

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Evaluation *in vitro* des activités
antioxydante et antibactérienne et
caractérisation de l'huile essentielle de
l'écorce de citron (*Citrus lemon L.*)**

Présenté par :

BOUBERKA Warda & BOUCHETA Kahina

Soutenu le : **21 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^f BACHIR BEY M.

MCB

Président

M^fCHIKHOUN A.

MCA

Encadreur

Mme BOUBECHIR K.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciement

Nous commençons par remercier le dieu de nous avoir donné la force et la patience pour pouvoir mener ce travail.

*Nous remercions en premier lieu monsieur **Chikhoun.A** pour avoir accepté d'être notre encadreur de mémoire de fin de cycle, de nous avoir guidé et soutenu durant ce travail.*

*Nous tenons à remercier **Mr Bachir Bey** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et **Mme Boubechir** d'avoir accepté à examiner ce mémoire.*

Nous tenons également à remercier toute l'équipe du laboratoire de physicochimie des aliments et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin lors de la réalisation de ce travail.

Enfin, nos remerciements sont dressés plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.

Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à :

Mes chers parents que je ne trouverai jamais l'expression forte pour exprimer mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour tous les sacrifices consentis. Je leur remercie pour leur confiance et que Dieu leurs accorde une très longue vie.

Mes grands-parents maternel et paternel

Mes très chères tantes et mes oncles ainsi que mes cousines et cousins

Ma chère binôme Warda pour le parcours qu'on a fait ensemble ainsi qu'à toute sa famille

Mon cher ami Adel ainsi que toute sa famille

Mes très chères amies en particuliers, Nesrine, Fairouz, Souad, Katia, Siham et Ryma

Tous mes collègues de la promotion QPSA.

Kahina

Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à :

Mes chers parents que je ne trouverai jamais l'expression forte pour exprimer mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour tous les sacrifices consentis. Je leur remercie pour leur confiance et que Dieu leurs accorde une très longue vie.

Ma chère sœur Sonia et ma nièce Nada

Mes grands-parents maternels

Mes très chères tantes et mes oncles ainsi que mes cousines et cousins

Ma chère binôme Kahina pour le parcours qu'on a fait ensemble ainsi qu'à toute sa famille

Mes très chères amies en particuliers, Nesrine, Fairouz, Souad, Katia, Siham et Ryma

Tous mes collègues de la promotion QPSA.

Warda

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. Huiles essentielles

I. huiles essentielles 2

1. Historique 2

2. Définitions 2

3. Propriétés physico chimiques 2

4. Composition chimique 2

4.1. Groupe des terpénoides 3

4.2. Groupe des composés aromatiques 3

5. Principales utilisations des HE 3

5.1. Industrie agroalimentaire 3

5.2 Pharmaceutique 3

5.3. Parfumerie 4

6. Modes d'extraction 4

6.1. Hydrodistillation 4

6.2. Entraînement à la vapeur d'eau 4

6.3. Expression ou pressage à froid 4

6.4. Extraction par les solvants 4

6.5. Extraction par solvant assisté par microondes 5

6.6. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique 5

7. Analyse des huiles essentielles 5

7.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) 5

II. Monographie de la plante étudiée

1. Citronnier 7

1.1. Description 7

1.2 Classification Botanique 7

1.3. Composition biochimique de citron 8

1.4. Production de citron 8

1.4.1. Production mondiale 8

1.4.2. Production algérienne 8

1.5. Huile essentielle de citron 8

1.6. Toxicité de l'huile essentielle de citron 8

III. Activité biologique des huiles essentielles

1. Activité antioxydante	9
1.1. Définition d'un antioxydant	9
1.2. Classification des antioxydants	9
1.2.1. Antioxydants naturels	9
1.2.2. Antioxydants synthétiques	9
1.3. Evaluation de l'activité antioxydante	9
1.3.1. Test de DPPH	9
1.3.2. Test de blanchiment de β -carotène	10
1.3.2. Mesure du pouvoir réducteur	10
2. Activité antimicrobienne	10
2.1. Introduction	10
2.2. Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne	10
2.2.1. Aromatogramme	10
2.2.2. Microatmosphère	11
2.2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales bactéricides	11

Expérimentation

I. Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal	12
2. Méthodes	12
2.1. Extraction de l'huile essentielle de citron	12
2.1.1. Hydrodistillation	12
2.2. Rendement d'extraction	12
2.3. Analyse de l'huile essentielle par CG/SM	14
2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	14
2.4.1. Mesure de piégeage du radical DPPH	14
2.5 Evaluation de l'activité antibactérienne	14
2.5.1. Origine et choix des souches	14
2.5.2. Préparation de l'inoculum	15

II. Résultats et discussions

II. Résultats et discussions	17
1. Rendement d'extraction en huile essentielle	17
2. Analyse de la composition chimique	17
3.Évaluation de l'activité antioxydante	19
4. Evaluation de l'activité antibactérienne	20

Conclusion	23
-------------------------	-----------

Références bibliographiques

Figure 1 : Photographie du fruit de citron	7
Figure 2 : photographie des feuilles de citron	7
Figure 3 : Montage de la technique d'extraction par hydrodistillation	12
Figure 4 : illustration de la méthode de diffusion sur milieu gélosé	16
Figure 5 : Chromatogramme de l'HE de citrus limon obtenu par CG/SM	19
Figure 6 : Activités de piégeage du radical DPPH de différentes concentrations de l'HE de citron et de limonène	20
Figure 7 : Diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes testé	21
Figure 8 : Zones d'inhibition de l'HE de citrus limon sur les souches bactériennes testées	22

Tableau I : Principaux constituants chimique de citron	8
Tableau II : Liste et caractéristiques des souches bactériennes testées.....	15
Tableau III : Rendement en huile essentielle de fruit étudié.....	17
Tableau IV : Résultats de l'analyse de la composition chimique par CG/SM de l'HE de citron	18
Tableau V : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) d'HE du <i>citrus limon</i> et oxacilline.....	21

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

BHA : Butyl Hydroxy Anisol

BHT : Butyl Hydroxy Toluène

CG /SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DPPH : 2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl

HE : Huile essentielle

J.C : Jésus Christ

MADR : Ministre de l'agriculture et de développement rural Algérien.

M_v: Masse de la matière végétale

M_{HE}: Masse de l'huile essentielle

nm: Nanomètre.

R_{HE}: Rendement de l'huile essentielle

TBHQ : 2-Tertiobutyl-4-hydroxyphénol

UFC : Unité formant colonie

UV: Ultraviolet

Introduction Générale

Les problèmes de santé aujourd'hui et ses préoccupations pertinentes ont conduit l'homme à utiliser des substances naturelles dans un large éventail de domaine industriel (Taghigolmakani et Moayyedi, 2015).

Les plantes médicinales, considérées comme ayant des propriétés thérapeutiques, ont été utilisés depuis le début de la civilisation humaine pour traiter différentes maladies et l'utilisation de cette stratégie efficace pour la promotion de la santé humaine a considérablement augmenté au cours des dernières années (Campélo *et al.*, 2011).

Les huiles essentielles sont l'une des plus renommées de ces substances naturelles, ainsi elles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elle dont l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens et donc comme conservateur naturelle qui préserve l'aliment des différentes altérations oxydatives et microbiennes (Himed *et al.*, 2016).

Parmi ces plantes on a l'espèce *citrus limon* de la famille des rutacées et troisièmes le plus important de la famille des agrumes après l'orange et la mandarine (Kelechi *et al.*, 2017). Le citron est parmi les fruits les plus connus, cultivés aujourd'hui dans toutes les régions méditerranéennes utilisées pour plusieurs applications (Anton et lobstein, 2005).

C'est dans ce contexte, que notre travail de mémoire s'inscrit, sur l'étude de l'huile essentielle extraite de l'écorce de l'espèce *Citrus limon*, dans le but de déterminer leur intérêt biologique.

La partie théorique de cette étude est consacrée à une recherche bibliographique concernant les huiles essentielles, monographie de la plante et sur les activités antioxydante et antibactérienne.

La seconde partie du travail est réservée à l'étude expérimentale, dans laquelle nous essayerons :

- D'extraire par hydrodistillation l'huile essentielle de l'écorce du citron et d'estimer le rendement d'extraction.
- D'analyser la composition chimique de l'huile essentielle extraite par la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM).
- D'évaluer *in vitro* les activités antioxydante et antibactérienne de l'essence étudiée.

I. Huiles essentielles

I.1. Historique

Déjà 40 000 ans avant J.C., les aborigènes australiens utilisaient les plantes aromatiques pour traiter les infections. En Chine, en Inde, les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis fort longtemps. Les pays arabes ont considérablement progressés l'aromathérapie. Mille ans avant J.C., les perses semblent avoir inventé la distillation, mais il faudra attendre 2000 ans pour que ce procédé soit sensiblement perfectionné. C'est Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), qui a produit la première huile essentielle pure extraite à partir de roses (**Zhiri, 2006**).

I.2. Définitions

D'après **Liebig (1841)**, une foule de matière végétale donnent par la distillation avec de l'eau des huiles essentielles ou essences ; ce sont des liquides volatiles, peu solubles dans l'eau, sont ordinairement incolores, et inflammable.

Selon la pharmacopée française (1965) citée par **Bruneton (1999)**, les huiles essentielles sont des produit de composition généralement assez complexe renferment les principes volatils contenus dans les végétaux.

La norme AFNOR a défini l'huile essentielles comme produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entrainement à la vapeur soit par procédé mécanique à partir de l'épicarpe de citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physique (**AFNOR, 1998**).

I.3. Propriétés physico-chimiques

D'après **Bruneton (2009)**, les principales propriétés physico-chimiques des HE sont :

- Généralement liquide à température ambiante.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Leur densité est en générale inférieur à celle de l'eau.
- Leur indice de réfraction élevé.
- Sont solubles dans les solvants organiques usuels mais très peu soluble dans l'eau.

I.4. Composition chimiques

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, à côté des composés majoritaires, on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (**Pibiri, 2006**).

D'après **Bruneton (1987)**, les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoides d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés des phénylpropane.

I.4.1. Le groupe des terpénoides

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique" (**Lamarti et al., 1994**).

I.4.2. Groupe des composés aromatiques

Ce groupe dérive des phénylpropane. Ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Leur voie biosynthétique est différente à celle des terpènes (**Bekkali et al., 2008**).

I.5. Principales utilisation des HE

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles, peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs à savoir :

➤ **En industrie agroalimentaire**

L'oxydation des lipides est un problème récurrent dans les aliments parce qu'elle implique des altérations organoleptiques, pour éviter ce phénomène, les industriels rajoutent à leur recette différents conservateurs de synthèse. Les chercheurs ont travaillé sur l'effet antioxydant des huiles essentielles extraites de plantes ou de fruits. Ils ont conclu que certaines huiles essentielles peuvent jouer un rôle essentiel pour limiter l'oxydation des lipides selon le type d'aliment et les conditions de stockage (**Fernandez et Chemat, 2012**).

➤ **En pharmaceutique**

Le lecteur découvrira plus loin les propriétés pharmacologiques de quelques huiles essentielles utilisés en thérapeutique. Ce sont principalement les propriétés antiseptiques et antifongiques qui sont reconnues par les autorités sanitaires (**kaloustian et Minaglou, 2012**). Elles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques, ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques de désinfection. Elles sont utilisées dans le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale et les soins dentaire (**Bekhechi et Abdelouahid, 2010**).

Souvent, les huiles essentielles sont rajoutées dans la formulation des spécialités pharmaceutiques, pour masquer le mauvais goût des médicaments et pour donner un caractère plus agréable à la consommation (**kaloustian et Minaglou, 2012**).

➤ **En parfumerie**

C'est le principal débouché des HE. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont aussi consommateurs même si le coût élevé des produits naturels conduit à privilégier parfois les produits synthétiques. Elles sont intégrées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires ainsi que de nombreux produits d'ambiance comme les liquides pour pots-pourris (Couderc,2001).

I.6.Modes d'extraction

Les principales méthodes d'extraction couramment utilisées sont :

I.6.1.Hydrodistillation

L'appareil utilisé pour cette méthode est de type Clevenger. Il est constitué d'un chauffe ballon, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et d'un collecteur en verre qui reçoit les extraits de la distillation. L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement et à l'ombre (Fadil *et al.*, 2015).

I.6.2.Entrainement à la vapeur d'eau

L'extraction par entrainement à la vapeur d'eau est un type de vapeur distillation, qui est seulement différente dans le chemin d'entrée de la vapeur dans le récipient de still. Cette méthode est utilisée lorsque le matériel végétal a été séché .Pour ce procédé, la vapeur est appliquée à partir du haut du matériel végétal. Ce processus peut également être exploité sous basse pression ou sous vide et réduit la température de la vapeur à moins 100°C (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

I.6.3. Expression ou pressage à froid

Le procédé est utilisé uniquement pour l'obtention des huiles essentielles contenues dans les zestes d'agrumes. Il s'agit d'un processus physique dans lequel les glandes à huile essentielle de la peau du fruit sont percées, broyées ou concassées mécaniquement afin de libérer l'essence. Cette méthode est économiquement plus rentable que l'hydrodistillation et permet d'éviter d'éventuelles dégradations thermiques (Venturini,2012).

I.6.4. Extraction par les solvants

Les solvants les plus utilisés sous réserve de législations restrictives particulières sont les hydrocarbures aliphatiques (éther de pétrole, hexane, propane), les solvants halogénés (dérivés chlorés, et fluorés du méthane et de l'éthane) et l'éthanol. L'inconvénient majeur de l'extraction par les solvants est leur manque de sélectivité et aussi la toxicité des solvants (Bruneton, 1999).

I.6.5. L'extraction par solvant assistée par micro-ondes

C'est une technique par solvant assistée par microondes en vue d'une analyse chromatographique. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes de la matière, végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les microondes (méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. Cette technique se présentait comme beaucoup plus efficace qu'une méthode conventionnelle et permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie (**Chemat et Lucchesi, 2005**).

I.6.6. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique

Ce procédé est basé sur le fait que le CO₂ dans des conditions dites critiques (fortes pressions) présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les HE, les arômes et les colorants(**Mayer, 1989**).L'avantage de cette technique est de minimiser les risques de dégradation thermiques .(**Venturini, 2012**).

I.7. Analyse des huiles essentielles

I.7.1 Chromatographie phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CG-SM) permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (**Cavalli, 2002**).

✓ Principe

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes :(**Pradeau et Cohen, 1992**).

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de départ.
- **Accélération** : les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : les ions seront distribués suivant leur rapport masse /charge.
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse / charge.

Les spectres de masse obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles (**Cavalli, 2002**).

II.1. Citronnier

II.1.1. Description

Le citronnier est une plante médicinale importante de la famille des rutacées, originaire du bassin méditerranéen et répandu particulièrement en Italie, en Espagne, et Chypre (Mohanapriya *et al.*, 2013 ; Leroy, 2016).

Ce sont des arbres ou arbustes pouvant atteindre 15m de haut, les feuilles sont cireuses et coriaces, alternes et possèdent souvent un pétiole, de forme ovale leur limbe est entier ou irrégulièrement denté, elles sont persistantes. Le fruit est une baie, ronde ou allongée. L'écorce du fruit comprend dans sa partie la plus externe un épicarpe dénommée le zeste coloré en jaune remplis de l'huile essentielles (Anton et Lobstein, 2005).

Le citron a un large spectre d'activité biologique, y compris les activités antibactérienne, antifongique, antidiabétique, anticancéreuse et antivirales (Burt, 2004).

Les figures 1 et 2 montrent la photographie du fruit et des feuilles de citron



Figure 1 : Photographie du fruit de citron



Figure 2 : Photographie des feuilles de citron

II.1.2. Classification botanique

La classification scientifique du citron, selon Ecornier (2001), est comme suit :

Règne : *Plantae*

Famille : *Rutacées*

Division : *Magnoliophyta*

Genre : *Citrus*

Classe : *Magnoliopsida*

Nom binomial : *Citrus Limon (L) Burm f*

Ordre : *Sapindales*

II.1.3. Composition biochimique du citron

Les principaux constituants chimiques du citron sont regroupés dans le tableau I :

Tableau I: Principaux constituants chimique de citron (Goetz, 2014).

Matière	Famille des constituants	Constituants chimiques
Jus	Flavone	Citroflavonoïdes
	Acide organiques	Acide citrique, acide malique
	Hydrate de carbone	Saccharose, glucose
	Vitamines	Vitamine C (acide ascorbique)
	Minéraux	Sodium, calcium, phosphore, zinc
Ecorce de citron	Huile essentielle	90% D-limonène (monoterpène cyclique) 0,4% β -pinène, 9.6% γ -terpinène

II.1.4. Production de citron

II.1.4.1. Production mondiale

Selon l'organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture des Nations Unies les principaux pays producteur de citron et de limes sont l'Inde, le Mexique l'Argentine et l'Espagne avec un taux de 10,34 millions de tonnes (FAO, 2010).

II.1.4.1. production algérienne

La production de citrons obtenue en Algérie durant la saison 2011-2012 est de 760 823 tonnes (MADR, 2012).

II.1.5. Huile essentielle de citron

L'huile essentielle, préparée à partir des épicarpes de *Citrus limon* est un peu moins riche en carbures mono terpéniques que celle d'orange amère (92 à 95%) et sa teneur en limonène oscille entre 60 et 75%, ce carbure monocyclique est accompagné d'environ 8 à 12 de β -pinène et 8 à 10% de γ -terpène. On note la présence d'aldéhydes aliphatiques (0,2 à 0,5%) et aldéhydes monoterpéniques 2 à 3% (Brunton, 1999).

III.1. Activité antioxydante

III.1.1. Définition d'un antioxydant

Les antioxydants sont des substances qui lorsqu'elles sont présentes dans les aliments ou dans le corps à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retardent ou empêchent de façon marquée l'oxydation de ce substrat (**Race, 1997**).

Les constituants antioxydants de la matière végétale agissent comme des piègeurs classiques et aident à convertir les radicaux en espèces moins réactives. Les antioxydants sont notre première ligne de défense contre les radicaux libres et sont essentiels pour maintenir une santé et un bien-être optimaux (**Yadav et al., 2016**).

III.1.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels et antioxydants synthétiques :

III.1.2.1. Antioxydants naturels

Les antioxydants naturels se retrouvent dans de nombreux fruits et légumes qui comprennent l'acide ascorbique, le tocophérol, le β -carotène, l'acide chlorogénique et les flavonols. Leur activité dépend beaucoup de leurs propriétés physiques et chimiques et de leur mécanisme d'action (**Ullah et al., 2003, Pal et al., 2014**).

III.1.2.2. Antioxydants synthétiques

La plupart des produits alimentaires et pharmaceutiques contiennent des antioxydants synthétiques, ces composés sont rajoutés aux aliments afin de prolonger la durée de conservation du produit. Les antioxydants synthétiques les plus populaires utilisés sont des composés phénoliques tels que BHA, BHT, TBHQ et les esters de l'acide gallique. Ils ont été très soigneusement testés pour leur comportement toxicologique (**Pokorny et al., 2001 ; Shebis et al., 2013**).

III.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Selon **Avlessi et al., (2003)**, plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les activités antioxydantes des extraits volatils des plantes aromatiques à savoir :

III.1.3.1. Le test de DPPH

Ce test permet de mettre en évidence de façon relativement simple le pouvoir antiradicalaire d'un antioxydant ou d'un extrait antioxydant. Cette méthode mesure la capacité réductrice d'un antioxydant en présence d'un radical libre, le DPPH \cdot . Ce radical libre est très

stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette présentant une absorption maximale à 517 nm (**Fernandez et Chemat ,2012**).

III.1.3.2. Test de blanchiment de β -carotène

Cette technique de spectrophotométrie a initialement été développée par **Marco (1968)**, puis légèrement modifiée par **Miller (1971)**. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induits un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène (**Bourkhiss et al., 2010**).

III.1.3.2. Mesure du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles et d'extraits représente l'aptitude de ces composés à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Cette aptitude est évaluée par la méthode décrite par **Oyaizu, 1986**.

III.2. Activité antimicrobienne

III.2.1. Introduction

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles ont été reconnues depuis des siècles et avec la demande croissante de changements dans la législation, les tendances de consommation et l'isolement croissant des pathogènes résistants aux antibiotiques, alternatives aux produits chimiques des bactéricides doivent être trouvés (**Fisher et Phillips, 2008**).

Les huiles essentielles sont utilisées pour leur propriété antiseptique contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne dont beaucoup de ces huiles ont des activités antibactériennes remarquables contre un large spectre (**De Billerberck, 2007, Pirbalouti et al., 2010**). Elles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire. Il existe cependant quelques exceptions (**Daouda, 2015**).

III.2.2 Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne

III.2.2.1. Aromatogramme

C'est une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore des disques (**Pibiri, 2006**). Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une

boite de Pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries (**Bouguerra et al., 2014**).

III.2.2.2. Micro-atmosphère

C'est une technique dérivée de la méthode précédente. Le protocole des Microatmosphère est techniquement proche de celle des aromagrammes, la différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (**Pibiri, 2005**).

III.2.2.3. Détermination des CMI et CMB

Il est nécessaire de définir, pour caractériser l'activité antimicrobienne d'un composé, des paramètres simples. Pour l'activité antibactérienne, le plus courant est la « Concentration Minimale Inhibitrice » (CMI), elle correspond à la concentration nécessaire pour inhiber totalement la croissance d'un nombre déterminé de germes après un temps d'incubation donné (**Hulin et al., 1998**).

Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricides et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre : la concentration minimale bactéricide (CMB), elle correspond à la concentration en agent inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps bien déterminer (**Davidson et Parish, 1989**).

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par les écorces (zestes) du citron (*Citrus limon*). Que nous avons achetés du marché local de Bejaia, au mois de mars 2018. Les citrons ont subi un lavage puis un essuyage, à l'aide d'un couteau on a épluché les citrons pour obtenir l'écorce et on les a pesées avec une balance.

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction de l'huile essentielle du citron

I.2.1.1 Hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles est réalisés par la méthode d'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger modifié (figure3). Environ 400 g d'écorces de citron sont introduites dans un ballon de 2 litres rempli d'eau jusqu'à deux tiers (2/3) de son volume. Le tout est porté à l'ébullition. La vapeur produite traverse les écorces d'agrumes, chargé d'huile essentielle et passe ensuite dans le condenseur puis l'huile essentielle séparée de l'eau par différence de densité. L'huile extraite est conservée en l'absence de lumière à une température de 4°C, dans un flacon en verre fermé hermétiquement jusqu'à son analyse.



Figure 3 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger modifié.

I.2.2. Rendement d'extraction :

Selon la norme AFNOR, le rendement des huiles essentielles (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielles (M_{HE}) obtenu après extraction et la masse

de la matière végétale (M_V) utilisée. il est donné par la formule suivante : (**Bouguerra et al., 2014**).

$$R_{HE} \% = (M_{HE}/M_V) \times 100$$

R_{HE} : rendement de l'huile essentielle en pourcentage.

M_{HE} : masse de l'huile essentielle extraite en gramme.

M_V : masse de la matière végétale en gramme

I.2.3. Analyse de l'huile essentielle par CG/SM

L'huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). L'analyse de la composition chimique de l'HE a été réalisée au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) d'Alger., selon les conditions opératoires suivantes:

Chromatographie phase gazeuse (CPG)

- Appareil de type GC 6890 N (HP Agilent technologies)
- Colonne : HP 5-MS (crosslinked 5% PHME siloxane)
 - Longueur : 30 m
 - Diamètre interne : 0,250 mm
 - Epaisseur du film de la phase : 0,25 μ m
- Programmation de la température : 35°C en isotherme pendant 2 min puis augmentation de la température à raison de 5°C/min jusqu'à 320°C.
- Mode d'injection : Split à $T^\circ = 250^\circ\text{C}$
- Température de détection : 280°C
- Pression : 6,75 psi
- Gaz vecteur : Hélium
- Débit du gaz vecteur : 1ml/min
- Volume injecté : 0,2 μ l.

Spectrométrie de masse

- Mode de détection : Scan ;
- Appareil : MS-5973 N (HP Agilent Technologies) ;
- Potentiel d'ionisation : 70 eV ;
- Pression (Source, analyseur) : 6,75 Psi.

L'identification des constituants de l'huile essentielle extraite est basée sur la comparaison des spectres de masses des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature.

I.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'huile essentielle de l'écorce *citrus limon* a été déterminée par le test de piégeage du DPPH

I.2.4.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

✓ Principe

Le principe de la méthode est basé sur la mesure de piégeage des radicaux libres de DPPH en solution de méthanol. L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à une décoloration de ce dernier qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydante du produit ajouté. Cette décoloration peut être suivit par un spectrophotomètre en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm.

✓ Mode opératoire

Le test utilisant le radical DPPH est réalisées en suivant la méthode décrites par (Sahin *et al.*, 2004), où 25 µl de chacune des dilutions (100-1000mg/l) préparées à partir de la solution mère constitué de 200mg de l'huile essentielle du citron et 0.5ml de méthanol sont mélangés avec 975µl d'une solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 min à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Les expériences sont réalisées en 3 répétitions pour chaque concentration. Le pourcentage d'activité antioxydante (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$I(\%) = [(A \text{ témoin} - A \text{ éch.}) / A \text{ témoin}] * 100$$

A témoin: Représente l'absorbance du DPPH et le solvant (méthanol) à t=0 min avant l'addition de l'échantillon (huile essentielle) à une concentration donnée.

A éch: Absorbance de l'échantillon testé après 30min d'incubation.

I.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du citron a été appréciée selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les tests ont été effectués au niveau du laboratoire de Mycologie de l'université de Bejaia.

I.2.5.1. Origine et choix des souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ont été choisies pour leur fréquence élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité, et *Dickeya solani*. *Pectobacterium atrosepticum* qui

sont des souches phytopathogène. Les caractéristiques de ces souches bactériennes sont représentées dans le tableau II :

Tableau II : listes et caractéristiques des souches bactériennes testées

Souche bactérienne	Référence	Nature de Gram	Famille	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 8577	Gram+	Micrococcaceae	Intoxication alimentaire Infection hospitalière (Mouasetal.,2017)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC A 404	Gram-	Enterobacteriaceae	Douleur abdominale et des diarrhée sanglante(Mouasetal.,2017)
<i>Dickeyasolani</i>	22.22	Gram-	Enterobacteriaceae	La pourriture molle de la Pommede terre (Des essarts, 2015)
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	86.21	Gram-	Enterobacteriaceae	La pourriture molle de la pomme de terre(Smadjaetal.,2004)

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, pour les deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont été incubées à 37°C pendant 18heures, et pour les deux autres bactéries ont été incubées à 28°C pendant 18heures afin d’obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l’inoculum.

I.2.5.2. Préparation de l’inoculum

A partir d’une culture jeune de 18h, des suspensions bactériennes sont réalisées et misent dans 3 à 4 ml d’eau physiologique stérile. Après une brève agitation au vortex, la transmittance est lue au spectrophotomètre UV-Vis. Pour la lecture de la transmittance, on utilise un spectrophotomètre réglé sur une longueur d’onde de 625 nm et une absorbance ajusté entre 0.08 et 0.10 appropriée pour chaque souche afin d’obtenir une concentration bactérienne de 10⁶ UFC/ml.

✓ Mode opératoire

Cette activité est évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé selon la technique décrite par (Meddour *et al.*, 2013).

Après avoirensemencé en surface à l’aide d’un écouvillon les boites de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton avec une suspension bactérienne jeune, des disques de papier Wathman stériles (6 mm de diamètre) sont déposés sur la surface de la gélose (2 disques par boite), puis imprégné de 5 µl de l’huile essentielle du citron (figure 4). Les boites sont maintenues à 4°C pendant 20 min pour que l’huile essentielle puisse diffuser puis elles ont été incubées dans l’étuve à 37°C pour les *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et à

28°C pour *Dickeya solani* et *Pectobacterium atrosepticum* pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre.

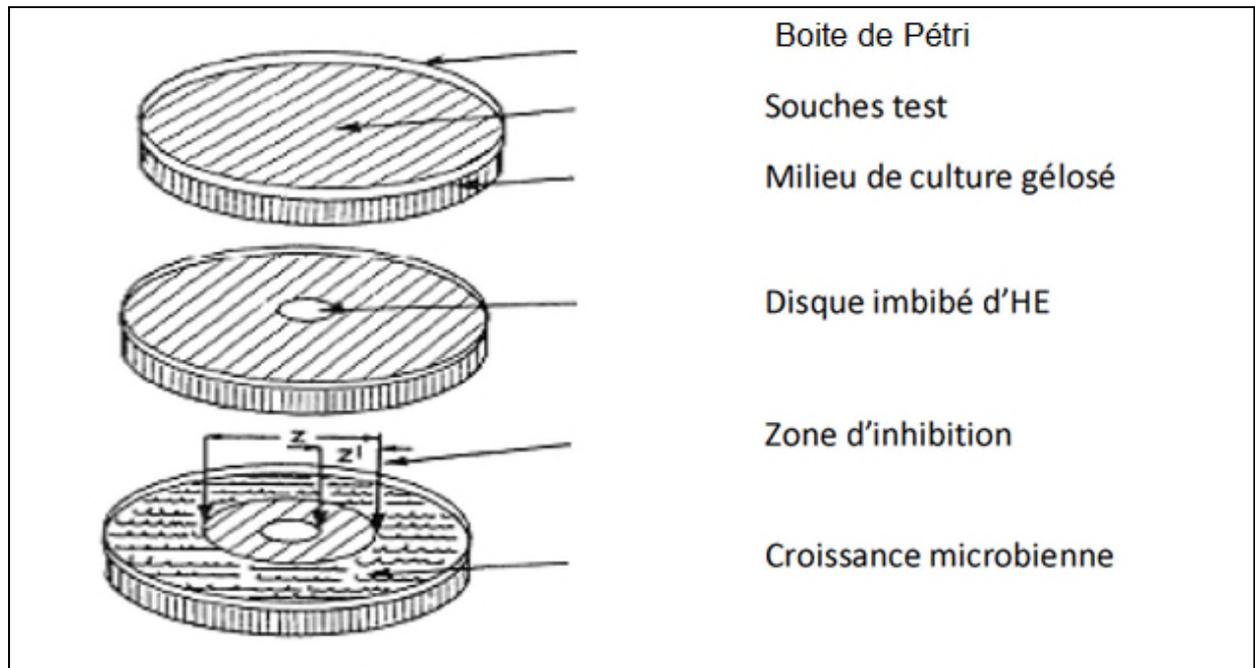


Figure 4 : Illustration de la méthode de diffusion sur le milieu gélosé

II. Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction en huile essentielle

Le rendement d'extraction en huile essentielle de la plante étudiée exprimés en pourcentage poids par rapport à l'écorce des fruits, est indiqué dans le tableau III.

Tableau III : Rendement en huile essentielle de fruits étudié (*Citrus limon*)

Fruit	Rendement par rapport à l'écorce seul (%)	Rendement par rapport au fruit entier (%)
Citron	0,40	0,10

D'après le tableau III, le rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation de l'écorce seul est de l'ordre de 0,40% et pour le fruit entier est de 0,10%.

Ben Miri et al.,(2018) et **Djenane.(2015)** ont trouvé des valeurs de 0,62% et 0,70% avec l'HE de l'écorce de citron frais algérien. Pour le citron tunisien, **Bourgou et al., (2012)** ont signalé un rendement de 1,30% et de 1,12 % pour le citron Pakistanien (**Ahmad et al., 2006**).Par conséquent, les teneurs en HE rapportés par ces auteurs sont plus élevées par rapport à nos résultats.

Cette différence peut s'expliquer par le choix de la période de la récolte, le climat, la géographie, la génétique de la plante, le degré de fraîcheur, la période de séchage et la méthode d'extraction utilisée (**Djenane, 2015**).

D'après **Himed (2011)**, le mode d'extraction a un impact sur le rendement des huiles essentielles. Il a constaté que le rendement obtenu par hydrodistillation est supérieur à celui obtenu par pression à froid.

II.2. Analyse de la composition chimique

L'identification des composés des huiles essentielles par CG/SM a été essentiellement basée sur la comparaison du spectre de masse de la molécule inconnue à celui d'un composé pur fourni par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

Après injection de l'échantillon d'HE du citron selon les conditions opératoires citées précédemment, les résultats obtenus sont résumé dans le tableau IV et le chromatogramme est illustré dans la figure 5.

Tableau IV: Résultats de l'analyse de la composition chimique par CG/SM de l'HE de l'écorce du citron.

N°	Composé	Temps de rétention (min)	Concentration %
1	α -Thujene	9,89	0,20
2	α -Pinène	10,32	2,60
3	β-Pinène	13,08	10,08
4	β -Myrcène	13,94	2,20
5	Limonène	16,74	49,60
6	γ-Terpinène	19,36	14,20
7	α -Terpinolene	20,94	1,00
8	linalool	21,78	0,30
9	β -Thujone	22,02	0,40
10	Citronellal	25,37	0,20
11	α -Terpineol	27,99	0,40
12	Neral	31,79	2,30
13	Citral	34,01	4,00
14	Nerylacetate	39,94	1,40
15	Geranylacetate	41,15	0,80
16	β -Caryophyllene	43,20	1,10
17	α -Bergamotene	44,32	1,40
18	Bicyclogermacrene	47,87	0,30
19	β -Bisabolene	48,88	2,00
	Total		95,20

D'après les résultats du tableau IV, 19 composés ont été identifiés dans l'HE de zeste de citron qui représente environ 95% de la composition chimiques totale.

Les composés majoritaires obtenus dans l'HE essentiel étudiée sont : le Limonène (49,6%), le γ -Terpinène (14,2%), et le β -Pinène (10,2%).

Par comparaison avec les résultats rapportés par la littérature, **Djenane, (2015)** a analysé l'HE de citron locale, il a rapporté que le limonène était le composé majoritaire (51,40%) suivi du β -Pinène (17,04%) et du γ -Terpinène avec 13,46%. Les travaux de **Dongmo et al., (2002)** ont signalé que l'HE du citron Espagnol analysée est riche en limonène avec (56,99%) en β -Pinène (9,74%) et en γ -Terpinène (4,79%).

Hamdan et al., (2013) ont rapporté que le limonène (52,73%), β -Pinène(7,67%), γ -Terpinène(9,88%)étaient les principaux constituants chimique dans l'HE du citron Egyptien.

Selon les auteurs cités précédemment, le pourcentage des composés chimiques de l'HE de citron sont supérieur par rapport à nos résultats.

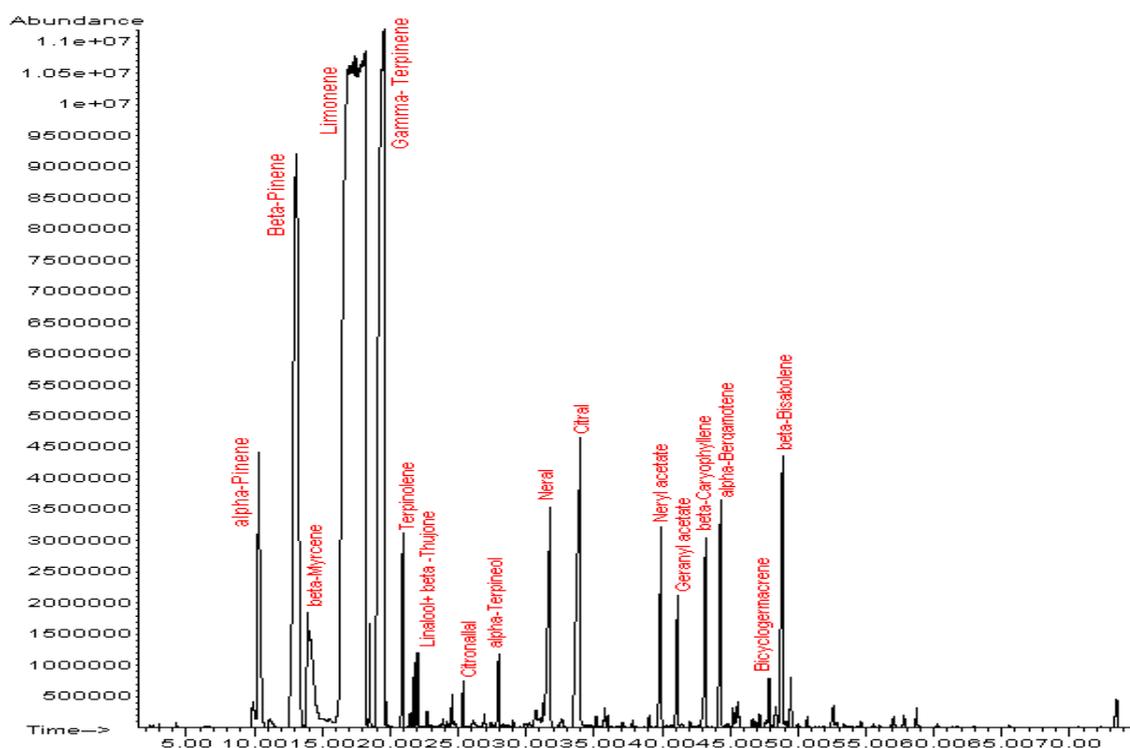


Figure 5 : Chromatogramme de l'HE de *Citrus limon* obtenu par CG/SM

Ces variations qualitatives et quantitatives de la composition chimique de l'HE du citron peuvent dépendre de plusieurs facteurs qui sont : les conditions climatiques, saisonnières, et géographiques, période de la récolte et la technique de distillation. Il convient également de noter que la maturité du fruit a un impact significatif sur le produit chimique (Pannizi *et al.*, 1993 et Djenane, 2015).

II.3.Évaluation de l'activité antioxydante de l'HE de *Citrus limon*

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH sont résumés dans la figure 6 :

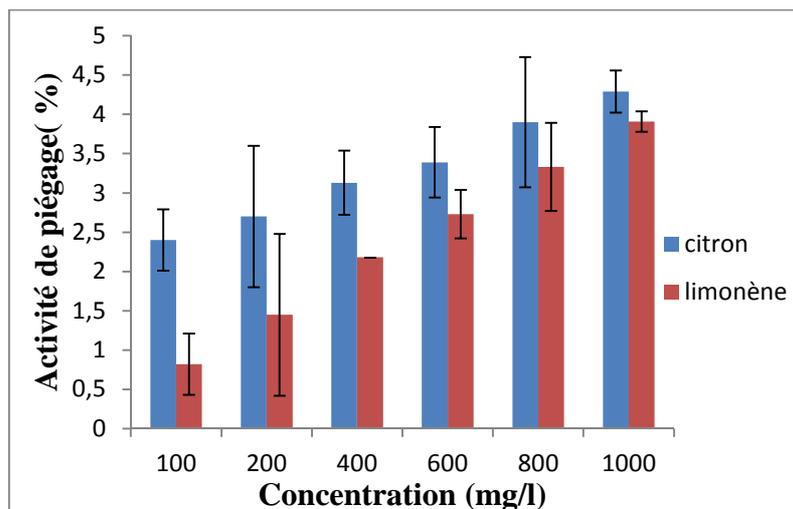


Figure 6 :Activité de piégeage du radical DPPH de l’HE de l’écorce de citron et du limonène

L’activité antioxydante de l’HE de citron a été évaluée en utilisant la méthode de piégeage de radical DPPH en comparant avec celle du limonène (composé majeur de l’HE du citron).D’une façon générale, l’activité antioxydante de l’HE de citron et de limonène montre une très faible activité de piégeage même à des fortes concentrations. On observe que l’HE du citron manifeste une activité supérieure à celle du limonène comme le montre la figure 6.

Par comparaison avec les travaux de **Ben hsouna et al., (2017)**, l’HE de citron tunisienne étudiée montre une forte activité antioxydante. Ils ont enregistré une activité de piégeage équivalente à 90% même à une concentration 100µg/ml.

D’après **Hojjati et Barzegar (2017)**, l’activité antioxydante des huiles essentielles d’écorces de citron dépend essentiellement de la composition chimique de l’huile. En outre, **Saidani et Merzouk (2002)**, ont rapporté que le potentiel antioxydant de l’huile essentielle de l’écorce de citron est directement liée à la teneur en limonène.

II.4.Evaluation de l’activité antibactérienne

La méthode des aromagrammes est la technique choisie pour évaluer l’activité antibactérienne de l’HE de citron. Pour cela 4 souches bactériennes ont été testées.

A cet effet, une échelle de mesure de l’activité antimicrobienne a été mise par (**Ponce et al.,2003**)répartissant les diamètres des zones d’inhibition en 4 classes :

- ✓ Non sensible ou résistante(-) : diamètre < 8 mm
- ✓ Sensible (+) : diamètre entre 8 et 14 mm
- ✓ Très sensible (++) : diamètre entre 14 et 19 mm
- ✓ Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 19 mm

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *Citrus limon* et comparés à celui de l'oxacilline sur les souches testées sont résumés dans le tableau V et illustrés dans les figures 7.

Tableau V : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'HE du citron et de l'oxacilline

Souches bactériennes	HE du citron	oxacilline
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5 ± 0,5	35,35
<i>Escherichia coli</i>	8,0 ± 2,0	6,00
<i>Dickeya solani</i>	37,5 ± 2,5	13,74 ± 0,4
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	9,5 ± 0,5	6,00

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

La figure 8 montre les photographies des résultats obtenus sur boîtes de Pétri de l'activité antibactérienne de l'HE de l'écorce de *citrus limon*.

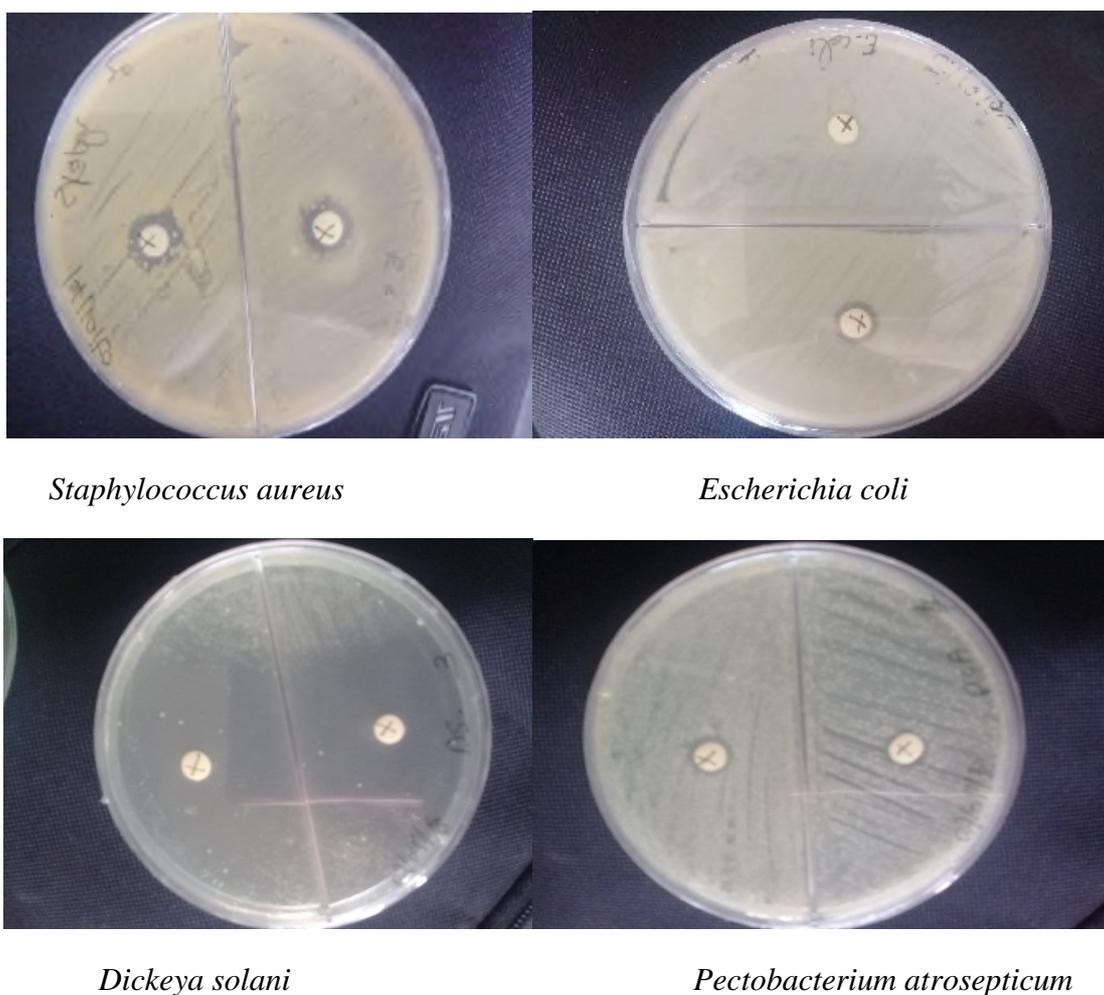


Figure 8 : Zones d'inhibition d'HE de l'écorce de *citrus limon* sur les souches bactériennes testées

Selon l'échelle citée par **Ponce et al. (2003)** :

- La souche *Dickeya solani* est extrêmement sensible à l'huile essentielle du citron (37,5mm).
- Les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Pectobacterium atrosepticum* sont sensibles (12,5mm et 9,5mm).
- *Escherichia coli* s'est avéré la moins sensible à l'action de l'HE de citron avec un diamètre de 8mm.

Concernant l'antibiotique oxacilline, il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis *Escherichia coli* et *Pectobacterium atrosepticum*. En revanche la souche *Staphylococcus aureus* a manifesté une forte sensibilité avec un diamètre de 35,35mm et une légère sensibilité pour la bactérie *Dickeya solani*.

Dans l'ensemble, l'huile essentielle de citron exercent une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram + et même à Gram – comparé à l'oxacilline.

Les travaux de **Deb Roy et al. (2012)** et **DeBillerbeck (2007)** sur l'activité antibactérienne de l'HE du citron, ont trouvé des diamètres de zone d'inhibition de la croissance d'*E.coli* et de *Staphylococcus aureus* de l'ordre respectivement de 8 et de 12mm.

Selon **Oussalah et al. (2007)** le pouvoir antimicrobien des HE est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composés majoritaire.
- Le choix et les conditions physiologiques des microorganismes.

Conclusion et perspectives

Étant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse, une tendance à la préservation des aliments en utilisant des plantes qui contiennent des composés bioactifs est en progression constante. Notre travail a axé sur la mise en évidence des propriétés anti-radicalaire et antibactérienne de l'huile essentielle d'écorces de citron (*Citrus limon*).

L'extraction de l'huile essentielle de l'écorce du citron par la méthode d'hydrodistillation a montré un résultat intéressant. Il est de l'ordre de 0,40% de matière végétale fraîche.

L'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de l'écorce du *Citrus limon* par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, nous a permis d'identifier 19 molécules chimiques. L'huile analysée est dominée par le limonène (49,6%), suivie du γ -terpinène (14,2%) et du β -pinène (10,2%).

L'évaluation de l'activité anti radicalaire de l'huile essentielle du citron et celle du limonène, par la méthode de piégeage du radical DPPH°, a montré de faibles capacités antioxydantes des échantillons analysés même à de fortes concentrations (1000 mg/L).

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode d'aromatogramme a montré que l'huile essentielle de Citron exerce un effet antimicrobien puissant vis-à-vis certaines souches testées, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Dickeya solani* et *Pectobacterium atrosepticum*.

Par ailleurs à l'issue de ce travail, nous émettons quelque réflexions et recommandation sous forme de perspectives pour l'amélioration et une meilleure exploitation des huiles essentielles. Pour ceci il serait souhaitable de :

- ❖ Tester d'autres méthodes d'extractions pour déterminer leur influence sur le rendement en huiles essentielles.
- ❖ Faire une étude comparative de la composition chimique et des effets antimicrobiens et antioxydant des huiles essentielles du citron poussant dans différentes région d'Algérie.
- ❖ Il est intéressant de tester d'autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante telle que les tests de blanchiment du β -carotène et du pouvoir réducteur.
- ❖ Etendre l'étude sur les activités biologiques telle que les activités antifongique, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

A

AFNOR, (1998). Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.

Ahmad, M., Rehman, S., Anjum, F. M., Bajwa, E., (2006).Comparative physical examination of various citrus peel essential oils. International Journal of Agriculture and Biology, 8, pp 186-190.

Anton, R., Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec et Doc*, Paris, pp 522.

Avelessi, F., Dongou, J., Woho, V, D., Alifonou, G, A., Sohounhloue, D, K., Menut, C.(2004). Propriétés antioxydants de l'huile essentielle des feuilles de *clausenaamisata* (Wild) Hook. C.R. chimie 7, 1057-1061.

B

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology. 46: 446– 475.

Bekhechi, C., Abdelouahid, D. (2010). Les huiles essentielles, office des publications universitaires, Edition 1. 04.5145.

Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. In lipids in health and disease 16:146.

Ben miri, Y., Arino, A., Djenane, D.(2018). Study of antifungal, antiaflatoxicogenic, antioxidant activity and photo toxicity of Algerian *Citrus Limonvar. eureka* and *Citrus sisensis* var. Valencia essential oils, journal of essential oil bearing plants, 21:2,345-361.

Bougerra, A., Himed, L., Barkat, M.(2014). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *citrus reticulate*. Société algérienne de nutrition. P 8.

Bourgou, S., Rahali, F., Ourghemmi, I., Saidani, T. M.(2012). Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian *Citrus* during Fruit Maturation .The Scientific World Journal. P.10.

Bourkhis, M., Hnach,M., Paolini,J., Costa,J., Farah,A., Satrani,B.(2010).Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoire des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulatas*(VAHL).Bulletin de la Société Royale des Science de Liège, Vol.79, P.141-154.

Bruneton, J. (1987). Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. 2eme Ed. *Tec et Doc*.Lavoisier. Paris.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.3eme edition, Ed. *Tec et Doc*.Lavoisier, Paris

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4eme Edition. Ed.*Tecet Doc*, Lavoisier, Paris.

Burt, S. (2004). Essential oil, their antibacterial properties and potential application in foods a review. International Journal of Food Microbiologies. 94: 223- 253.

C

Campêlo, L.M., De Almeida, A.A., Mendes de Freitas, R., Cerqueira, G.S., De Sousa, G.F., Saldanha, G.B., Feitosa, C.M., De Freitas, R.M. (2011). Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus Limon* essential oil in Mice. Journal of Biomédecine and Biotechnology.P8.

Cavalli J-F., 2002. Caractérisation par CPG/IK, CPG / SM et RMN du carbone-13 des huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat de chimie organique et analytique. Université de Corse Pascal Paoli, Faculté des Sciences et Techniques, Corte, 274. France.

Chemat, F., Lucchessi, M, E. (2005). Extraction assistée par microonde des huiles essentielles et des extraits aromatique, J. Soc. Ouest-Afr. Chim, 020 ; 77-99.

Couderc, V. L. (2001). Toxicité des huiles essentielles, thèse doctorat. Ecole national vétérinaire, Tou 3-4106.

D

Daouda, T. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatique médicinales de côte d'ivoire. Thèse doctorat, université Felix hoaphou et bioghy en biologie humaine tropicale.

Davidson P.M., Parish M.E., 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*, 43, 148-155.

De Billerbeck, V. G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Pharmacognosie, laboratoireElios, France.

Deb Roy S., Bania1 R., Chakraborty J., Goswami1 R., Laila R., Ahmed S. A., (2012). Pharmacognostic, phytochemical, physicochemical property and antimicrobial activity studies of lemon peel oil J. Nat. Prod. Plant Resour., 2 (3) pp. 431-435.

Des Essart, Y.R. (2015). Pathogénie de *Dickeya solani dianthiocola* et *Dickeya solani* chez *Solanum tuberosum*, développement et évaluation de stratégies de lutte biologique. Thèse doctorat. Science Végétal : du gène à l'écosystème. Université Paris-Sud.

Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4: 208-228.

Dongmo, P, M, J., Kuate, J., Boyom, F, F., Duceller, D., Damesse, F., Zollo, P, H, A., Menut, C., Bessiere, J, M. (2002). Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de citrus sur la croissance mycélienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, vol.57, P.95-104.

E

Ecormier, J. (2001). Les arbres fruitiers, le grand tamarinier, Azalées. Ed. Sainte-Marie, p 230.

F

Fadil, M., Farah, A., Ihssan, B., Halouni, T., Rachiq, S. (2015). Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse. J. Mater. Environ. Sci. 6 (8) 2346-2357. P 12.

FAO. (2010). Food and agriculture organization of the united nation. Perspective à moyen terme pour les produits agricoles.

Fernandez, X., Chemat, F. (2012). La chimie des huiles essentielles tradition et innovation .Ed Vuibert, Paris.

Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. University of Northampton, school of health, park campus, boughtou green road, Northampton. Trends in food science technology 19, 156-164.

G

Goetz, P. (2014). *Citrus limon* (L.) Burm. f. (*Rutacées*) Citronnier. Enseignement de phytothérapie. Springer-verlag, France.

H

Hamdan, D., Ashour, M.L., Mulyaningsih, S., El-Shazly, A. Wink, M. (2013). Chemical composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus x Limon* L. Burm. f.) And their anti-inflammatory and antimicrobial activities. Heidelberg, Germany.

Himed, L. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine. 65 p.

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

Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L., 1998. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. Sciences des aliments, 18, 563-582.

Hojjati, M., Barzegar, H. (2017). Chemical composition and biological activities of lemon (*Citrus Limon*) leaf essential oil. Nutrition and food sciences research. Vol 4, No 4, P: 15-24

K

Kaloustian, J., Minaglou, F, H, (2012). La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer-verlag France paris.

Kelechi, A.K., Elias, D.T., Lawrence, E.O., Chukwuma, O.J. (2017). Effects of *Citrus Limon* juice serum bilirubin, high density lipoprotein and low density lipoprotein in adult male wistar rats under variable models of stress. Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences

L

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Cadre, j. (1994). Biogenèse des monoterpènes, chaîne isoprénique, Bull. Soc. Pharm. 133, 79-99.

Leibig, J. (1841). Traité de chimie organique, librairie de fortin, Masson. Place de l'école de médecine. Paris.

Leroy, E. (2016). Mon amie le citron : le citron et ses bienfaits sur la santé. Bodbooks on demande, amazon, France.

M

Mayer G.B. (1989). Produits PFI- CO₂, une nouvelle génération de produits pour l'alimentation extraits au CO₂. Industries Agro-Alimentaires, 847-853.

Marco, G.L. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants, J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 594 – 8.

Meddour,A .,Yahia, M., Benkiki, N., Ayachi,A.(2013).Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis Spinosa* L. *Lebanese science journal*, vol.14, No.1.

Miller, H.E. (1971). Simplified method for the evaluation of antioxidants, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91 – 97.

MADR, (2012). Ministre de l'agriculture et de développement rural algérien.

Mohanpriya, M., Ramaswamy, L., Rajendran, R. (2013). Health and medicinal properties of lemon (*Citrus limonum*). *International journal of Ayurvedic and Herbal medicine*.3.1 (1095-1100).

Mouas, Y., Benrebaha, F.Z.,Chaouia, C.(2017).Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus Officinalis*.L .*Revue agribiologie*7(1) :363-370.

O

Oussalah,M., Caillet,S., Saucier,L.,Lacroix,M.(2007).inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogene bacteria :*E.coli*157 :H7 ,*Salmonella typhimurium* , *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*,18,414-420.

Oyaizu M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*,44, 307-315.

P

Pal, M., Misra, K., Dhillon, G., Verma, M. (2014). Antioxidants, Exploitation of agro industrial wastes to produce low, cost microbial surfactant (PP-117-138).

Panizzi, L., Flaminni, G., Cioni, P, L., Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology*.39 167-170.

Pibiri, M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. These Doctorat, Lausanne, Canada, 177

Pirbalouti, A; G., Rahimi, B., Moosavi, S, A. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against listeria monocytogenése on chicken frank furthers. Acta agriculture.

Pokonry, J., Yanishlieva N., Gordon H., (2001). Antioxydants in food. Practical application. Wood Head Publishing in Food Science and Technology.

Ponce, A, G., Fritz, R., Delvalle, C., Roura, S, I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native micro flora of organic Swiss Shard. Lebensmwisstechnol 36:697-84.

Pradeau, D., Cohen Y., (1992). L'analyse pratique du médicament. Ed. *Medicalsinternationals*, 418-428.

R

Race, S. (1997). Natural antioxidants, chemistry, health effects, and application editeur fereindoon Shahidi, Memorial University of new found land St Dohn's, new found Canada.

S

Sahin, F., Güllüce, M., D aferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *origanum vulgare ssp. Vulgare* in the Eastern Anotolia region of Tukey. Food Control. 15: 549- 557.

Shebis, Y., Iluz, D., Tahan, Y, K., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y. (2003). Natural antioxidants function and sources. Food and nutrition science. 4, 643-649.

Saidani, M., Merzouk, B. (2002). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. Laboratoire adaptation et d'amélioration des plantes. Phytochemistry 62:1283-1289.

Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., Orange, N (2004). Involvement of N-acylhomoserine lactones Throughout plant infection by

ermine *carotovorasub sp. atroseptica (Pectobacterieum atrosepticum)*. The American phytopathological society. Vol. 17, No. 11, pp.1269-1278.

T

Taghi-golmakani, M., Moayyedi, M.(2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave assisted extraction method of essential oil from *citrus Limon* (Lisbon variety) peel. Food Science and Nutrition 3(6):506-518.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S. (2014). Essential oil: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. Conciste review in food science.

U

Ullah, J., Hamayoum, M., Ahmad, T., Ayub, M., Zofarullah, M. (2003). Effect of light, natural and synthetic antioxidants on stability of edible oil and fats Asian journal of plant science 2 (17-24) 1192-1194.

V

Venturini, N. (2012). Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples Des spiritueux de myrte (*Myrtuscommunis L*) et de cédrat (*Citrus medica L*) de corse. Thèse doctorat en chimie. Ecole doctorale environnement et société UMR CNRS 6134 (SPE). P 242.

Y

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J. P., SRIVATVA, S., Prahba, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body, up council of agriculture research. Res. Environ. Life Sci. 9(11) 1328-1331.

Z

Zhiri, A. (2006). Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. Science, Nutrition, prévention et santé. Edité par la fondation pour le libre choix. 1-16.

Résumé

Le but de ce travail est l'évaluation *in vitro* l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de l'écorce d'une espèce aromatique *Citrus limon*, extraite par hydrodistillation et analysé par GC/SM, l'activité antioxydante est évalué par le test de DPPH, l'activité antibactérienne vis-à-vis 4 souches bactériennes (une souche à Gram positif et 3 souches à Gram négatif) est évaluée par la méthode aromatogramme. L'extraction a donné un rendement de 0,40%, et l'analyse chromatographique a donné 19 molécules dont 3 sont majoritaires : limonène (49,60%), γ -térpinène (14,20%), β -pinène (10,08%). Cette l'huile essentielle a montré une très faible activité antioxydante et un effet antibactérien important vis-à-vis certaines souches.

Mots clés : *Citrus limon*, huile essentielle, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstrat

The aim of this work is the *in vitro* evaluation of antioxidant and antibacterial activity of essential oil of the bark of an aromatic species *Citrus limon*, extracted by hydrodistillation and analyzed by GC/MS, the antioxidant activity is evaluated by the DPPH test, the antibacterial activity with respect to 4 bacterial strains (one was Gram+ and 3 Gram-) is evaluated by the aromatogram method. The extraction gave a yield of 0.40%, and the chromatographic analysis gave 19 molecules of which 3 are in the majority: limonene (49.60%), γ -terpine (14.20%), β -pinene (10, 08%). This essential oil has shown a very low antioxidant activity and an important antibacterial effect vis-à-vis certain strains.

Key words: *Citrus limon*, essential oil, antioxidant activity, antibacterial activity.