</sub> et -CH<sub>3</sub> entre 2980 et 2850 cm<sup>-1</sup>.

Le spectre de l'huile essentielle de *Citrus limonum* possède un pic qui n'est pas présent dans le spectre de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* et il est localisé à 1677 cm<sup>-1</sup> caractéristique de la fonction carbonyle. En plus de cette différence, la taille des pics de la vibration C-H des groupes -CH<sub>2</sub> et -CH<sub>3</sub> est importante dans le spectre IR de l'huile essentielle de *Citrus limonum* permettant de confirmer sa richesse par rapport à celle de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*. Il faut signaler aussi la présence de la liaison -C=C- à 1643 cm<sup>-1</sup> dans les deux spectres IR.

### IV.3.3. Chromatographie en phase vapeur (CPG):

L'analyse par le CPG des deux H.E nous a donné les chromatogrammes suivants :

#### Huile essentielle de *Citrus limonum* :

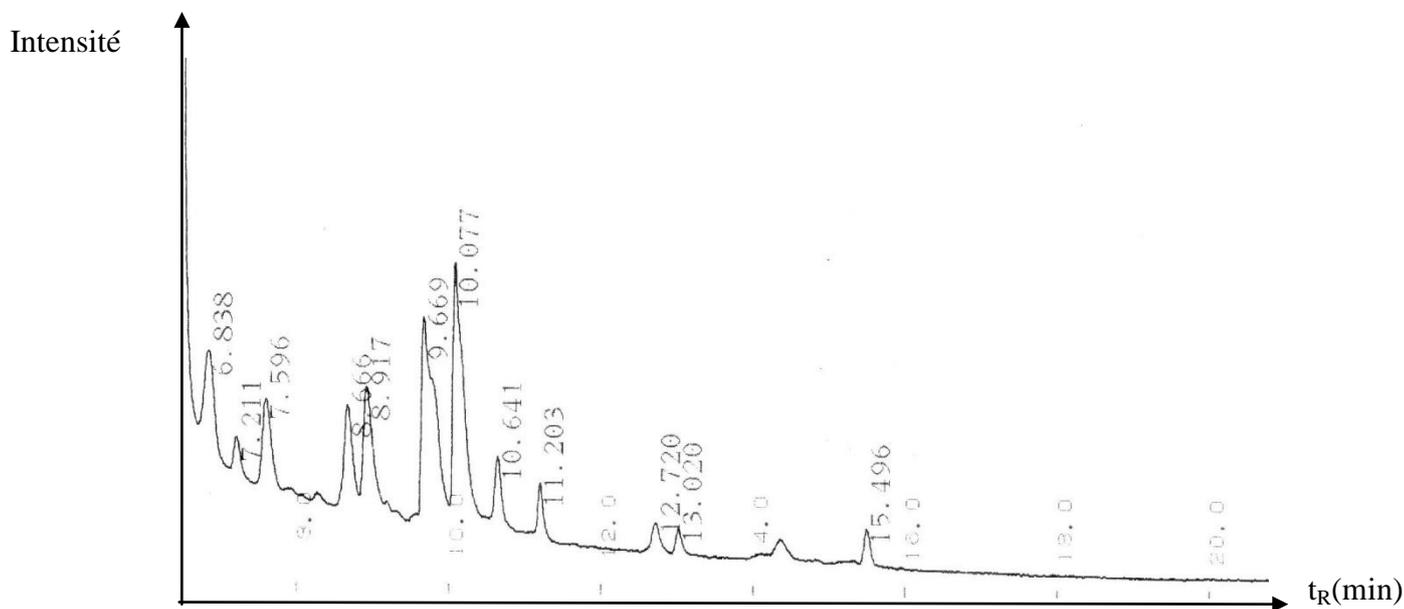


Figure IV.5. Chromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus limonum*.

#### Huile essentielle de *Citrus sinensis* :

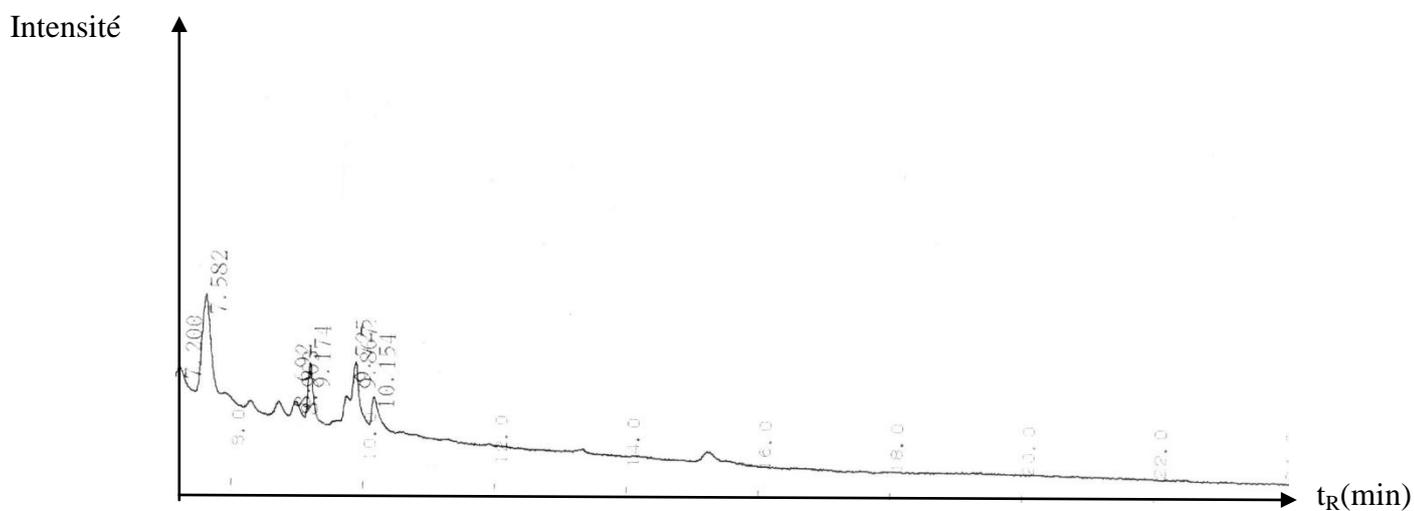


Figure IV.6. Chromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

Nous avons injecté des étalons pour pouvoir identifier les composés des deux H.E ,les résultats sont regroupés dans les Tableaux suivants :

**Tableau IV.3.** Compositions des huiles essentielles avec leurs temps de rétention.

t <sub>R</sub> (min)	$\alpha$ –pinène	$\beta$ –pinène	(D)- Limonène	Myrcène	Linalol	p- cymène	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus limonum</i>
6,8	-	-	-	-	-	-	-	X
7,2	-	-	-	-	-	-	-	X
7,9	X	-	-	-	-	-	X	X
8,8	-	X	-	-	-	-	X	X
8,9	-	-	-	-	-	-	-	X
9,2	-	-	-	-	-	-	X	-
9,7	-	-	-	-	-	X	X	X
10,1	-	-	X	-	-	-	-	X
10,2	-	-	-	X	-	-	X	X
10,6	-	-	-	-	-	-	-	X
11,2	-	-	-	-	-	-	-	X
12,7	-	-	-	-	-	-	-	X
13,1	-	-	-	-	-	-	-	X
15,4	-	-	-	-	-	X	-	X

**Tableau IV.4.** Identification des composés dans l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

HE <i>Citrus sinensis</i>	Composition
1	$\alpha$ –pinène
2	$\beta$ –pinène
3	Non identifié
4	p-cymène
5	Myrcène

**Tableau IV.5.** Identification des composés dans l'huile essentielle de *Citrus limonum*.

<b>HE <i>Citrus limonum</i></b>	<b>Composition</b>
1	Non identifié
2	Non identifié
3	<b><math>\alpha</math> –pinène</b>
4	<b><math>\beta</math> –pinène</b>
5	Non identifié
6	Non identifié
7	<b>p-cymène</b>
8	<b>(D)-Limonène</b>
9	<b>Myrcène</b>
10	Non identifié
11	Non identifié
12	Non identifié
13	<b>Linalol</b>

Les chromatogrammes des deux huiles essentielles sont différents et montrent clairement la richesse de l'HE de *Citrus limonum* par rapport à celle de *Citrus sinensis*. Les temps de rétention des étalons montrent la présence du (D)-limonène dans la composition de l'HE de *Citrus sinensis* élué à 10,06 min par contre l'HE de *Citrus limonum* contient en plus de la faible proportion du (D)-limonène une quantité importante en (L)-limonène élué à 10,64 min.

#### IV.4. Activité biologique des huiles essentielles :

##### IV.4.1. Aromatogramme:

L'activité antimicrobienne des H.E a été testée par la méthode de l'aromatogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques.

Le potentiel antibactérien des huiles essentielles de *Citrus limonum* (citron) et *Citrus sinensis* (l'orange douce), a été évalué sur 04 souches bactériennes (02 Gram+ et 02 Gram-), 02 levures et 01 champignon provenant d'IPA-Alger.

##### IV.4.1.1. Essai avec l'huile essentielle de *Citrus sinensis* :

On prépare une solution mère composé de 50% HE et 50% de Diméthyle Sulfoxyde (DMSO). Ensuite, à partir de la solution mère trois dilutions d'H.E de concentration différentes dans le DMSO ont été préparé: 1/2, 1/4, 1/8.

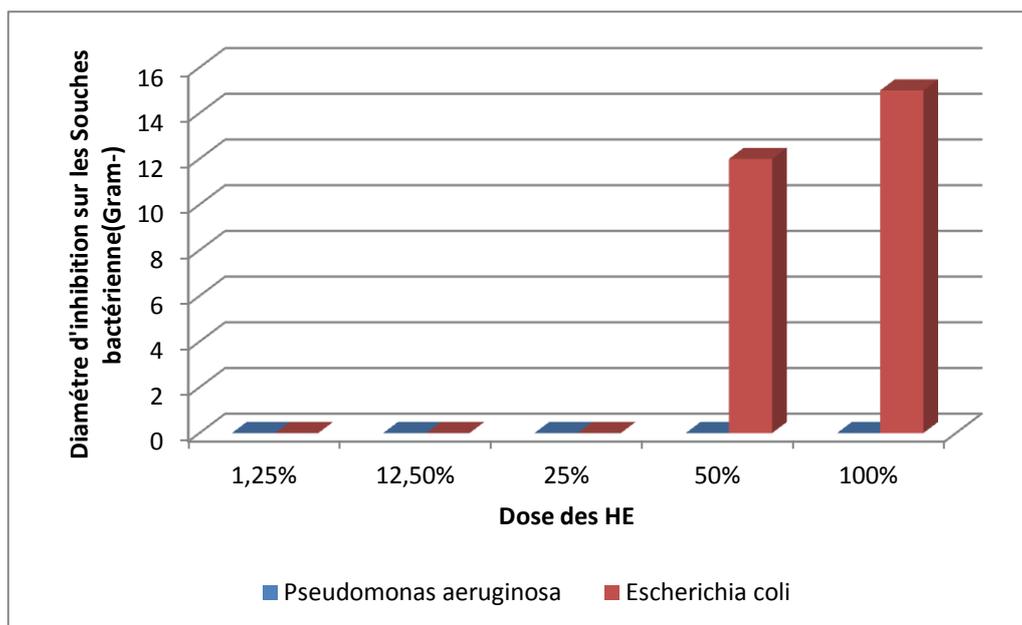
La sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'H.E de *Citrus sinensis* est déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme) en mesurant le diamètre de l'halo d'inhibition. Après les 24 heures d'incubation, les boîtes imprégnées par l'H.E de *Citrus sinensis* à l'état dilué et à l'état pur ont montré une inhibition très importante de la croissance des bactéries et des levures testées.

##### IV.4.1.1.1. Etude de l'activité antibactérienne :

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram- sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.6.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre les souches bactériennes à Gram-.

souches bactériennes (Gram-)	Dose des H.E				
	1,25% (D1)	12,5% (D2)	25% (D3)	50% (D4)	100% (D5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> )	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E.Coli</i> )	-	-	-	12	15



**Figure IV.7.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure et à différentes dilutions contre les bactéries à Gram-.

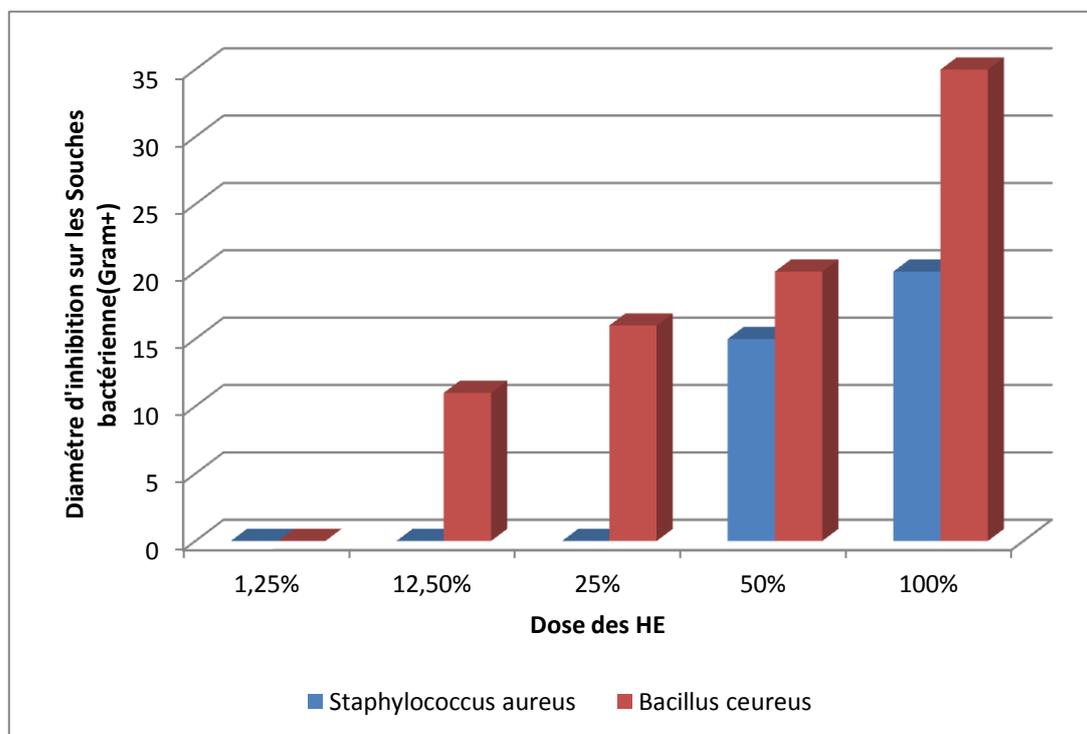
La bactérie *E.Coli* est la seule qui est sensible à l'H.E de *Citrus sinensis* pour les doses (D4) et (D5).

Tandis que *P. aeruginosa* est résistante à l'H.E de *Citrus sinensis* soit pure ou diluée.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram+ sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.7.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre les souches bactériennes à Gram+.

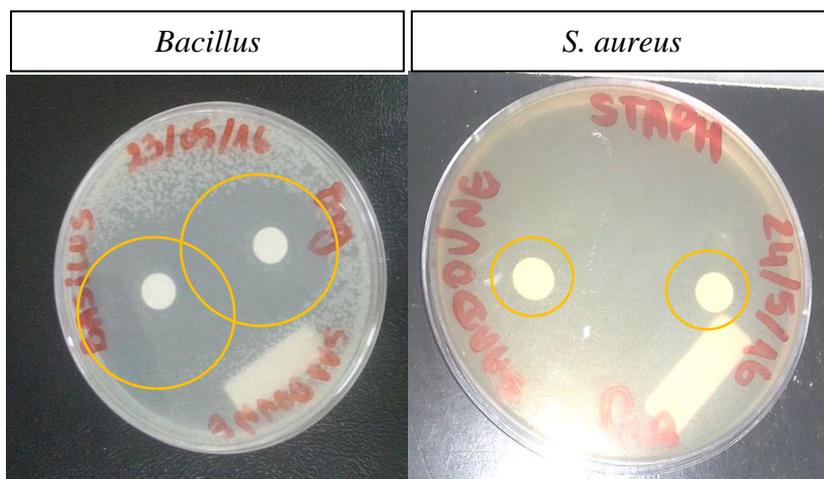
souches bactériennes (Gram+)	Dose des H.E				
	1,25% (D1)	12,5% (D2)	25% (D3)	50% (D4)	100% (D5)
<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> )	-	-	-	15	20
<i>Bacillus ceureus</i> ( <i>Bacillus</i> )	-	11	16	20	35



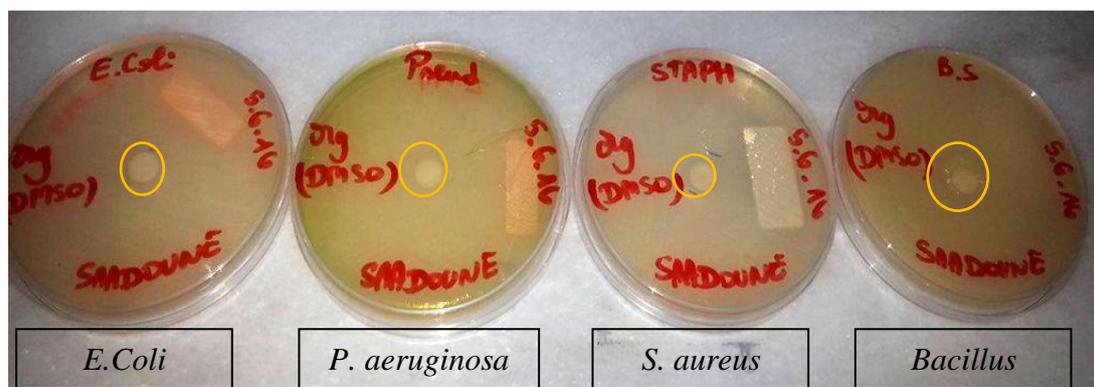
**Figure IV.8.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure et à différentes dilutions contre les bactéries à Gram+.

Les bactéries *S. aureus*, *Bacillus* montrent des zones d'inhibition importantes à l'H.E de *Citrus sinensis*.

Pour les dilutions préparées de l'H.E de *Citrus sinensis*, la bactérie *Bacillus* est la plus sensible.



**Figure IV.9.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure sur les souches bactériennes à Gram+.



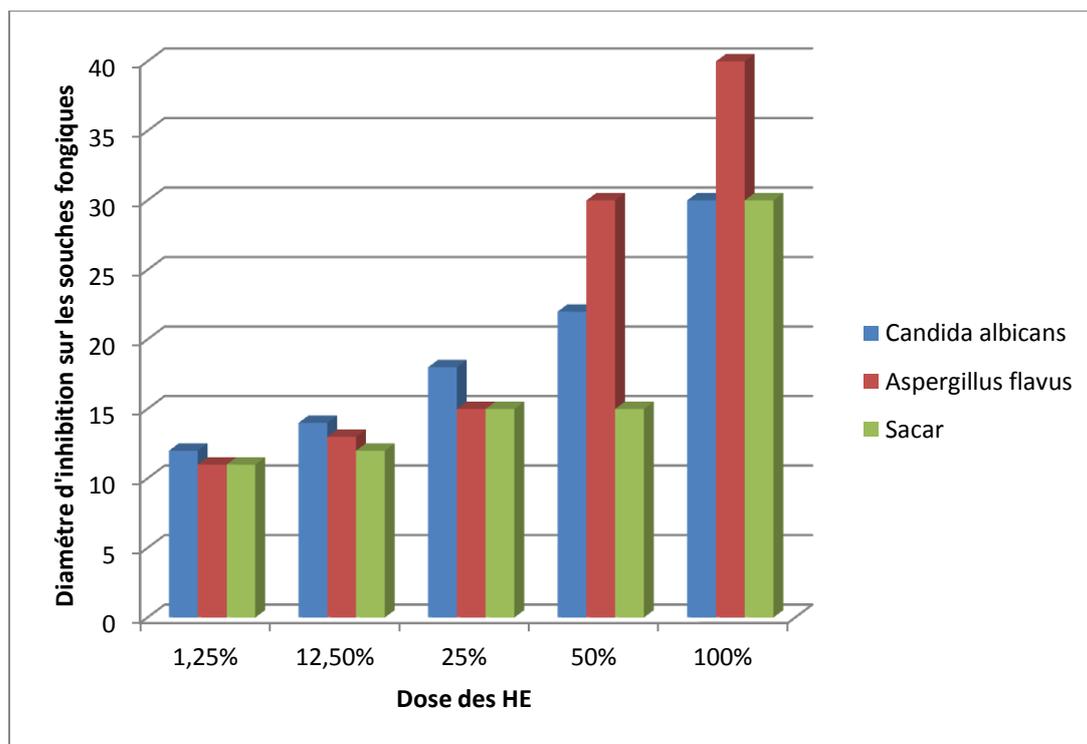
**Figure IV.10.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* diluée (solution mère).

#### IV.4.1.1.2. Etude de l'activité antifongique :

Les résultats de l'étude de l'activité antifongique sont regroupés dans le tableau suivant :

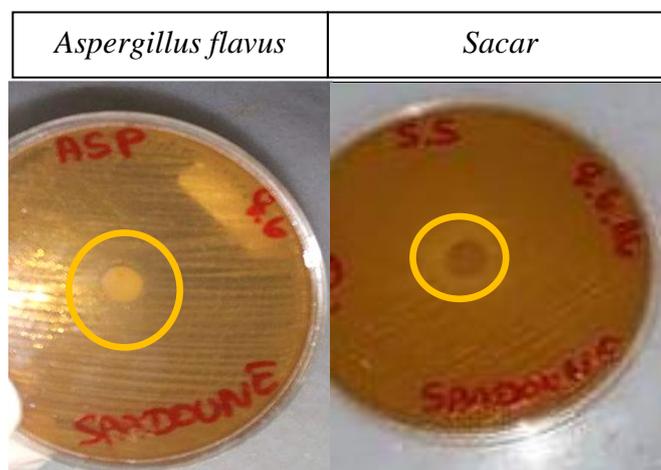
**Tableau IV.8.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre les souches fongiques.

souches fongiques	Dose des H.E				
	1,25% (D1)	12,5% (D2)	25% (D3)	50% (D4)	100% (D5)
<i>Candida albicans</i> ( <i>Candida</i> )	12	14	18	22	30
<i>Aspergillus flavus</i> ( <i>ASP</i> )	11	13	15	30	40
<i>Sacar</i> ( <i>S.S</i> )	11	12	15	15	30



**Figure IV.11.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure et à différentes dilutions contre les souches fongiques.

Les champignons et les levures (*ASP*, *S.S*, *Candida*) présentent une grande sensibilité à l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure, même diluée avec des diamètres d'inhibition qui varie entre 30 mm à 40 mm pour l'H.E pure et entre 11 mm à 18 mm pour l'H.E diluée.



**Figure IV.12.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure sur les souches fongiques.



**Figure IV.13.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* diluée sur les souches fongiques (*Sacchar*).

#### IV.4.1.2. Essai avec l'huile essentielle de *Citrus limonum*:

On prépare une solution mère composée de 50% HE et 50% de Diméthyle Sulfoxyde (DMSO). Ensuite, à partir de la solution mère trois dilutions d'H.E de concentration différentes dans le DMSO ont été préparées: 1/2, 1/4, 1/8.

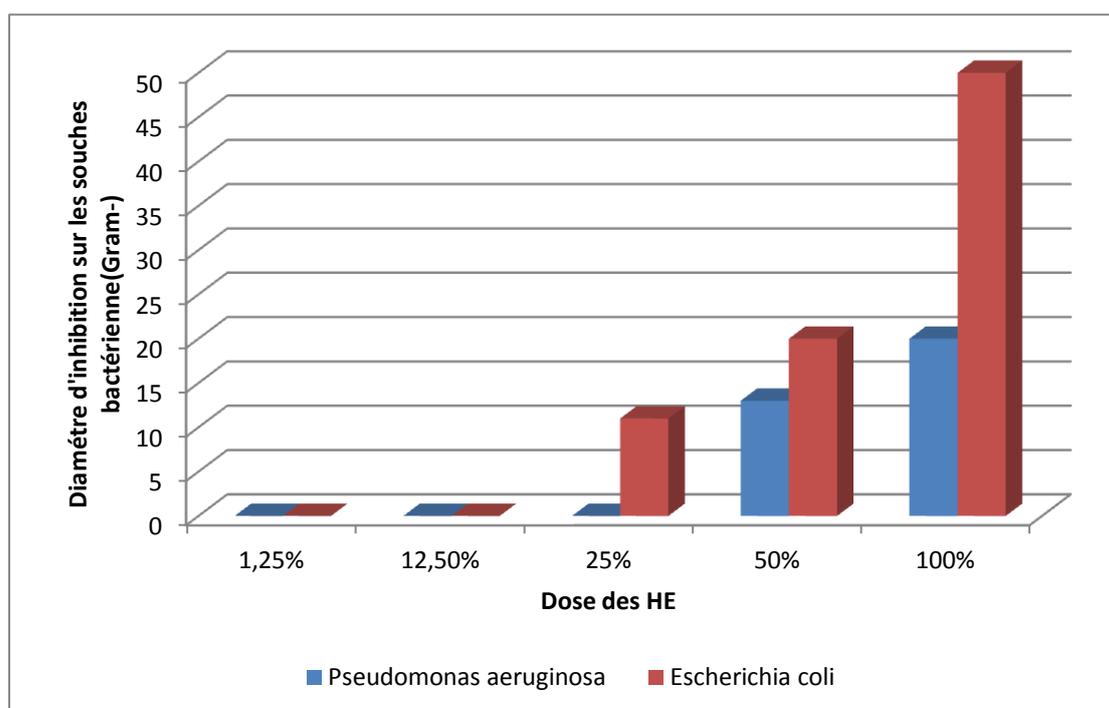
La sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'H.E de *Citrus limonum* est déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme), en mesurant le diamètre de l'halo d'inhibition. Après les 24 heures d'incubation, les boîtes imprégnées par l'H.E de *Citrus limonum*, à l'état dilué et à l'état pur, ont montré une inhibition très importante de la croissance des bactéries et des levures testées.

##### IV.4.1.2.1. Etude de l'activité antibactérienne :

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram- sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.9.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus limonum* contre les souches bactériennes à Gram-.

souches bactériennes (Gram-)	Dose des H.E				
	1,25% (D1)	12,5% (D2)	25% (D3)	50% (D4)	100% (D5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	13	20
<i>Escherichia coli</i>	-	-	11	20	50



**Figure IV.14.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure et à différentes dilutions.

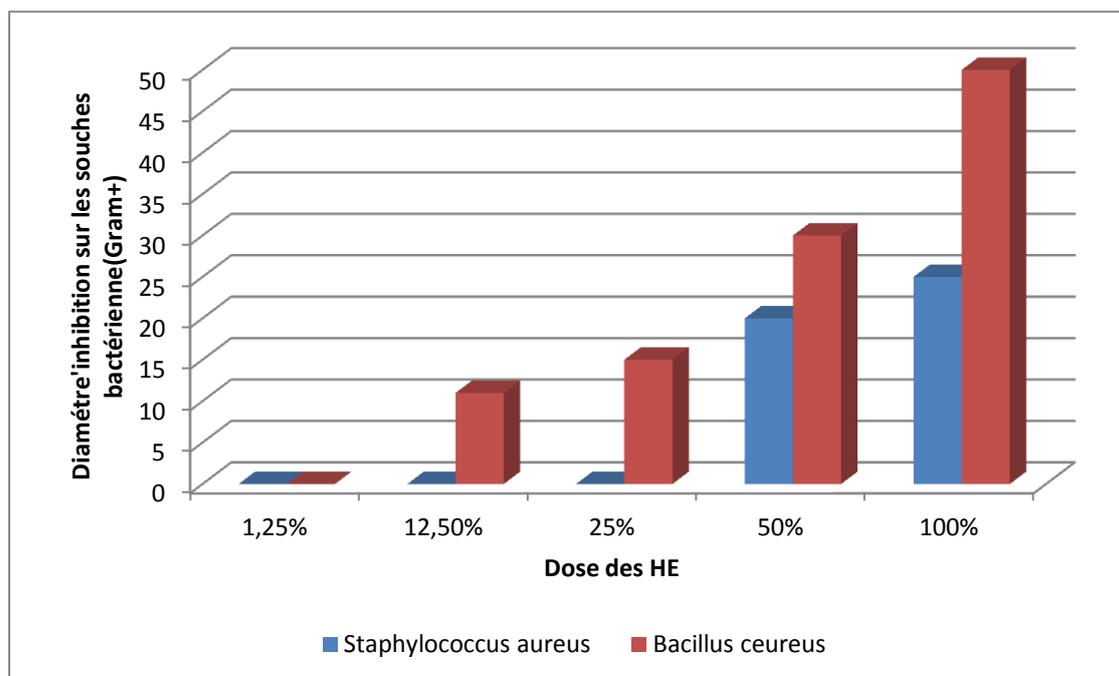
L'HE de *Citrus limonum*, à l'état dilué et à l'état pur, a montré une inhibition importante sur la croissance des bactéries testées à Gram- (Tableau IV.9).

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont importants pour la bactérie *P.aeruginosa*.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram+ sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.10.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus limonum* contre les souches bactériennes à Gram+.

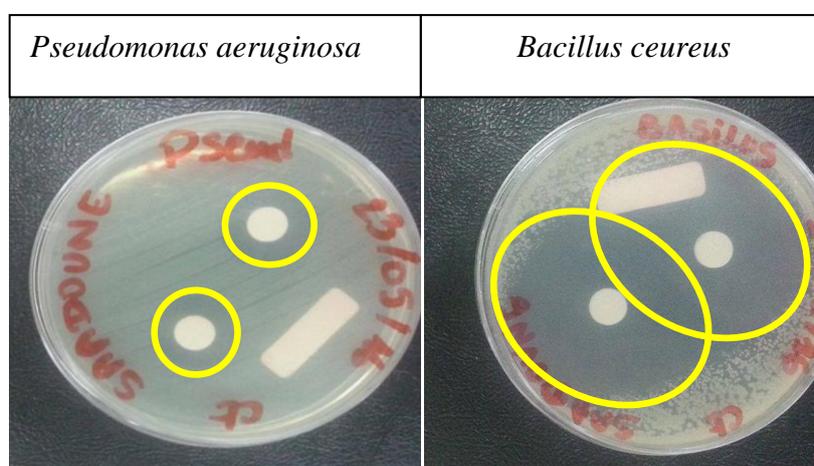
souches bactériennes (Gram+)	Dose des H.E				
	1,25% (D1)	12,5% (D2)	25% (D3)	50% (D4)	100% (D5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	20	25
<i>Bacillus ceureus</i>	-	11	15	30	50



**Figure IV.15.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure et à différentes dilutions.

La sensibilité de la bactérie *Bacillus* vis-à-vis de l'H.E de *Citrus limonum*, à l'état dilué et à l'état pur, est importante (Tableau IV.10).

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont importants pour la bactérie *S.aureus* uniquement pour les doses (D4) et (D5).



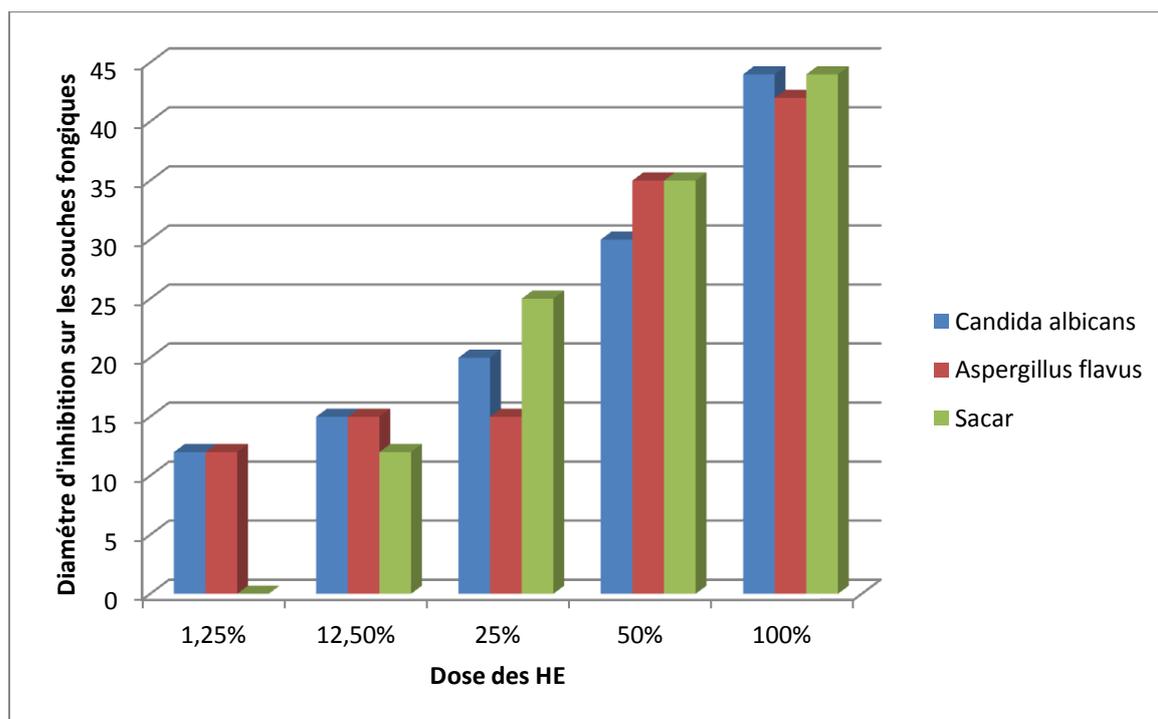
**Figure IV.16.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure sur quelques bactéries.

#### IV.4.1.2.2. Etude de l'activité antifongique :

Les résultats de l'étude de l'activité antifongiques sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.11.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus limonum* contre les souches fongiques.

souches fongiques	Dose des H.E				
	1,25% (D1)	12,5% (D2)	25% (D3)	50% (D4)	100% (D5)
<i>Candida albicans</i>	12	15	20	30	44
<i>Aspergillus flavus</i>	12	15	15	35	42
<i>Sacar</i>	0	12	25	35	44

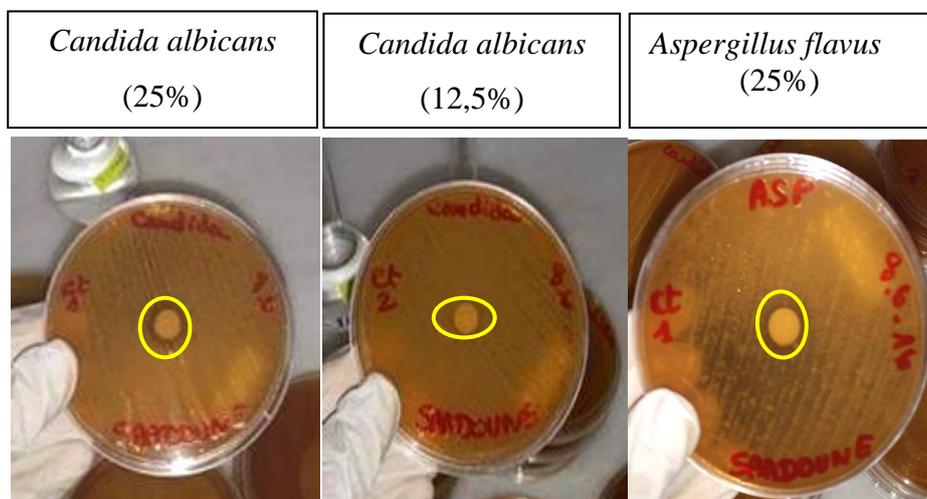


**Figure IV.17.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure et à différentes dilutions.

Les champignons et les levures sont plus sensibles à l'H.E de *Citrus limonum* selon le diamètre d'inhibition observé qui varie entre 40 mm et 44 mm (Tableau IV.11). L'huile essentielle de *Citrus limonum* semble présenter un excellent effet antifongique.



**Figure IV.18.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure sur *Aspergillus flavus*.



**Figure IV.19.** Effet inhibitrice des dilutions de l'huile essentielle de *Citrus limonum* sur les souches fongiques.

Les deux H.E testées ont présenté un large spectre d'action; agissant aussi bien sur les bactéries à Gram + que sur les bactéries à Gram -. Néanmoins, les diamètres des auréoles d'inhibitions des deux H.E diluées n'ont pas dépassé 30 mm. Notons que le pouvoir antibactérien de l'H.E de *Citrus limonum* s'est révélé plus important que celui de *Citrus sinensis*.

On note également que l'activité antibactérienne est proportionnelle à la concentration, plus l'H.E est concentrée, plus la zone d'inhibition est étendue ce qui indique la diminution de la croissance bactérienne.

Les deux H.E ont manifesté des caractéristiques antibactériennes très intéressantes vis-à-vis des souches fongiques. Notons encore que le pouvoir antibactérien de l'H.E de *Citrus limonum* s'est révélé plus important que celui de *Citrus sinensis*.

L'observation a montré que les différentes dilutions des deux H.E ont induit des zones d'inhibition ; à noter que les dilutions sont plus efficaces vis-à-vis des souches fongiques (*ASP, S.S, Candida*).

La souche de *P. aeruginosa* jouit en revanche d'une grande résistance vis-à-vis de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

Selon Kalemba et Kunicka (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend de la propriété de l'huile essentielle et de microorganisme lui-même. (Nikaido et al,1996 ;Tepe et al,2005 ;Gilles et al,2010) confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-.En fait, les Gram- possèdent une résistance aux agents biocides avec la nature de leur paroi bactérienne.

En revanche, de rares publication rapportent qu'il n'existe aucun lien apparent, ni aucune corrélation entre l'activité antimicrobienne de l'H.E et la nature de la paroi bactérienne. (Zaika, 1998).

Les souches du genre *Pseudomonas* se sont avérées plus résistante à l'H.E. Cette résistante n'est pas surprenante. Ceci à été confirmé par plusieurs études antérieures. (Hammer et al, 1999 ; Dorman et Deans, 2000).

#### **IV.4.2.Micro atmosphère :**

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase vapeur de l'HE, nous avons utilisé la technique de la micro atmosphère avec trois doses différentes (20 $\mu$ l, 40 $\mu$ l et 60 $\mu$ l d'HE par disque).

##### **IV.4.2.1. Essai avec l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure :**

###### **IV.4.2.1.1. Etude de l'activité antibactérienne :**

L'étude de l'activité antibactérienne de l'H.E de *Citrus sinensis* pure contre les souches bactériennes à Gram- et à Gram+ a révélé les résultats suivants :

**Tableau IV.12.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure contre les souches bactériennes à Gram-.  
(Micro-atmosphère)

	Doses de l'HE en $\mu$ l		
	20	40	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-

**Tableau IV.13.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure contre les souches bactériennes à Gram+.  
(Micro-atmosphère)

	Doses de l'HE en $\mu$ l		
	20	40	60
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus ceureus</i>	-	-	-

En micro-atmosphère, les souches bactériennes, à Gram+ et à Gram- sont très résistante à l'H.E de *Citrus sinensis* pure.

#### IV.4.2.1.2. Etude de l'activité antifongique :

L'étude de l'activité antifongique de l'H.E de *Citrus sinensis* pure a révélé les résultats suivants :

**Tableau IV.14.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure contre les souches fongiques. (Micro-atmosphère)

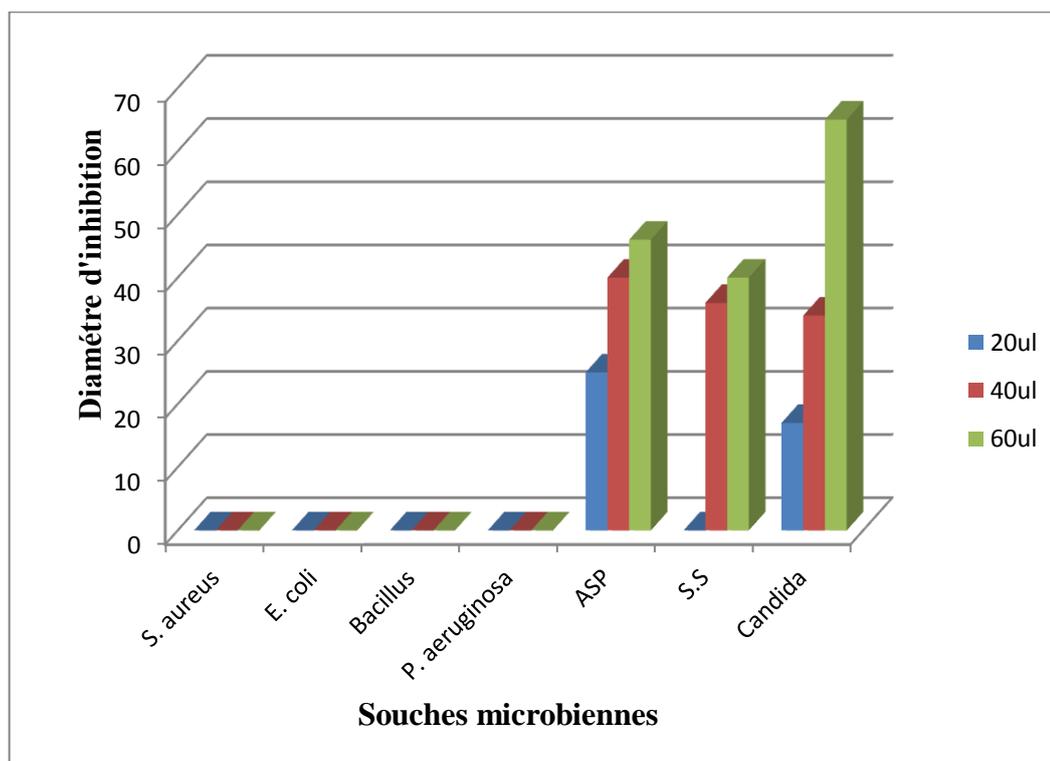
	Doses de l'H.E en $\mu\text{l}$		
	20	40	60
<i>Aspergillus flavus</i>	25	40	46
<i>Candida albicans</i>	17	34	65
<i>Sacar</i>	-	36	40



**Figure IV.20.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure sur *Candida albicans*. (Micro-atmosphère)



**Figure IV.21.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure sur *Sacar.* (Micro-atmosphère)



**Figure IV.22.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pure à différentes doses. (Micro-atmosphère)

#### IV.4.2.2. Essai avec l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure :

##### IV.4.2.2.1. Etude de l'activité antibactérienne :

L'étude de l'activité antibactérienne de l'H.E de *Citrus limonum* pure contre les souches bactériennes à Gram- et à Gram+ a révélé les résultats suivants :

**Tableau IV.15.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure contre les souches bactériennes à Gram-.  
(Micro-atmosphère)

	Doses de l'HE en $\mu$ l		
	20	40	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-

**Tableau IV.16.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure contre les souches bactériennes à Gram+.  
(Micro-atmosphère)

	Doses de l'H.E en $\mu$ l		
	20	40	60
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus ceureus</i>	10	12	23

Pour l'H.E de *Citrus limonum*, la souche bactérienne à Gram+ *Bacillus ceureus* est la seule qui a donné une zone d'inhibition en micro-atmosphère.

#### IV.4.2.2.2. Etude de l'activité antifongique :

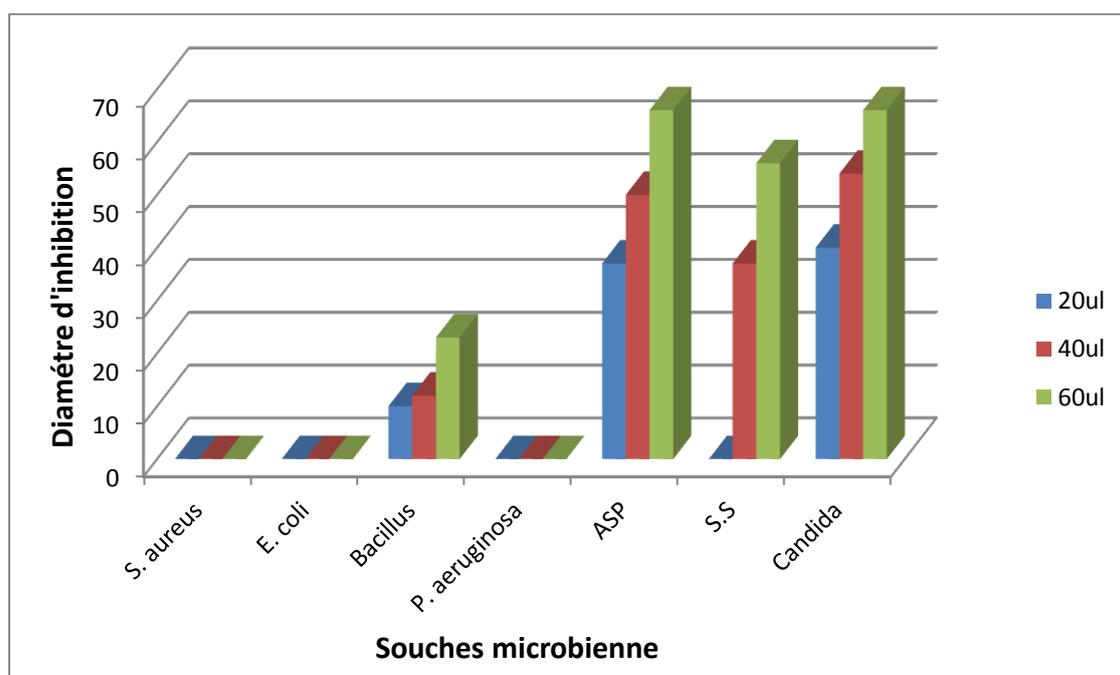
L'étude de l'activité antifongique de l'H.E de *Citrus limonum* pure a révélé les résultats suivants :

**Tableau IV.17.** Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure contre les souches fongiques. (Micro-atmosphère)

	Doses de l'H.E en $\mu$ l		
	20	40	60
<i>Aspergillus flavus</i>	37	50	66
<i>Candida albicans</i>	40	54	66
<i>Sacar</i>	-	37	56



**Figure IV.23.** Effet inhibitrice de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure sur *Candida albicans*. (Micro-atmosphère)



**Figure IV.24.** Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus limonum* pure à différentes doses. (Micro-atmosphère)

A la lecture de ces résultats, il apparaît clairement que l'action inhibitrice de la phase vapeur (Micro atmosphère) est inférieure à celle de la phase liquide (Aromatogramme) pour les souches bactériennes. Uniquement, les souches fongiques ont montré une grande sensibilité à l'H.E pour les trois doses. De la même façon que l'Aromatogramme il existe une relation entre la quantité d'H.E par disque et le diamètre d'inhibition. Ceci a été corroboré par plusieurs publications scientifiques (Tyagi et Malik, 2011 ; Boukhatem et al, 2013).

#### **IV.4.3. Etude comparative entre l'Aromatogramme et Micro-atmosphère :**

L'efficacité d'une H.E dépend de sa richesse en composés chimiques, plus l'H.E est riche en substances actives, plus son activité est importante. L'activité biologique d'une H.E est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques et cétoniques).

Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des H.E et semblent agir en synergie avec les composés principaux (Zhiri, 2006).

L'ensemble des résultats microbiologiques obtenus au cours de cette étude montre que tous les produits testés possèdent une activité antibactérienne et antifongique très importante, dans laquelle certaines souches semblent se distinguer par une sensibilité très élevée, dont le (L)-limonène (80 %) est le constituant principal de H.E de *Citrus limonum* et le (D)- limonène (90%) est le constituant principal de H.E de *Citrus sinensis*, ce dernier peut être responsable du fort pouvoir fongicide. A noter que l'H.E de *Citrus limonum* d'où son composé majoritaire est le (L)-limonène a montré une très forte action inhibitrice microbienne contre les souches fongiques par rapport à l'H.E de *Citrus sinensis*.

Au cours de la présente étude, nous avons remarqué que la fraction volatile de l'huile essentielle étudiée montre une meilleure activité antifongique par rapport à la méthode de contact direct sur milieu gélosé. Ce résultat est en bon accord avec les données bibliographiques. L'explication de ces observations peut être attribuée à la faible solubilité des huiles essentielles dans l'eau et par conséquent dans le milieu gélosé grâce à leur caractère hydrophobe. Ainsi, le caractère volatile et hydrophobe rend ces huiles plus absorbables par le mycélium fongique que par le contact direct sur gélose. Ce comportement peut être du d'une part, à la nature lipophile du tissu fongique et d'autre part à la forte teneur en eau dans la gélose.

A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la Micro-atmosphère est très peu documentée. En effet, rares sont les articles qui traitent cette méthode. Les études réalisées par Tyagi et Malik(2010,1011) ont mis en exergue que la phase vapeur est plus inhibitrice sur la croissance des germes que la phase liquide. Ceci a été confirmé notamment sur les souches fongiques.

D'autre part, dans la phase de contact direct des concentrations relativement élevées des huiles essentielles sont nécessaires pour inhiber la croissance des bactéries. Cependant, cette concentration plus élevée peut impliquer des effets sur les propriétés organoleptiques des aliments (le goût et la saveur). Ainsi, l'utilisation des huiles essentielles en phase vapeur semble être un protocole de contrôle prometteur qui pourrait être appliqué en fumigation. A titre d'exemple, on peut incorporer des HE dans l'emballage et le packaging des aliments et puisque l'H.E est volatile donc elle va inhiber et éliminer toute contamination bactérienne et fongique sans le moindre contact avec l'aliment. Cette constatation a été confirmée par une étude récente. (Boukhatem et al, 2013)

Piacentini a noté pour la première fois les propriétés antimicrobiennes des H.E de Citrus en 1949 in (Fisher & Phillips, 2008) que les essences de Citrus en solution étaient plus puissantes que les phénols comme désinfectants. Selon les travaux de Prudent et al, (1995) ; Sharma-Tripathi, (2006) ; et ViudaMartos et al, (2008), les H.E de *Citrus* : d'orange douce, de citron, de mandarine et, pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*. Il a été établi d'après Cox et al, (2000) que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.



# **CONCLUSION GENERALE**

# CONCLUSION

Le présent travail vise l'impact de la composition des huiles essentielles de *Citrus sinensis* (Orange) et *Citrus limonum* (Citron) sur l'activité microbiologique. L'extraction de l'essence aromatique de ces deux agrumes a été réalisée au Département de Génie des procédés. Les huiles essentielles de *Citrus limonum*, et *Citrus sinensis* ont été analysées selon la méthode standard AFNOR afin de déterminer les constantes physiques habituelles définissant l'huile essentielle extraite par hydrodistillation : densité relative, l'indice de réfraction, Pouvoir rotatoire. Les résultats obtenus sont conformes aux normes en vigueur. Les analyses chromatographiques des deux HE montrent clairement la richesse de l'HE de *Citrus limonum* par rapport à celle de *Citrus sinensis*.

L'estimation de l'activité antimicrobienne des H.E a été réalisé sur plusieurs souches microbiennes de référence (ATCC). Pour cela deux méthodes qualitatives ont été utilisées (Aromatogramme et Micro-atmosphère) avec des doses croissantes. Les résultats obtenus sont très encourageants, les expériences montrent une inhibition très importante de la croissance des bactéries testées. Les diamètres d'inhibition, autour des disques, sont importants pour toutes les bactéries testées (*S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus*, et *P. aeruginosa*) avec des diamètres d'inhibition qui varie entre 15 et 50 mm, même pour les souches fongiques la sensibilité des bactéries vis-à-vis des deux H.E est très importantes avec des diamètres d'inhibition qui varie entre 30 à 44 mm.

Par contre, en micro-atmosphère, les deux H.E ont présenté une action inhibitrice uniquement sur les souches fongiques.

Il est important de signaler que l'HE de *Citrus limonum* a marqué un effet inhibiteur plus important à ceux de l'HE de *Citrus sinensis*. Cela est du à la différence de la composition chimique de ces deux H.E d'où le composé majoritaire de l'HE de *Citrus limonum* est le (L)-limonène tandis que le composé majoritaire de l'HE de *Citrus sinensis* est le (D)-limonène. Ce dernier peut être responsable du fort pouvoir

fongicide de ces H.E sur la croissance des bactéries testées. Donc l'HE de *Citrus limonum* semble constituer un excellent produit à activité bactéricide.

A la suite de ces résultats, il serait donc très intéressant de continuer ce travail sur plusieurs aspects :

- Séparer les composés majoritaires de ces deux H.E de Citrus ((D)-limonène et (L)-limonène) et étudier leur effet sur l'activité microbologique.
- Elaborer une préparation galénique ou cosmétique dans laquelle sera incorporé l'HE et apprécier ainsi son efficacité.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Franchomme P., Pénéol D, Jollois R. L'aromathérapie exactement- Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Editions Jollois, 1990,445p.
- [2] AFNOR NF T-75- 111, 112 & 202: (Association Française de Normalisation, Norme).« Huiles essentielles ». Paris, France.
- [3] CLEMENT J.M. (1981). Les agrumes. Librairie Larousse, Paris, 3-37.
- [4] A critical review on the chemical composition of Citrus oils. *Perfum Flavor*, 16(2), 17-34.
- [5] LOUSSERT R. (1989). Les agrumes. 2. Production Edition Lavoisier, Paris, 157.
- [6] MOUFIDA S. & MARZOUK B. (2003). Biochemical characterization of blood orange,sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.
- [7] Dipentene -GESTIS–Substance Database ([www.hvbg.de/d/bia/fac/zesp/zesp.htm](http://www.hvbg.de/d/bia/fac/zesp/zesp.htm)).
- [8] Limonene-([www.inchem.org/documents/cicads/](http://www.inchem.org/documents/cicads/)).
- [9] European pharmacopia essential oils - aetherolea; 2008.
- [10]d,l-Limonéne In:Base de données CHEMINFO. Hamilton,2003.
- [11] Limonene -In :Base de données HSDB,2003([toxnet.nlm.nih.gov/](http://toxnet.nlm.nih.gov/)).
- [12] Burdock G.A., *Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients*, 1995, 3<sup>e</sup> ed, CRC Press.

- [13] PADRINI F. & LUCCHRONI N. (2003). *Le grand livre des huiles essentielles: Médecine douce, bien être.* Edition de Vecchi S-A. PARIS.
- [14] Iserin P., (2001), *encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soins* 2ème édition Ed Larousse/VUEF, pp13-16, p 250, pp291-296,
- [15] Cestac P., Doisneau-Sixou S., Favre G. ; *Ann. Pharm. Fr.*, 2005.
- [16] Vigushin D.M., Poon G.K., Boddy A., English J., Halbert G.W., Pagonis C., Jarman M., Coombes R.C. ; *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1998.
- [17] Gillij Y.G., Gleiser R.M., Zygadlo J.A. ; Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants..., *Bioresour. Technol.*, 2007.
- [18] *Brevet US 2004/0092606 A1*, 2003, Tor McPartland.
- [19] *Brevet 4,511,488*, 1983, Penetone Corporation.
- [20] Bordenca C., Allison R.K., Dirstine P.H. ; *Ind. Eng. Chem.*, 1951.
- [21] *Brevet US5158790*, 1992, Wm. Wrigley, Jr. Company
- [22] Evarts J.B. Jr., Fuchs P.L. ; *Tet. Lett.*, 2001.
- [23] Crawford R.J., Erman W.F., Broaddus C.D. ; *J. Am. Chem. Soc.*, 1972.
- [24] Villecco M.B., Catalan C.A.N., Joseph-Nathan P., *Tetrahedron*, 2003.
- [25] Niwa M., Sugie Y., Yamamura S. ; *Phytochemistry*, 1981, 20, 1137 - <http://www.hpmix.com/home/ssc/ssc02/R8.htm>
- [26] Hansson T., Wickberg B. ; *J. Org. Chem.*, 1992.
- [27] Bar G., Parsons A.F., Thomas C.B. ; *Tetrahedron*, 2001.

[28] Haddouchi F, Lazouni H, Ahammer K.A, Carson C.F. & Riley T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*.

[29] HAMMER K.A., CARSON C.F. & RILEY T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.

[30] Aouni M., Pelen F. et Soulimani R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11, 225 – 236.

[31] Pauli A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*.

[32] Kalembe D. & Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*.

[33] Knobloch K., Paulis A., Iberl B., Weignaud H., and Weis N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Ess. Oil Res.* 1, 118 – 119.

[34] E. GUINOISEAU, 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action, Thèse pour l'obtention du grade de Docteur, Mention : Biochimie -Biologie moléculaire, Université De Corse-Pasquale Paoli, Ecole Doctorale Environnement Et Société UMR CNRS 6134 SPE Faculté des Sciences et Techniques.

[35] BENJELALI B., TANTAOUI E.A. & ESMAILI-ALAOUI M. (1986). Méthodes d'études des propriétés des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 20, 155-167.