



الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية الجزائرية وزارة تعليم العالي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID -TLEMCEEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Bio activités, Analyses et Contrôle des Huiles Essentielles et Végétales.

Présenté par :

CHEMOURI Cherifa.

Extraction et évaluation des activités biologiques de deux huiles essentielles de citron de la région de Tlemcen

Soutenu le : 30 /06 /2025 , devant le jury composé de :

Présidente : Pr. CHAOUICHE Farah

Université de TLEMCEEN

Examinatrice : Dr. DIB Hanane

Université de TLEMCEEN

Encadrant : Dr. SELADJI Meryem

Université de TLEMCEEN

2024/2025

Dédicace :

Je dédie ces pages à ceux qui ont semé l'espoir sur mon chemin,

À mes parents, phares lumineux de ma vie,

À mes frères, compagnons de toujours,

À mes mentors qui ont façonné ma réflexion,

Et à tous ceux qui ont marqué mon parcours de leur empreinte.

Remerciements :

Avant toute chose, je loue Allah, le Très-Haut, de m'avoir bénie avec la résistance, la motivation, la santé et surtout l'endurance nécessaires pour traverser ces cinq années d'études et concrétiser ce projet de recherche.

Je désire remercier chaleureusement Mme **SELADJI Meryem**, Maître de conférences A au Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail avec bienveillance et professionnalisme. Ses conseils pertinents, ses corrections constructives et sa présence rassurante ont été des atouts majeurs tout au long de cette aventure scientifique.

Mes sincères remerciements vont également à **Mme CHAUCHE Farah**, Professeur à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie), pour l'honneur qu'elle m'a porté en présidant ce jury.

Mes sincères remerciements s'adressent à **Mme DIB Hanane**, Maître de conférences A au Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, qui m'honore en acceptant d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier **Mme KENICHE**, Directrice du laboratoire COSNA, pour m'avoir permis d'effectuer les extractions d'huile essentielle. Je tiens à remercier aussi **Mme BEKHECHI**, Professeure à l'Université de Tlemcen, pour son aide durant l'extraction des huiles essentielles.

Je remercie les propriétaires d'exploitations : **M. FARWANI Ahmed**, Directeur d'agronomie IAP, et **M. TALEB Mourad**, pour leur aide généreuse et l'autorisation de procéder à la récolte de Citron dans leurs domaines.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Melle BOUKLI Marwa** pour son aide précieuse, sa disponibilité constante et son accompagnement tout au long de la préparation de ce mémoire. Son soutien, ses conseils avisés et sa bienveillance ont été d'une grande importance pour l'aboutissement de ce travail. Je lui suis profondément reconnaissante pour le temps qu'elle m'a consacré et l'attention qu'elle a portée à chaque étape de mon parcours.

Enfin, je témoigne ma gratitude la plus sincère à mes parents pour leur appui constant, à toute ma famille, ainsi qu'à toutes les personnes qui comptent dans ma vie.

Résumé

Les fruits des agrumes représentent une source importante de composés bioactifs bénéfiques pour la santé humaine. L'objectif de ce travail est la valorisation de l'huile essentielle (HE) extraite de l'écorce de citron (*Citrus limon*) récoltée dans deux stations (El Fehoul et Saf Saf) de la wilaya de Tlemcen, en déterminant : les rendements en HE et les activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne *in vitro*).

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation. Les rendements sont très variables, allant de 0,10 à 0,62% pour El Fehoul et de 0,10 à 0,36% pour Saf Saf. Cependant, les échantillons prélevés dans la station d'El Fehoul sont les plus riches en huile essentielle (moyenne = 0,34% contre 0,20% pour Saf Saf).

La première partie a été consacrée à l'étude de l'activité antioxydante des deux échantillons. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical DPPH a montré que l'échantillon d'El Fehoul présente un pouvoir réducteur de l'ordre de 50,22% contre 44,32% pour Saf Saf à la concentration de **430 mg/mL**. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont de l'ordre de **431,5 mg/mL** pour El Fehoul et **1271,3 mg/mL** pour Saf Saf. En revanche, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé, l'acide ascorbique, avec une IC₅₀ de **49,7 mg/MI**.

Dans un deuxième temps, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des deux stations a été évaluée à l'aide de deux approches complémentaires : la diffusion sur disque et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les résultats obtenus par diffusion sur disque révèlent une efficacité particulièrement marquée pour l'huile essentielle de Saf Saf, qui induit des diamètres d'inhibition très élevés contre *Bacillus subtilis* (79,0 mm), *Staphylococcus aureus* (73,5 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (65,0 mm). L'huile issue d'El Fehoul présente également une activité antibactérienne, mais avec des diamètres plus modestes, variant entre 18,3 mm et 22,0 mm selon les souches testées.

L'analyse par la méthode de la CMI vient confirmer et affiner ces observations. Pour *Staphylococcus aureus*, la CMI de l'huile de Saf Saf est de 10 µL/mL, tandis que celle d'El Fehoul atteint 40 µL/mL, traduisant une efficacité quatre fois moindre. *Bacillus subtilis* est inhibé à une concentration de 5 µL/mL avec l'huile de Saf Saf, contre 20 µL/mL pour El Fehoul. De même, pour *Pseudomonas aeruginosa*, la CMI est de 20 µL/mL pour Saf Saf et 50 µL/mL pour El Fehoul.

Concernant *Candida albicans*, la souche fongique testée, une forte sensibilité est observée avec une CMI extrêmement basse de 0,625 µL/mL pour l'huile de Saf Saf, contre 5 µL/mL pour celle d'El Fehoul. Ce résultat confirme le pouvoir antifongique supérieur de l'échantillon de Saf Saf.

En revanche, aucune activité n'a été détectée à l'égard de *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* pour les deux huiles, que ce soit par diffusion sur disque ou par microdilution, indiquant une absence totale d'effet inhibiteur sur ces souches.

Ces résultats démontrent la bonne corrélation entre les deux méthodes utilisées et mettent en évidence une efficacité nettement plus élevée de l'huile essentielle de Saf Saf comparée à celle d'El Fehoul, tant pour les souches bactériennes que fongiques sensibles.

En perspective, cette étude ouvre des voies prometteuses pour le développement d'alternatives naturelles aux produits de synthèse dans les secteurs thérapeutique et cosmétique, nécessitant toutefois des investigations complémentaires sur la composition chimique et l'élargissement du spectre d'activité biologique.

Mots clés : *Citrus limon*, huile essentielle, composition chimique, pouvoir antioxydant, DPPH, activité antimicrobienne, hydrodistillation.

Abstract

Citrus fruits offer a diverse range of health benefits due to their abundance of bioactive compounds. The aim of this study is to valorize the essential oil (EO) extracted from lemon peel (*Citrus limon*) collected from two locations (El Fehoul and Saf Saf) in Tlemcen province, by determining EO yields and biological activities (antioxidant and antimicrobial properties *in vitro*).

EO extraction was carried out using hydrodistillation. The yields varied significantly from 0.10% to 0.62% for El Fehoul and from 0.10% to 0.36% for Saf Saf. However, samples from El Fehoul station exhibited the highest EO content (average = 0.34% vs 0.20% for Saf Saf).

The first part focused on studying the antioxidant activity of both samples. Evaluation of antioxidant activity using the DPPH radical scavenging method revealed that El Fehoul sample exhibited a reducing power of approximately 50.22% compared to 44.32% for Saf Saf at **430 mg/mL** concentration. The IC_{50} values obtained were approximately **431.5 mg/mL** for El Fehoul and **1271.3 mg/mL** for Saf Saf. However, this activity remained low compared to the reference antioxidant used, ascorbic acid, with an IC_{50} of **49.7 mg/mL**.

In the second phase of this study, the **antimicrobial activity** of the essential oils extracted from the two stations (Saf Saf and El Fehoul) was evaluated using two complementary approaches: **disk diffusion** and **Minimum Inhibitory Concentration (MIC)** determination.

The results obtained from the disk diffusion method revealed a particularly strong effectiveness of the **essential oil from Saf Saf**, showing **very large inhibition zones** against *Bacillus subtilis* (79.0 mm), *Staphylococcus aureus* (73.5 mm), and *Pseudomonas aeruginosa* (65.0 mm). The oil from El Fehoul also exhibited antibacterial activity but with **more modest inhibition zones**, ranging from **18.3 mm to 22.0 mm**, depending on the tested strains.

The MIC method confirmed and refined these findings. For *Staphylococcus aureus*, the MIC of Saf Saf oil was **10 µL/mL**, while that of El Fehoul reached **40 µL/mL**, indicating **four times lower effectiveness**. *Bacillus subtilis* was inhibited at **5 µL/mL** with Saf Saf oil, compared to **20 µL/mL** for El Fehoul. Similarly, for *Pseudomonas aeruginosa*, the MIC was **20 µL/mL** for Saf Saf and **50 µL/mL** for El Fehoul.

Regarding *Candida albicans*, the tested fungal strain, a high sensitivity was observed, with an extremely low MIC of **0.625 µL/mL** for the Saf Saf oil, versus **5 µL/mL** for El Fehoul. This result confirms the **superior antifungal power** of the Saf Saf sample.

In contrast, **no activity** was detected against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* for either of the oils, whether using the disk diffusion or microdilution method, indicating a **total lack of inhibitory effect** on these strains.

These results demonstrate a **strong correlation between the two methods** used and highlight a **significantly higher antimicrobial efficacy** of the Saf Saf essential oil compared to that from El Fehoul, both for sensitive bacterial and fungal strains.

In perspective, this study opens promising avenues for developing natural alternatives to synthetic products in therapeutic and cosmetic sectors, requiring however complementary investigations on chemical composition and broadening of the biological activity spectrum.

Keywords: *Citrus limon*, essential oil, Tlemcen, antioxidant capacity, DPPH, antimicrobial activity, terroir, hydrodistillation

الملخص

تقدم ثمار الحمضيات مجموعة متنوعة من الفوائد الصحية بفضل ثرائها بالمركبات النشطة بيولوجياً. الهدف من هذا العمل هو تثمين الزيت الأساسي (HE) المستخرج من قشر الليمون (*Citrus limon*) المحصول في محطتين (الفحول وصاف صاف) بولاية تلمسان، من خلال تحديد: المردود من الزيت والأنشطة البيولوجية (مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات في المختبر).

تم استخلاص الزيوت العطرية عن طريق التقطير المائي. تختلف العوائد على نطاق واسع، حيث تتراوح من 0,10 إلى 0,62% للفحول ومن 0,10 إلى 0,36% لاصاف صاف. إلا أن العينات المأخوذة من محطة الفحول هي الأغنى بالزيت العطري (متوسط = 0,34% مقابل 0,20% لاصاف صاف).

خصص الجزء الأول لدراسة النشاط المضاد للأكسدة للعينتين. أظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة بواسطة طريقة الاصطياد الجذري DPPH أن عينة الفحول تقدم قوة اختزالية في حدود 50,22% مقابل 44,32% لاصاف صاف عند تركيز 430 ملغ/مل. قيم IC_{50} المحصل عليها هي في حدود 431,5 ملغ/مل للفحول و 1271,3 ملغ/مل لاصاف صاف. من ناحية أخرى، يظل هذا النشاط منخفضاً مقارنة بمضاد الأكسدة المرجعي المستخدم، وهو حمض الأسكوربيك، مع IC_{50} يبلغ 49,7 ملغ/مل.

في المرحلة الثانية من هذا العمل، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية المستخلصة من محطتي Saf Saf (CMI) وتحديد التركيز المثبط الأدنى بطريقة الانتشار على الأقراص باستخدام طريقتين متكاملتين El Fehoul و

، حيث سجلت Saf Saf نتائج طريقة الانتشار على الأقراص عن فعالية ملحوظة للزيت الأساسي المستخرج من *Staphylococcus aureus* (73,5 مم) و *Bacillus subtilis* (79,0 مم) ضد أقطار تثبيط كبيرة جداً ، فقد أظهر أيضاً نشاطاً مضاداً El Fehoul أما الزيت المستخرج من *Pseudomonas aeruginosa* (65,0 مم). حسب السلالة المختبرة مم 22,0 و 18,3 للبكتيريا، لكنه كان أقل فعالية، حيث تراوحت أقطار التثبيط بين

بالنسبة. هذه الملاحظات وعمقتها، حيث تم تحديد تركيز الزيت اللازم لإيقاف نمو الميكروبات CMI أكدت طريقة El زيت /مل ميكرو لتر 40 مل، بينما كانت /ميكرو لتر 10 Saf Saf لزيت CMI، بلغت *Staphylococcus aureus* - ، فقد تم تثبيطها *Bacillus subtilis* وبالنسبة لـ. كانت أربع مرات أقوى Saf Saf، مما يعني أن فعالية زيت Fehoul *Pseudomonas aeruginosa* وبالنسبة لـ. El Fehoul. لزيت /مل ميكرو لتر 20، مقارنة بـ Saf Saf مع زيت /مل ميكرو لتر 5 بتركيز El زيت /مل ميكرو لتر 50، و Saf Saf لزيت /مل ميكرو لتر 20 CMI، كانت *aeruginosa*

0,625 فقط Saf Saf لزيت CMI، فقد أظهرت نتائج مذهلة، حيث بلغت *Candida albicans* أما بالنسبة للفطر Saf Saf. لزيت ، مما يدل على قوة التأثير المضاد للفطريات El Fehoul لزيت /مل ميكرو لتر 5 مل، مقابل /ميكرو لتر

لكل من الزيتين، *Escherichia coli* و *Enterococcus faecalis* من ناحية أخرى، لم يتم تسجيل أي نشاط مضاد تجاه تجاه هاتين السلالتين ، مما يدل على غياب تام للتأثير المثبط CMI سواء بطريقة الأقراص أو بطريقة

Saf Saf توضح هذه النتائج وجود توافق جيد بين الطريقتين المستخدمتين، وتبرز فعالية الزيت الأساسي المستخرج من ، سواء ضد السلالات البكتيرية أو الفطرية الحساسة El Fehoul مقارنة بزيت بشكل أكبر

من منظور مستقبلي، تفتح هذه الدراسة آفاقاً واعدة لتطوير بدائل طبيعية للمنتجات الاصطناعية في القطاعين العلاجي والتجميلي، مما يتطلب مع ذلك تحقيقات كيميائية حول التركيب الكيميائي وتوسيع طيف النشاط البيولوجي.

الكلمات المفتاحية: الحمضيات الليمونية، الزيت العطري، تلمسان، قوة مضادات الأكسدة، DPPH، النشاط المضاد للميكروبات، التيروار، التقطير المائي.

Table des matières

Introduction générale

Partie1:Synthèse bibliographique

Historique.....	I.
4.....	
Origine des agrumes.....	II.
4.....	
Définition :	1.
5.....	
Diversité des agrumes :	2.
6.....	
Importance des agrumes dans le monde	3.
6.....	
Importance des agrumes en Algérie	4.
7.....	
Importance des agrumes à Tlemcen	5.
7.....	
Généralité sur le citron	III.
8.....	
A. Origine génétique et géographique du citron (<i>Citrus limon</i>)	8
B. Description botanique de <i>Citrus limon</i>	9
Le fruit	9
Ses Fleurs.....	9
C. Classification botanique (Martínez et al., 2020).....	10
D. Variétés de citron :.....	11
IV. Huile essentielle de citron :.....	11
a. Caractéristiques principales	12
• Méthodes d'obtention.....	12
• Les principales caractéristiques de l'huile essentielle de zeste de citron sont les suivantes (Hellal, 2011) :	12
b. Propriétés et indications thérapeutiques de l'huile essentielle de citron	13
i. Applications traditionnelles	13
ii. Propriétés pharmacologiques modernes	13
V. Travaux antérieurs.....	14
1.1. Composition chimique :	14
2. Activités biologiques :	23
2.1. Activité antioxydante.....	24
2.2. Activité antimicrobienne.....	25
2.3 Autre activité :	27

VI. Analyse d'un mélange huile essentielle	28
1) Analyse qualitative d'un mélange complexe	28
2) CPG et GC-MS : Analyse Avancée des Composés Volatils :	28
3) La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	30
1. Matériel végétal	33
2. Localisation géographique.....	34
3. Procédé d'extraction des huiles essentielles	34
4. Détermination du rendement en huile essentielle	
5. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle du zeste de <i>Citrus limon</i> :	37
5.1. Activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste de <i>Citrus limon</i>	37
A. Principe de la méthode.....	38
○ Mécanisme réactionnel.....	38
○ Détection spectrophotométrique	39
5.2. Activité Antimicrobienne de l'huile essentielle du zeste de <i>Citrus limon</i>.....	40
1. Mise en Culture des Souches	41
II. Méthodes d'Évaluation de l'Activité Antimicrobienne.....	41
2.1 Méthode de Diffusion sur Disque (Aromatogramme)	42
2.2 Méthode de Micro-dilution en Milieu Liquide	43
B. III. Difficultés Techniques	43
C. IV. Conditions d'Asepsie et de Stérilisation.....	44
Résultats et Discussion	45
1. Rendement en huile essentielle des différents échantillons.....	46
2.Étude des activités biologiques de l'huile essentielle du zeste de <i>Citrus limon</i>	
2.1 Activité antioxydante	49
2.2 Activité antimicrobienne :	53
2.2.1 Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque .	53
2.2.2 Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de contact direct.....	56
Conclusion.....	59
Références bibliographiques	62
Annexes	72

Abréviations

HE : Huile essentielle.

HEF : Huile essentielle EL Fehoul

HES : Huile essentielle SAF SAF

JC : Avant Jésus-Christ.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ERN : Espèces Réactives de l'Azote

CMI : Concentration minimale inhibitrice

UV : Ultra-violet

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50%.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Liste des figures :

Figure 1 Origine et dispersion des agrumes à travers le monde, (Kamiri, 2011).....	5
Figure 2 Structure anatomique d'un fruit d'agrumes (dessin© F. Curk-INRAEJ), (Luro et al., 2022).....	6
Figure 3 Illustration botanique de <i>Citrus × latifolia</i> (limettier de Tahiti)	10
Figure 4 Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG)	29
Figure 5 Schéma de principe d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN)	31
Figure 6 Schéma simplifié d'un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC)	Erreur ! Signet non défini.
Figure 7 Situation des sites d'échantillonnage de <i>C. limon</i> dans la région de Tlemcen	34
Figure 8 Mécanisme d'action d'un antioxydant sur le radical DPPH.....	39
Figure 9 Pourcentages de rendement en huile essentielle obtenus à partir du zeste de Citron limon récolté à la station d'EL Fehoul	46
Figure 10 des disparités notables entre les échantillons. La station d'El Fehoul affiche des performances comprises entre 0,21% et.....	47
Figure 11 Évaluation comparative des rendements en huile essentielle (%) du zeste de Citrus limon provenant des deux stations	47
Figure 12 Rendements moyens (%) en huile essentielle du zeste de Citrus limon issus des deux stations.....	48
Figure 13 Évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle du zeste de citron limon	50
Figure 14: Évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle du zeste de citron limon	50

Figure 15 :Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'HE de Citrus limon comparée aux standards (SAF SAF, FEHOUL et Acide ascorbique)..... 51

Figure 16 Comparaison des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles de Citrus limon issues de Fehoul (HEF) et Saf Saf (HES) sur différentes souches microbiennes. 54

Liste des tableaux :

Tableau 1 Caractéristiques morphologiques (Klimek-Szczykutowicz et al., 2020)	9
Tableau 2 Exemples de variétés de citron et leurs caractéristiques (Zerbani, 2020)	11
Tableau 3 Composition chimique de l'huile essentielle de CITRON LIMON rapportée dans la littérature	15
Tableau 4 Analyse des travaux scientifiques relatifs à l'activité antimicrobienne d'huile Citron limon	25
Tableau 5 Origines des souches bactérienne utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	41
Tableau 6 Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'huile essentielle de Citrus limon des différents échantillons testés exprimée en IC50.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 7 moyenne des zones d'inhibitions d'huile essentielle de citron limon région El Fehoule	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 8 Résultats de l'activité antimicrobienne par contact direct (puits actifs)	56

Introduction Générale

L'Algérie dispose d'un patrimoine agrumicole riche et diversifié, particulièrement concentré dans les régions nordiques à climat méditerranéen, où la culture des agrumes revêt une importance stratégique, tant sur le plan économique qu'agronomique (Aroua, 2019). Parmi les espèces cultivées, le citronnier (*Citrus limon*) se distingue par ses multiples vertus et usages dans divers domaines. Utilisé depuis l'Antiquité comme aliment et comme remède naturel, le citron occupe une place notable dans les traditions médicinales à travers le monde.

Appartenant à la famille des Rutacées, le citronnier trouve ses origines en Asie du Sud-Est, notamment dans le nord-est de l'Inde, en Chine et en Malaisie, où sa culture est attestée depuis plus de 3000 ans (Chevalier, 1943). Il s'agit d'un hybride naturel issu du croisement entre *Citrus medica* (cédratier) et *Citrus aurantium* (bigaradier) (Calabrese, 2002). Introduit dans le bassin méditerranéen à l'époque de l'expansion arabo-musulmane, cet arbre s'est largement implanté dans les zones tropicales et subtropicales du globe (Butelli et al., 2017).

La consommation d'agrumes est associée à une réduction du risque de nombreuses pathologies, en grande partie grâce à la richesse de ces fruits en composés bioactifs capables de neutraliser les radicaux libres et de prévenir le stress oxydatif (Ghorbanpour et al., 2017). L'huile essentielle extraite du zeste de citron se distingue par sa forte teneur en monoterpènes, notamment le limonène (65 à 75 %), auquel sont attribuées plusieurs activités pharmacologiques, telles que des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et hépatoprotectrices (Kačániová et al., 2024). D'un point de vue médicinal, le citron est reconnu pour ses effets antiscorbutiques, dermatologiques, digestifs et cicatrisants (Mohanapriya et al., 2013).

En Algérie, la culture du citronnier est bien représentée, notamment dans les régions sahariennes du nord telles que la wilaya de Ghardaïa, où elle couvre une superficie dépassant les 700 hectares (MADR, 2021). La région de Tlemcen, située au nord-ouest du pays, bénéficie d'un climat méditerranéen propice à la culture des agrumes et constitue un terroir favorable à la production d'huiles essentielles de haute qualité (Settaoui et al., 2017).

Dans un contexte de recherche croissante de solutions naturelles pour remplacer les produits de synthèse, les huiles essentielles d'agrumes suscitent un intérêt accru en raison de leur efficacité biologique et de leur faible toxicité. Ce travail vise à contribuer à la valorisation du *Citrus limon*, espèce appartenant à la famille des Rutacées, à travers l'étude de spécimens récoltés dans deux stations agricoles de la région de Tlemcen : El Fehoul et Safsaf.

Introduction générale

Les objectifs de cette étude sont, d'une part, de déterminer les rendements en huile essentielle de zestes prélevés sur différents individus, et d'autre part, d'évaluer leurs activités antioxydante et antimicrobienne. Le mémoire est structuré en trois parties : la première est une synthèse bibliographique abordant les généralités sur les agrumes, la description botanique du *Citrus limon* et les propriétés des huiles essentielles. La seconde partie est dédiée à la méthodologie expérimentale, incluant la collecte du matériel végétal, l'extraction des huiles et l'évaluation des activités biologiques. Enfin, la troisième partie présente et discute les résultats obtenus, suivie d'une conclusion et de perspectives de recherche.

Parité 1:

Synthèse bibliographique

I. Historique

Entre les périodes de crises qu'a connues la Corse, notamment les soulèvements contre Gênes et la stagnation économique entre 1875 et 1957, une phase de prospérité agricole s'est développée sous les règnes de Louis XV, Louis XVI, Napoléon Ier et Napoléon III. L'agrumiculture y joue un rôle central, encouragée par les politiques publiques et portée par un climat favorable (**Praloran, 1965**).

Des témoignages littéraires du XIXe siècle, comme ceux de Balzac (1841) ou Daudet (1869), soulignent la renommée des agrumes corses, notamment les oranges d'Ajaccio. Des récits plus descriptifs, comme ceux de Testu (1879) et Ardouin-Dumazet (1898), confirment l'importance de cette culture sur tout le littoral, avec une prédominance du cédratier cultivé jusqu'à 400 m d'altitude (**Praloran, 1965**).

Les régions de Bastia, Ajaccio, la Balagne, Porto ou Vescovato étaient alors des centres majeurs de production. En 1896, le port de Bastia expédiait plus de 1 500 tonnes de cédrats, et la vallée de Porto comptait près de 4 000 arbres en production.

La présence actuelle de vieux arbres encore productifs témoigne de la résilience de cette tradition. Le déclin du secteur s'explique surtout par des causes politico-économiques et l'exode rural, plus que par des limites climatiques ou agronomiques. La relance de l'agrumiculture pourrait ainsi représenter un levier de développement durable pour l'île (**Praloran, 1965**).

II. Origine des agrumes

Les agrumes trouvent leur origine en Asie du Sud-Est, notamment dans les régions tropicales et subtropicales de la Chine, de l'Inde et de l'Indonésie. Leur diffusion s'est faite progressivement vers l'ouest à travers les routes commerciales, atteignant le bassin méditerranéen grâce aux échanges entre les civilisations anciennes. C'est dans cette région que les agrumes ont été largement cultivés, diversifiés et intégrés dans l'agriculture locale (**Wu et al., 2018**).

Au fil des siècles, la culture des agrumes a évolué, s'adaptant aux conditions climatiques locales et aux préférences des marchés. À partir du XXe siècle, la production s'est fortement industrialisée, notamment dans les pays exportateurs de jus comme le Brésil et les États-Unis.

Cependant, au cours de la campagne 2006-2007, un tournant s'est opéré. Pour la première fois de son histoire, la région méditerranéenne a franchi le seuil des 20 millions de tonnes de production, marquant un record absolu. Cette hausse confirme une dynamique de croissance amorcée après des années de stagnation entre 16 et 17 millions de tonnes jusqu'en 2003-2004. Tous les groupes variétaux ont vu leur production augmenter, à l'exception du pomelo **Figure1 (Wu et al., 2018)**.

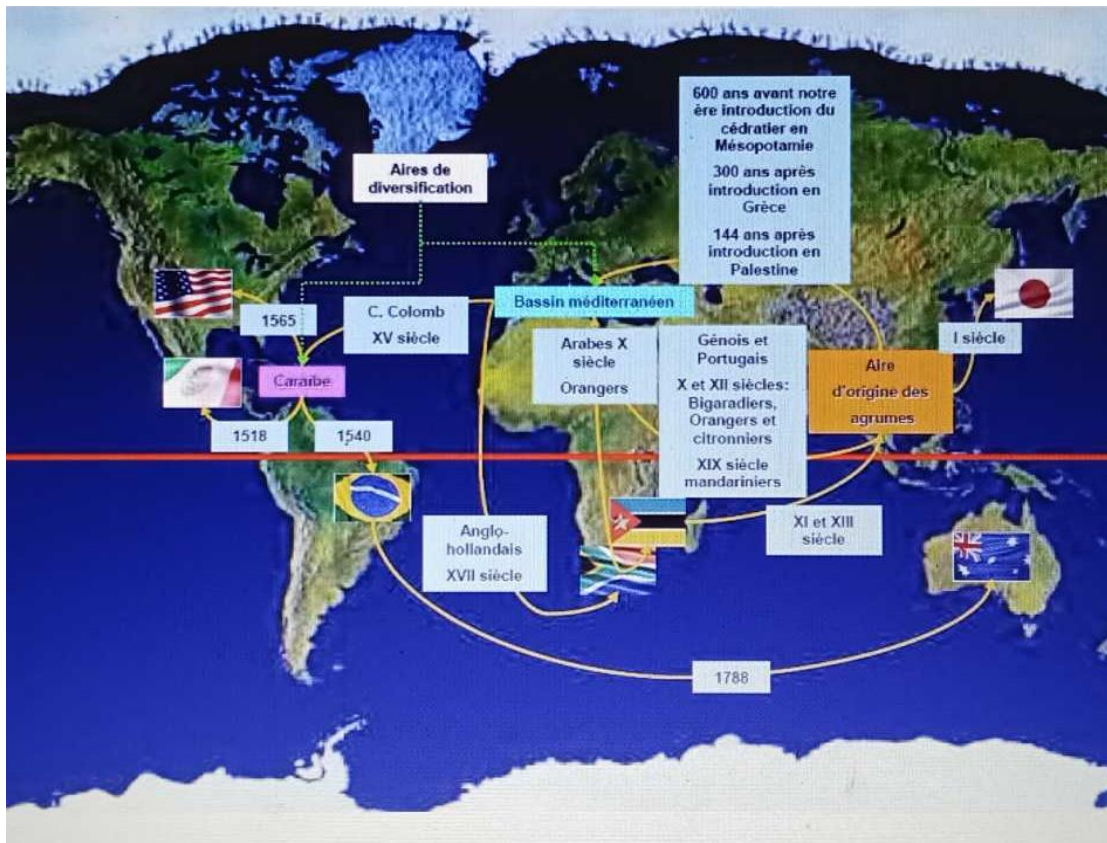


Figure 1 Origine et dispersion des agrumes à travers le monde, (Kamiri, 2011)

1. Définition :

Les agrumes sont des fruits issus d'arbres de la famille des Rutacées, principalement du genre Citrus et apparentés. Le mot "agrumes" vient du latin acrumen, signifiant "aigre", en référence à leur goût généralement acidulé. Ce sont des fruits appelés hespérides, composés :

1. D'une peau :

- La couche externe (flavédo ou zeste) est colorée et riche en huiles essentielles parfumées.
- La couche interne (albédo ou ziste), blanche et spongieuse, varie en épaisseur (Luro et al., 2022).

2. De quartiers internes (issus des carpelles) :

- Contiennent des vésicules remplies de jus riche en eau, en sucres, en acides organiques, en pigments (comme les caroténoïdes) et en sels minéraux.
- Chaque quartier peut contenir des pépins (Luro et al., 2022).

3. **D'un axe central** (columelle), parfois creux ou rempli, parfois absent. Taxonomiquement, les agrumes appartiennent à six genres compatibles entre eux : *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* (kumquats), et *Citrus*, ce dernier regroupant les espèces les plus cultivées au monde Figure2 (Luro et al., 2022).

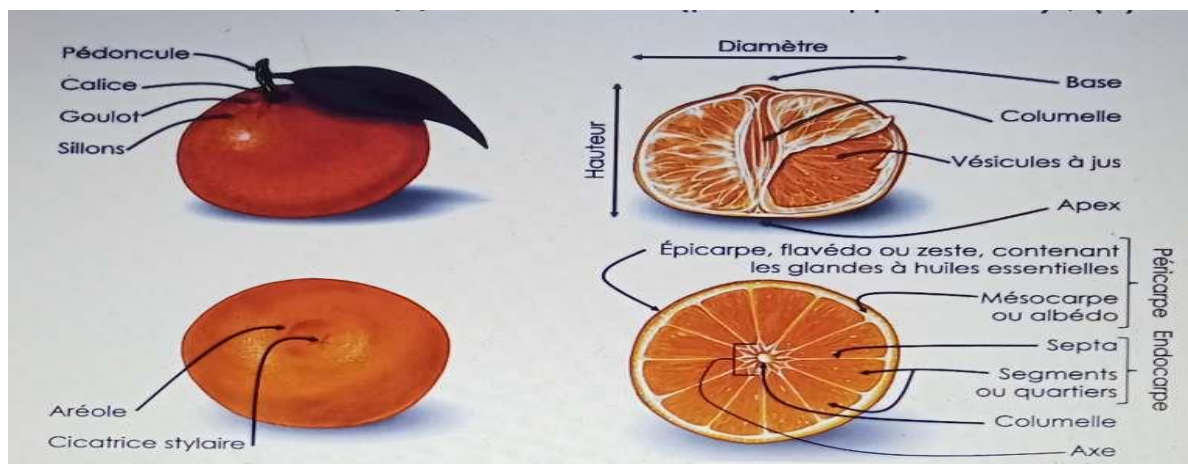


Figure 2 Structure anatomique d'un fruit d'agrumes (Luro et al., 2022).

2. Diversité des agrumes :

La diversité des agrumes est exceptionnelle tant sur le plan génétique que morphologique, résultant d'un long processus d'évolution, de dispersion et d'hybridations naturelles. Elle comprend dix espèces ancestrales identifiées, dont quatre sont à l'origine de la majorité des agrumes cultivés. Cette diversité se manifeste par une grande variété de formes, de tailles, de couleurs, de goûts et d'adaptations écologiques. On distingue notamment (Curk & Ollitrault, 2018) :

- **Les espèces ancestrales** : cédratier (*C. medica*), pamplemoussier (*C. maxima*), mandarinier (*C. reticulata*), papéda (*C. micrantha*), lime australienne (*C. australis*, etc.).
- **Les hybrides naturels** : oranger (hybride de *C. reticulata* × *C. maxima*), citronnier (hybride de *C. medica* × bigaradier), pomelo, limettier, bigaradier, lime mexicaine, lime de Rangpur...

Les cultivars horticoles : cultivars de citron, orange douce, mandarine, clémentine, lime douce, bergamote, etc (Curk & Ollitrault, 2018) .

3. Importance des agrumes dans le monde

Les agrumes représentent la principale culture fruitière mondiale, cultivés dans plus de 100 pays. Leur succès s'explique par leurs bienfaits pour la santé, la forte demande, et les progrès en transport.

Ce secteur génère plus de 10 milliards de dollars par an. Les principaux producteurs sont le Brésil, les États-Unis, la Chine et les pays méditerranéens. Les oranges dominent la production mondiale, notamment pour le jus, dont le Brésil est le premier exportateur.

Dans la région méditerranéenne, les agrumes sont surtout destinés au marché frais. L'Espagne et le Maroc sont les leaders des exportations de petits agrumes comme les clémentines. La Tunisie, avec 250 000 tonnes par an, occupe la 9e place régionale (Snoussi Trifa, 2013).

4. Importance des agrumes en Algérie

En Algérie, les agrumes représentent une filière agricole stratégique, particulièrement développée dans les régions nordiques à climat méditerranéen, telles que la Mitidja, la plaine de Mostaganem et Skikda. Cette culture occupe une place centrale dans l'économie agricole nationale, non seulement en raison de sa contribution significative à la sécurité alimentaire, mais aussi pour son rôle dans la création d'emplois et le développement rural. Les agrumes algériens, notamment les oranges, les clémentines et les citrons, sont appréciés pour leur qualité gustative et leur richesse en nutriments essentiels comme la vitamine C, les flavonoïdes et les antioxydants (Aroua, 2019). Ils sont consommés frais ou transformés localement, et une partie est destinée à l'exportation, notamment vers l'Europe et les pays du Golfe. En dépit de leur importance économique, les vergers agrumicoles sont confrontés à plusieurs contraintes, notamment les ravageurs comme les cochenilles, les maladies phytosanitaires et les fluctuations climatiques, ce qui souligne la nécessité d'une gestion intégrée et durable de cette culture essentielle (Aroua, 2019).

5. Importance des agrumes à Tlemcen

Les vergers d'agrumes de la région de Tlemcen occupent une place centrale tant sur le plan économique qu'agronomique. La richesse variétale qui y est cultivée, comprenant notamment des clémentiniers et diverses variétés d'orangers (telles que Thomson, Washington Navel et Valencia Late), se distingue par un calendrier de maturation étalé de septembre à mai. Cette succession variétale favorise la présence continue d'hôtes pour *Ceratitis capitata*, permettant

ainsi l'observation et l'analyse de plusieurs générations du ravageur au cours de la saison (Settaoui et al. (2017)).

Par ailleurs, les conditions pédoclimatiques propres à Tlemcen – marquées par des variations de température et d'humidité – offrent un cadre idéal pour l'étude des dynamiques de population de la mouche méditerranéenne des fruits. Ces caractéristiques font de la région un véritable modèle pour l'évaluation de l'infestation en verger, ainsi que pour le développement et l'ajustement des stratégies de lutte intégrée. Tlemcen constitue ainsi une zone d'intérêt majeur dans la compréhension de l'écologie de ce ravageur et dans la mise en œuvre de mesures de contrôle ciblées et adaptées (Settaoui et al., (2017)).

III. Généralité sur le citron

A. Origine génétique et géographique du citron (*Citrus limon*)

Le citron (*Citrus limon*) est une espèce hybride qui résulte du croisement entre le **cédrat** (*C. medica*), une espèce ancestrale riche en composés aromatiques, et le **bigaradier** (*C. × aurantium*), lui-même un hybride issu du **pummelo** (*C. maxima*) et de la **mandarine** (*C. reticulata*). Cette origine complexe a été confirmée par des analyses génétiques, notamment par l'étude de la diversité des allèles du gène *Ruby*, un régulateur clé de la biosynthèse des anthocyanines. Dans cette étude, les allèles identifiés dans les citronniers révèlent une contribution génétique marquée du cédrat (alleles verts dans les figures de l'étude) et des introgressions provenant des génomes du pummelo (alleles rouges) et de la mandarine (alleles jaunes ou roses). Par ailleurs, un accessoire particulier, le citron "Dulce", est mentionné comme une chimère greffée contenant un troisième allèle du gène *Ruby*, probablement issu d'une limetta acide (Butelli et al., 2017).

Sur le plan géographique, le citron est originaire de la région du **nord-est de l'Inde**, de la **Birmanie** (Myanmar) et du **Yunnan**, au sud de la Chine. Ces régions représentent des zones de diversité génétique primaires pour les espèces fondatrices du citron. Sa formation naturelle serait survenue il y a environ **2 000 à 3 000 ans**, avant que l'espèce ne se diffuse vers l'ouest à travers la **Perse** et le **Moyen-Orient**, notamment grâce aux routes commerciales. Il a été introduit dans le **bassin méditerranéen** durant les premiers siècles de l'expansion arabo-musulmane (vers le VII^e siècle), où il s'est largement acclimaté et cultivé. Aujourd'hui, le citron est cultivé à travers le monde, en particulier dans les **régions méditerranéennes**, en **Californie**, en **Amérique latine**, et en **Asie subtropicale** (Butelli et al., 2017).

B. Description botanique de *Citrus limon*

Tableau 1 Caractéristiques morphologiques (Klimek-Szczykutowicz et al., 2020)

<p>Citrus limon (L.) Burm. f. communément appelé citronnier, est un petit arbre atteignant généralement une hauteur de 2,5 à 3 mètres. Il possède des feuilles persistantes, de forme lancéolée, c'est-à-dire allongée et étroite</p>	
<p>Le fruit est une baie de forme ovale, allongée et pointue, de couleur verte au départ, devenant jaune à maturité. À l'intérieur, il est composé d'une pulpe juteuse divisée en plusieurs segments, similaires à ceux d'une orange</p>	
<p>Ses Fleurs sont bisexuées (hermaphrodites), blanches avec des bords légèrement teintés de violet. Elles peuvent apparaître seules à l'aisselle des feuilles ou groupées en petites grappes</p>	

Le péricarpe (peau du fruit) se compose de :

L'exocarpe : mince, cireux, c'est la couche externe visible.

Le flavedo : partie externe du mésocarpe, contenant des vésicules remplies d'huile essentielle et des pigments caroténoïdes.

L'albêdo : partie interne du mésocarpe, faite d'un tissu spongieux et blanc (parenchyme).

L'endocarpe : c'est la pulpe du fruit, organisée en segments séparés par du tissu spongieux provenant du mésocarpe



S : Photo prise au verger 2, SAF SAF, le 13/01/2025

C. Classification botanique (Martínez et al., 2020)

Royaume : Plantes (*Plantae*)

Classe : *Equisetopsida*

Sous-classe : *Magnoliidae*

Super-ordre : *Rosanae*

Ordre : *Sapindales*

Famille : Rutacées (*Rutaceae*)

Genre : *Citrus* (Agrumes)

Espèce : *Citrus × latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez



Figure 3 Illustration botanique de *Citrus × latifolia* (Gunther, 1887).

D. Variétés de citron :

Dans le bassin méditerranéen, les principales variétés cultivées de citronnier comprennent Verna, Eureka, Lisbon, Monachello, Interdonato et Lunaris. Ces variétés sont sélectionnées pour leurs performances agronomiques et leur valeur commerciale, notamment en termes de productivité, de teneur en jus, et de capacité à produire en dehors de la saison hivernale. Bien que la période de maturité naturelle du citron se situe en hiver, sa consommation reste importante tout au long de l'année, en particulier durant l'été (Zerbani, 2020).

Parmi les nombreuses variétés disponibles sur les marchés, certaines se distinguent par leurs caractéristiques morphologiques, organoleptiques et saisonnières. Le tableau suivant présente les variétés les plus couramment rencontrées ainsi que leurs principales particularités (Zerbani, 2020).

Tableau 2 Exemples de variétés de citron et leurs caractéristiques (Zerbani, 2020)

Variété	Saison de production	Caractéristiques du fruit
Primofiori	Octobre à décembre	Fruit ovale, peau fine, pulpe très juteuse
Interdonato	Septembre à octobre	Gros fruit, peau très fine, pulpe acide et juteuse, sans pépins
Verna	Toute l'année	Fruit jaune intense, peau épaisse et rugueuse, sans pépins, goût faiblement acide
Eureka	Toute l'année (4 saisons)	Fruit ovoïde, zeste difficile à prélever, pulpe très juteuse et fortement acide

IV. Huile essentielle de citron :

L'essence de citron se distingue par ses vertus vivifiantes, stimulantes et assainissantes exceptionnelles. Cette huile volatile offre une compatibilité cutanée optimale et s'adapte parfaitement à une utilisation domestique diversifiée. Sa fragrance pétillante et dynamisante, qui rappelle l'éclat matinal des fruits citronnés, constitue un atout précieux dans les pratiques aromatiques thérapeutiques. (Paw et al., 2020).

a. Caractéristiques principales**✚ Méthodes d'obtention**

L'essence est principalement obtenue par expression à froid du flavedo (écorce externe) des fruits mûrs du citronnier. Cette technique traditionnelle permet de préserver l'intégrité des composés volatils en éclatant mécaniquement les vésicules oléifères contenant les substances aromatiques. Il est également possible de procéder par scarification contrôlée du fruit, suivie d'une expression mécanique utilisant des systèmes rotatifs.

Cette méthode d'extraction particulière produit techniquement une essence plutôt qu'une huile essentielle au sens strict, cette dernière étant classiquement obtenue par entraînement à la vapeur d'eau (Gök et al., 2015).

D'autres procédés d'extraction sont disponibles mais ne répondent pas aux critères pharmaceutiques ou alimentaires : hydrodistillation avec appareil Clevenger, extraction au CO₂ supercritique sous haute pression, ou encore broyage complet du fruit avec séparation centrifuge. Les extraits ainsi obtenus trouvent leur application dans l'industrie des arômes, la savonnerie, la cosmétique ou la parfumerie fine (Gök et al., 2015).

✚ Les principales caractéristiques de l'huile essentielle de zeste de citron sont les suivantes (Hellal, 2011) :

- **Aspect** : liquide clair et homogène.
- **Couleur** : jaune pâle à jaune citron.
- **Odeur** : fraîche, vive, typiquement citronnée, rappelant le zeste du fruit.
- **Saveur** : légèrement amère, piquante, zestée.
- **Densité** : entre 0,849 et 0,856 à 20 °C.
- **Norme AFNOR** : densité maximale de 0,876 à 20 °C (NF T 75-202).
- **Indice de réfraction** : entre 1,472 et 1,476 à 20 °C.
- **Norme AFNOR** : entre 1,4700 et 1,4780.
- **Composé principal** : limonène (majoritaire, 65 à 75 %).
- **Autres composants** : β-pinène, γ-terpinène, citral.
- **Utilisations** : arômes alimentaires, cosmétique, parfumerie, aromathérapie

b. Propriétés et indications thérapeutiques de l'huile essentielle de citron**i. Applications traditionnelles**

○ **Système respiratoire** : L'huile essentielle de citron trouve ses applications dans le traitement des affections respiratoires hautes depuis des générations. Riche en limonène et kaempférol, elle s'utilise par voie inhalatoire, en application cutanée ou en vaporisation pour apaiser les manifestations du rhume, de la toux et de l'encombrement nasal. Son action fluidifiante sur les sécrétions bronchiques facilite l'expectoration et améliore le confort respiratoire lors d'infections ORL (Agarwal et al., 2022).

○ **Fonction gastro-intestinale** : Cette essence stimule naturellement la sécrétion des enzymes digestives, optimisant ainsi les processus de digestion. Elle constitue un remède efficace contre les troubles digestifs tels que la dyspepsie, les nausées et les météorismes. Son action bénéfique s'étend également au système hépatique qu'elle soutient dans ses fonctions de détoxification (Agarwal et al., 2022).

○ **Dermatologie** : Diluée convenablement, l'huile essentielle de citron manifeste des propriétés tonifiantes, resserrantes et purifiantes sur l'épiderme. Elle convient particulièrement aux épidermes à tendance séborrhéique, aux imperfections cutanées (acné, comédons), aux lésions mineures et aux excroissances verrucales. Elle contribue par ailleurs à homogénéiser le teint et à assainir l'haleine (Mohanapriya et al., 2013).

○ **Circulation veineuse** : Par son action stimulante sur le retour veineux, elle apporte un soulagement aux manifestations de l'insuffisance veineuse chronique, notamment la lourdeur des membres inférieurs et les varices. Elle s'intègre également dans les protocoles de traitement de la lipodystrophie gynoïde (Mohanapriya et al., 2013).

ii. Propriétés pharmacologiques modernes

○ **Fondements historiques et usage traditionnel** : L'essence de Citrus limon bénéficie d'une longue tradition d'utilisation en médecine populaire. Le jus de citron était historiquement employé pour éteindre la soif, faciliter les processus digestifs (particulièrement en association avec le miel), et traiter diverses dermatoses incluant les éruptions cutanées et les dyschromies. Son utilisation s'étendait au traitement des helminthiases, de la lithiase rénale, et à la lutte contre le stress oxydatif cellulaire. Des recherches contemporaines indiquent qu'une consommation régulière de jus citriques améliore le bilan lipidique sanguin, inhibe l'agrégation plaquettaire et augmente les taux de cholestérol HDL. Des propriétés modulatrices de la fonction thyroïdienne ont également été

attribuées à ses extraits, suggérant un intérêt thérapeutique dans l'hyperthyroïdie (**Rafique et al., 2020**).

○ **Potentiel anticancéreux** : La recherche en oncologie s'intéresse aujourd'hui aux substances naturelles capables d'inhiber la prolifération néoplasique. Dans cette perspective, les huiles essentielles, par leur richesse en terpènes et polyphénols bioactifs, émergent comme des agents naturels prometteurs. L'huile essentielle de Citrus limon, notamment par sa concentration élevée en limonène et citral, présente un intérêt particulier dans la chimioprévention de certaines néoplasies. Des recherches ont démontré que le limonène exerce des effets antiprolifératifs sur les lignées cellulaires cancéreuses mammaires, hépatiques et coliques, en perturbant la signalisation cellulaire et en déclenchant l'apoptose (**Raut & Karuppaiyl, 2014**).

○ **Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires** : Les investigations in vitro sur les huiles essentielles de zeste de citron ont révélé une capacité antioxydante significative, objectivée par les tests DPPH et FRAP. Bien que leur efficacité reste modérée comparativement aux antioxydants de synthèse, elles démontrent un potentiel thérapeutique intéressant, imputable à leur teneur en monoterpènes tels que le D-limonène, le β -pinène et le γ -terpinène. L'activité anti-inflammatoire évaluée expérimentalement a mis en évidence une inhibition notable des processus inflammatoires, particulièrement par la prévention de la dénaturation protéique et l'inhibition d'enzymes pro-inflammatoires (**El Aboubi et al., 2022**).

V. Travaux antérieurs

1.1. Composition chimique :

L'huile essentielle de citron se caractérise par une richesse exceptionnelle en monoterpènes, avec le limonène comme constituant majoritaire (65 à 75%). La composition inclut également le β -pinène, le γ -terpinène, l' α -pinène, le myrcène, le linalol, ainsi que des composés oxygénés comme le citral et divers sesquiterpènes.

Cette composition confère à l'huile des propriétés pharmacologiques diversifiées : activité antioxydante puissante par neutralisation des radicaux libres, action antimicrobienne à large spectre (antibactérienne, antifongique, antivirale), effets anti-inflammatoires, carminatifs, répulsifs, hépatoprotecteurs, antimutagènes et anticancéreux potentiels.

La présence significative de flavonoïdes (naringine, hespéridine, néohespéridine) renforce considérablement le potentiel antioxydant et apporte des bénéfices cardiovasculaires et neuroprotecteurs (**Kačániová et al., 2024**).

Le tableau 03 ci-dessous présente la composition chimique typique de l'huile essentielle de *Citrus limon*, ainsi que les teneurs approximatives des principaux constituants.

Tableau 3 Composition chimique de l'huile essentielle de *CITRON LIMON* rapportée dans la littérature

Parité utilisé	Composé majoritaire	Rendement et méthode extraction	Région	Référence
Algérie				
Zeste	Limonène (66,07% ; 61,26%), β -pinène (9,88% ; 1,47%), γ -terpinène (8,22% ; 3,84%), α -pinène (3,05% ; 9,65%), β -myrcène (2,96% ; 1,35%), sabinène (1,63%), β -élémyène (2,22%), γ -cadinène (1,21%), géraniol (1,20% ; 4,22%), néral (1,08% ; 2,39%), linalyl propionate (1,07%)	Hydrodistillation appareil de type Clevenger rendement 1,12 %	Ghardaïa (Algérie)	Bencheikh et al., 2024
Zeste	Limonène (64,75%), γ -terpinène (11,72%), β -pinène (11,24%), α -pinène (1,93%), β -myrcène (1,68%), géraniol (1,68%), β -bisabolène (1,03%)	Pression à froid	Mitidja, Nord Algérie	Benoudjit et al., 2020

Zeste	Limonène (61,26%), α -pinène (9,65%), γ -terpinène (3,84%), β -myrcène (1,35%), β -pinène (1,47%), α -citral (4,22%), cis-citral (2,39%), β -élémente (2,22%), γ -cadinène (1,21%), linalyl propionate (1,07%)	Hydrodistillat ion	Constantine, Nord-Est Algérie	Kehal et al., 2023
Feuille	Limonène (27,09%), géraniol (30,08%), néral (22,87%), β -pinène (2,77%), (E)- β -ocimène (1,14%), citronellal (0,48%), α -terpinéol (0,47%), myrcène (0,46%)	Hydrodistillat ion (HD) Rendement : 0,30 ± 0,004%		Bouabdallah et al., 2022
Maroc				
Zeste	D-limonène (53,44%), β -pinène (17,37%), γ -terpinène (12,81%), α -pinène (2,17%), sabinène (1,80%), β -myrcène (1,50%), fenchol (1,60%), L-terpinène-4-ol (1,23%), géraniol (1,18%), neryl acétate (1,19%), β -bisabolène (1,05%)	Hydrodistillat ion (appareil Clevenger) Rendement : 1,03%	Beni Mellal (Maroc)	El Aboubi et al., 2022
Zeste	D-limonène (55,28%), δ -terpinène (12,93%),	Hydrodistillat ion	Berkane (Maroc)	Brahmi et al., 2021

	β -pinène (11,88%), lemonol (3,02%), α -pinène (2,06%), α -citral (1,998%), β -myrcène (1,885%), géraniol (1,871%), sabinène (1,649%), acétate de néryle (1,362%)	Rendement : 2,3%		
Zeste	D-limonène (39,49%), linalyl acétate (14,07%), α -pinène (7,93%), β -pinène (5,54%), α -terpinéol (4,90%), p-terpinéol (3,51%), carvacrol (1,25%), β -myrcène (1,20%)	Hydrodistillation Rendement : 0,78%	Marrakech (Maroc)	Abdu et al., 2021
Tunisie				
Fleur	Limonène (39,74%), β -pinène (25,44%), α -terpinéol (7,30%), nérolidol (6,91%), farnésol (4,28%), acétate de géranyle (3,03%), acétate de linalyle (3,01%), linalol (2,16%), acétate de néryle (1,74%)	Hydrodistillation Rendement : 3% (v/p) fleurs fraîches		Ben Hsouna et al., 2017
Zeste	Limonène (jusqu'à 76,78%), α -terpinyl acétate (10,55%), α -gumulène (9,37%), phellandrène (6,47%),	Macération Méthanol : 4,55% Hexane : 0,43%	Sfax, Tunisie	Taktak et al., 2021

	sabinène (4,89%), hexanol (4,02%), γ - terpinène (3,90%), perilla alcool (2,57%), α -terpinène (2,55%)	Acétate d'éthyle : 0,42%		
Feuille	<p>La composition comprend plusieurs esters, parmi lesquels le neryl acétate (29,5 %) et le géranyl acétate (6,6 %). Les alcools monoterpéniques sont représentés par le nérol (13,8 %), le géraniol (3,5 %), le linalol (2,1 %), le (-)-terpinen-4-ol (1,7 %) et l'α-terpinéol (1,8 %). Les monoterpènes incluent le D-limonène (12,9 %) et le β-pinène (3,2 %).</p> <p>Les aldéhydes monoterpéniques comprennent le géraniol (7,8 %), le néral (5,8 %) et le citronellal (3,4 %). Du côté des sesquiterpènes, on retrouve le caryophyllène (2,7 %), l'α-bergamotène (0,5 %), le β-bisabolène (0,8 %) et le (-)-spathuléol</p>	Hydrodistillat ion avec appareil de Clevenger Rendement 0.48 \pm 0.09 %	Béja	<i>Maaroufi et al., 2021</i>

	(0,7 %). Enfin, un ester d'acide gras, le méthyl arachidonate, est présent à 2,0 %.			
Zeste	La composition est dominée par les monoterpènes , notamment le limonène (37,63 %), le β-pinène (31,49 %), l' α-pinène (5,90 %), le γ-terpinène (5,12 %), le sabinène (3,80 %), le p-cymène (2,21 %), le camphène (0,90 %) et le myrcène (présent en traces). On retrouve également un oxyde monoterpénique , le 1,8-cinéole , à 0,82 %	Hydrodistillat ion avec appareil de type Clevenger Beldi Rendement 0,48%	Menzel Bouzelfa (Nord-Est)	Bourgou et al., 2012
Espagne, Italie, etc.				
écorce	La composition est largement dominée par les monoterpènes , avec le limonène	Hydrodistillat ion	Italie	Loizzo et al., 2016

	<p>(59,64 ± 1,8 %), suivi du γ-terpinène (19,03 ± 1,8 %), du β-pinène (5,76 ± 0,4 %), du myrcène (0,92 ± 0,06 %), de l'α-pinène (0,62 ± 0,07 %), du sabinène (0,21 ± 0,07 %), de l'α-terpinène (0,24 ± 0,03 %) et du terpinolène (0,25 ± 0,08 %).</p>			
zeste	<p>Le composé principal est le limonène, présent en proportion variable selon les cultivars (38,1 % à 95,8 %). Parmi les monoterpènes, on retrouve également le β-pinène (0,1 à 15,8 %) et le γ-terpinène (traces à 18,0 %). Les alcools monoterpéniques sont</p>	Hydrodistillation	Espagne	Lota et al., 2002

	représentés par le linalool (jusqu'à 23,3 %), tandis que les esters incluent le linalyl acétate (jusqu'à 31,2 %).			
Ecorce	La composition est dominée par les monoterpènes , principalement le D-limonène (~65–70 %), le β-pinène (~10–15 %), le γ-terpinène (~8–10 %), l' α-pinène (~1–2 %) et le myrcène (~1 %). Les aldéhydes monoterpéniques , représentés par le citral (néral + gèranial, ~2–3 %), sont également présents en proportions notables. Parmi les alcools monoterpéniques , on retrouve le linalol (~0,2–0,5 %). Les	Pression à froid Rendement 0,2 % (m/m)	Californie	Liu, Li, & Ho, 2022.

	<p>esters incluent l'acétate de néryle et l'acétate de géranyle (~0,2–0,5 %). Enfin, les sesquiterpènes, comme le bisabolène, sont présents à des teneurs faibles (~0,2–0,5 %).</p>			
Autre Pays				
Zeste	<p>La composition est largement dominée par les monoterpènes, en particulier le limonène (85,9 %), suivi du sabinène (3,9 %), du myrcène (3,1 %), de l'α-pinène (1,1 %), du β-ocimène (0,4 %) et du γ-terpinène (0,2 %).</p> <p>Les alcools monoterpéniques incluent le linalool (0,5 %). D'autres composés tels que l'octanal, le nonanal ou le</p>	<p>Hydrodistillat ion (appareil de type Clevenger) Rendement 1,45 % (poids sec)</p>	Niger	Owolabi et al., 2018

	<p>terpinolène sont présents à l'état de traces.</p>			
<p>Feuilles</p>	<p>La composition comprend principalement des monoterpènes, tels que le sabinène (29,50 %), le β-ocimène (8,37 %), le D-limonène (7,86 %), le 3-carène (7,18 %), le β-myrcène (3,96 %), l'α-pinène, le γ-terpinène (2,64 %) et le γ-terpinolène (2,48 %). Parmi les aldéhydes monoterpéniques, on retrouve le citronellal (4,45 %), et du côté des esters, le citronellyl acétate (3,71 %) est présent. Un sesquiterpène, le β-élémane, est également mentionné.</p>	<p>Hydrodistillat ion à l'aide d'un appareil de Clevenger</p>	<p>Egypte</p>	<p>Asker et al., 2020</p>

2. Activités biologiques :

2.1. Activité antioxydante

2.1.1 Définition et mécanismes

L'activité antioxydante correspond à la capacité d'une substance à neutraliser les radicaux libres et à réduire les dommages qu'ils causent aux cellules. Les radicaux libres sont des molécules instables produites naturellement par l'organisme lors du métabolisme cellulaire, mais également par des facteurs environnementaux tels que la pollution, le stress ou l'exposition solaire. Lorsque leur production devient excessive par rapport aux défenses antioxydante, il en résulte un stress oxydatif qui peut endommager les cellules et favoriser le développement de pathologies comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires (**Rossi et al., 2009**)

2.1.2 Activité antioxydante de *Citrus limon*

D'après la littérature scientifique, de nombreuses études se sont intéressées à l'activité antioxydante de *Citrus limon*, révélant des propriétés remarquables selon les parties végétales utilisées et les méthodes d'extraction employées.

ChunYan et al. (2010), ont analysé l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus limon* par le test DPPH•. Les résultats ont mis en évidence une inhibition dose-dépendante du radical libre, avec une progression jusqu'à 100 µg/ml puis une stabilisation au-delà. À la concentration de 120 µg/ml, l'huile essentielle a atteint un taux d'inhibition de 70%, comparativement à 88,6% pour le BHT utilisé comme standard de référence. Ces données suggèrent une capacité de piégeage des radicaux DPPH• notable, bien que légèrement inférieure à celle du composé synthétique.

Li et al. (2022) ont confirmé cette tendance en évaluant l'huile essentielle de *Citrus limon* (LEO) à différentes concentrations (16-144 mg/ml). Leurs résultats ont montré une augmentation dose-dépendante du pouvoir antioxydant, avec un pourcentage maximal d'inhibition de 79,35% à 144 mg/ml. Cette activité antioxydante remarquable est attribuée à la composition majoritaire en d-limonène et à l'effet synergique de composés mineurs tels que le γ -terpinène et le β -pinène.

Budiarto et al. (2024), ont réalisé une méta-analyse révélant que les huiles essentielles de citron présentent une activité antioxydante significative mais variable. La capacité antioxydante moyenne observée était de -3,22% avec une forte hétérogénéité ($I^2 = 87,6\%$, $p < 0,001$), indiquant une grande variabilité entre les études. Les huiles issues du fruit (5,41%) et de la graine (4,99%) ont montré une activité supérieure à celles issues des feuilles (-7,02%) ou de la plante entière (-6,34%). Concernant les méthodes d'extraction, la macération a donné les meilleurs résultats (4,84%), contrairement à la distillation à la vapeur (-0,64%) ou l'hydro

distillation (-6,64%). En termes d'efficacité (IC50), les extraits de feuilles ont présenté la plus faible valeur (5,04 mg/ml), indiquant une meilleure capacité à inhiber les radicaux libres.

Moosavy et al. (2017), ont démontré que l'huile essentielle extraite des zestes de citron possède une activité antioxydante notable. Le test DPPH a révélé une capacité de piégeage des radicaux libres de 55,09%, contrastant avec l'acide ascorbique (5,18%, $p < 0,05$). Cette efficacité est attribuée à la richesse en composés phénoliques ($81,82 \pm 8,02$ mg équivalent acide gallique/g d'HE) et en flavonoïdes ($11,72 \pm 1,82$ mg équivalent rutine/g d'HE). Les mono terpènes majoritaires comme le DL-limonène et le γ -terpinène contribuent également à cette activité, corroborant la corrélation positive entre la teneur en polyphénols et la capacité antioxydante des extraits végétaux.

2.2. Activité antimicrobienne

2.2.1 Définition et mécanismes généraux

L'activité antimicrobienne désigne la capacité d'une substance à inhiber la croissance ou à détruire les micro-organismes pathogènes, incluant les bactéries, les champignons, les virus et les parasites. Cette propriété biologique est fondamentale tant en thérapeutique qu'en préservation alimentaire et constitue un axe de recherche majeur dans le développement de nouvelles molécules bioactives.

L'activité antimicrobienne repose sur la capacité d'un agent à inhiber la croissance microbienne (activité bactériostatique) ou à induire la mort cellulaire (activité bactéricide). Cette distinction n'est toutefois pas absolue, un même antimicrobien pouvant être bactéricide contre certains germes et bactériostatique contre d'autres, (**Leekha et al. 2011**).

2.2.2 Activité antimicrobienne de Citrus limon - Données de la littérature

D'après la littérature, l'activité antimicrobienne de *Citrus limon* a été examinée dans plusieurs études, récapitulées dans le tableau 04

Tableau 4 Analyse des travaux scientifiques relatifs à l'activité antimicrobienne d'huile *Citron limon*

Méthode utilisé	Souche utilisé	Résulte	Référence
Diffusion sur disque	Bacillus subtilis	Zeste 21 mm	(Thapa et al., 2022) (Népal Pays en Asie du Sud)
	Escherichia coli	13 mm	

Méthode des disques de diffusion	Bacillus cereus	5,67 ± 0,58 mm	(Kačániová et al., 2024) (la Slovaquie)
	Micrococcus luteus		
	Staphylococcus aureus	7,67 ± 0,58 mm	
	Escherichia coli		
	Vibrio parahaemolyticus	6,33 ± 0,58 mm	
	Yersinia enterocolitica	4,67 ± 0,58 mm	
	Candida albicans		
	Candida glabrata	5,00 ± 1,00 mm	
	Candida krusei		
	Candida tropicalis	4,67 ± 0,58 mm	
	Salmonella enterica	6,33 ± 0,58 mm	
		6,00 ± 1,00 mm	
		6,67 ± 0,58 mm	
	6,33 ± 0,58 mm		
	4,33 ± 0,58 mm		
Méthode des disques de diffusion	Bacillus subtilis	24.5 ± 0.7 mm	(Ben Hsouna et al., 2017) (la Tunisie)
	Bacillus cereus		
	Staphylococcus aureus	21.3 ± 1.0 mm	
	Staphylococcus aureus		
	Enterococcus faecalis	22.6 ± 0.9 mm	
	Listeria monocytogenes	19.8 ± 1.1 mm	
	Micrococcus luteus		
	Pseudomonas aeruginosa	16.2 ± 0.8 mm	
	Escherichia coli		
	Salmonella enterica (enteritidis)	17.5 ± 0.6 mm	
	Klebsiella pneumoniae	23.4 ± 1.2 mm	

		15.0 ± 0.8 mm	
		17.4 ± 1.0 mm	
		16.7 ± 1.2 mm	
		17.2 ± 0.9 mm	
Disques en résine acrylique	Candida albicans	Zeste 100 %	(Oliveira et al., 2013) (le Brésil.)
	Escherichia coli	100 %	
	Enterococcus faecalis	49.3 %	
Diffusion sur disque	Escherichia coli	Zeste 15 mm	(Bozkurt et al., 2017) (Adana, en Turquie)
	Bacillus cereus	11 mm	
	Staphylococcus aureus	13 mm	
	Salmonella typhimurium	9 mm	
	Listeria monocytogenes	14 mm	
	Enterococcus faecalis	9 mm	
Diffusion sur disque	Salmonella typhimurium	Zeste 10 mm et 6 mm	(Gupta et al., 2014) (Himachal Pradesh, Inde)
	Escherichia coli	4 mm et 7 mm	
	Aspergillus fumigatus	2mm et 4 mm	
	Penicillium chrysogenum	1 mm et 2 mm	

2.3 Autre activité :

L'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle extraite de l'écorce du citron limon (*Citrus × limon*) a été évaluée par le biais d'un test d'inhibition de la 5-lipoxygénase (5-LOX), une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des leucotriènes, médiateurs clés de l'inflammation. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition enzymatique est dose-dépendante, avec une concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) de **32,05 ± 3,91 µg/ml**. À titre comparatif, le contrôle positif nordihydroguaiarétique

(NDGA) a présenté une activité significativement plus élevée, avec une CI_{50} de **0,24 $\mu\text{g/ml}$** (Jin et al., 2011).

Cette activité inhibitrice modérée pourrait être en grande partie attribuée à la forte teneur en **D-limonène**, composé majoritaire de l'huile essentielle, dont l'efficacité anti-5-LOX a été démontrée dans la littérature avec une CI_{50} de **13 $\mu\text{g/ml}$** . Ces résultats suggèrent un potentiel anti-inflammatoire intéressant de l'huile essentielle de Citrus \times limon, justifiant des investigations complémentaires in vivo pour confirmer ces effets et explorer d'éventuels mécanismes synergiques entre ses constituants (Jin et al., 2011).

VI. Analyse d'un mélange huile essentielle

1) Analyse qualitative d'un mélange complexe

L'analyse qualitative d'un mélange complexe d'huiles essentielles vise à identifier les différentes molécules présentes, même en très faibles quantités. Ces mélanges contiennent souvent des composés volatils nombreux, parfois instables, ce qui rend leur identification difficile (Muselli, 2007)

2) CPG et GC-MS : Analyse Avancée des Composés Volatils :

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique analytique puissante utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composés volatils d'un mélange complexe. L'échantillon est d'abord vaporisé, puis entraîné par un gaz vecteur à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Les différents composés interagissent de manière variable avec cette phase stationnaire, ce qui provoque leur séparation selon leur polarité, leur volatilité et leur affinité avec la colonne.

Les composés séparés sont ensuite détectés à la sortie de la colonne à l'aide de détecteurs spécifiques, tels que le détecteur à ionisation de flamme (FID) ou la spectrométrie de masse (MS) **Figure 07**, permettant à la fois une détection sensible et une identification structurale.

Grâce à sa haute sensibilité, sa rapidité et sa précision, la CPG est largement utilisée dans de nombreux domaines, notamment l'analyse des huiles essentielles, des polluants environnementaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou encore dans la recherche biomédicale **Figure 4**(Al-Rubaye et al., 2017).

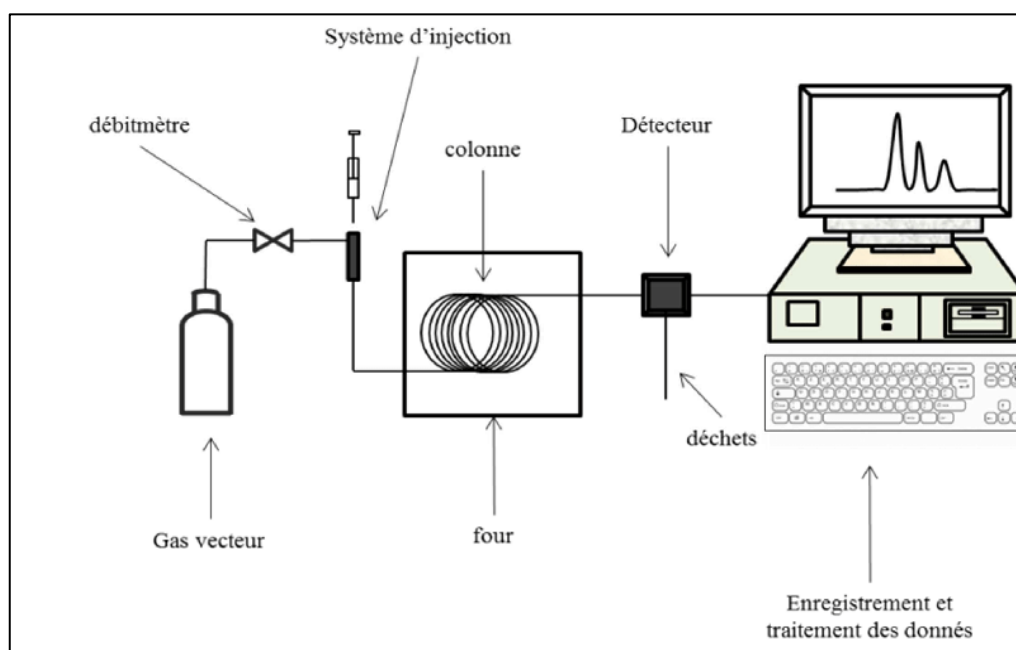


Figure 4 Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG)

❖ Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC-MS)

La GC-MS est une technique combinée qui permet d'analyser des mélanges complexes comme les huiles essentielles. Elle repose sur deux étapes principales :

❖ **La chromatographie en phase gazeuse (GC)** permet de séparer les différents composés volatils d'un échantillon. Chaque composé est entraîné par un gaz vecteur à travers une colonne, où il est séparé en fonction de sa volatilité et de son interaction avec la phase stationnaire.

❖ **La spectrométrie de masse (MS)** identifie ensuite les composés séparés en analysant leur fragmentation. Cela donne une sorte d'empreinte digitale (spectre de masse) caractéristique de chaque molécule.

Cette combinaison permet non seulement de séparer, mais aussi d'identifier les composants, même lorsqu'ils sont très similaires, comme c'est le cas des nombreux isomères dans les huiles essentielles (ex. : mono terpènes). Toutefois, comme les spectres de masse peuvent se ressembler entre isomères, on améliore la fiabilité de l'identification en combinant le **temps de rétention** (donné par la GC) avec le spectre de masse (fourni par la MS). (Marriott et al., 2001).

L'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) permet d'évaluer efficacement leur qualité. Par exemple, en comparant deux types de colonnes, polaire et non polaire, il a été démontré que la colonne polaire (ZB-WAX) offrait une meilleure séparation des composés principaux, les santalols, grâce à des pics chromatographiques bien définis. À l'inverse, la colonne non polaire (DB-5MS) montrait des traînées de pics et une séparation moins nette, ce qui rendait l'identification plus difficile. Cela souligne l'importance du choix de la colonne selon la nature chimique des composés analysés.

L'étude a également montré que la méthode était fiable, avec de faibles écarts entre les mesures à différentes concentrations. De plus, les comparaisons entre la détection FID et MS ont révélé des résultats similaires, confirmant la pertinence de la GC-MS non seulement pour quantifier les composants mais aussi pour identifier d'éventuelles falsifications.

Grâce à cette approche, il a été possible de détecter des cas d'adultération d'huiles de bois de santal. Certaines huiles commercialisées sous le nom de *Santalum album* ne respectaient pas les critères en termes de composition, notamment en santalols, ce qui indique qu'elles provenaient d'autres espèces ou avaient été altérées. La GC-MS apparaît ainsi comme un outil précieux pour authentifier les huiles essentielles (Howes et al., 2004).

3) La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est une méthode d'analyse qui permet d'étudier la structure des molécules en observant certains noyaux comme l'hydrogène (^1H), le carbone (^{13}C) ou l'azote (^{15}N). Lorsqu'un échantillon est placé dans un champ magnétique puissant, ces noyaux s'alignent selon ce champ. Ensuite, une impulsion radiofréquence est envoyée pour les exciter Figure 07. Lorsqu'ils reviennent à leur état initial, ils émettent un signal mesuré par l'appareil.

Ce signal fournit plusieurs types d'informations :

- ✓ Le déplacement chimique indique l'environnement chimique du noyau.
 - ✓ Le couplage scalaire (J) montre les connexions entre atomes liés.
 - ✓ L'effet Overhauser nucléaire (NOE) permet de connaître les distances entre noyaux proches dans l'espace.
 - ✓ Les couplages dipolaires résiduels (RDC) donnent des informations sur l'orientation des liaisons dans la molécule.

Grâce à des expériences multidimensionnelles (2D, 3D...), on peut identifier chaque signal et relier les noyaux entre eux. Ces données sont ensuite utilisées pour reconstituer la structure 3D de la molécule, notamment celle des protéines en solution Figure 5 (Marion, 2013).

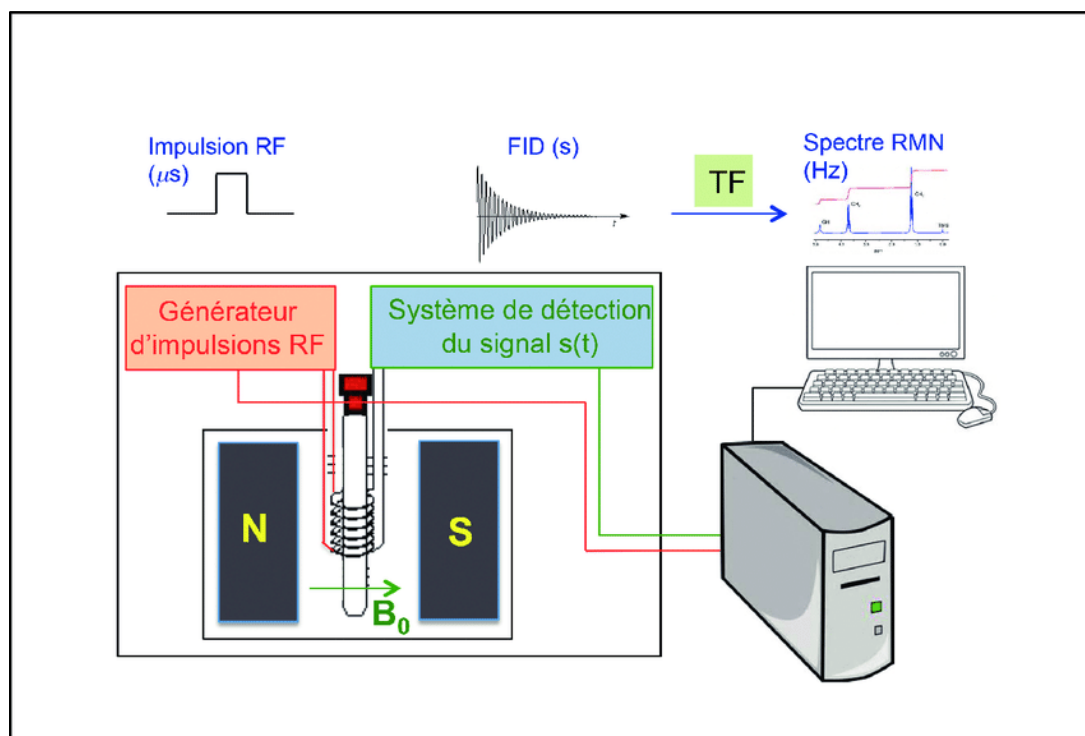


Figure 5 Schéma de principe d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Partie 2:
Matériel et Méthodes

Dans le cadre de cette recherche, nous avons entrepris l'évaluation des rendements en huile essentielle extraits des zestes de *Citrus limon*, ainsi que l'étude de leurs propriétés biologiques, notamment leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

L'ensemble des travaux a été réalisé au sein du **Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)** de l'université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. Les fruits de citron analysés proviennent de deux stations agricoles localisées dans la wilaya de Tlemcen : **Saf Saf** et **El Fehoul**, sélectionnées pour leurs conditions favorables à la culture du citronnier.

1. Matériel végétal

Les fruits de citron ont été récoltés dans deux stations agricoles de la wilaya de Tlemcen : **El Fehoul (photo 1, verger 1)** et **Saf Saf (photo2, verge 2)** été réalisées :

- le **13 janvier , 25 mai 2025** (station : El Fehoul),
- le **16 janvier , 20 mai 2025** (station : Saf Saf),

Les échantillons ont été prélevés manuellement à partir de plusieurs arbres matures, choisis de manière aléatoire dans chaque station afin d'assurer la représentativité.



Photo 01 : vue des pieds du *Citron limon*
verge 1 El Fehoule



Photo 02 : vue des pieds du *Citron limon*
verge 2 Saf Saf

2. Localisation géographique

Les prélèvements ont été effectués dans deux zones arboricoles de la wilaya de Tlemcen, reconnues pour leur production d'agrumes.

La carte présentée ci-dessous (Figure 05) met en évidence la position géographique des deux sites retenus pour la récolte des échantillons.



Figure 5 Situation des sites d'échantillonnage de *C. limon* dans la région de Tlemcen

3. Procédé d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles issues des zestes de *Citrus limon* (photo 3) a été réalisée dans deux laboratoires spécialisés selon différentes méthodes d'hydro distillation.



Photo 03 : Echantillons des zestes de Citron Eureka (*Citron limon*) destinés à l'extraction

Au laboratoire **Cosna** et laboratoire **LAPRONA** , l'extraction a été effectuée par hydrodistillation de type Clevenger utilisant un ballon capacité (photo 4), et hydrodistillation (photo 5) Cette méthode permet une collecte précise des huiles essentielles grâce à la conception spécifique de l'appareil hydrodistillation .



Photo 04 : hydro distillation à l'aider d'un

appareil de type Clevenger – grande volume



Photo 5 : Appareil d'hydro distillation classique utilisé pour les zestes de citron

Les parties externes des fruits frais (épicarpes) ont été immergées dans un ballon contenant de l'eau, puis l'ensemble a été chauffé jusqu'à ébullition. La vapeur générée s'est dirigée vers un réfrigérant, où elle s'est condensée, entraînant les composés volatils. Le mélange obtenu s'est ensuite séparé en deux phases : l'huile essentielle, plus légère, a flotté à la surface, tandis que l'eau a été recyclée vers le ballon pour poursuivre l'extraction.

Pour éviter toute altération liée à l'oxygène ou à la lumière, les huiles essentielles (Photo 7) ont été soigneusement conservées dans des flacons en verre, à une température contrôlée de 4 ± 1 °C, à l'abri de la lumière.



Photo 7 : Huile essentielle obtenue par hydro distillation (simple et Clevenger)

4. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle (HE) permet de quantifier la proportion d'huile obtenue à partir d'une masse donnée de matière végétale. Ce paramètre, exprimé en pourcentage, reflète l'efficacité de l'extraction. Il se calcule selon la formule suivante :

$$\text{❖ Rdt (\%)} = (M / M_0) \times 100$$

Avec :

- **M** : masse d'huile essentielle extraite (en grammes),
- **M₀** : masse de matière végétale utilisée pour l'extraction (en grammes),
- **Rdt (%)** : pourcentage de rendement en huile essentielle.

5. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle du zeste de *Citrus limon* :

L'efficacité thérapeutique végétale s'appuie sur les métabolites secondaires (phytoconstitués). Ces substances, non impliquées dans la croissance primaire, sont produites face aux stress environnementaux (sécheresse, températures extrêmes, pathogènes). Les terpènes, composés phénoliques et alcaloïdes présentent des activités biologiques documentées : antimicrobienne, antioxydante, cytotoxique, anti-inflammatoire (**Ghorbanpour et al., 2017**). Ces propriétés confèrent aux plantes médicinales un intérêt thérapeutique majeur en médecine traditionnelle et pharmacologie moderne

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des zestes de *Citrus limon* (Citron Eureka). Pour disposer d'une quantité suffisante en vue des analyses biologiques, les huiles essentielles obtenues à partir des différents échantillons ont été combinées.

5.1. Activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste de *Citrus limon*

L'activité antioxydante, c'est quand des substances protègent le corps en empêchant les radicaux libres de l'abîmer. Elles peuvent les bloquer, leur donner des électrons ou renforcer les défenses du corps (**Gülçin .,2012**).

On trouve des antioxydants naturels dans notre nourriture : vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols et flavonoïdes. Ils travaillent ensemble pour nous protéger du stress oxydatif qui cause des maladies comme les problèmes cardiaques, le cancer et les maladies du cerveau (**Gülçin .,2012**).

Dans cette partie, le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle du zeste de *Citrus limon* a été déterminé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) en utilisant l'éthanol comme solvant.

Le dosage DPPH constitue une technique spectrophotométrique permettant d'évaluer la capacité antioxydante des composés testés. Cette méthode repose sur l'utilisation du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), caractérisé par sa coloration violette intense et sa stabilité en solution (**Brand-Williams et al., 1995**).

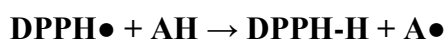
A. Principe de la méthode

L'activité antioxydante se manifeste par la neutralisation du radical DPPH, provoquant une transformation chromatique observable. Le radical DPPH initialement violet subit une réduction en présence d'agents antioxydants, générant la forme réduite DPPH-H de teinte jaunâtre (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Cette transformation colorimétrique résulte de la capacité des antioxydants à transférer des électrons ou des protons vers le radical libre Figure 7. L'intensité et la rapidité de ce changement chromatique reflètent directement la puissance antioxydante de la substance évaluée (**Romulo, 2020**).

○ **Mécanisme réactionnel**

La réaction de neutralisation peut être schématisée selon l'équation suivante :



Dans cette équation, AH symbolise le composé antioxydant donneur d'hydrogène, tandis que A● représente le radical formé après transfert (**Brand-Williams et al., 1995**).

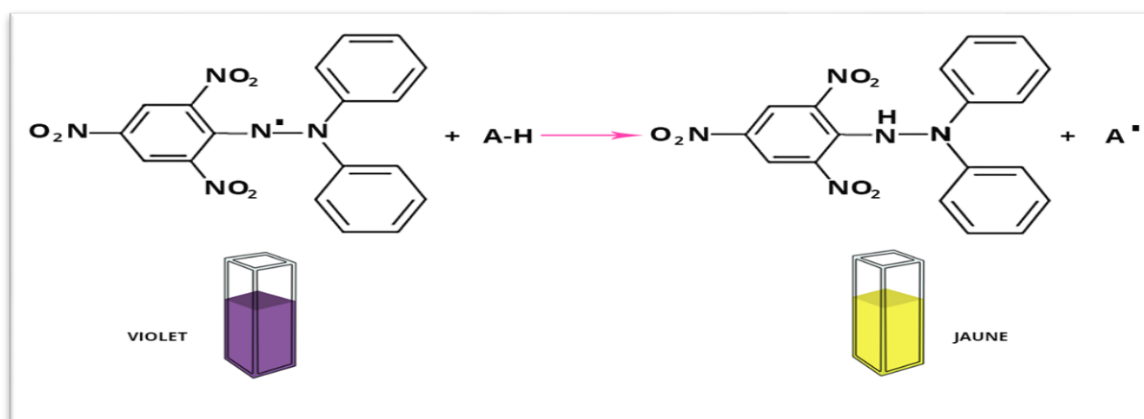


Figure 7 Mécanisme d'action d'un antioxydant sur le radical DPPH

○ Détection spectrophotométrique

La mesure s'effectue par spectrophotométrie dans la gamme spectrale de 515 à 520 nm, zone d'absorption maximale du radical DPPH. La diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde traduit directement la consommation du radical par les composés antioxydants présents dans l'échantillon testé (**Sanchez-Moreno, 2002**).

La procédure expérimentale débute par la préparation d'une solution mère obtenue en diluant 0,5 mL d'huile essentielle de *Citrus limon* dans 0,5 mL d'éthanol, soit un volume total de 1 mL. Compte tenu de la densité approximative de l'huile essentielle (0,87 g/mL), la concentration de cette solution mère est estimée à **430 mg/mL**.

Une série de dilutions au facteur 1/2 a ensuite été réalisée à partir de cette solution mère, permettant d'obtenir les concentrations suivantes : **430 ; 215 ; 107,5 ; 53,75 ; 26,875 mg/mL**.

Le protocole consiste à mélanger 0,05 mL de chaque dilution (soit 50 µL) avec 1,95 mL de solution éthanoïque de DPPH préparée à 0,024 mg/mL (correspondant à 0,024 g/L).

Parallèlement, l'acide ascorbique est utilisé comme référence antioxydante positive. Une solution mère à 1 mg/mL est préparée, puis diluée selon la même gamme de concentrations que les échantillons testés. Chaque dilution de la référence est mélangée avec la solution de DPPH dans les mêmes proportions : 0,05 mL d'échantillon pour 1,95 mL de DPPH.

Un témoin est simultanément préparé en combinant 0,05 mL d'éthanol pur avec 1,95 mL de solution de DPPH.

L'ensemble des mélanges réactionnels est maintenu à l'obscurité pendant **30 minutes** à température ambiante, afin de permettre la stabilisation des réactions de piégeage des radicaux libres. Les absorbances sont ensuite mesurées à **517 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant l'éthanol comme blanc de référence.

L'activité de l'huile essentielle a été comparée à l'acide ascorbique en tant que contrôle positif aux mêmes concentrations.

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH en pourcentage (%) a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Avec : A_contrôle : Absorbance du contrôle négatif ; A_échantillon : Absorbance du mélange réactionnel

La concentration inhibitrice médiane (**CI₅₀**) de l'huile essentielle, correspondant à la concentration nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux DPPH présents dans le milieu, a été calculée par analyse de régression linéaire à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme des concentrations testées. Chaque détermination a été effectuée en triplicata et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne .

5.2. Activité Antimicrobienne de l'huile essentielle du zeste de *Citrus limon*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a pour objectif de mesurer l'inhibition de la croissance des micro-organismes en présence de l'huile essentielle de *Citrus limon*. L'étude de son pouvoir antimicrobienn a été réalisée sur plus neuve bactérie et levure , en ayant recours à deux techniques : la méthode de diffusion sur disque et celle du contact direct sur milieu gélosé.

➤ **Origine des souches microbiennes**

Les souches pathogènes utilisées dans cette étude (**voir Tableau 05**) ont été sélectionnées en raison de leur potentiel pathogène

Tableau 5 Origines des souches microbiennes utilisées .

Bactéries Gram positif	Référence	Bactéries à Gram négatif	Référence	Champignons	Référence
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Candida albicans</i>	IP444
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603	—	—
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	—	—	—	—
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 15307	—	—	—	—

- **Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielle**

1. Mise en Culture des Souches

Les souches microbiennes, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37±1°C pour les bactéries et 30±1°C pour les levures pendant 24 à 48 heures, puis ensemencées sur boîtes contenant des milieux sélectifs pour vérifier leur pureté (Pessini et al., 2003).

Après 24 heures d'incubation à 37±1°C pour les bactéries et 30±1°C pour les levures, les souches sont ensemencées sur bouillon nutritif puis incubées pendant 18 heures aux mêmes températures. De cette culture, quelques gouttes sont prélevées et mises dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension microbienne est bien homogénéisée.

La turbidité est ajustée au standard Mc Farland 0,5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à :

- **Bactéries** : 1-2 × 10⁸ UFC/ml (DO = 0,08 à 0,1 / λ = 625 nm)
- **Levures** : 1-5 × 10⁶ UFC/ml (DO = 0,12 à 0,15 / λ = 530 nm)
- **Moisissures** : 10⁶ spores/ml avec une transmittance de 68-82% (λ = 530 nm)

Les suspensions de moisissures sont préparées à partir d'une culture de 7 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Pfaller et al., 1998).

II. Méthodes d'Évaluation de l'Activité Antimicrobienne

2.1 Méthode de Diffusion sur Disque (Aromatogramme)

La méthode de diffusion sur disque permet de tester qualitativement la sensibilité ou la résistance des micro-organismes par contact direct avec les huiles essentielles. Cette méthode est généralement utilisée pour la présélection de l'activité antimicrobienne, car le diamètre d'inhibition constitue une indication qualitative de la sensibilité des germes (**Fernandez et Chemat, 2012**).

a) Protocole Expérimental

Des disques de papier filtre Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés de :

- **Extraits** : 10 µl (300 µg/disque) solubilisés dans le DMSO
- **Huiles essentielles** : 20 µl (15 µl d'huile essentielle + 5 µl de DMSO)

Les disques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri (3 disques par boîte), préalablement ensemencées par écouvillonnage avec 1 ml de suspension microbienne :

- **Bactéries** : 10^6 UFC/ml (sauf *S. aureus* : 10^7 UFC/ml)
- **Levures** : 10^6 UFC/ml
- **Moisissures** : 10^4 spores/ml

b) Milieux de Culture

- **Bactéries** : Gélose Mueller-Hinton
- **Levures** : Milieu Sabouraud Dextrose Agar
- **Moisissures** : Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

c) Contrôles

- **Témoin négatif** : DMSO (20 µl/disque)
- **Témoins positifs** :
 - Ampicilline (10 µg/disque)
 - Oxacilline (1 µg/disque)
 - Nystatine (30 µg/disque)

d) Conditions d'Incubation

Les boîtes sont laissées 1 heure à température ambiante pour permettre la pré-diffusion, puis incubées :

- **Bactéries** : $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18-24 heures
- **Levures** : $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24-48 heures
- **Moisissures** : $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 3 jours

Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus.

e) Interprétation des Résultats

L'interprétation se fait selon la classification suivante :

- $\emptyset \leq 8 \text{ mm}$: non sensible
- $8 \text{ mm} < \emptyset \leq 14 \text{ mm}$: sensible
- $14 \text{ mm} < \emptyset < 20 \text{ mm}$: très sensible
- $\emptyset \geq 20 \text{ mm}$: extrêmement sensible

2.2 Méthode de Micro-dilution en Milieu Liquide

Cette méthode permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB) et fongicides (CMF) des substances antimicrobiennes testées (Okusa et al., 2007).

f) Protocole Expérimental

200 μl d'une solution préparée à partir de 2 ml de bouillon Mueller-Hinton, 40 μl d'huile essentielle et 40 μl de DMSO sont transférés dans une microplaque à 96 puits. Une gamme de concentrations est effectuée par des dilutions au 1/2 dans les milieux de culture.

À partir d'une culture microbienne de 24 heures, un inoculum est préparé :

- **Bactéries** : 10^6 UFC/ml
- **Levures** : 10^4 UFC/ml

100 μl de cet inoculum sont homogénéisés dans chaque puits de la gamme de concentrations puis incubés à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 ou 48 heures. Les concentrations finales obtenues sont comprises entre 20 et 0,156 $\mu\text{l}/\text{ml}$.

g) Contrôles

- **Témoin croissance** : milieu de culture + inoculum
- **Témoin stérilité** : milieu de culture seul
- **Témoin solvant** : inoculum + 0,1% Tween 80

h) Définition de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant pas de préciser si elle a été tuée ou si elle a seulement cessé de se multiplier (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999**).

La turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour.

B. III. Difficultés Techniques

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles présente des difficultés pratiques liées à :

- L'insolubilité des constituants dans l'eau
- Leur volatilité
- La nécessité de les tester à faibles concentrations

Ces contraintes influencent grandement les résultats obtenus (**Fernandez et Chemat, 2012**).

C. IV. Conditions d'Asepsie et de Stérilisation

L'ensemble du matériel (tubes à essai, disques en papier Whatman, milieux de culture) est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Toutes les manipulations sont réalisées dans des conditions d'asepsie strictes, dans un rayon de 10 cm autour de la flamme du bec Bunsen, avec flamage systématique des instruments et désinfection des surfaces de travail.

Résultats et Discussion

1. Rendement en huile essentielle des différents échantillons

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydro distillation, une méthode traditionnelle qui utilise la vapeur d'eau pour entraîner les molécules aromatiques contenues dans les écorces de citron. Cette technique présente l'avantage d'être accessible et efficace pour récupérer les composés volatils.

L'étude a été menée sur 8 échantillons d'écorces de Citrus limon provenant de deux stations distinctes de la wilaya de Tlemcen : El Fehoul et Saf Saf. Les prélèvements ont été effectués en trois fois durant les mois de janvier et mai, soit 4 échantillons par site. L'huile obtenue se caractérise par un aspect liquide translucide, une couleur variant du transparent au jaune clair et un parfum intense typique du citron.

Les rendements en huile essentielle, exprimés en pourcentage de la matière végétale fraîche, sont présentés dans les fig(8.9.10.11)

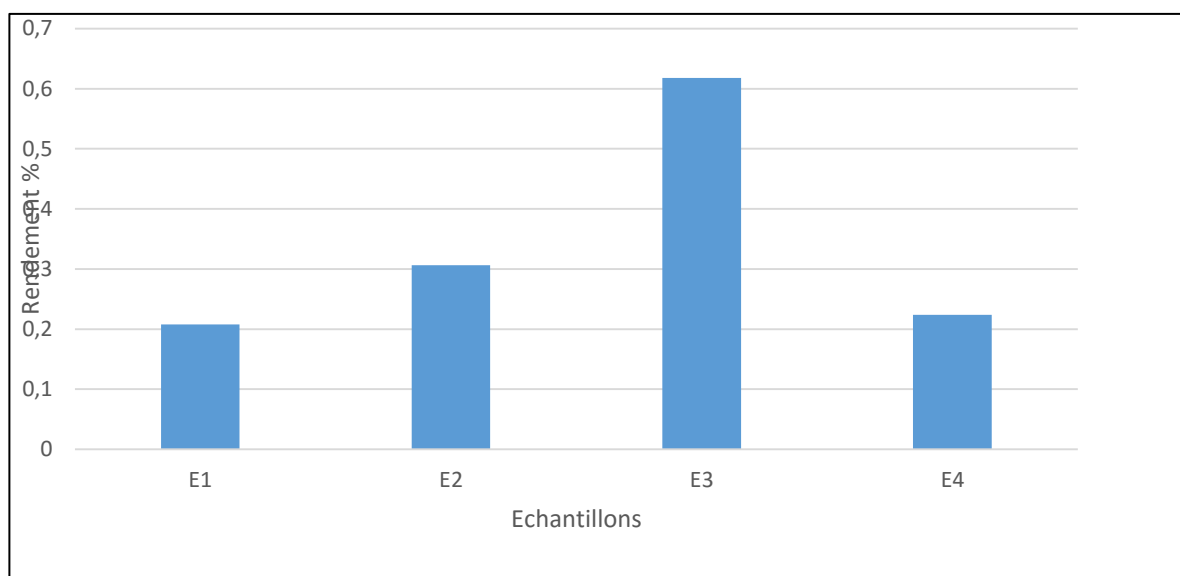


Figure 8 Pourcentages de rendement en huile essentielle obtenus à partir du zeste de Citron limon récolté à la station d'EL Fehoul

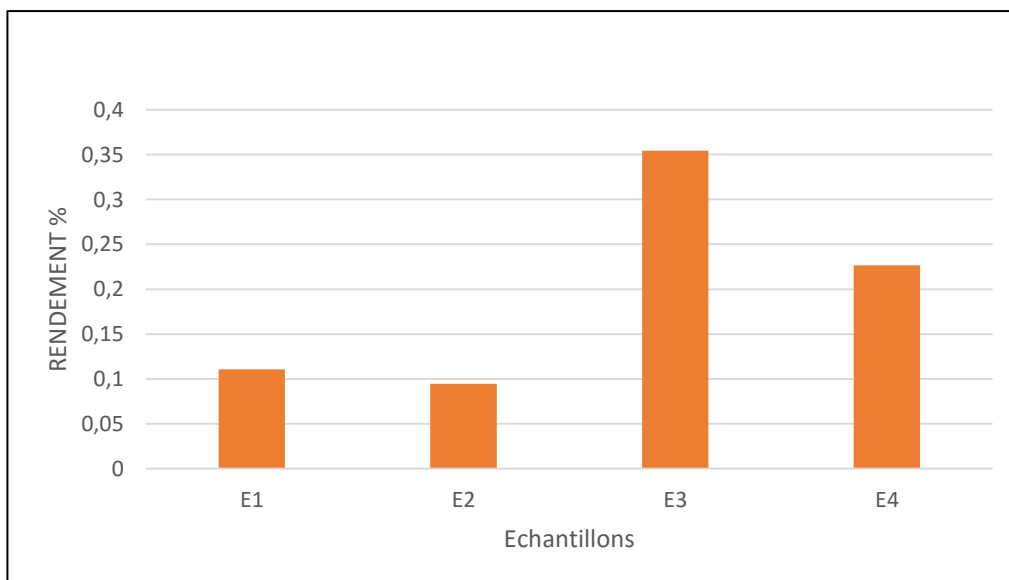


Figure 9 des disparités notables entre les échantillons. La station d'El Fehoul affiche des performances comprises entre 0,21% et

L'examen des rendements fait apparaître des disparités notables entre les échantillons. La station d'El Fehoul affiche des performances comprises entre 0,21% et 0,62% de matière fraîche, le pic étant atteint par l'échantillon E3. La station de Saf Saf enregistre des valeurs inférieures, s'échelonnant de 0,09% à 0,36%, avec également un optimum pour l'échantillon E3. ures ci-dessous :

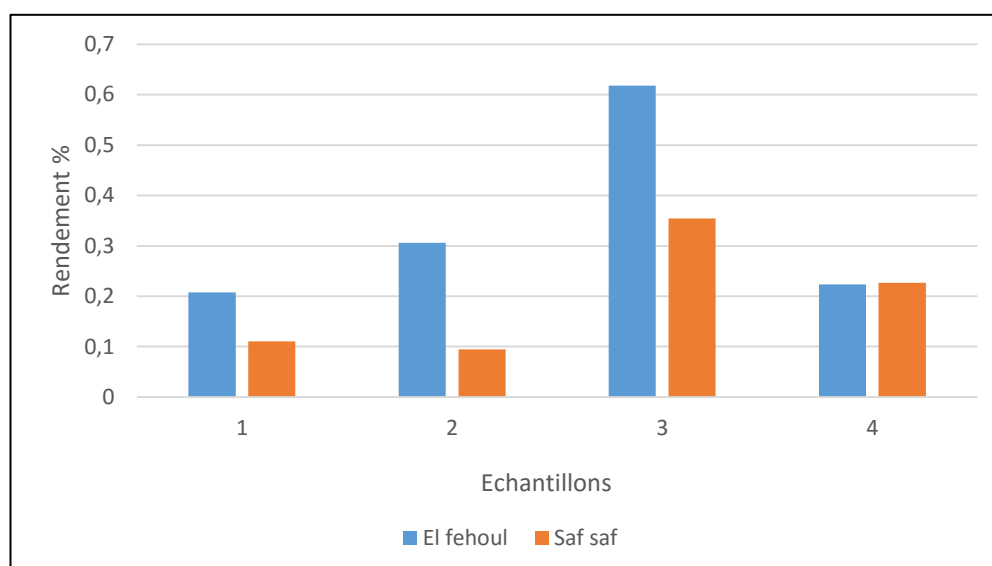


Figure 10 Évaluation comparative des rendements en huile essentielle (%) du zeste de Citrus limon provenant des deux stations

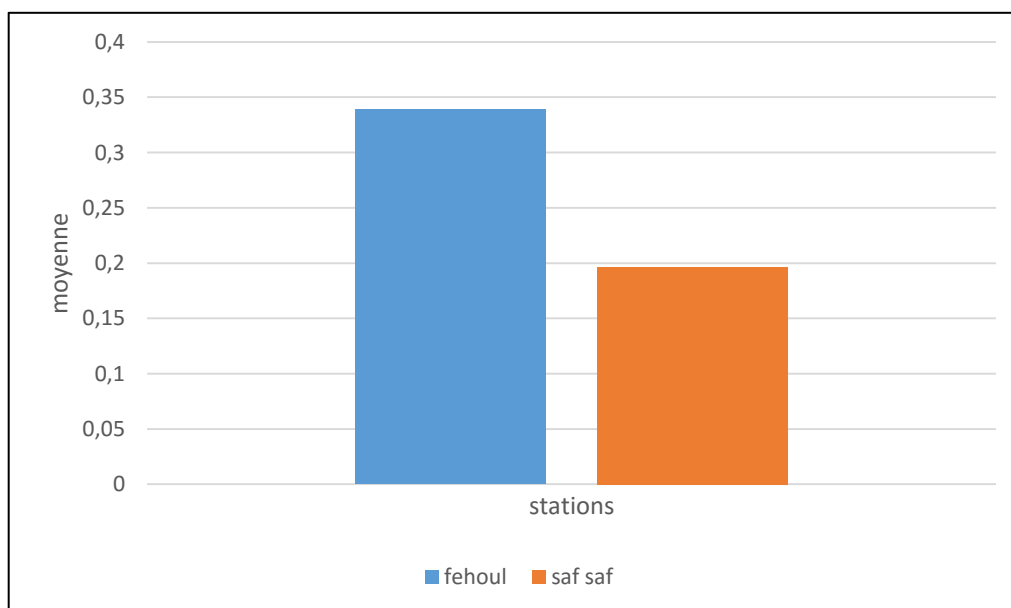


Figure 11 Rendements moyens (%) en huile essentielle du zeste de Citrus limon issus des deux stations.

Ces écarts de rendement trouvent leur origine dans plusieurs facteurs : les spécificités pédoclimatiques de chaque zone, l'état de maturité des fruits lors de la cueillette et les conditions de préservation avant traitement. Il ressort de cette analyse qu'El Fehoul offre un potentiel supérieur à Saf Saf pour la valorisation des agrumes en huile essentielle.

L'analyse comparative des rendements moyens en huile essentielle entre les deux stations d'étude révèle une différence significative. La station d'El Fehoul présente un rendement moyen de **0,34%**, tandis que la station de Saf Saf affiche un rendement moyen inférieur de **0,20%**. Cette variation inter-stationnelle de **0,14** point de pourcentage suggère une influence des facteurs environnementaux locaux sur la biosynthèse des composés volatils.

Les rendements individuels obtenus varient de **0,10% à 0,62%** pour la station d'El Fehoul et de **0,10% à 0,36%** pour la station de Saf Saf. Cette variabilité intra-stationnelle peut être attribuée aux différences microclimatiques, aux propriétés pédologiques des sols, ainsi qu'aux conditions de croissance spécifiques à chaque site de prélèvement.

Une analyse comparative de nos résultats avec les données de la littérature révèle que nos rendements se situent dans la fourchette basse des valeurs rapportées pour *Citrus limon*.

Plusieurs études antérieures rapportent des rendements supérieurs aux nôtres. **Ahmad et al. (2021)** rapportent des rendements de **0,30 à 1,21%** au Pakistan, dont les valeurs maximales restent supérieures à nos résultats. En Roumanie, **Manaila et al. (2016)** ont obtenu un rendement de **1,12%** par hydrodistillation, soit environ trois fois nos moyennes.

Les travaux de **Golmakani et Moayyedi (2015)** en Iran montrent des rendements de **1,18 à 1,36%** selon la méthode d'extraction (HD/MAHD/SFME), confirmant l'influence de la technique d'extraction sur les performances. Cette observation est corroborée par les résultats de **Brahmi et al. (2021)** au Maroc, qui rapporte un rendement de **2,3%** par hydrodistillation classique, pouvant atteindre 6,3% avec l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.

Les rendements les plus élevés sont rapportés par **Ngo et al. (2020)** au Vietnam avec **2,20%** pour *Citrus aurantifolia*, espèce phylogénétiquement proche de *C. limon*.

2. Étude des activités biologiques de l'huile essentielle du zeste de *Citrus limon*

Cette section porte sur l'évaluation de l'activité antioxydante et antifongique de l'huile essentielle extraite du zeste de *Citrus limon*. Pour disposer d'un volume suffisant en vue de réaliser l'ensemble des tests biologiques, les huiles essentielles provenant de deux échantillons distincts ont été regroupées : l'échantillon E3 de la station d'El Fehoul et l'échantillon E3 de la station de Saf Saf.

2.1 Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de l'HE de citron (*Citrus limon*) a été testé par la méthode de DPPH, en utilisant l'éthanol absolu comme solvant et la mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations. Les résultats sont reportés sur la Figure suivant.

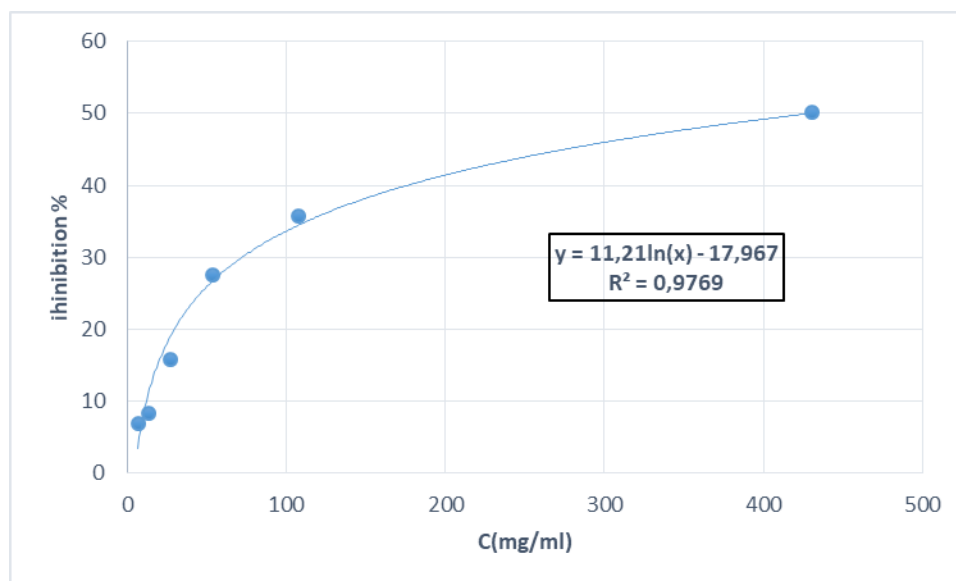


Figure 12: Évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle du zeste de *citron limon* El FEHOUL

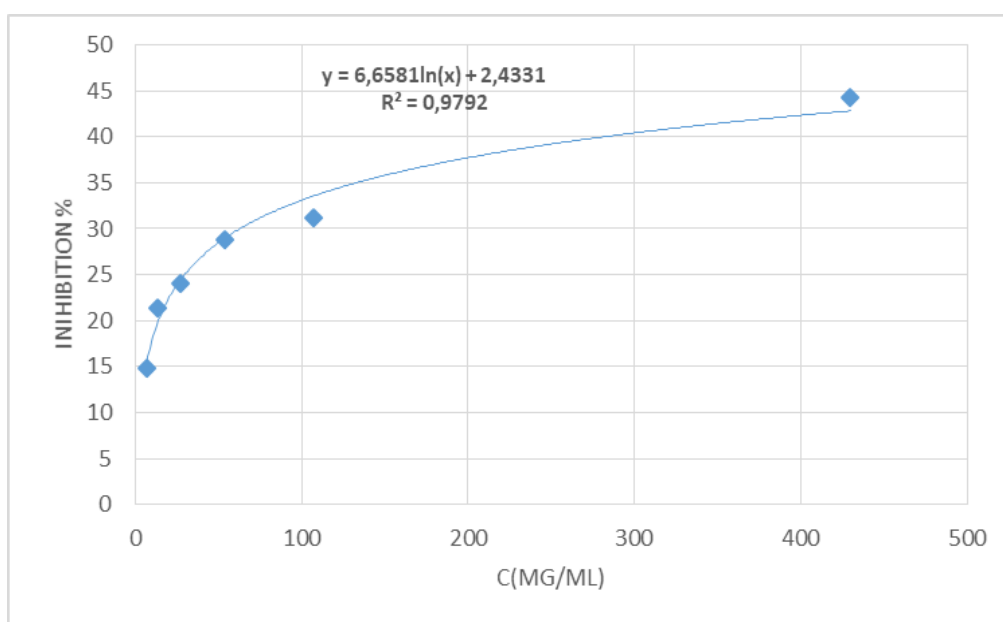


Figure 6 Évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle du zeste de citron limon de SAF SAF .

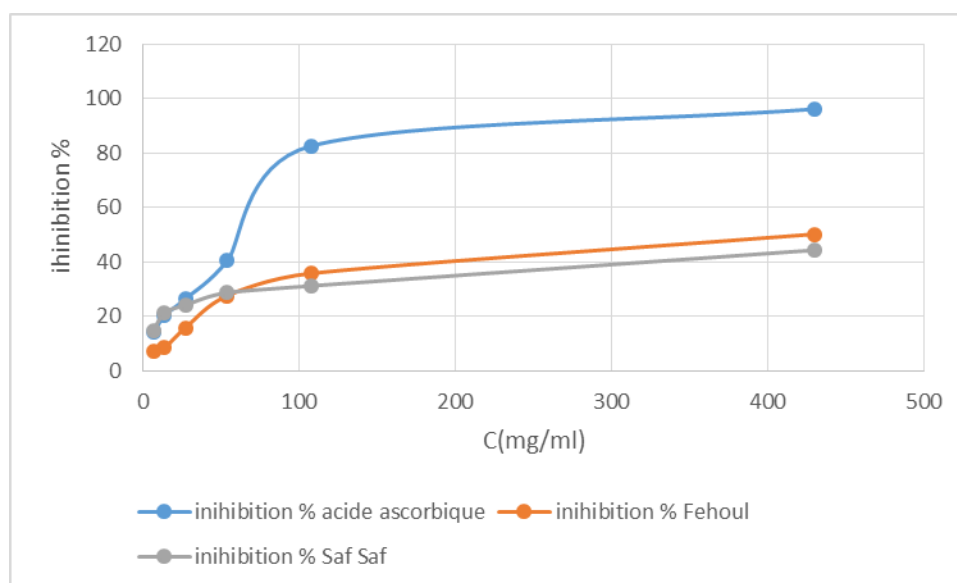


Figure 7 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'HE de *Citrus limon* comparée aux standards (SAF SAF, FEHOUL et Acide ascorbique)

D'après les résultats obtenus, l'activité antioxydante des échantillons testés révèle une réponse dose-dépendante caractéristique du test DPPH•. Les pourcentages d'inhibition augmentent avec la concentration, confirmant que l'efficacité des composés antioxydants s'accroît avec la dose.

À la concentration la plus élevée (430 mg/mL), l'échantillon **FEHOUL** présente une activité antioxydante plus élevée (**50,22 %**) que **SAF SAF** (**44,32 %**). Cette tendance se maintient aux concentrations plus faibles : par exemple, à **107,5 mg/mL**, FEHOUL affiche **35,78 %** contre **31,20 %** pour SAF SAF.

Cependant, les **valeurs d'IC₅₀** révèlent que **FEHOUL** est globalement plus efficace. En effet, **FEHOUL présente une IC₅₀ plus faible (≈ 431,5 mg/mL)** comparée à **SAF SAF (≈ 1271,3 mg/mL)**. Cela signifie que **FEHOUL nécessite une concentration plus faible pour inhiber 50 % des radicaux DPPH•**, et possède donc un **meilleur pouvoir antioxydant**.

À titre de comparaison, l'acide ascorbique, utilisé comme contrôle positif, présente une **IC₅₀ de 49,7 mg/mL**, ce qui confirme sa forte activité antioxydante.

Tableau 6: capacité de piégeage du radical DPPH par huile essentielle de citrus lion des différents échantillons testés exprimée en IC_{50}

Echantillons	IC_{50}
SAF SAF	1271,3mg/ml
FEHOUL	431,5 mg/ml
Acide ascorbique	49,7 mg/ml

Les valeurs d' IC_{50} représentent la concentration nécessaire d'un antioxydant pour neutraliser 50 % des radicaux libres. Plus cette valeur est faible, plus le pouvoir antioxydant est élevé. Ainsi, dans cette étude, **FEHOUL se montre plus actif que SAF SAF**, bien que tous deux restent nettement moins puissants que l'acide ascorbique.

Ces résultats sont globalement cohérents avec la littérature. Par exemple:

ChunYan et al. (2010) ont observé une inhibition de **70 % à seulement 120 $\mu\text{g/mL}$** , soit **0,12 mg/mL**, ce qui est **plus de 3 000 fois inférieur** à la concentration nécessaire pour atteindre 50 % d'inhibition avec l'extrait Saf Saf. Cette donnée met en évidence la **très haute efficacité** de certaines huiles riches en composés actifs, et souligne la **faible puissance antioxydante relative** de nos extraits.

Li et al. (2022) ont évalué l'huile essentielle de *Citrus limon* (LEO) sur une gamme de concentrations allant de 16 à 144 mg/mL. Ils ont observé une inhibition maximale de 79,35 % à 144 mg/mL, ce qui traduit une activité antioxydante nettement supérieure à celle observée pour les extraits Fehoul et Saf Saf, même à des concentrations beaucoup plus élevées (430 mg/mL). Cette efficacité est attribuée à la présence majoritaire de D-limonène, un monoterpène connu pour ses propriétés antioxydantes, ainsi qu'à l'effet synergique de composés secondaires comme le γ -terpinène et le β -pinène.

Moosavy et al. (2017), quant à eux, ont étudié l'huile essentielle de zeste de citron et rapporté une capacité de piégeage des radicaux DPPH• de 55,09 %, comparable à notre extrait de Fehoul (50,22 % à 430 mg/mL). Ils ont aussi montré que cette activité est liée à une teneur élevée en composés phénoliques ($81,82 \pm 8,02$ mg EAG/g d'huile essentielle) et en flavonoïdes ($11,72 \pm 1,82$ mg équivalent rutine/g). Les monoterpènes dominants comme le

DL-limonène et le γ -terpinène jouent un rôle clé dans cette action antioxydante, soutenant l'idée d'une corrélation positive entre richesse en polyphénols et activité DPPH•

Les huiles essentielles Fehoul et Saf Saf présentent une activité antioxydante dose-dépendante, avec un avantage clair pour Fehoul. Toutefois, en comparaison avec la littérature, leur efficacité reste modérée, voire faible. Cela pourrait s'expliquer par une teneur plus faible en D-limonène, monoterpènes actifs, phénols ou flavonoïdes.

Une analyse plus approfondie de la composition chimique (par GC-MS) est recommandée pour déterminer la présence ou absence des composés bioactifs responsables de cette activité.

2.2 Activité antimicrobienne :

Le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *C. limon* a été testé vis-à-vis de différentes souches bactériennes et fongiques en utilisant la méthode de diffusion sur disque et la méthode de contact direct en milieu gélosé.

2.2.1 Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* sont représentés dans les tableaux suivant.

Tableau 7: Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de Citrus limon (SAF SAF et EL Fehoul) vis-à-vis des différentes souches testées selon la méthode des disques.

Plante / Extrait	Diamètres zones d'inhibition mm								
	Gram +					Gram -			Levures
	<i>M. luteus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
Citron - HEF	18,3	22,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	19,0	6,0
Citron - HES	29,3	47,0	6,0	73,5	26,1	6,0	65,0	79,0	22,5
Témoins / Antibiotiques									
DMSO (10 µL/disque)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
AMX (25 µg/disque)	26,0	25,0	15,0	26,0	25,0	12,0	6,0	6,0	6,0
VA (30 µg/disque)	16,0	15,0	18,0	16,0	15,0	8,0	6,0	6,0	6,0
CN (30 µg/disque)	28,0	20,0	15,0	28,0	20,0	18,0	6,0	10,0	6,0
AMP (10 µg/disque)	27,0	22,0	20,0	27,0	22,0	15,0	6,0	6,0	6,0
OX (1 µg/disque)	16,0	12,0	8,0	16,0	12,0	6,0	6,0	6,0	6,0
OF (5 µg/disque)	27,0	25,0	22,0	27,0	25,0	29,0	24,0	20,0	0,0
CIP (5 µg/disque)	25,0	29,0	24,0	25,0	29,0	28,0	28,0	24,0	0,0
Ny (30 µg/disque)	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0

HEF: huile essentielle de région El Fehoul, HES:huile essentielle de région SAFSAF DMSO : Diméthylsulfoxyde (contrôle négatif) ; Contrôles positifs : Céphalexine CN. 30µg/disc), AMX. Amoxicilline ; VA. Vancomycine ; AMP. Ampicilline ; OX. Oxacilline ; OF. Ofloxacin ; CIP . Ciprofloxacine ; Ny. Nystatine.

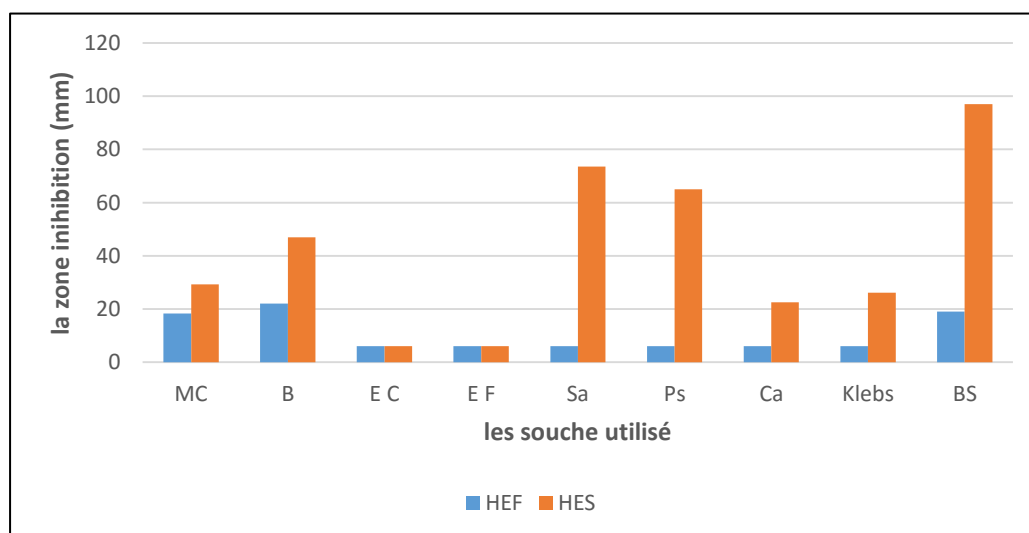


Figure 8 Comparaison des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles de Citrus limon issues de Fehoul (HEF) et Saf Saf (HES) sur différentes souches microbiennes.

l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des zestes de *Citrus limon*, récoltés dans deux stations différentes : Fehoul (HEF) et Saf Saf (HES). Le diamètre des zones d'inhibition obtenues permet d'apprécier l'efficacité relative de chaque échantillon vis-à-vis des souches microbiennes testées. Un diamètre supérieur à 10 mm est généralement considéré comme significatif (Tekwu et al., 2012 ; Rossi, 2003). Les résultats montrent que l'huile essentielle de Saf Saf (HES) présente une activité antimicrobienne remarquable contre la majorité des souches testées, avec des diamètres d'inhibition variant entre 22,5 mm et 97,0 mm. L'effet le plus prononcé a été observé contre *Bacillus subtilis* (79,0 mm), suivi par *Staphylococcus aureus* (73,5 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (65,0 mm). Cette forte activité peut être liée à une concentration élevée de composés bioactifs dans l'huile de cette provenance. En revanche, l'huile essentielle extraite à Fehoul (HEF) a révélé une activité plus modérée. Elle est active notamment contre *Micrococcus luteus* (18,3 mm), *Bacillus sp.* (22,0 mm) et *Bacillus subtilis* (19,0 mm). Aucune activité n'a été notée contre *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* pour les deux huiles testées, les diamètres observés étant équivalents à ceux du témoin négatif (6,0 mm). Ces résultats confirment que l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend non seulement de la souche microbienne ciblée, mais également de la composition chimique de l'extrait, elle-même influencée par les conditions de récolte, l'origine géographique et le mode de préparation. La comparaison avec les travaux antérieurs renforce ces constats.

En Tunisie, Ben Hsouna et al. (2017) ont rapporté des diamètres d'inhibition de $17,2 \pm 0,9$ mm pour *Klebsiella pneumoniae*, $17,4 \pm 1,0$ mm pour *Escherichia coli* et $15,0 \pm 0,8$ mm pour *Pseudomonas aeruginosa* à partir d'huile essentielle de zeste de *Citrus limon*. Nos résultats avec l'échantillon HES montrent une activité nettement supérieure contre *K. pneumoniae* (26,1 mm) et une inhibition exceptionnelle de *P. aeruginosa* (65,0 mm), soit plus de quatre fois la valeur rapportée. Toutefois, *E. coli* est resté insensible à nos deux huiles, contrairement à l'étude tunisienne. L'efficacité antimicrobienne rapportée par ces auteurs est principalement attribuée à la richesse en limonène, α -pinène, β -pinène, myrcène, linalool et β -caryophyllène, qui agissent en synergie pour perturber les membranes cellulaires des micro-organismes.

De même, Kačániová et al. (2024) ont observé une faible efficacité de l'huile essentielle de *Citrus limon*, avec des diamètres allant de $4,67 \pm 0,58$ mm pour *E. coli* à $7,67 \pm 0,58$ mm pour *M. luteus* et $6,33 \pm 0,58$ mm pour *S. aureus*. En comparaison, notre extrait HES a montré des

inhibitions respectives de 29,3 mm pour *M. luteus* et 73,5 mm pour *S. aureus*, traduisant une efficacité plus de dix fois supérieure dans ce dernier cas.

En Turquie, Bozkurt et al. (2017) ont rapporté des diamètres d'inhibition de 15 mm pour *Escherichia coli*, 13 mm pour *Staphylococcus aureus*, 14 mm pour *Listeria monocytogenes*, 15 mm pour *Bacillus cereus*, 9 mm pour *Enterococcus faecalis* et 10 mm pour *Salmonella typhimurium*, à partir d'huiles essentielles de zeste de *Citrus limon* (cultivars Meyer lemon et Interdonato lemon). Nos résultats avec l'échantillon HES révèlent une activité beaucoup plus marquée contre *Staphylococcus aureus* (73,5 mm), soit plus de cinq fois la valeur observée, tandis que *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* n'ont montré aucune sensibilité (6 mm), en contraste avec les inhibitions modérées rapportées dans cette étude. Par ailleurs, bien que *Bacillus subtilis* ne figure pas parmi les souches testées par Bozkurt et al., notre extrait HES s'est distingué par une inhibition exceptionnelle (79,0 mm), traduisant une efficacité remarquable.

L'efficacité antimicrobienne observée dans l'étude turque est principalement attribuée à la forte teneur en **d-limonène**, composé majoritaire de l'huile essentielle de citron, reconnu pour sa capacité à perturber l'intégrité des membranes cellulaires bactériennes, provoquant la fuite du contenu intracellulaire et la lyse cellulaire. Cette action peut être renforcée par d'autres monoterpènes présents en proportion variable selon les cultivars et les conditions d'extraction.

2.2.2 Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de contact direct

Les résultats obtenus par la méthode de contact direct sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6 Résultats de l'activité antimicrobienn par contact direct (puits actifs)

Souches microbiennes	HEF (volume appliqué)	HES (volume appliqué)
<i>Micrococcus luteus</i>	Puits 4 (2,5 µL)	Puits 5 (1,25 µL)
<i>Bacillus sp.</i>	Puits 2 (10 µL)	Puits 3 (5 µL)
<i>Escherichia coli</i>	Puits 1 (20 µL)	Puits 1 (20 µL)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Puits 1 (20 µL)	Puits 1 (20 µL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Puits 1 (20 µL)	Puits 2 (10 µL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Puits 1 (20 µL)	Puits 3 (5 µL)
<i>Candida albicans</i>	Puits 1 (20 µL)	Puits 6 (0,625 µL)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Puits 3 (5 µL)	Puits 5 (1,25 µL)

<i>Bacillus subtilis</i>	Puits 1 (20 µL)	Puits 3 (5 µL)
--------------------------	-----------------	----------------

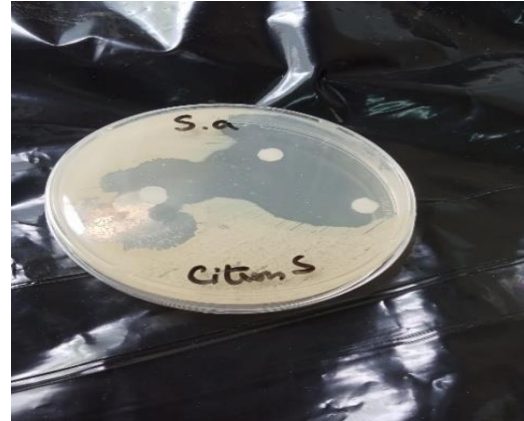
Les résultats de l'activité antimicrobienne par contact direct révèlent une supériorité marquée de l'huile essentielle de SAF SAF (HES) par rapport à l'huile essentielle d'El Fehoule (HEF). L'huile de SAF SAF démontre une efficacité 2 à 32 fois supérieure selon les souches testées, avec une performance exceptionnelle contre *Candida albicans* (0,625 µL vs 20 µL pour El Fehoule). Cette différence d'efficacité suggère une composition chimique distincte ou une concentration plus élevée en composés bioactifs dans l'huile de SAF SAF .

Le profil de sensibilité microbienne montre que *Micrococcus luteus* est la souche la plus sensible aux deux huiles, tandis qu'*Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* présentent une résistance équivalente (20 µL requis). Le large spectre d'activité observé englobe bactéries Gram-positives, Gram-négatives et levures, positionnant l'huile de SAF SAF comme un candidat prometteur pour des applications antimicrobiennes, notamment grâce à son efficacité remarquable contre les pathogènes cliniquement importants comme *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

La comparaison avec l'étude de **Moosavy et al. (2017)** sur l'huile essentielle de zeste de *Citrus limon* (Tabriz, Iran) révèle des différences d'efficacité pour *Staphylococcus aureus*. L'huile de citron iranienne présente une CMI de 1,25% contre *S. aureus*, tandis que nos résultats montrent que l'huile de SAF nécessite 10 µL et celle d'El Fehoule 20 µL par contact direct. Cette variation d'efficacité peut s'expliquer par les différences d'origine botanique (citron vs SAF/El Fehoule), de région géographique (Iran vs région d'étude) et de méthodologie d'évaluation (CMI vs contact direct), soulignant l'influence de ces facteurs sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

L'huile essentielle HES (Saf saf) de notre étude présente généralement une activité antimicrobienne supérieure aux huiles d'agrumes testées dans les études internationales, particulièrement contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Micrococcus luteus*. Cette efficacité remarquable peut être attribuée aux conditions géographiques et climatiques spécifiques de la région d'étude, à la variété locale de *Citrus limon*, ainsi qu'aux méthodes d'extraction utilisées qui ont permis de concentrer les composés antimicrobiens actifs. Néanmoins, l'absence d'activité contre *Escherichia coli* constitue une particularité de nos échantillons comparativement à certaines études antérieures.

Photo 7: Zones d'inhibition formées par l'huile essentielle de Citrus limon contre différentes souches bactériennes après incubation



Conclusion

La région de Tlemcen, située au nord-ouest de l'Algérie, bénéficie d'un climat méditerranéen favorable à la culture des agrumes, constituant ainsi un terroir privilégié pour la production d'huiles essentielles de qualité.

Dans le contexte actuel de recherche d'alternatives naturelles aux produits de synthèse, les huiles essentielles d'agrumes suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés biologiques diversifiées et de leur innocuité relative.

La présente recherche s'attache à caractériser et valoriser les huiles essentielles de *Citrus limon* (citron) issues de deux terroirs distincts de la région de Tlemcen : El Fehoul et Saf Saf. Notre démarche expérimentale a englobé l'extraction par hydrodistillation, l'évaluation des rendements d'extraction, ainsi que la caractérisation des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits obtenus.

Les rendements en huile essentielle sont variables, allant de 0,10% à 0,62% pour le verger d'El Fehoul et de 0,10% à 0,36% pour le verger de Saf Saf. Cependant, nous avons constaté que les échantillons prélevés dans la station d'El Fehoul sont les plus riches en huile essentielle (Moyenne = 0,34% contre 0,20% pour Saf Saf).

Les résultats des activités biologiques de l'huile essentielle de *C. limon*, nous permettent d'avancer les points suivants :

La première partie a été consacrée à l'étude de l'activité antioxydante des deux échantillons. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical DPPH a montré que l'échantillon d'El Fehoul présente un pouvoir réducteur de l'ordre de 50,22% contre 44,32% pour Saf Saf à la concentration de **430 mg/mL**. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont de l'ordre de **431,5 mg/mL** pour El Fehoul et **1271,3 mg/mL** pour Saf Saf. En revanche, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé, l'acide ascorbique, avec une IC₅₀ de **49,7 mg/mL**.

Dans un deuxième temps, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des deux stations a été évaluée à l'aide de deux approches complémentaires : la diffusion sur disque et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les résultats obtenus par diffusion sur disque révèlent une efficacité particulièrement marquée pour l'huile essentielle de Saf Saf, qui induit des diamètres d'inhibition très

élevés contre *Bacillus subtilis* (79,0 mm), *Staphylococcus aureus* (73,5 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (65,0 mm). L'huile issue d'El Fehoul présente également une activité antibactérienne, mais avec des diamètres plus modestes, variant entre 18,3 mm et 22,0 mm selon les souches testées.

L'analyse par la méthode de la CMI vient confirmer et affiner ces observations. Pour *Staphylococcus aureus*, la CMI de l'huile de Saf Saf est de 10 µL/mL, tandis que celle d'El Fehoul atteint 40 µL/mL, traduisant une efficacité quatre fois moindre. *Bacillus subtilis* est inhibé à une concentration de 5 µL/mL avec l'huile de Saf Saf, contre 20 µL/mL pour El Fehoul. De même, pour *Pseudomonas aeruginosa*, la CMI est de 20 µL/mL pour Saf Saf et 50 µL/mL pour El Fehoul.

Concernant *Candida albicans*, la souche fongique testée, une forte sensibilité est observée avec une CMI extrêmement basse de 0,625 µL/mL pour l'huile de Saf Saf, contre 5 µL/mL pour celle d'El Fehoul. Ce résultat confirme le pouvoir antifongique supérieur de l'échantillon de Saf Saf.

En revanche, aucune activité n'a été détectée à l'égard de *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* pour les deux huiles, que ce soit par diffusion sur disque ou par microdilution, indiquant une absence totale d'effet inhibiteur sur ces souches.

Ces résultats démontrent la bonne corrélation entre les deux méthodes utilisées et mettent en évidence une efficacité nettement plus élevée de l'huile essentielle de Saf Saf comparée à celle d'El Fehoul, tant pour les souches bactériennes que fongiques sensibles.

En perspective, plusieurs axes de recherche mériteraient d'être développés pour approfondir cette investigation :

L'identification et quantification des composés chimiques majoritaires par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, afin d'établir des corrélations structure-activité ;

- L'extension des tests antimicrobiens à d'autres souches pathogènes d'intérêt clinique et agroalimentaire, notamment les champignons filamenteux et les virus ;
- La caractérisation d'activités biologiques complémentaires telles que les propriétés anti-inflammatoires, antidiabétiques et neuroprotectrices ;
- La diversification des méthodes d'évaluation antioxydante par les tests FRAP, ABTS et ORAC pour une caractérisation plus complète du potentiel réducteur ;
- L'isolement et la purification des principes actifs majoritaires en vue du développement de molécules d'intérêt thérapeutique ou cosmétique.

Références bibliographiques

-A-

- **Abdu, K. M., Erahioui, R., Zahidi, A., Khedid, K., & IBN AHMED, S. (2021).** Evaluation of antifungal activity of lemon (Citrus lemon) in Marrakech and Kenitra cities Morocco. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(8), 4183-4190.
- **Agarwal, P., Sebghatollahi, Z., Kamal, M., Dhyani, A., Shrivastava, A., Singh, K. K., ... & Baek, K. H. (2022).** Citrus essential oils in aromatherapy: Therapeutic effects and mechanisms. *Antioxidants*, 11(12), 2374.
- **Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., & Kadhim, M. J. (2017).** A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9(1), 81-85.
- **Aroua, K. (2019).** INVENTAIRE DES COCHENILLES DES AGRUMES (CLÉMENTINIER ET ORANGER) DANS DEUX RÉGIONS DE LA MITIDJA (ALGÉRIE). *AGROBIOLOGIA*, 9(2), 1707-1714.
- **Asker, M., El-Gengaihi, S. E., Hassan, E. M., Mohammed, M. A., & Abdelhamid, S. A. (2020).** Phytochemical constituents and antibacterial activity of Citrus lemon leaves. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 1–7.
- **Aroua, F. (2019).** L'agrumiculture en Algérie : état des lieux, contraintes et perspectives. Mémoire de fin d'études, Université de Mostaganem, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

-B-

- **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. *Lipids in health and disease*, 16, 1-11.
- **Bencheikh, S. E., Bahmane, K., Djbrit, R., Goudjil, M. B., & Segni, L. (2024).** Comparative analysis of antioxidant and antibacterial activities of leaf and zest essential oils from "Citrus limon". *Studies in Engineering and Exact Sciences*, 5(2), e10124-e10124.

- **Benoudjit, F., Maameri, L., & Ouared, K. (2020).** Evaluation of the quality and composition of lemon (*Citrus limon*) peel essential oil from an Algerian fruit juice industry. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 6(4).
- **Bouabdallah, S., Cianfagione, K., Azzouz, M., Batiha, G. E. S., Alkhuriji, A. F., Al-Megrin, W. A. I., ... & Eldahshan, O. A. (2022).** Sustainable extraction, chemical profile, cytotoxic and antileishmanial activities in-vitro of some citrus species leaves essential oils. *Pharmaceuticals*, 15(9), 1163.
- **Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I., & Saïdani Tounsi, M. (2012).** Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, 2012(1), 528593.
- **Bozkurt, T., Gülnaz, O., & Kaçar, Y. A. (2017).** Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 11(10), 29-33.
- **Brahmi, F., Mokhtari, O., Legssyer, B., Hamdani, I., Asehraou, A., Hasnaoui, I., ... & Tahani, A. (2021).** Chemical and biological characterization of essential oils extracted from citrus fruits peels. *Materials Today: Proceedings*, 45, 7794-7799.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- **Budiarto, R., Khalisha, A., Sari, D. N., Ujilestari, T., Wahyono, T., Azmi, A. F. M., ... & Sholikin, M. M. (2024).** Antioxidant properties of lemon essential oils: a meta-analysis of plant parts, extraction methods, dominant compounds, and antioxidant assay categories. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11(1), 147.
- **Butelli, E., Garcia-Lor, A., Licciardello, C., Las Casas, G., Hill, L., Recupero, G. R., ... & Martin, C. (2017).** Changes in anthocyanin production during domestication of Citrus. *Plant Physiology*, 173(4), 2225-2242.
- **Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Colquhoun, I. J., & Martin, C. (2017).** *The origins of fruit quality traits in citrus: Comparative genomics reveals the genetic basis of antioxidant and carotenoid content. Scientific Reports*, 7(1), 1-10

-C-

- **ChunYan, H., Hong, P., ZhenYu, Z., & Jing, S. (2010).** Evaluation of antioxidant and antitumour activities of lemon essential oil. *J Med Plant Res*, 4, 1910-5.
- **Curk, F., & Ollitrault, P. (2018).** L'évolution des agrumes revisitée. INRAE – Cirad.
- **Chevalier, A. (1943).** Les agrumes : origine, distribution et amélioration. *Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Coloniale*, 23(250), 721–731.
- **Calabrese, F. (2002).** Les agrumes : origine, taxonomie et histoire de la culture. In: L'INRA, ed. *Les fruits tropicaux et méditerranéens*. Montpellier: CIRAD-INRA, pp. 45–56.

-D-

- **DOTSÉ, K., ASSAGBUI, R., KOUMAGLO, K., & ARNASON, J.** LA STANDARDISATION DES PHYTOMÉDICAMENTS PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC).

-E-

- **El Aboubi, M., Hdech, D. B., Bikri, S., Benayad, A., El Magri, A., Aboussaleh, Y., & Aouane, E. M. (2022).** Chemical composition of essential oils of Citrus limon peel from three Moroccan regions and their antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic and dermatoprotective properties. *Journal of Herbmед Pharmacology*, 12(1), 118-127.

-F-

- **Fernandez, X., Chemat, F. (2012).** *La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation*, Vuibert, Paris, 288p.

-G-

- **Ghorbanpour, M., Hadian, J., Nikabadi, S., & Varma, A. (2017).** Importance of medicinal and aromatic plants in human life. *Medicinal plants and environmental challenges*, 1-23.
- **Gmitter, F. G., Chen, C., Nageswara Rao, M., & Soneji, J. R. (2007).** Citrus fruits. *Fruits and Nuts*, 265-279.

- **Golmakani, M.-T., & Moayyedi, M. (2015).** Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation method for extraction of essential oils from citrus limon peels: Yield, time, energy and chemical composition. *Food Chemistry*, 172, 557–564.
- **Gülçin, I. (2012).** Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345–391.
- **Gupta, M., Gularia, P., Singh, D., & Gupta, S. (2014).** Analysis of aroma active constituents, antioxidant and antimicrobial activity of *C. sinensis*, *Citrus limetta* and *C. limon* fruit peel oil by GC-MS. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(2), 895-899.
- **Günther, A. (1887).** *Report on the deep-sea fishes collected by H.M.S. Challenger during the years 1873–1876.* In *Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–76, Zoology (Vol. 22, pp. 1–335).* London: Her Majesty's Stationery Office.

-H-

- **Hellal Zohra. (2011).** Caractérisation physico-chimique et biologique des huiles essentielles de quelques espèces de *Citrus* cultivées en Algérie. Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, 157 p.
- **Himed, L., Merniz, S., & Barkat, M. (2016).** Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. *Algerian Journal of Natural Products*, 4(1), 252–260.
- **Howes, M. J. R., et al. (2004).** Analysis of sandalwood essential oils using GC–MS. *Journal of Chromatography A*, 1028, 307–312.

-I-

- **Inoue, M., Hayashi, S., & Craker, L. E. (2019).** Role of medicinal and aromatic plants : Past, present, and future. In *Pharmacognosy-medicinal plants*. IntechOpen.

-K-

- **Kačániová, M., Čmiková, N., Vukovic, N. L., Verešová, A., Bianchi, A., Garzoli, S., ... & Vukic, M. D. (2024).** Citrus limon essential oil: chemical composition and Selected biological properties focusing on the antimicrobial (in vitro, in situ), Antibiofilm, Insecticidal activity and preservative effect against *Salmonella enterica* inoculated in carrot. *Plants*, 13(4), 524.
- **Kamiri, M. (2011).** Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes (Doctoral dissertation, Université de Corse).
- **Kehal, F., Chemache, L., Himed, L., & Barkat, M. (2023).** Antimicrobial and Antioxidant Activities of Citrus limon Peel Essential Oils and their Application as a Natural Preservative in Fresh Cream: Effects on Oxidative and Sensory Properties. *Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology*, 27(1).
- **Klimek-Szczykutowicz, M., Szopa, A., & Ekiert, H. (2020).** Citrus limon (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants*, 9(1), 119.

-L-

- **Li, Y., Liu, S., Zhao, C., Zhang, Z., Nie, D., Tang, W., & Li, Y. (2022).** The chemical composition and antibacterial and antioxidant activities of five citrus essential oils. *Molecules*, 27(20), 7044.
- **Liu, S., Li, S., & Ho, C. T. (2022).** Dietary bioactives and essential oils of lemon and lime fruits. *Food Science and Human Wellness*, 11(4), 753-764.
- **Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Sanzo, G. D., Verardi, A., Lopresto, C. G., ... & Calabrò, V. (2016).** Chemical profile and antioxidant properties of extracts and essential oils from *Citrus* × limon (L.) burm. Cv. Femminello comune. *Chemistry & biodiversity*, 13(5), 571-581.
- **Lota, M.-L., De Rocca Serra, D., Tomi, F., & Casanova, J. (2002).** Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of the genus *Citrus* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(1), 61–78.
- **Luro, F., Costantino, G., Ollitrault, P., & Curk, F. (2022).** Origine et évolution de la diversité des agrumes.

-M-

- **Maaroufi, Z., Cojean, S., Loiseau, P. M., Yahyaoui, M., Agnely, F., Abderraba, M., & Mekhloufi, G. (2021).** In vitro antileishmanial potentialities of essential oils from Citrus limon and Pistacia lentiscus harvested in Tunisia. *Parasitology Research*, 120, 1455-1469.
- **Marion, D. (2013).** An introduction to biological NMR spectroscopy. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(11), 3006-3025.
- **Marriott, P. J., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001).** Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of chromatography A*, 936(1-2), 1-22.
- **Martínez, M. F., López, H. B., & Orduz-Rodríguez, J. O. (2020).** Capítulo I Generalidades del cultivo, descripción botánica, variedades y fenología de la lima ácida Tahití. *Modelo productivo*, 25.
- **Mohanapriya, 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.
- **Moosavy, M. H., Hassanzadeh, P., Mohammadzadeh, E., Mahmoudi, R., Khatibi, S. A., & Mardani, K. (2017).** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Lemon (*Citrus limon*) peel in vitro and in a food model. *Journal of food quality and hazards control*, 4(2), 42-48.
- **Muselli, A. (2007).** Analyse des mélanges complexes de volatils issus des végétaux (Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli).
- **Mohanapriya, M., Ramaswamy, L., & Rajendran, K. (2013).** Health and medicinal properties of lemon (*Citrus limon*). *International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 3(1), 1095–1100.
- **MADR (Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural). (2021).** Annuaire statistique de l’agriculture 2020. Direction des statistiques agricoles, Algérie

-N-

- **Ngo, T. C. Q., Tran, T. K. N., Dao, T. P., Tran, T. H., Ngo, H. D., Huynh, X. P., ... & Mai, H. C. (2020, December).** Yield and composition analysis of Vietnamese lemon (*Citrus aurantifolia*) essential oils obtained from hydrodistillation and

microwave-assisted hydrodistillation. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 991, No. 1, p. 012123). IOP Publishing.

-O-

- **Oliveira, S. A. C., Zambrana, J. R. M., Di Iorio, F. B. R., Pereira, C. A., & Jorge, A. O. C. (2013).** The antimicrobial effects of Citrus limonum and Citrus aurantium essential oils on multi-species biofilms. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 22-27.
- **Owolabi, M. S., Avoseh, O. N., Ogunwande, I. A., Setzer, W. N., Ogungbo, R., Ogundajo, A. L., ... & Flamini, G. (2018).** Chemical composition of Citrus limon (L.) Osbeck growing in Southwestern Nigeria: Essential oil chemotypes of both peel and leaf of lemon. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 6(4).

-P-

- **Paw, M., Begum, T., Gogoi, R., Pandey, S. K., & Lal, M. (2020).** Chemical composition of Citrus limon L. Burmf peel essential oil from North East India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(2), 337-344.
- **Praloran, J. C. (1965).** Les agrumes en Corse dans la seconde moitié du XIXe siècle.
- **Rafique, S., Hassan, S. M., Mughal, S. S., Hassan, S. K., Shabbir, N., Perveiz, S., & Farman, M. (2020).** Biological attributes of lemon: A review. *Journal of Addiction Medicine and Therapeutic Science*, 6(1), 030-034.
- **Rossi, P.-G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., de Rocca Serra, D., & Gonny, M. (2007).** Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19(2), 176–182.

-R-

- **Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014).** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
- **Romulo, A. (2020, February).** The principle of some in vitro antioxidant activity methods. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 426, No. 1, p. 012177). IOP Publishing.

- **Rossi, R., Corino, C., Pastorelli, G., Durand, P., & Prost, M. (2009).** Assessment of antioxidant activity of natural extracts. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup2), 655-657.

-S-

- **Sanchez-Moreno, C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- **Settaoui, S., Taibi, A., Hammadi, F., & Doumandji, S. (2017).** Infestation des agrumes par la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)(Diptera, Trypetidae) à Tlemcen-Algérie. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 7(1), 102-110.
- **Snoussi Trifa, H. (2013).** Diversité génétique intra et interspécifique des porte-greffes d'agrumes utilisés en Tunisie (Doctoral dissertation, INAT).

-T-

- **Taktak, O., Ben Ameer, R., Ben Youssef, S., Pieters, L., Foubert, K., & Allouche, N. (2021).** Chemical composition and biological activities of essential oils and organic extracts from fresh and sun-dried Citrus limon peels. *Chemistry Africa*, 4, 51-62.
- **Thapa, S., Poudel, K., Limbu, S. K., Dahal, G., & Pokhrel, S. (2022).** Phytochemical screening, GC analysis and antibacterial activity of citrus limon peel extract and essential oil. *Journal of Nepal Chemical Society*, 43(1), 69-75.
- **Tekwu, E. M., Pieme, A. C., & Beng, V. P. (2012).** Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1), 265–273.

-W-

- **Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., ... & Talon, M. (2018).** Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311-316.

-Z-

- **ZERBANI Ghania (2020)**. Caractéristiques physico-chimiques et antimicrobiennes des savons additionnés à l'huile essentielle de citron (Citrus limon). Mémoire de Master, Université de Ghardaïa, Faculté des Sciences et Technologies, Département de Génie des Procédés, spécialité Génie chimique, 93 p.

Annexes

Tableau 1 : Rendements (en %) en huile essentielle du zeste de *Citron limon* (Station El Fehoule)

Echantillons	Poids (g) (matériel végétal)	Poids HE (g)	Rendements (%)
E1	1000	2.077	0.207
E2	998	3.062	0.306
E3	1000	6.180	0.618
E4	1000	2.234	0.223
Moy ± ET		0,338	

E : Echantillon, HE : Huile essentielle, Moy : Moyenne, ET ; Ecart type

Tableau 2 : Rendements (en %) en huile essentielle du zeste de *Citron limon* (Station SAF SAF).

Echantillons	Poids (g) (matériel végétal)	Poids HE (g)	Rendements (%)
E1	1006	1.112	0.110
E2	800.96	0.756	0.094
E3	1000	3.544	0.354
E4	999.87	2.266	0.226
Moy ± ET		0,196	

E : Echantillon, HE : Huile essentielle, Moy : Moyenne, ET ; Ecart type