

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la vie**

**Département de Biotechnologie agro écologique**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme**

**de Master en Sciences de la Nature et de la Vie**

**Option : Biotechnologie et Valorisation de Plantes**

**Thème**

Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des écorces de fruits de deux especes d'agrumes, *Citrus sinensis* (Orange) et *Citrus limonum* (Citron)

Présenté par :

**Bouzar Yousra**

**El kechbour Chaima**

**Ghezzali Amina**

Devant le jury composé de :

**Président : Mr Abbad M M.C.A (Université de Blida 1)**

**Examinatrice : Mme Ghanai R M.C.B (Université de Blida 1)**

**Promoteur : Mr Bendali A M.A.A (Université de Blida 1)**

**Année universitaire : 2021/2022**

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*à celui qui m'a donné tout ce qu'il possédait pour que je puisse réaliser ses espoirs en moi, à l'homme qui a possédé l'humanité de toutes ses forces, à celui qui a veillé sur mon éducation par des sacrifices.*

*À ma première école dans la vie, mon cher père, que Dieu le protège et prolonge sa vie.*

*Et à celle qui a accordé la douceur de son foie avec toute la tendresse, à celle qui était patiente avec tout, et dont la prétention à moi était le succès, m'a suivi pas à pas dans mon travail, à qui je suis aîsée chaque fois que je me souviens son sourire sur son visage, source de tendresse, ma mère est mon ange le plus cher.*

*Pour eux je dédie cet humble acte afin d'apporter dans leur coeur un peu de bonheur à ma soeur et la lumière de mes yeux et mes soeurs qui sont mon soutien dans la vie.*

*Et à celui qui m'a appris la détermination et la passion sincère qui a illuminé le chemin de ma vie en toute sincérité, à mon compagnon de route et l'amour de ma vie, mon mari.*

*Et mes amies Radia et Yousra aussi pour leur soutien continu.*

*Amína*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*Aux deux être les plus chers au monde, mes parents que dieu nos les garde, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer..*

*A ma très chère mère qui est la lumière de ma vie, et qui a attendu avec Patience le fruit de sa bonne éducation ; A mon très cher père qui m'a éclairée mon chemin et qui m'a encouragé et soutenue tout au long de mes études*

*A mes chers frères ( ahmed , boualem , rida et achref ) et Mes chères soeurs ( amina, soumia, meriem, radia)*

*Merci pour vos prières et votre soutien sans faille. Que l'esprit d'amour règne toujours au milieu de nous.*

*Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et mes copines*

*(asma, nada ,assala ,maroua et houda ) qui m'ont toujours encouragé, pour leur sincère amitié et confiance, et à qui je dois ma reconnaissance et mon attachement.*

*A tous ceux que j'aime et que je respecte.*

*Chaïma*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma source de mon bonheur mon cher papa et ma maman chérie*

*Sans eux je*

*n'ai pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts,*

*leurs amours et*

*leurs encouragements durant toutes mes études.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour*

*éternel*

*et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour*

*mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le*

*soutien et l'amour. Que dieu vous protège et garde pour moi je vous*

*aime très fort.*

*À ma grande mère qui a été toujours à mes côtés et me souhaite que*

*les meilleures veux, que dieu prolonge sa vie.*

*À mes meilleures amies Hanane et Amina pour leur sincère amitié,*

*confiance et encouragements à moi .*

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma  
profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

***Yousra***

## **REMERCIEMENTS**

*Tout d'abord, nous tenons à nos plus sincères remerciements vont au ALLAH pour nous avoir protégées, guidées et orientées durant toute notre vie et tout au long de notre parcours universitaire, et pour nous donner la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre plus grande reconnaissance à nos parents qui font ce qui nous sommes devenu aujourd'hui.*

*Nous tenons à remercier profondément : Notre promoteur Mr Bendali Abdelaziz de nous avoir confié ce travail riche d'intérêt et d'avoir accepté de le diriger à chaque étape de sa réalisation et dont l'aide précieuse que nous a été indispensable sur le plan scientifique et technique et les grandes qualités humaines : votre amabilité, gentillesse, confiance et sympathie que vous nous avez témoignées au cours de pratique, vous méritent toute admiration.*

*Nous remercions Mr Abbad respectivement d'avoir accepté de présider le jury de ce manuscrit,*

*Mme Ghanai de nous faire l'honneur d'examiner notre travail.*

*Sans oublier le membre du laboratoire de la station expérimentale :*

*Mr Ghribi Youcef pour leur disponibilité, leur soutien et leur formation pour nous au sein de l'extraction des huiles essentielles.*

*Enfin, nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

*À tous ces intervenants, nous présenterons nos remerciements, notre respect et notre gratitude.*

# Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale .....	1

## *Partie bibliographique*

### **CHAPITRE I : Généralités sur les agrumes**

1	Historique .....	4
2	Définition .....	4
3	Produits dérivés des agrumes .....	5
4	Présentation botanique .....	5
4.1	La famille des rutacées .....	5
4.1.1	Le genre Citrus .....	5
4.1.1.1	Classification botanique .....	6
4.1.1.2	Caractères spécifiques des Citrus .....	6
4.1.1.2.1	Ecorce du fruit de Citrus .....	6
4.1.1.2.2	L'espèce Citrus sinensis .....	7
4.1.1.2.2.1	Position systématique .....	8
4.1.1.2.2.1.1	Caractéristiques de citrus sinensis .....	8
4.1.1.3	L'espèce Citrus Limonum .....	9
4.1.1.3.1	Position systématique .....	10
4.2	Caractéristiques de citrus limonum .....	11

### **CHAPITRE II : Les huiles essentielles**

1	Généralités sur les huiles essentielles .....	12
1.1	Définition des huiles essentielles .....	12
1.2	Rôle des huiles essentielles .....	13
1.3	Critères déterminants la qualité des huiles essentielles .....	13

1.4	Caractérisation des huiles essentielles .....	14
1.4.1	Caractéristiques organoleptiques : .....	14
1.4.2	Caractéristiques physico-chimiques : .....	14
1.5	Composition chimique des huiles essentielles .....	15
1.5.1	Les Terpénoïdes (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>n</sub> .....	15
1.5.2	Les composés aromatiques : .....	16
1.5.3	Les composés d'origine diverses : .....	16
1.6	Biosynthèse des huiles essentielles .....	17
1.7	Analyse physico-chimique des huiles essentielles .....	17
1.7.1	Chromatographie en phase gazeuse : .....	18
1.7.2	La spectrométrie de masse : .....	18
1.7.3	Analyse par couplage CPG/SM .....	19
1.8	Classification des huiles essentielles .....	20
1.9	Conservation des huiles essentielles .....	20
1.10	Toxicité des huiles essentielles : .....	21
1.11	Domaines d'utilisation des huiles essentielles .....	22
<b>2</b>	<b>Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....</b>	<b>23</b>
2.1	Extraction par Hydrodistillation .....	24
2.2	Extraction par solvant organique .....	25
2.3	Le CO <sub>2</sub> supercritique .....	25
2.4	Extraction assistée par micro-ondes .....	26
2.5	Extraction par ultrasons .....	27
2.6	Extraction par incision .....	28
2.7	Extraction en enfleurage .....	28
2.8	Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	28
2.9	Expression mécanique à froid .....	29
<b>3</b>	<b>Les activités biologiques des huiles essentielles .....</b>	<b>30</b>
3.1	Activité antimicrobienne .....	31
3.1.1	L'activité antifongique : .....	31
3.1.2	L'activité antivirale : .....	31
3.1.3	L'activité antibactérienne : .....	32
3.1.3.1	Définitions: .....	32
3.1.3.2	Morphologie et Structure des bactéries: .....	33
3.1.3.3	Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries: .....	34

3.1.3.4	Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne .....	35
3.1.3.4.1	Les techniques en Milieu solide:.....	35
3.1.3.4.2	Les techniques en milieu liquide.....	37
3.2	Activité antioxydante :.....	38

### CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

1	Huiles essentielles d'agrumes .....	38
1.1	L'huile essentielle de Citrus Sinensis : .....	39
1.2	L'huile essentielle de Citrus Limonum .....	42
2	Composition chimique des essences et huiles essentielles de Citrus .....	44
2.1	Limonène.....	44
2.1.1	Définition : .....	44
2.1.2	Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène : .....	45
2.1.3	Propriétés optiques du limonène : .....	46
2.1.4	La biosynthèse du limonène : .....	47
2.1.5	Aspects biologiques et toxicologiques du limonène : .....	47
2.1.6	Quelques usages du limonène : .....	48

### *Partie expérimentale*

#### CHAPITRE IV : Techniques d'études et conditions expérimentales

1	Matériels et méthode .....	50
1.1	Matériel végétale : .....	50
1.2	Souches microbiennes : .....	50
1.3	Produits utilisés : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.4	Préparation du matériel végétal : .....	52
1.5	Procédé d'extraction : .....	52
1.5.1	Calcul du rendement : .....	54
1.5.2	Etude de la cinétique d'extraction : .....	54
2	Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles .....	55
2.1	Technique en milieu solide (Aromatogramme) : .....	55
2.1.1	Stérilisation du matériel : .....	55
2.1.2	Préparation des milieux de cultures : .....	55

2.1.3	Préparation de préculture : .....	56
2.1.4	Préparation de l'inoculum .....	56
2.1.5	Ensemencement : .....	57
2.1.6	Dépôts des disques : .....	57
2.1.7	Lecture des résultats : .....	57

## **CHAPITRE V : Résultats et discussion**

1	Rendement des huiles essentielles : .....	60
2	Etude de la cinétique d'extraction : .....	60
3	Activité biologique des huiles essentielles .....	62
3.1	Aromatogramme : .....	62
3.1.1	Essai avec l'huile essentielle de Citrus Sinensis .....	62
3.1.2	Essai avec l'huile essentielle de Citrus Limonum .....	66
3.1.3	Etude de l'activité antifongique : .....	68
	Conclusion .....	72

Références bibliographique

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse

**CMI**: Concentrations minimales inhibitrices

**DMAPP**: Diméthylallyl-pyrophosphate (Composé chimique)

**GPPG** : diphosphate de géranyle

**H.E** : Huile essentielle

**IPP** : Isopentenyl pyrophosphate

**LPS** : Lipo-polysaccharides

**SM** : Spectrométrie de masse

## Liste des figures

<b>Numéro de figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Morphologie de fruit de Citrus Sinensis	7
2	Aspect morphologique des feuilles et du fruit de Citrus Sinensis	8
3	Morphologie de fruit de Citrus Limonum	9
4	Aspect morphologique des feuilles et du fruit de Citrus limonum	10
5	Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse	18
6	Schéma du principe de mesure par spectrométrie de masse	19
7	Schéma du principe de couplage CPG/SM	20
8	Schéma des modes d'extraction des huiles essentielles	24
9	Schéma du principe d'Hydrodistillation	25
10	Schéma du procédé de l'extraction par CO2 supercritique	26
11	Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes	27
12	Schéma du principe d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	28
13	Schéma du principe d'extraction par expression mécanique à froid	29
14	Structure d'une cellule bactérienne	33
15	Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries	34
16	Principe de méthodes de Vincent	35
17	principe de l'activité antimicrobienne par micro-atmosphère	36
18	Structure du limonène	44

<b>19</b>	Enantiomères du limonène	46
<b>20</b>	Les écorces fraîches de Citrus Limonum et Citrus Sinensis	53
<b>21</b>	Dispositif d'extraction des huiles essentielle par hydrodistillation	53
<b>22</b>	Les huiles essentielles extraites	54
<b>23</b>	Incubation des microorganismes sur milieu liquide	57
<b>24</b>	Quantité en ml des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum extraites en fonction du temps	62
<b>25</b>	Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre les souches bactériennes à Gram-	64
<b>26</b>	Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre les souches bactériennes à Gram+	65
<b>27</b>	Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Limonum contre les souches bactériennes à Gram-	67
<b>28</b>	Effet inhibitrice de l'huile essentielle de C.Limonum contre les souches bactériennes à Gram+	68
<b>29</b>	Effet inhibitrice des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum contre la levure Candida albicans	70

## Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre	Page
1	Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'Agrumes	38
2	Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de Citrus Sinensis	40
3	Spécificités biochimiques et caractéristique de l'huile essentielle de Citrus Limonum	42
4	Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène	45
5	Provenance des germes utilisés	51
6	Tableau Rendements en huiles essentielles de Citrus en (%)	60
7	L'évaluation des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum durant l'extraction	61
8	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Escherichia coli	63
9	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Pseudomonas aeruginosa	63
10	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Bacillus ceureus	64
11	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Staphylococcus aureus	65
12	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre	66

	la bactérie Escherichia coli	
<b>13</b>	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Pseudomonas aeruginosa	66
<b>14</b>	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Bacillus ceureus	67
<b>15</b>	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Staphylococcus aureus	67
<b>16</b>	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la levure Candida albicans	69
<b>17</b>	Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la levure Candida albicans	69

## Résumé

### **Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des écorces de fruits de deux espèces d'agrumes, *Citrus sinensis* (Orange) et *Citrus limonum* (Citron)**

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

Les H.E extraites par hydrodistillation à partir des écorces d'agrumes de *Citrus Limonum*, *Citrus Sinensis*, ont présenté un faible rendement allant de 0,18 à 0,23%.

L'activité antibactérienne des deux H.E a été déterminée in vitro par la méthode d'aromatogramme ( technique en milieu solide ) sur 5 souches ( 04 bactéries et 01 levure ) .

Les bactérie gram +(staphylococcus aureus et bacillus ceureus ), les bactérie gram – (escherichia coli et pseudomonas aeruginosa) ,la levure (candida albicans).

Le screening a mis en évidence que les deux H.E possèdent une activité bactériostatique remarquable sur la croissance de certaines souches bactériennes, En outre, ces deux H.E présente un fort pouvoir antifongique sur la levure utilisée.

Il ressort de cette étude que l'HE de *Citrus limonum* présente une activité antibactérienne plus élevé que l'HE de *Citrus sinensis* contre les mêmes bactéries.

### **Mots clés :**

*Citrus Sinensis*, *Citrus Limonum*, Huiles essentielles, activité antibactérienne, activité antifongique.

## **Abstract**

### **Evaluation of the antimicrobial activity of essential oils from the fruit peels of two citrus species, Citrus sinensis (Orange) and Citrus limonum (Lemon)**

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

Essential oils extracted by steam distillation from the citrus fruit of Citrus Limonum peel, Citrus Sinensis, presented a low yield from 0.18 to 0.23%.

The antibacterial activity of the two essential oils was determined in vitro by aromatogram method ( technique in solid medium ) on 05 strains (04 bacteria and 01 yeast ) .

Gram + bacteria (staphylococcus aureus and bacillus ceureus), gram – bacteria (escherichia coli and pseudomonas aeruginosa), yeast (candida albicans).

.The screening showed that both essential oils possess a remarkable bacteriostatic activity on the growth of some bacterial strains, in addition, both essential oils has great antifungal power of the yeast used .

It appears from this study that the Citrus Limonum essential oil has a higher antibacterial activity than the Citrus Sinensis essential oil against the same bacteria.

#### **Keywords :**

Citrus Sinensis, Citrus Limonum, Essential oils, antibacterial activity, antifungal activity.

## ملخص

تقييم الفعالية المضادة للميكروبات للزيوت الأساسية من قشور الفاكهة لنوعين من الحمضيات ،  
الحمضيات الصينية (البرتقال) والليمون الليمون (الليمون)

الهدف المحدد لعملنا هو تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات لإثنين من الزيوت الأساسية من الحمضيات:

Citrus Sinensis ( البرتقال ) و Citrus Limonum ( الليمون )

تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير بالبخار من فواكه الحمضيات لقشور الليمون و البرتقال الحلو وقد قدم عائد منخفض 0,18 إلى 0,23 % .

تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية في المختبر بطريقة النشر على الوسط الصلب في 5 سلالات ( 04 بكتيريا و خميرة واحدة).

أظهر الفحص أن كلا الزيوت الأساسية لديها نشاط جرثومي ملحوظ على نمو بعض الأنواع من البكتيريا .  
بالإضافة الى ذلك ، فان الزيوت الأساسية لديها قدرة قوية مضادة للخمائر .

استنتجنا من هذه الدراسة أن زيت الليمون لديه نشاط مضاد للجراثيم أعلى من زيت البرتقال على نفس البكتيريا .

## الكلمات المفتاحية :

زيوت أساسية، النشاط المضاد للجراثيم، النشاط المضاد للخمائر ، Citrus Limonum, Citrus Sinensis .

# Introduction générale

---

## Introduction générale

Une plante est dite aromatique quand elle contient des substances odorantes volatiles appelées « l'huile essentielle » que l'on peut obtenir suivant des techniques d'extractions connues. [71]

Les huiles essentielles occupent une place importante dans la vie quotidienne des êtres humains. Elles possèdent des propriétés très intéressantes, qui trouvent leur application dans divers domaines : médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture.

Les HEs existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs qu'elles dégagent. Les HE se retrouvent dans des grandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique .[45]

Les huiles essentielles produites comme métabolites secondaires , ont été élaborées à partir de plantes aromatiques pour se soigner, pour conjurer le mauvais sort, aromatiser les aliments et les conserver. Elles ont été recommandées également pour le plaisir et la détente que procure leur pratique régulière .[82]

En général, les huiles essentielles des agrumes ont été reconnues comme une ressource importante naturelle, elles possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés : antibactériennes, anti inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, stimulantes, calmantes et relaxantes [71].

L'objectif de notre travail consiste à l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de deux espèces appartenant à la même famille botanique ; la famille des Rutaceae représentée par les espèces : *Citrus sinensis* et *Citrus limonum*.

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de la station expérimentale de la faculté des sciences de la nature et de la vie d'université de Blida 1.

Et pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de ces deux espèces qui a été réalisée au sein du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

# Introduction générale

---

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties.

La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en trois chapitres.

- Le premier chapitre traite la systématique botanique et les caractéristiques des deux espèces étudiées.
- Le second chapitre présente l'étude des huiles essentielles et leurs valorisations par une meilleure connaissance de leurs composition chimique et activité biologique.
- Et le troisième chapitre est consacré particulièrement pour étudier les huiles essentielles des deux espèces de citrus choisis.
- Dans la seconde partie (expérimentale), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de son activité antibactérienne.

Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés.

Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, et la liste des références bibliographiques.

**CHAPITRE I**  
**Généralités sur les agrumes**

# CHAPITRE I : Généralités sur les agrumes

---

## 1 Historique

Le mot " agrumes " est un nom collectif désignant les espèces utilitaires du genre Citrus. Le terme général d'agrumes regroupe toute une famille de fruits qui ont comme points communs une écorce épaisse et odorante, chargée d'huiles essentielles, et une chair juteuse divisée en quartiers, contenant des pépins plus ou moins acide [13]

L'histoire des agrumes, d'après Webber et al. (1967), remonte à 4000 ans avant J-C où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour de la montagne de l'Himalaya et du Sud-est Asiatique.[ 74]

Les agrumes sont des fruits très répandus dans notre alimentation : pamplemousses, citrons, oranges, clémentines, mandarines...etc. Ces fruits possèdent de très nombreuses vertus notamment en raison de leur teneur en vitamine C qui est un puissant antioxydant. Elle est intéressante pour lutter contre les radicaux libres responsables de certains cancers et de certaines pathologies cardiovasculaires. Ils stimulent également les défenses immunitaires et permettent d'éviter un certains nombres de maladies (angine, rhume,... etc.). [86]

## 2 Définition

Le terme général agrumes, par lequel on désigne les oranges, les citrons, les mandarines . est assez peu précis. Dérivé de l'adjectif «aigre»,il signifie simplement que l'on parle de fruits acides. Ce n'est pas toujours vrai car l'on trouve des variétés d'oranges, de citrons ou de limes dénuées d'acidité, et ce n'est pas caractéristique car bien d'autres fruits sont aussi acides et même bien d'avantage que les agrumes. En Espagne, de la même façon, le terme «agrio» employé comme adjectif signifie aigre, acide et comme substantif, au pluriel, désigne les agrumes.

## 3 Produits dérivés des agrumes

Les agrumes sont soit consommés comme un fruit frais, soit utilisés dans la fabrication de produits dérivés ou de coproduits. Environ le tiers de la production totale d'agrumes est destiné à être transformé. Cette proportion est encore plus importante dans le cas des oranges, ou plus de 40% des oranges récoltées dans le monde sont transformées. En outre, ce fruit représente plus de 80% de la totalité des agrumes transformés.

Le produit le plus important issu de la transformation des agrumes est le jus d'orange. Il est évalué en degrés de Brix, qui est une unité de mesure permettant d'évaluer la concentration de solides ainsi que le ratio sucre/acide [86]

## 4 Présentation botanique

### 4.1 La famille des rutacées

Les rutacées sont des plantes, ligneuses et rarement herbacées des régions tempérées à tropicales, productrices des huiles essentielles (HEs), simples ou composées, sans stipules, éparses ou opposées.

Les feuilles présentent des glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides contenant des HEs. La famille des Rutacées comprend 140 genres et 1300 à 1600 espèces [84]

#### 4.1.1 Le genre Citrus

Le Citrus est un genre de plantes des pays chauds de la famille des Rutacées, regroupant des arbres et arbustes, dont plusieurs sont cultivées pour leurs fruits. Parmi les espèces du genre Citrus, on trouve le citronnier, le lime, l'oranger amer, le mandarinier, le clémentinier, le pamplemoussier, etc [3]

Le genre Citrus est celui qui renferme le plus d'espèces et de variétés d'agrumes consommées, commercialisées et utilisées industriellement partout dans le monde. [76]

## **CHAPITRE I : Généralités sur les agrumes**

---

### **4.1.1.1 Classification botanique**

Selon Padrini et Lucheroni (1996), la classification des citrus est la suivante :

**Règne : Végétal**

**Embranchement : Spermaphytes**

**Classe : Eudicotylédones**

**Ordre : Sapindales**

**Famille : Rutaceae**

**Genre : Citrus**

### **4.1.1.2 Caractères spécifiques des Citrus**

L'écorce du fruit contient des poches sécrétrices contenant des essences pouvant être extraites selon différents procédés. Leur taille est également très variable et leur poids peut atteindre un kilogramme. Le mésocarpe, en général assez épais par rapport à la taille du fruit, peut en constituer la plus grande partie. Il renferme dans sa partie externe le flavedo (8 à 10% du fruit) coloré par des pigments caroténoïdes et l'albêdo (30% du fruit) qui est une couche blanche et spongieuse plus ou moins épaisse. A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles.[9]

### **4.1.1.3 Ecorce du fruit de Citrus**

Est appelée « flavédo », comprend une partie externe, l'épicarpe (dénommé « zeste »), coloré en jaune, orangé à rouge à maturité, parsemé de nombreuses poches sécrétrices schizolysigènes remplies d'huile essentielle, et un mésocarpe externe. Le mésocarpe interne, appelé « albêdo » de couleur blanche, a une texture plus ou moins spongieuse et d'épaisseur variable.

L'épiderme interne ou endocarpe, émet des poils renflés charnus qui forment la pulpe sucrée et comestible [86] . Cette partie est divisée en segments (carpelle)

## CHAPITRE I : Généralités sur les agrumes

---

où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe).[13][87]

### 4.1.1.2.1 L'espèce *Citrus sinensis*

L'aire d'origine de l'oranger est probablement le Nord de l'Inde ou les régions proches de Chine. L'oranger est un arbre pouvant atteindre 10m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé et la floraison blanche très parfumée. Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange.

Il existe plusieurs variétés, les plus connues la Sanguilli, Thomson, Navel, Valencia late, Washington Navel Powell, Floride Pineapple, etc. [58]

Les oranges navels se différencient des autres par deux caractéristiques bien distinctes: la présence au sein de l'apex d'un petit fruit rudimentaire appelé « navel » et l'absence de pépins qui lui confère un grand intérêt commercial. « Washington » est la variété la plus cultivée et la plus appréciée des consommateurs. Le fruit est relativement gros (200 à 250g) et de forme sphérique. Cette variété est appréciée pour sa précocité ; elle se récolte de novembre à février et fait l'objet d'un important commerce d'exportation. [74]



Figure 1 : Morphologie de fruit de *Citrus sinensis*

### 4.1.1.2.1.1 Position systématique

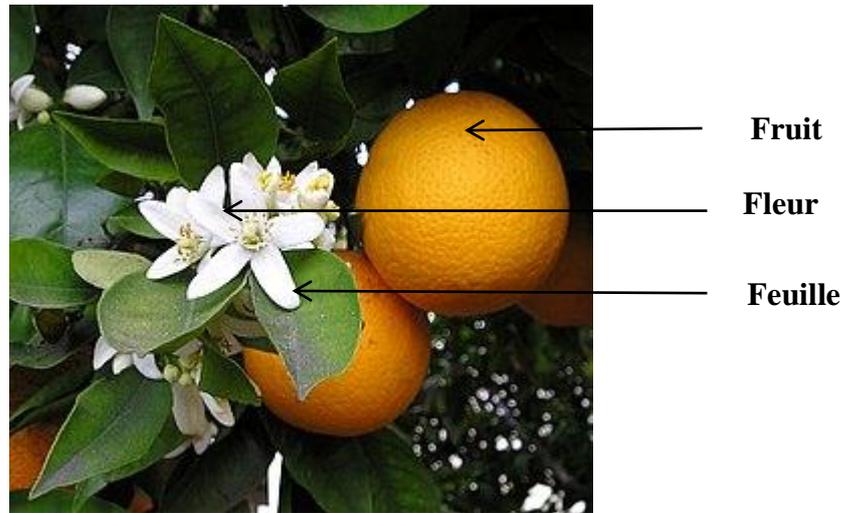
La classification botanique de l'oranger [76]

- Règne : végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : dicotylédones
- Sous- classe : Rosidées
- Ordre : Sapindales
- Famille :Rutaceae
- Genre : Citrus
- Espèce : Citrus sinensis (Var. Washington navel)

#### 4.1.1.2.1.1.1 Caractéristiques de citrus sinensis

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ [57]

- **Les feuilles** : Sont persistantes, vert foncé et légèrement aillées.
- **Les fleurs** : la floraison blanche est printanière et agréables parfumée.
- **Les fruits** : Il est bien connu, largement répandu sur les étales des marchés pratiquement pendant tout l'année ; le fruit est de forme et de couleur variable suivant les variétés, mais en général sphérique et de couleur orangée, c'est un fruit très consommé en frais et en jus.



**Figure 2 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit de Citrus sinensis**

### **4.1.1.3 L'espèce Citrus limonum**

Le terme « citron », né en 1398, est dérivé du latin citrus, il a graduellement remplacé « limon » dans la langue populaire. [4] Cette variété est introduite en Algérie dans les années quarante à partir de la Californie. [78]

Elle est la plus cultivée du fait de sa mise à fruits rapide et de ses floraisons très remontantes permettant la production des fruits au printemps et en été. Ses fruits, de calibre moyen, sont pourvus d'un mamelon apical peu prononcé et se localisent à l'extrémité des rameaux. Sa pulpe donne un jus clair, acide et bien parfumé. [57]



Figure 3 : Morphologie de fruit *Citrus limonum*

### 4.1.1.3.1 Position systématique

Le citronnier, est classé par CRETE (1965), comme suit : [29]

- Règne : végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Dialypétales
- Ordre :Térébenthales

Famille :Rutaceae

- Genre : Citrus
- Espèce : Citrus limonum L(Var. Eureka)

# CHAPITRE I : Généralités sur les agrumes

## 4.2 Caractéristiques de citrus limonum

D'après LOUSSERT (1989) , Citrus limonum(famille des Rutacées) est un petit arbre persistant de 2 à 7m de haut, rameaux plus ou moins couverts d'épines courtes, épaisses et rigides.

- **Les feuilles** sont persistantes, oblongues ovales, à sommet aigu, plus ou moins dentées. Le limbe est de couleur verte. Le pétiole est ailé et étroit.
- **Les fleurs** solitaires ou fasciculées, bourgeons teintés de rougeâtre, les pétales sont de couleur blanchâtre et leur extérieur est teinté de pourpre. L'androcée est formé de 20 à 40 étamines.
- **Les fruits** sont de forme ovale (7 à 12cm de long et 5 à 7cm de large). Ils sont renflés ou en forme tétin



Figure 4 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit de Citrus limonum

**CHAPITRE II**  
**Les huiles essentielles**

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

### 1 Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupées une place importante dans la vie quotidienne de l'homme dont il se servait pour se parfumer, aromatiser sa nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle. [81]

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leurs attribuaient avant tout un usage religieux [82]. Puis progressivement, ces huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants de médecine traditionnelle [19]. De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques [70].

#### 1.1 Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles (essences = huiles volatiles) sont : «des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation». [48]

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, Par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes. [7]

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

Elles ont des applications importantes en médecine soit par leur qualité odorante soit pour soulager la douleur ou pour leur efficacité physiologique.

L'AFNOR définit l'huile essentielle comme : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques, l'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». [3]

### 1.2 Rôle des huiles essentielles

Elles jouent un rôle important dans la défense des plantes et des forêts contre les agressions naturelles, mais aussi pour lutter contre la sécheresse en contribuant à la pluviosité. Leur composition varie souvent selon les conditions climatiques et l'environnement.

### 1.3 Critères déterminants la qualité des huiles essentielles

**a- La sélection** de la plante qui est tributaire du genre et de l'espèce botanique.

**b- Le chémotype (chimiotype)** : représentant les différents panels de molécules chimiques que des plantes de la même espèce peuvent produire si elles sont placées dans des conditions de cultures différentes.

**c- La période de récolte** : la récolte doit se faire au moment où les principes actifs les plus intéressants produits par la plante sont à leur concentration maximale.

**d- La conservation des huiles essentielles** : elle doit se faire dans des flacons en verre opaque hermétique, dans un endroit frais, à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter leur oxydation et la polymérisation de leurs composants.

**e- La partie de la plante** considérée pour l'extraction est déterminante pour la qualité de l'huile. [49]

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

### 1.4 Caractérisation des huiles essentielles

#### 1.4.1 Caractéristiques organoleptiques :

Chaque extrait est caractérisé par ces propriétés organoleptiques telles que l'odeur , l'aspect et la couleur.

- **L'odeur** : L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parviennent à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'au dix millièmes de grammes par litre d'air.
- **La couleur** : La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée.
- **L'aspect** : L'aspect d'un extrait dépend des produits qui la constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide- liquide.

#### 1.4.2 Caractéristiques physico-chimiques :

La qualité d'une huile essentielle et sa valeur sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

- **Densité** : La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume, donc c'est le rapport du poids d'un certain volume d'un corps et le poids du même volume d'un corps de référence (eau).
- **Indice de réfraction** : L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. [19] L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé.
- **Indice d'acide** : C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration. [19]

### 1.5 Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction.

Selon Brunet on, les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables, des constituants qui appartiennent de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : [17,27]

- Composés terpéniques
- Composés aromatiques
- Les composés d'origine diverses.

#### 1.5.1 Les Terpénoïdes (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>

Se sont les molécules les plus répandues dans les HEs. Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiples de 5 atomes de carbone de formule générale (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> . [63]

##### a- Monoterpènes :

Ce sont les composés les plus abondants dans les HEs, ils sont responsables de la saveur caractéristique et de l'arôme que possède la plante.

Ils sont les simples constituants des terpènes et comportent deux unités isoprènes (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, ou bicycliques. [25]

##### b- Sesquiterpènes :

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C<sub>15</sub>H<sub>22</sub> (assemblage de trois unités isoprènes).

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

### 1.5.2 Les composés aromatiques :

Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes, ils sont classés selon la nature des fonctions qu'ils portent (acides, aldéhydes, phénols...).

La plus part des constituants sont d'origine terpénique ; seul un petit nombre HE sont constituées majoritairement de composés aromatiques (HE de cannelle et de girofle).

Parmi les constituants très nombreux des huiles essentielles l'un domine généralement: HE de badiane et d'anis renferment 95% d'anéthol. [27]

### 1.5.3 Les composés d'origine diverses :

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînable lors de l'hydrodistillation, on peut citer :

- Les carbures linéaires et ramifiés, saturés ou non
- Les acides de C3 à C10: ce sont les composés les plus anti-inflammatoires du règne végétal; ils sont hypothermisants, hypotenseurs.
- Les alcools.
- Les aldéhydes.
- Les esters acycliques.
- Les lactones: elles agissent avec effet hypo-termisants, et ont une action fongicide plus puissante que celle des cétones.
- ❖ Dans les concrètes, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante, non entraînaibles à la vapeur d'eau, tels que:
  - Les homologues des phényles propanes.
  - Les diterpènes.
  - Les coumarines: neuro-sédatives, anticoagulantes. [17] [27]

## **CHAPITRE II : Les huiles essentielles**

---

### **1.6 Biosynthèse des huiles essentielles**

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. [12]

Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogéniques distinctes : le groupe des terpènes d'une part et celui des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. [17]

Les composés terpéniques constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal et les principaux constituants des huiles essentielles. Ils sont synthétisés à partir d'un précurseur unique appelé

l'isopentenyl pyrophosphate (IPP). Cette unité isoprénique à 5 atomes de carbone peut être synthétisée dans le cytoplasme via la voie du mévalonate ou dans les plastides via la voie non mévalonique (la voie de dioxy xylulose phosphate)

### **1.7 Analyse physico-chimique des huiles essentielles**

Les propriétés physico-chimiques sont des indices propres constants d'une substance pure. Elles sont toujours mesurées, mais elles sont indiquées à titre indicatif, car la complexité des huiles essentielles ne permet pas de détecter les fraudes uniquement grâce à elles. L'analyse physico-chimique reste donc indispensable et la mieux adaptée pour connaître la composition exacte d'huile essentielle, et donc la plante de laquelle elle est extraite. L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes micro analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces.

Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques. [12]

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

### 1.7.1 Chromatographie en phase gazeuse :

Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilissables sans dégradation (non-thermolabiles). Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles.

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt. [20]

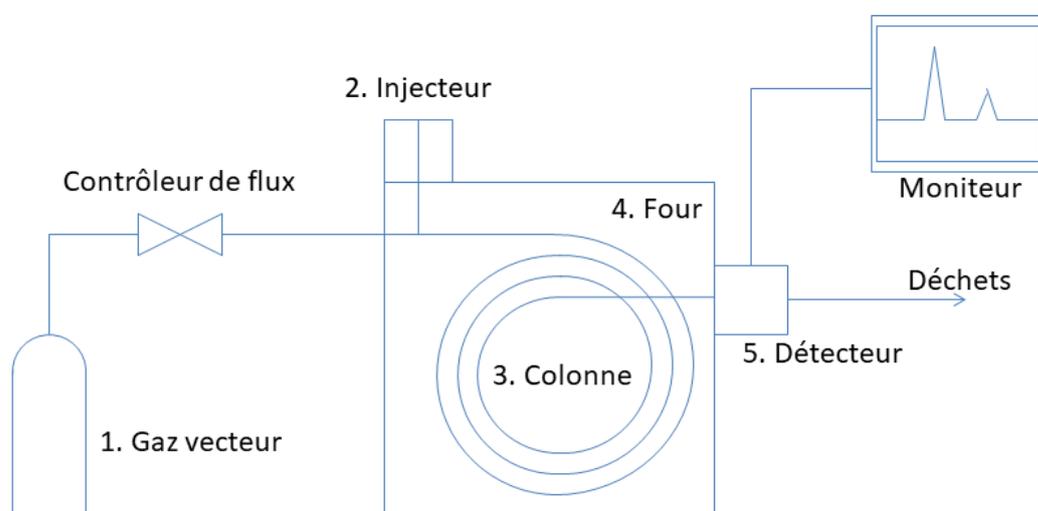


Figure 5 : Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse

### 1.7.2 La spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse (mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). [20]

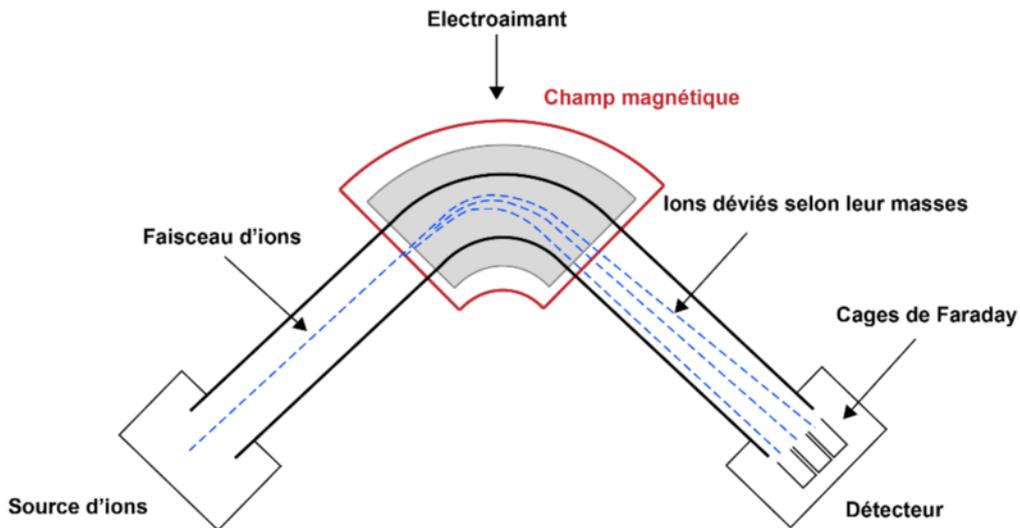


Figure 6 : Schéma du principe de mesure par spectrométrie de masse

### 1.7.3 Analyse par couplage CPG/SM

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM. [20]

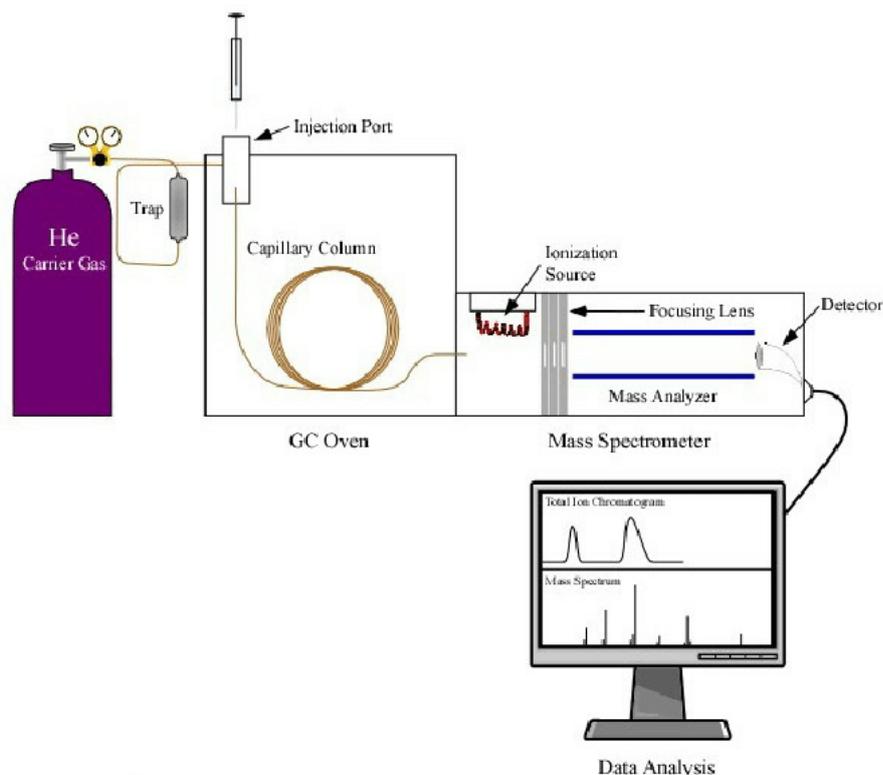


Figure 7 : Schéma du principe de couplage CPG/SM

### 1.8 Classification des huiles essentielles

Selon la fonction du constituant prédominant, LE LOURANT(1994) classe les HEs en trois catégories : [18]

- 1- HE hydrocarbonées riches en terpènes (Pin, citron : 90% en limonène).
- 2- HE oxygénés riches en alcools et esters comme celles de (Roses : (50% en géraniol; Thym :  $\geq$  «30% en thymol ; Coriandre : 70 à 80% en linalol).
- 3- HE sulfurées (Conifères).

### 1.9 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se conservent plusieurs années. Elles ont même tendance à se bonifier avec le temps (à l'exception des huiles essentielles extraites des zestes d'agrumes qui ne se conservent pas plus de 2 ans).

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière, il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air, il faut bien refermer les flacons après usage car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère. Tenir les flacons hors de portée des enfants. Les flacons doivent être stockés en position verticale, en position horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles ont une action corrosive sur le plastique). [17]

### 1.10 Toxicité des huiles essentielles :

Bien que les huiles essentielles sont des substances naturelles, mais cela ne signifie pas qu'il est sans danger pour la santé humaine. Il est ainsi important de connaître le produit, le choisir selon des critères qualitatifs rigoureux, de respecter avec précision les doses et de choisir le mode d'administration adéquat, et pour éviter la survenue d'effets indésirables, et les interactions avec d'autres médicaments.

Ainsi, les huiles essentielles peuvent s'avérer allergisants, photosensibilisants, cytotoxiques, irritants, néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques ;

On distingue :

**La toxicité aiguë** qui se manifeste peu de temps après l'introduction de l'HE dans l'organisme (en général quelques minutes après).

**La toxicité à long terme ou toxicité chronique** survenant après plusieurs années d'utilisation. Cette toxicité est relativement mal connue. En effet, les effets indésirables survenant après plusieurs années d'utilisation sont rarement signalés en raison de la difficulté à établir le lien de causalité. [17]

### Quelques conseils lors d'une intoxication aux HE

- En cas d'application trop importante sur la peau ou les muqueuses : éliminer l'excédent à l'aide d'un linge puis appliquer une quantité importante d'huile végétale. [66]

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

- En cas de projection d'HE dans l'oeil : rincer abondamment sous l'eau fraîche puis appliquer de l'huile végétale à l'aide d'un coton imprégné. [35]

### 1.11 Domaines d'utilisation des huiles essentielles

#### a- Dans l'industrie agroalimentaire :

Les huiles essentielles jouent un rôle capital dans l'aromatization des aliments. En effet, elles donnent la saveur aux condiments (poivre, gingembre) et aux aromatisants (menthe, anis, oranger, thym, laurier). A faible dose, certaines substances ont un effet favorable sur la digestion, ce qui explique leur utilisation en liquoristerie (essence d'anis ou de badiane).

Maintenant, l'industrie agroalimentaire utilise les HEs dans les préparations surgelées non seulement pour rehausser le goût mais aussi pour empêcher les contaminations alimentaires qui se développent (effet antimicrobien) [75]

#### b- En parfumerie et cosmétique :

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles confèrent à ces dernières une consommation importante en parfumerie et en cosmétique. Elles présentent environ 60% des matières premières de l'industrie des parfums synthétiques, du par fumage, des savons et des cosmétiques.

A la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène on notera la présence des HEs dans les préparations dermo- pharmacologique, baies « calmant » ou « relaxant », et leur emploi dans les rouges à lèvres, les shampoings, les dentifrices, se sont surtout les huiles essentielles de lavande, de citron, de citronnelle, qui sont utilisées. On notera qu'il y a une possibilité d'adsorption percutanée des constituants terpéniques. [10] [11]

#### c- En pharmacie :

Les huiles essentielles constituent le support d'une pratique de soins particulière l'aromathérapie.

## **CHAPITRE II : Les huiles essentielles**

---

Elles ont grande intérêt en pharmacie, elles s'utilisent sous la forme de préparations galéniques, et dans la préparation d'infusion (verveine, thym, menthe, mélisse, fleurs d'orange.). Tout fois, il faut souligner que la majorité des constituants de ces derniers sont lipophiles, et de ce fait, rapidement absorbés que ce soit par voie pulmonaire, par voie cutanée ou par voie digestive.

Elles sont également utilisées pour l'obtention des huiles essentielles dans un intérêt médicamenteux (en particulier dans le domaine des antiseptiques externes).

Plus de 40% du médicament sont à base de composants actifs de plants. De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de spécialités pharmaceutiques : sirop, goutte, gélules pommade ...

### **2 Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Il est nécessairement une opération complexe et délicate. Elle a pour but, en effet, de capter et recueillir les produits les plus volatils, subtils et les plus fragiles qu'élabore le végétal, et cela sans en altérer la qualité

Les HE subissent généralement des modifications de leur composition chimique lors du processus d'extraction causées par la chaleur ou bien par leurs interactions avec l'eau. En fait, seules les HE issues de l'expression à froid, n'ayant pas eu de contact avec le jus de fruit et protégées de l'oxydation, pourraient correspondre à la véritable essence de la plante.

Le choix d'une technique d'extraction doit être adapté aux composés spécifiquement recherchés; en principe cela ne dépend pas du type d'organe utilisé: feuille, fleur, bois, graine ou fruit, racine ou rhizome, à l'état frais ou à l'état sec. La méthode dépend du type de produit souhaité, ou de la nature chimique des molécules recherchées. La distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre. [40]

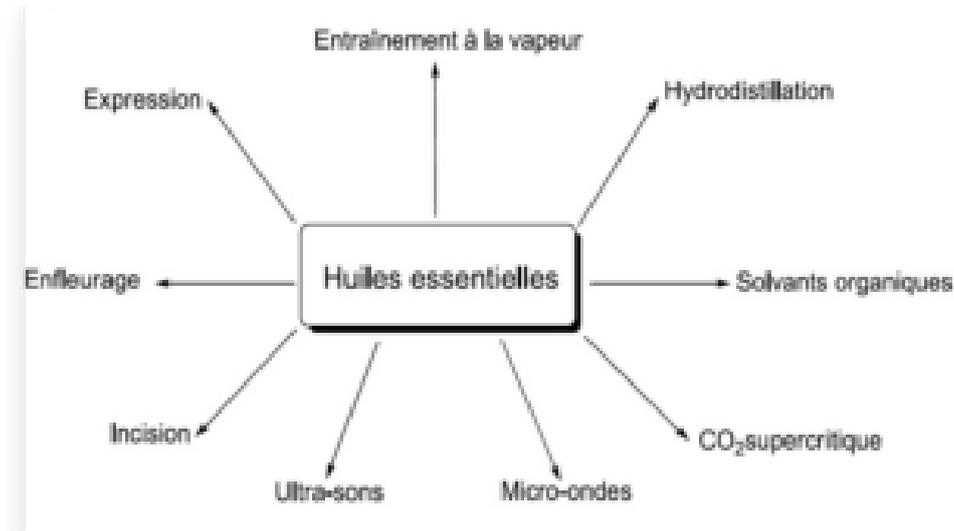


Figure 8: Schéma des modes d'extraction des huiles essentielles. [67]

### 2.1 Extraction par Hydrodistillation

La méthode par hydrodistillation est traditionnellement la plus couramment utilisée (environ 80% des cas) car elle est la plus économique .

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par

différence de densité . [70]

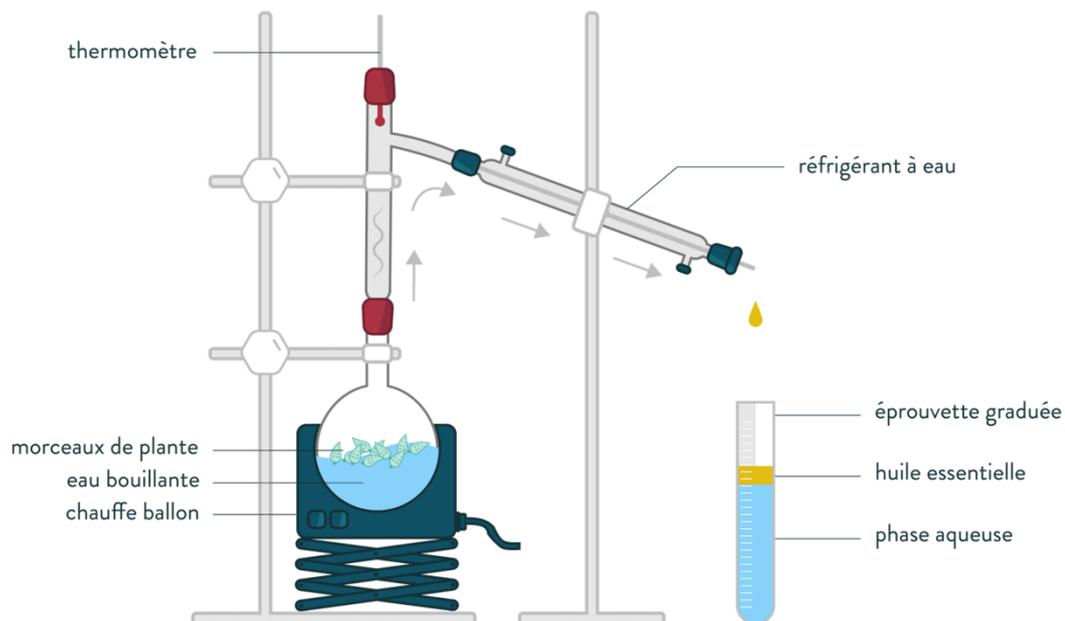


Figure 9 : Schéma du principe de la méthode d'Hydrodistillation

### 2.2 Extraction par solvant organique

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait.

L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils, mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances [17]. En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient des hydrolysats.

### 2.3 Le CO<sub>2</sub> supercritique

Est un solvant idéal puisqu'il présente d'incontournables avantages : il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus,

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

ce qui donne une qualité irréprochable de l'extrait. [18] La masse végétale et le CO<sub>2</sub> sont soumis à une condition au-delà du point critique: T°=31.1°C et P>73.8 bars. A cette condition le dioxyde de carbone atteint un état supercritique intermédiaire entre l'état gazeux et l'état liquide. [45]

Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant. [45]

Le principal point faible de cette méthode est le coût élevé de son installation. [71]

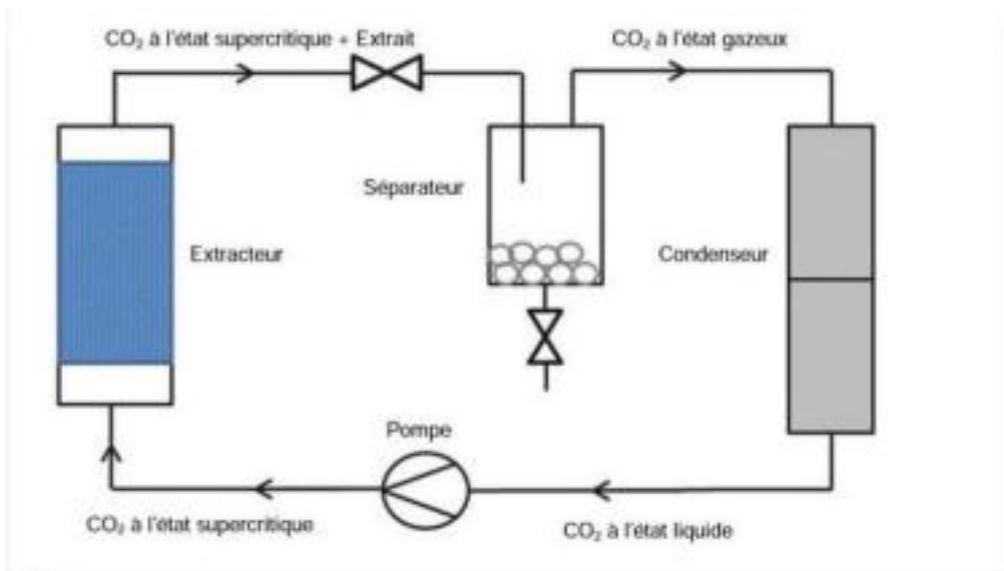


Figure 10 : Schéma du procédé de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique. [62]

### 2.4 Extraction assistée par micro-ondes

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal les plus riches en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de

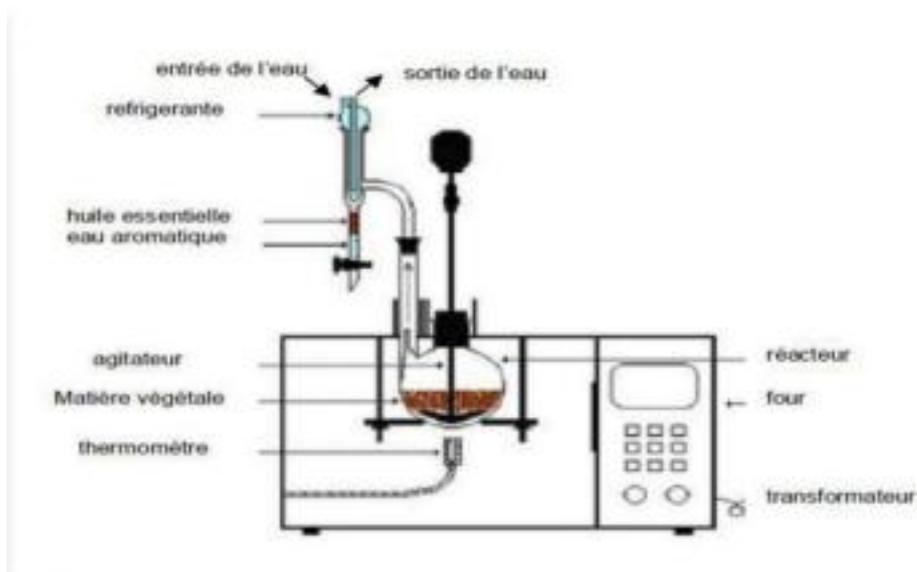
## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

ces structures. Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entraînent l'HE.

Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal [19].

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'incrémenter le rendement [26]



**Figure 11 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes.**

### 2.5 Extraction par ultrasons

Le matériel végétal mis en contact avec le solvant (eau ou solvant organique) est immergé dans un bain à sonication maintenu à une agitation constante. [50]

### 2.6 Extraction par incision

Ce procédé est utilisé très rarement. Il suffit de fendre l'écorce des arbres pour en recueillir le suc comme par exemple le caoutchouc de l'arbre hévéa. [85]

### 2.7 Extraction en enfleurage

L'enfleurage est une technique qui date de l'Antiquité égyptienne. Elle consiste à déposer des plantes en particulier les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de rose) sur une couche de graisse animale qui se sature en essence. On épuise ensuite le corps gras par l'alcool qui récupère les senteurs et qui sera ensuite évaporé sous vide [8,38]. Cette technique est actuellement abandonnée au profit de l'extraction par les solvants en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite. [1] un enfleurage à chaud est réalisé vers 60-70°C, par leur infusion dans des graisses fondues ou des huiles. Cette méthode est plus rapide que celle à température ambiante.

### 2.8 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE

Dans ce cas le matériel n'est pas en contact avec l'eau: la vapeur d'eau est injectée à travers la masse végétal disposée sur des plaques perforée en dessus de la base de l'alambic, les constituants volatils peu solubles dans l'eau sont entraînés et après condensation, séparés du distillat par décantation. Celle-ci s'effectue dans un récipient spécial. [16] [68]

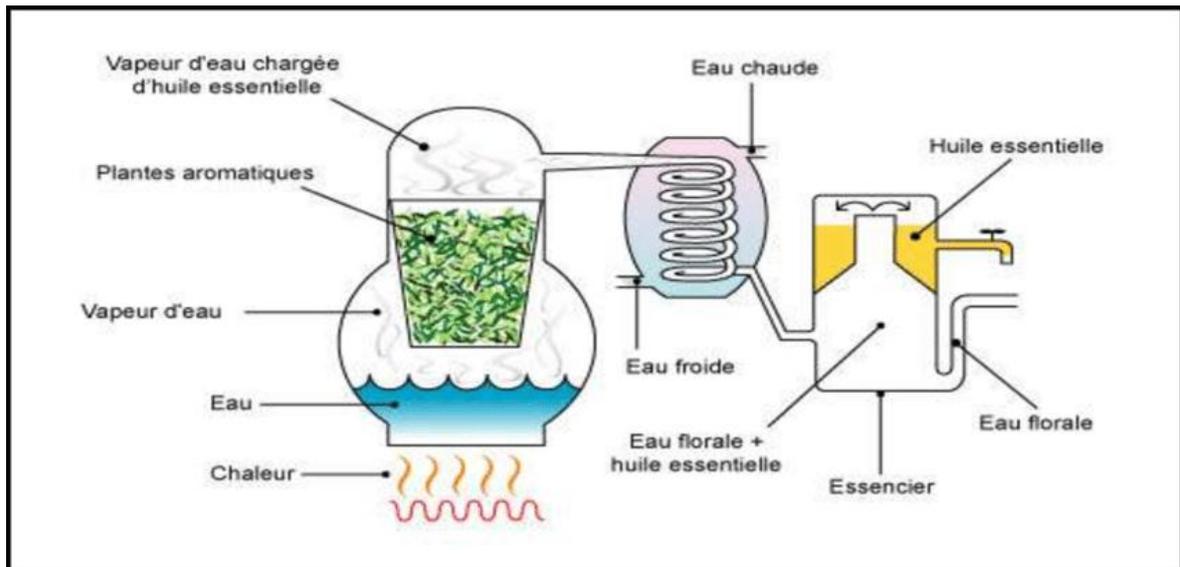


Figure 12 : Schéma du principe d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

### 2.9 Expression mécanique à froid

Ce mode d'obtention particulier est réalisé uniquement pour les fruits de la famille botanique des Rutaceae (citron, orange, bergamote, mandarine, etc.). C'est une méthode simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches oléifères localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu [37]. L'huile essentielle est séparée du jus de fruit par un procédé mécanique de décantation à froid.

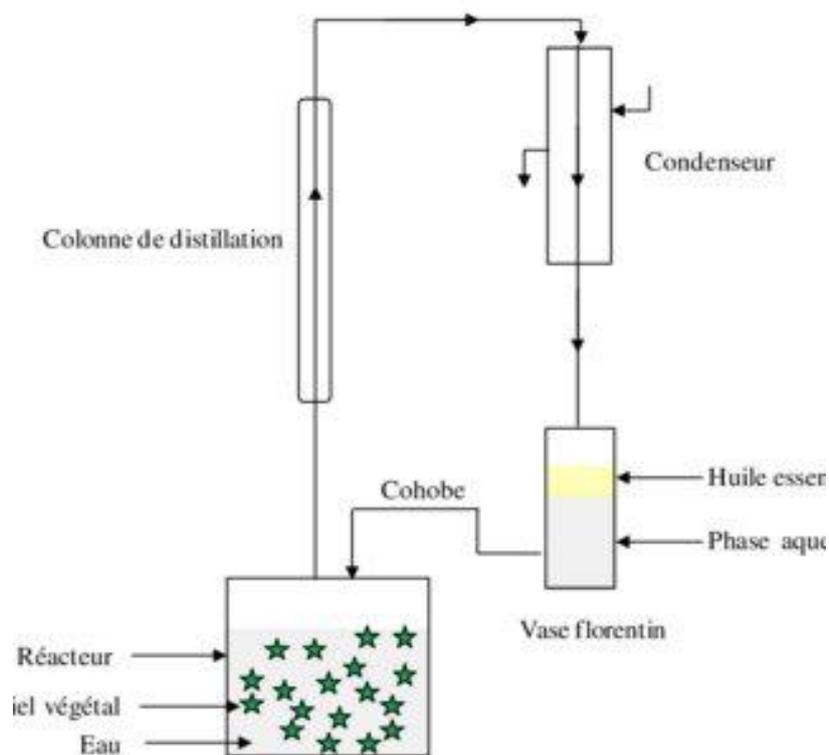


Figure 13 : Schéma du principe d'extraction par expression mécanique  
à froid

### 3 Les activités biologiques des huiles essentielles

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «Totum», c'est-à-dire, non seulement à ses composés majoritaires mais aussi à l'intégrité de ses constituants. [53]

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins en moins sensibles, aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ses derniers. La nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour. L'usage des huiles essentielles grâce à leur forte action antimicrobienne développé depuis plus d'une vingtaine d'année, constitue un sérieux substitue aux traitements par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses. [72]

### 3.1 **Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne inclue l'activité sur les bactéries, champignons, virus et protozoaires, elle est généralement liée aux composés majoritaires que contient l'huile essentielle, comme les monoterpènes, sesquiterpènes et les composés non terpéniques tels les Phénylpropanoïdes ainsi que les composés soufrés qui sont souvent des composés antimicrobiens .

#### 3.1.1 **L'activité antifongique :**

L'activité antifongique de l'HE peut-être due à ses constituants majoritaires, mais aussi à ses constituants minoritaires. [32]

Un large éventail de pathogènes fongiques humains, animaux et agricoles ont montrés une importante sensibilité aux huiles essentielles , ce qui accroît l'intérêt pour leur application thérapeutique ou industrielle. Parmi les pathogènes humains et animaux ciblés, les levures du genre *Candida* et les dermatophytes comme *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton* qui ont attiré le plus grand intérêt [42]

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

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

#### 3.1.2 **L'activité antivirale :**

Les virus sont très sensibles aux molécules présentes dans les HEs ce qui attribue à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales.

Les HEs arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination de mucus tout en stimulant le système immunitaire. [64]

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

### 3.1.3 L'activité antibactérienne :

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955) . Depuis, de nombreuses huiles essentielles ont été investies pour leur activité antibactérienne (Burt, 2004).[21]

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à une autre et d'une souche bactérienne à une autre.

#### 3.1.3.1 Définitions:

La substance antibactérienne de source végétale est définie comme étant des molécules utilisées pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance; la sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de la substance antibactérienne.[33]

Les HEs ont une double action contre les microbes, elles peuvent avoir une action bactéricide ou bactériostatique.

Plusieurs travaux montrent que les HEs et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. [22]

Compte-tenu de la diversité des molécules présentent dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action impliquant différentes cibles cellulaires .[23]

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

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

### 3.1.3.2 Morphologie et Structure des bactéries:

Durant de longues années, la bactérie a été considérée comme "un sac d'enzymes" car le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de structure. L'observation des bactéries, permet seulement de reconnaître la forme des cellules (sphérique ou coccoïde, cylindrique ou bâtonnet, spiralée ou hélicoïdale), leurs dimensions (qui varient selon les espèces de 0.1µm à 600µm) et les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles (en grappe, en chaînette, en paire ou diplocoque). Ce sont les caractéristiques qui définissent la morphologie bactérienne, et qui étaient les critères essentiels de reconnaissance et d'identification, et qui ont un rôle très important dans le diagnostic.

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

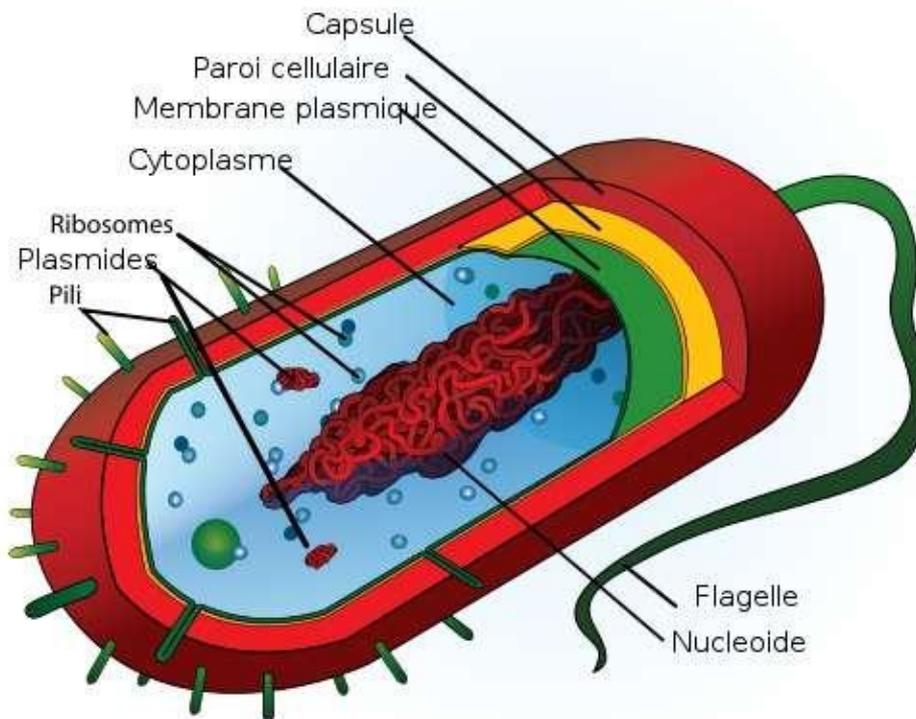
- Bactéries à GRAM positif (colorées en violet)
- Bactéries à GRAM négatif (colorées en rose).

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

La cellule est enveloppée par une paroi rigide, qui lui donne sa forme et sa résistance.

La paroi épaisse aisse chez les bactéries à GRAM positif et plus mince chez les bactéries à GRAM négatif; la paroi entoure une membrane cytoplasmique, plus fine et plus délicate.

Les bactéries à GRAM négatif possèdent une seconde membrane, qui est la membrane externe pour la distinguer de la membrane cytoplasmique, dite interne.



**Figure 14 : Structure d'une cellule bactérienne**

### **3.1.3.3 Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries:**

Le mode d'action des H.Es dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe dont les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire [21]. Il existe cependant quelques exceptions. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer .

#### **Leur action se déroule en trois phases :**

- 1- Attaque la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires .

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

- 2- Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure .
- 3- Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie. [31]

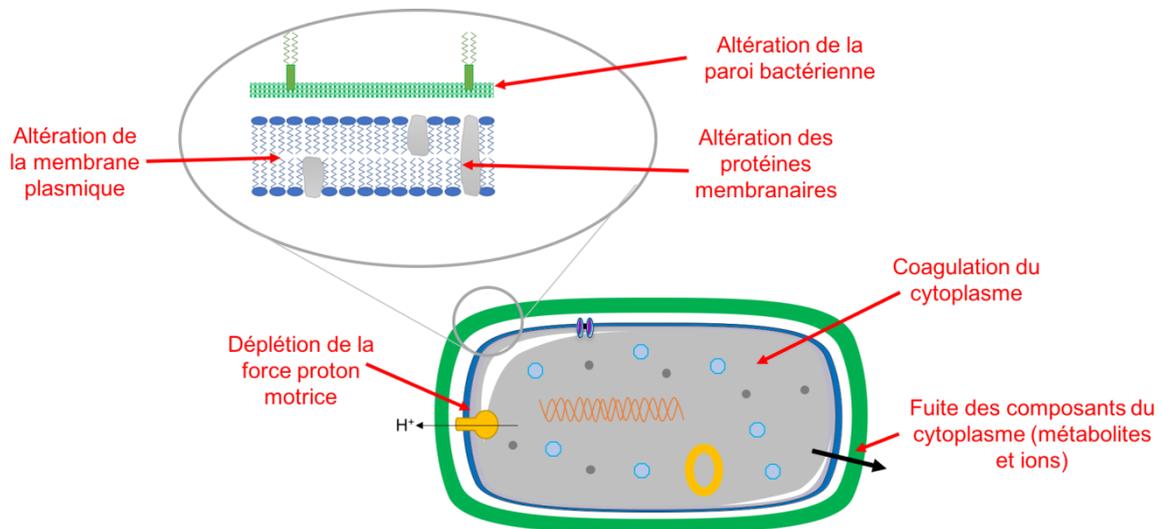


Figure 15 : Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

### 3.1.3.4 Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne in vitro d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide . [80]

Nous allons essayer d'énumérer ces différentes méthodes et de discuter chacune d'entre elle.

#### 3.1.3.4.1 Les techniques en Milieu solide:

##### a - Méthode de Vincent:

Elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme, ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques .

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée durant 50 ans d'utilisation mondiale. Elle permet également de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles et autres agents antimicrobiens. [80]

Le principe de cette méthode est la migration de l'huile essentielle par diffusion dans la gélose.

- Une quantité de l'HE est déposée sur des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre.
  - L'ensemble est mis sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton préalablementensemencés.
  - Après incubation la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques.
  - L'HE peut être versée dans un puits préparé sur la gélose au lieu des disques.
- [80]

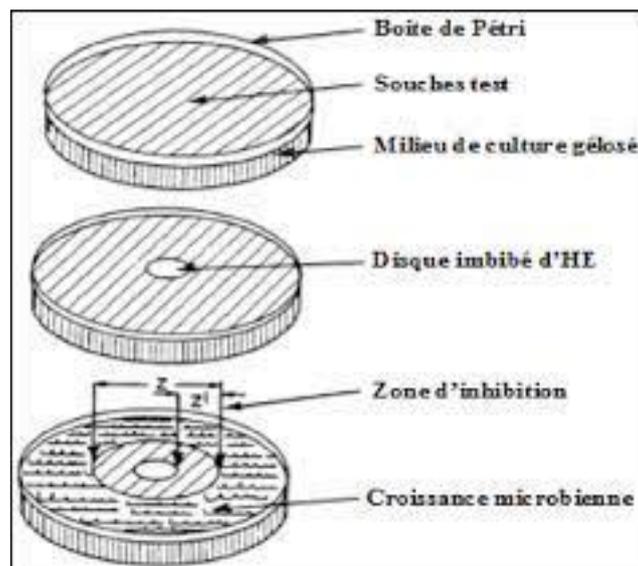


Figure 16 : Principe de méthodes de Vincent

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

### b- Méthode de micro atmosphère :

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance. [80]

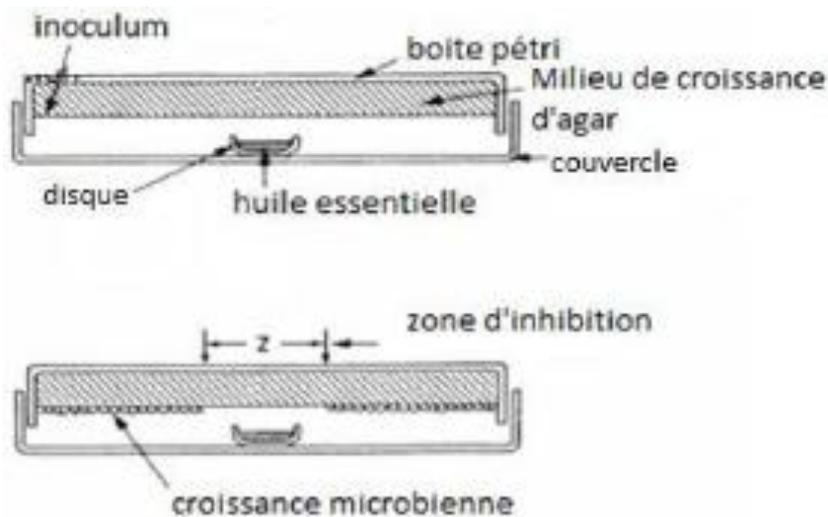


Figure 17 : principe de l'activité antimicrobienne par micro-atmosphère

### c- Méthode de Morel et Rochaix:

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles. Cette dernière est solubilisée dans l'alcool à différentes concentrations et incorporée dans un milieu gélosé ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu. [80]

### 3.1.3.4.2 Les techniques en milieu liquide

#### a- Méthode des disques de Sarbach :

L'essence est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'ensemble est placé dans des tubes à essai. Dans

## **CHAPITRE II : Les huiles essentielles**

---

chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation.

L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide d'une anse prélevée sur le milieu liquide de subculture. [80]

### **b- Méthode de Marzuella :**

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) [80]

### **3.2 Activité antioxydante :**

Les antioxydants sont des composés qui peuvent empêcher l'oxydation des composés oxydables en éliminant les radicaux libres. [51]

Les antioxydants sont classés selon leur origine et leur mode d'action.

#### **On distingue trois types d'antioxydants :**

- 1- les antioxydants enzymatiques.
- 2- les enzymes de réparation .
- 3- les antioxydants non enzymatiques.

Les substances naturelles dont les huiles essentielles sont classées entant qu'antioxydants non enzymatiques. L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte), cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène. [39]

Par contre, les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs.

## CHAPITRE II : Les huiles essentielles

---

**Les radicaux libres** : Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de  $10^{-4}$  secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. [39] [6]

**CHAPITRE III**  
**Les huiles essentielles**  
**d'agrumes**

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

### 1 Huiles essentielles d'agrumes

Les huiles essentielles d'agrumes sont des huiles obtenues par le pillage des écorces d'agrumes. Elles sont utilisées par l'industrie agro-alimentaire afin de donner de la saveur aux boissons et aux aliments. Elles sont également l'un des intrants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments et de savons, de parfums et autres cosmétiques, et pour des produits d'entretien à usage domestique.[4]

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

Constituants	Orange	Mandarine	Pamplemousse	Citron
Monoterpènes (Total)	89 – 91 (% de l'huile)	98 (% de l'huile)	88 (% de l'huile)	81 – 85 (% de l'huile)
Limonène	83 – 90	65 – 68	88 – 90	72 – 80
Hydrocarbures				
α-pinène	0,5	0,8	1,6	2,0
β-pinène	1,0	-	-	7 – 13
Myrcène	2,0	2,0	1,9	2,0
γ-terpinène	0,1	-	0,5	10,0
p-cymène	-	2,8	0,4	-
Aldéhydes	1,8 (% de l'huile)	-	1,2 – 1,8 (% de l'huile)	-

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

Heptanal	3,0 % des aldéhydes	-	4,0 % des aldéhydes	1,0 % des aldéhydes
Octanal	39,0	-	16 – 35	4,0
Nonanal	5,0	-	7,0	6,0
Décanal	42,0	5,0	43 – 53	3,0
Citral	0,05 – 0,2 (% de l'huile)	-	0,06 (% de l'huile)	1,9 – 2,6 (% de l'huile)
Alcools	0,9 (% de l'huile)		0,3 – 1,3 (% de l'huile) -	
Octanol	2,8	-	-	1
Linalol	1%	2	0 – 3 (% fraction déterpénées)	0, 2%
Esters	2,9 (% de l'huile)	-	3 –4 (% de l'huile)	-

### 1.1 L'huile essentielle de Citrus Sinensis :

L'essence d'orange douce possède une teneur en hydrocarbures monoterpéniques que l'on peut évaluer à environ 90%. Le composant dominant de la fraction monoterpénique est le d-limonène, suivi de loin par le myrcène, le sabinène et l' $\alpha$ -pinène. Les composants oxygénés sont responsables du parfum

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

---

caractéristique de l'essence avec notamment l'aldéhyde décyclique qui a une odeur d'orange. [30]

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

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

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

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

---

<b>Caractéristiques</b>	<b>Indice de réfraction</b>	<b>1,470 à 1,476</b>
	<b>Point éclair</b>	<b>+49° C</b>

### **Caractéristiques organoleptiques :**

- **Aspect** : Liquide pouvant devenir trouble par abaissement de la température.
- **Couleur** : Jaune à orangée.
- **Odeur** : Douce, fruitée et zestée. [59]

### **Propriétés :**

#### **Antiseptique atmosphérique :**

Le limonène, présent à plus de 80% dans l'huile essentielle de Citrus sinensis, est bactéricide, antifongique et antiviral. Il agit notamment sur des champignons responsables d'infections pulmonaires et il désinfecte l'air ambiant. Une utilisation en diffusion atmosphérique est donc particulièrement recommandée.

#### **Calmante et sédative :**

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

#### **Stomachique et carminative :**

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

**Enfin** : le limonène favorise l'expulsion des gaz intestinaux. [65]

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

---

### 1.2 L'huile essentielle de *Citrus Limonum*

De façon générale, on peut dire que l'essence de citron est composée de 92 à 93% de terpènes dont le d-limonène est le plus abondant. Le parfum est surtout déterminé par les éléments oxygénés dont le citral ou le géraniol C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O à raison de 3 à 5% et le citronellal C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O . [41]

Le développement des techniques modernes d'analyses a permis de déceler dans l'essence de citron plus de 341 composés volatils. Des différences significatives peuvent être appréciées lors de l'examen comparatif d'essences d'origines diverses, soit en ce qui concerne les concentrations relatives de certains composants, soit aussi par la présence de certains composés spécifiques.

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

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

<b>Huile essentielle de <i>Citrus limonum</i></b>		
<b>Spécificités biochimiques</b>	<b>Limonène</b>	<b>72 à 80%</b>
	<b>β-pinène</b>	<b>7 à 13%</b>
	<b>γ-terpinène</b>	<b>6 à 10%</b>
	<b>Linalol</b>	<b>0, 2%</b>
	<b>Géraniol</b>	<b>0, 1%</b>
	<b>Aldéhydes</b>	<b>2 à 3 %</b>
	<b>Sesquiterpènes</b>	<b>2 à 5 %</b>

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

---

<b>Caractéristiques</b>	<b>Pouvoir rotatoire à 20°C</b>	<b>+55° à +75°</b>
	<b>Densité à 20°C</b>	<b>0,845 à 0,858</b>
	<b>Indice de réfraction</b>	<b>1,470 à 1,480</b>
	<b>Point éclair</b>	<b>+49° C</b>

### **Caractéristiques organoleptiques :**

- **Aspect** : liquide (trouble à basse température).
- **Couleur** : jaune clair à verdâtre.
- **Odeur** : fraîche, zestée. [58]

### **Propriétés :**

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

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

#### **Anti nauséuse (limonène) :**

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

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

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

**Cholérétique et cholagogue (limonène) :** L'huile essentielle de Citrus limonum favorise la cholorèse, autrement dit la production de bile par le foie ainsi que son évacuation vers l'intestin.

**Elle est aussi :** Hypolipidémiant (favorise la dégradation des lipides).  
Anxiolytique. Carminative et anti-infectieuse. [58]

## 2 Composition chimique des essences et huiles essentielles de Citrus

Les huiles essentielles de Citrus contiennent une proportion relativement importante d'hydrocarbures terpéniques, dont le plus abondant est le limonène alors qu'il ne participe que peu à l'arôme.

Par contre, l'arôme est dû à des aldéhydes, alcools ou esters terpéniques, à des aldéhydes aliphatiques et parfois à de l'antranilate de méthyle.

Les essences obtenues par expression à froid renferment de plus des constituants non volatils comme les coumarines.

Les essences de Citrus possèdent de nombreux dérivés dont la nature et la présence dans l'essence varient d'une espèce de Citrus à une autre. Ces dérivés appartiennent à cinq grands groupes de substances :

- a- **Dérivés terpéniques** : monoterpènes et sesquiterpènes.
- b- **Dérivés hydroxylés** : alcools aliphatiques, alcools terpéniques
- c- **Constituants carbonylés** : aldéhydes, cétones
- d- **Acides et esters** : acides aliphatiques, acides terpéniques, esters
- e- **Dérivés de la benzopyrone** : coumarines, furo-coumarines, flavones .[76]

### 2.1 Limonène

#### 2.1.1 Définition :

Le limonène C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> est un hydrocarbure liquide appartenant à la famille des terpènes. Il est Produit naturellement par divers végétaux,

## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

---

notamment les agrumes et représente le constituant majoritaire de toutes les huiles issues des peaux de ces fruits, environ 95 %. [5]

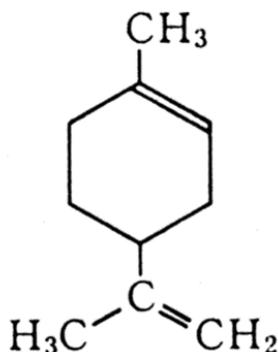


Figure 18 : Structure du limonène

### 2.1.2 Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène :

Les propriétés physico-chimiques et organoleptiques sont mentionnées dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène

Formule brute	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Masse molaire (g/mol)	136.23
Température d'ébullition (°C)	176
Température de fusion (°C)	-75

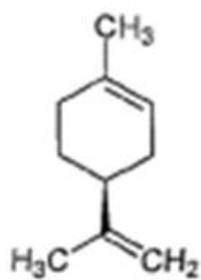
## CHAPITRE III : Les huiles essentielles d'agrumes

Masse volumique (g / cm <sup>3</sup> )		0.84
Solubilité	Eau	Insoluble
	Hexane	Soluble
Apparence		Liquide incolore
Odeur		Parfums caractéristique des agrumes

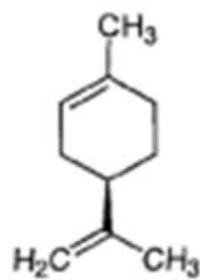
### 2.1.3 Propriétés optiques du limonène :

Le limonène est une molécule chirale qui existe sous forme de deux énantiomères, seule la lumière polarisée peut différencier les deux formes . [5]

- L'énantiomère d-limonène (le suffixe « d » signifie dextrogyre) dévie à droite le plan de lumière polarisée
- L'énantiomère l-limonène (le suffixe « l » signifie lévogyre) dévie le plan de polarisation vers la gauche
- Le dipentène ou dl-limonène est le mélange racémique des deux molécules.



**d- limonène**



**l- limonène**

Figure 19 : Enantiomères du limonène

### 2.1.4 La biosynthèse du limonène :

Le limonène est biosynthétisé par la plante en partant soit d'un dérivé d'un sucre, le glycéraldéhyde, soit de l'acétyl-Coenzyme A . [5]

Ce composé (le glycéraldéhyde) permet à la plante de synthétiser deux molécules : le diphosphate d'isopentenyle (IPP) et diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). La réaction de ces molécules l'une avec l'autre conduit au diphosphate de géranyle (GPP) qui est le précurseur direct du limonène.

Le d-limonène est un sous-produits de l'industrie des jus d'orange, de citron et de pamplemousses.

Il est obtenu à partir de l'huile des pelures de ces agrumes dans laquelle sa concentration peut atteindre 95% en poids. La récupération du limonène se fait par extraction selon deux méthodes. l'extracteur d'huile brune « Brown Oil Extractor » récupère l'huile des fruits avant l'extraction du jus alors que l'extracteurs en ligne FMC (FMC In Line Extractor) récupère l'huile des fruits pendant le procédés d'extraction du jus. Il s'agit de procédés fonctionnant par bris mécanique des alvéoles contenant l'huile essentielle et qui sont situées dans l'épicarpe des fruits.

### 2.1.5 Aspects biologiques et toxicologiques du limonène :

Le limonène pur n'est pas un agent sensibilisant de la peau et n'est pas allergène, en revanche ses produits d'oxydation par l'air (notamment l'oxyde de limonène) sont irritants et peuvent provoquer l'allergie.

L'oxydation du limonène dans l'air favorise la formation des nanoparticules solides et conduit également à la formation de divers composées oxygénés. En raison de leur taille, ces particules peuvent pénétrer dans les poumons.

### 2.1.6 Quelques usages du limonène :

- La thérapie anticancéreuse.
- Des patchs à l'orange : pour délivrer progressivement des médicaments.
- Insecticides.
- Le limonène est utilisé comme solvant de nettoyage.
- Préparation de plastiques.
- Préparation de la carvone.

**CHAPITRE IV**  
**Techniques d'études**  
**et conditions expérimentales**

## CHAPITRE IV : Techniques d'études et conditions expérimentales

---

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

L'extraction a été réalisée au Laboratoire de la station expérimentale de la faculté SNV,

Université de Blida, l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au laboratoire d'hygiène de la wilaya de BLIDA.

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

Le premier axe est consacré à : l'extraction des huiles essentielles des espèces végétales.

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

### 1 Matériels et méthodes

#### 1.1 Matériel végétal :

Le matériel utilisé est constitué des écorces des fruits de deux espèces d'agrumes , *Citrus limonum* (citron), et *Citrus sinensis* (orange) récoltées à la région de Metidja wilaya de Blida.

#### 1.2 Souches microbiennes :

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

- Souches bactériennes (02 Gram+ et 02 Gram-).
- Une levure.

Ces germes pathogènes font partie de la collection ATCC et ont été délivrées par l'institut Pasteur d'Alger (Tableau 5). Ces espèces sont souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens. Les souches bactériennes sont des souches hospitalières

## CHAPITRE IV : Techniques d'études et conditions expérimentales

isolées à partir des prélèvements sur des malades. Les souches bactériennes d'*Escherichia Coli* et de *Pseudomonas Aeruginosa* sont des souches hospitalières et celle de *Staphylococcus Aureus* est d'origine alimentaire.

**Tableau 5 : Provenance des germes utilisés.**

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

### 1.3 Produits non biologiques :

**Gélose de Mueller Hinton:** pour l'étude de la sensibilité des bactéries à nos H.Es.

**Gélose de Sabouraud :** pour l'étude de la sensibilité des levures à nos H.Es.

**Eau physiologique :** pour la préparation des suspensions bactériennes.

## CHAPITRE IV : Techniques d'études et conditions expérimentales

### 1.4 Préparation du matériel végétal :

Les fruits ont été soigneusement lavés, et épluchés à l'aide d'un économe (en évitant d'inclure l'albédo).

Leurs écorces ont été coupées en petits morceaux d'environ 1 cm maximum.

(710 grammes d'écorces d'orange plus 1060 grammes celle de citron )



Figure 20 : Les écorces fraîches de *Sitrus Limonum* et *Sitrus Sinensis*

### 1.5 Procédé d'extraction :

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation avec un Clevenger, Le dispositif d'extraction de l'HE de *Citrus limonum* et de *Citrus sinensis* par hydrodistillation est illustré dans la Figure (21).



**Figure 21 : Dispositif d'extraction des huiles essentielle par hydrodistillation**

Les écorces d'agrumes frais (710 gramme d'écorces d'orange plus 1060 celle de citron) sont introduits dans un ballon de 1.5 litre imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1 heure à 1 heures30.

Les vapeurs chargées de substances volatiles sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité en deux phases :

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

Les H.E extraites sont conservées dans des eppendorfs, fermés hermétiquement en rajoutant un parafilm sur les bouchons pour les préserver de l'air, ensuite sont couvrir avec du papier aluminium pour les garder à l'abri de la lumière.

## CHAPITRE IV : Techniques d'études et conditions expérimentales

---

Et enfin sont conservées à une température voisine de  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ , pour les protéger des variations de température qui sont des principaux agents de dégradation.

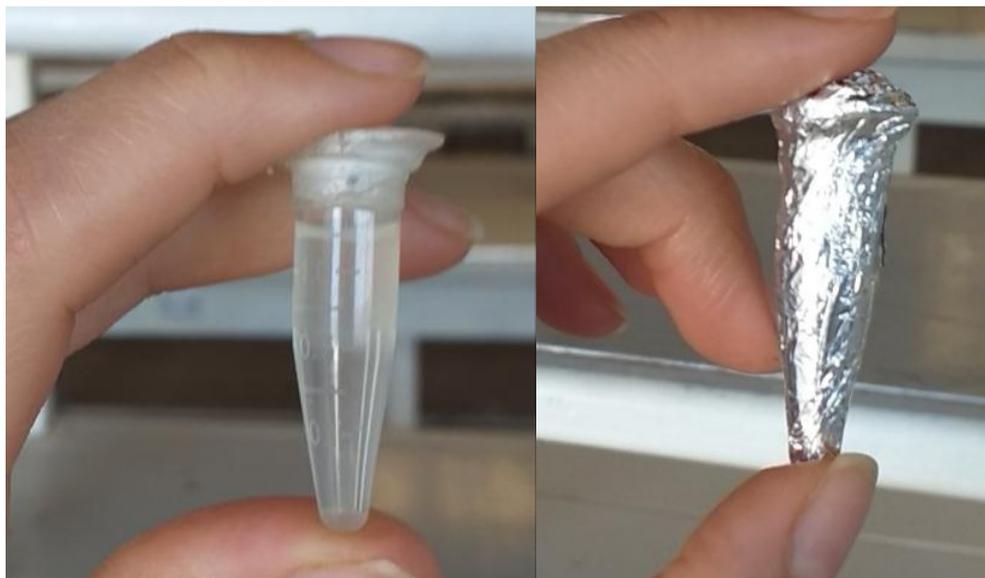


Figure 22 : Les huiles essentielles extraites

### 1.5.1 Calcul du rendement :

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

$$R = (mHE / mv) \times 100$$

R = rendement en huile essentielle en %.

mHE = masse de l'huile essentielle en gramme.

mv = masse de la matière végétale en gramme.

### 1.5.2 Etude de la cinétique d'extraction :

L'étude de la cinétique d'extraction a pour but de déterminer le temps nécessaire au bout duquel il n'est plus rentable de poursuivre l'extraction, qualifié par le

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

---

rendement maximum. Donc, la cinétique est le suivi de l'évolution de la quantité d'huile essentielle extraite en fonction du temps, pour cela et afin d'illustrer la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de Citrus Sinensis (orange) et de Citrus Limonum (citron). Par hydrodistillation type Clevenger, on a suivi la variation de la masse d'huile essentielle en fonction de temps jusqu'à l'extraction de la quasi-totalité d'huile essentielle.

### **2 Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles**

La recherche de l'activité antimicrobienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'H.E du Citron et de l'orange.

Dans ce test, nous avons effectué la méthode d'aromatogramme (Technique en milieu solide).

#### **2.1 Technique en milieu solide (Aromatogramme) :**

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

##### **2.1.1 Stérilisation du matériel :**

L'eau physiologique, les milieux de culture, les tubes à essai utilisés pour la préparation de la solution bactérienne et les disques en papier wattman (6mm de diamètre), ont été .stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

##### **2.1.2 Préparation des milieux de cultures :**

Les milieux de culture gélosé Muller Hinton (MH) et gélose Sabouraud (SB) ont été coulés aseptiquement en surfusion dans les boîtes de pétri à raison de 10 mL par boîte.

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

---

### **2.1.3 Préparation de préculture :**

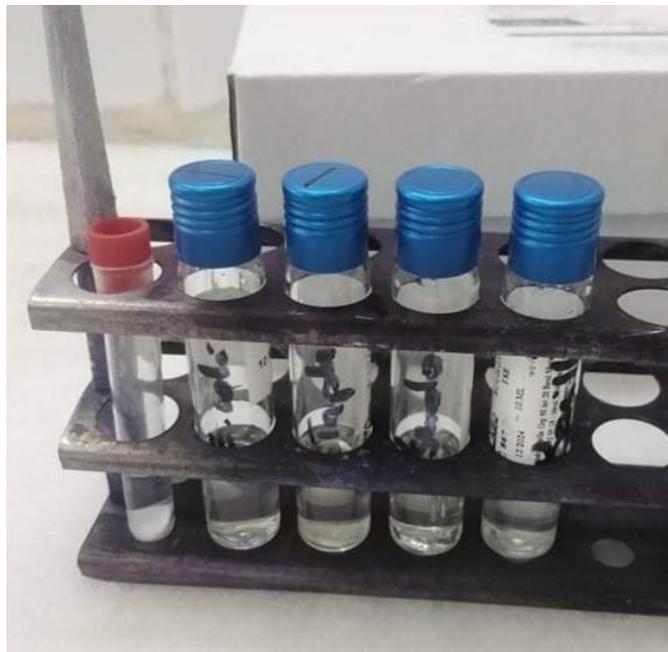
Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de 18 à 24 heures. Le repiquage des souches est effectué par ensemencement de la souche microbienne dans un milieu liquide.

Les germes utilisés ont été cultivés sur gélose nutritive, les boîtes ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures.

### **2.1.4 Préparation de l'inoculum**

A l'aide d'une pipette Pasteur, on racle 2 à 3 colonies bien isolés et identiques partir d'une culture pure de 24 heures d'incubation sur milieu d'isolement.

On dilue dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.



**Figure 23 : Incubation des microorganismes sur milieu liquide**

**Mettre la photo en annexes**

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

---

### **2.1.5 Ensemencement :**

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

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

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

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

### **2.1.6 Dépôts des disques :**

A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles de papier de Wathman 6 mm du diamètre sont imbibés avec l'H.E en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'H.E. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque, ensuite ces disques contenant l'HE sont déposés sur la surface gélosé. D'autres disques chargés de l'eau physiologique stérile ont été déposés sur la gélose pour servir de témoin négatif, ainsi que des disques d'antibiotiques (antibactérien gentamicine) pour servir de témoin positif.

Les boîtes de Petri ont été incubées à l'étuve pendant 24h à 37°C.

### **2.1.7 Lecture des résultats :**

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques.

Après mesure des zones d'inhibition, les souches sont classées en :

- Souche résistante (-) : diamètre < à 8mm
- Souche sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm

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

---

- Souche très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm
- Souche extrêmement sensible (+++) : diamètre  $\geq$  à 20 mm ( **référence** )

**CHAPITRE V**  
**Résultats et discussion**

## CHAPITRE V : Résultats et discussion

---

### 1 Rendement des huiles essentielles :

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

Le tableau suivant résume les rendements moyens en H.Es.

**Tableaux 6 : Rendements en huiles essentielles de Citrus en (%)**

Huile essentielle	<i>Citrus limonum</i>	<i>Citrus sinensis</i>
R (%)	0,18	0,23

Les résultats représentés sur le tableau montrent que les rendements moyens en H.E de Citrus limonum et Citrus sinensis obtenus à l'aide d'une extraction par hydrodistillation à l'échelle du laboratoire sont de l'ordre de 0,18% et 0,23% respectivement.

Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités. En effet, JEANNOT et al. (2005) et FUSELLI et al. (2008) ont observé des rendements allant de 0,25 à 0,57% pour l'H.E de C. Aurantium; 0,1 à pour l'H.E de C. Sinensis et 0,2 à 0,9% pour l'H.E de C. Limonum 0,6%.

Cette différence de rendement peut être expliquée par la variation des conditions environnementales (climat, situation géographique et la nature du sol), la période de la récolte, l'organe de la plante utilisé, le degré de la fraîcheur, la durée de séchage et la composition chimique. [54]

### 2 Etude de la cinétique d'extraction :

La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Pratiquement, il est difficile d'extraire la quantité complète de l'huile essentielle. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat, il détermine la fin du processus.

## CHAPITRE V : Résultats et discussion

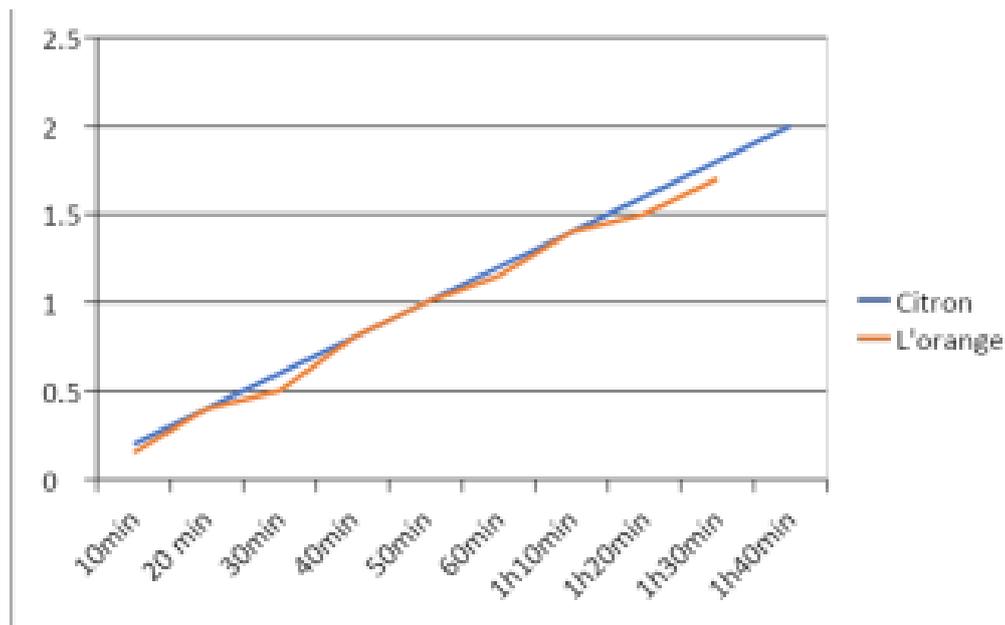
Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum par hydrodistillation type Clevenger.

Les résultats ont été représentés graphiquement sur la figure (25), et résumés en tableau (7).

**Tableau 7 : L'évaluation des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum durant l'extraction**

Temps (min)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Citron (ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2
Orange (ml)	0,15	0,4	0,5	0,8	1	1,15	1,4	1,5	1,7	

La courbe suivante montre l'évaluation des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum durant l'extraction :



**Figure 24 : Quantité en ml des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum extraites en fonction du temps**

## CHAPITRE V : Résultats et discussion

---

La figure précédente représente la variation des rendements en huiles essentielles de L'orange et de citron en fonction du temps, montre clairement l'allure générale attendue d'une courbe classique de la cinétique d'extraction.

D'après l'allure de la courbe on peut distinguer une seule partie d'extraction moyenne où un temps d'extraits 0,2 ml par 10 minutes.

Elle est représentée par une droite qui montre la facilité d'extraction.

### 3 Activité biologique des huiles essentielles

#### 3.1 Aromatogramme :

L'activité antimicrobienne des H.E a été testée par la méthode de l'aromatogramme.

La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques.

Le potentiel antibactérien des huiles essentielles de Citrus Limonum (citron) et Citrus Sinensis (l'orange douce), a été évalué sur 04 souches bactériennes (02 Gram+ et 02 Gram-), et une levure provenant d'IPA-Alger.

On travaille sur trois conditions :

- La première c'est l'huile essentielle pure.
- La deuxième c'est l'antibiotique (antibactérien gentamicine) pour servir de témoin positif.
- Et la troisième c'est l'eau physiologique, pour servir le témoin négatif.

La sensibilité des bactéries et de levure vis-à-vis de l'H.E est déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme) en mesurant le diamètre de l'halo d'inhibition, après les 24 heures d'incubation.

#### 3.1.1 Essai avec l'huile essentielle de Citrus Sinensis :

### 3.1.1.1 L'activité antibactérienne de l'huile essentielle

#### de Citrus Sinensis sur les bactéries à Gram - :

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram- sont regroupés dans les tableaux suivants :

**Tableau 8 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Escherichia coli**

	<b>HE 100%</b>	<b>Témoins+</b>	<b>Témoins-</b>
<b>Diamètre d'inhibition</b>	7mm	36mm	0mm
<b>La sensibilité</b>	Résistante	Extrêmement sensible	Résistante

**Tableau 9 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Pseudomonas aeruginosa**

	<b>HE 100%</b>	<b>Témoin+</b>	<b>Témoin-</b>
<b>Diamètre d'inhibition</b>	0mm	39mm	0mm
<b>La sensibilité</b>	Résistante	Extrêmement sensible	Résistante

Les bactéries E.Coli et P. aeruginosa sont résistantes à l'H.E de Citrus Sinensis, vis à vis leurs témoins positif.

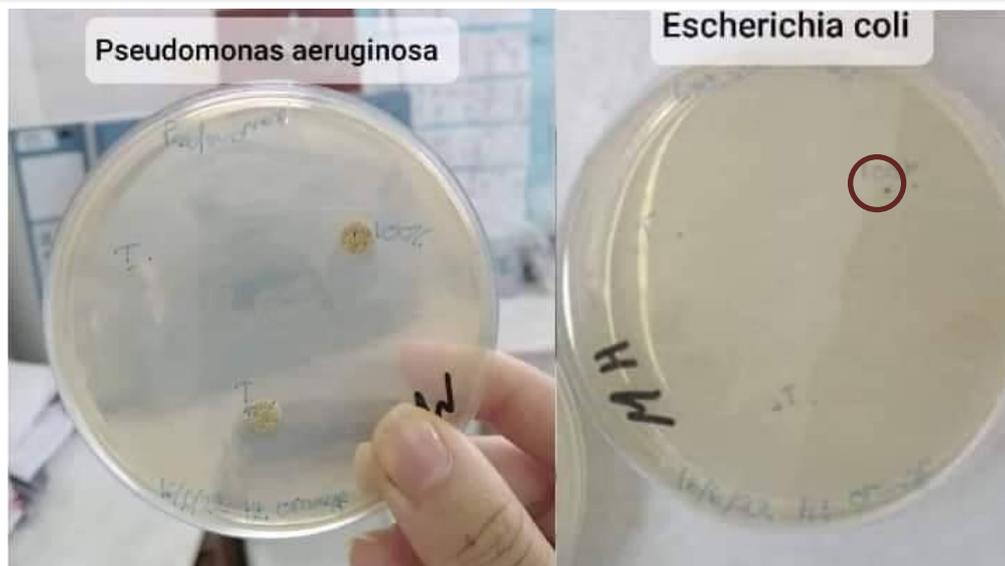


Figure 25 : Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre les souches bactériennes à Gram-

### 3.1.1.2 L'activité antibactérienne de l'huile essentielle

#### de Citrus Sinensis sur les bacteries à Gram + :

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram+ sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 10 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Bacillus ceureus

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	8mm	34mm	0
<b>La sensibilité</b>	Résistante	Extrêmement sensible	Résistante

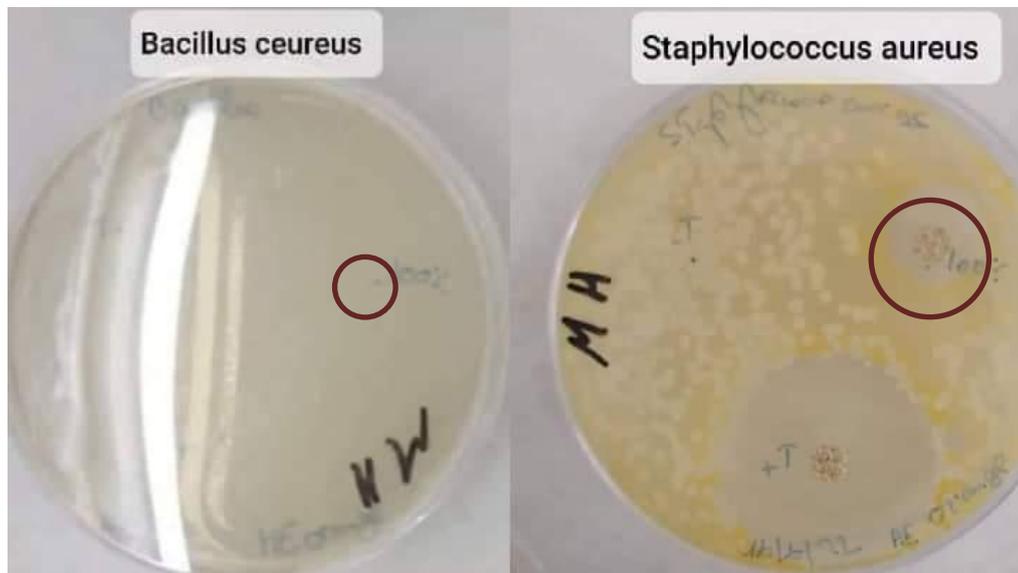
Tableau 11 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la bactérie Staphylococcus aureus

## CHAPITRE V : Résultats et discussion

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	17mm	32mm	0
<b>La sensibilité</b>	Très sensible	Extrêmement sensible	Résistante

La bactérie *S. aureus* est très sensible à l'H.E de *Citrus sinensis* comparé par la bactérie *Bacillus* qui est résistante à cette HE, vis à vis leurs témoins positif.

La bactérie *S. aureus* est la plus sensibles à l'HE de *Citrus Sinensis*



**Figure 26 : Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre les souches bactériennes à Gram +**

## CHAPITRE V : Résultats et discussion

### 3.1.2 Essai avec l'huile essentielle de Citrus Limonum

#### 3.1.2.1 L'activité antibactérienne l'huile essentielle de Citrus Limonum sur les bactéries à Gram- :

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne contre les souches à Gram- sont regroupés dans les tableaux suivants :

**Tableau 12 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Escherichia coli**

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	8 mm	33 mm	0
<b>La sensibilité</b>	Résistante	Extrêmement sensible	Résistante

**Tableau 13 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Pseudomonas aeruginosa**

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	7 mm	33mm	0
<b>La sensibilité</b>	Résistante	Extrêmement Sensible	Résistante

Les bactéries E.Coli et Pseudomonas sont résistantes à l'H.E de Citrus Limonum vis-à-vis leurs témoins positifs.

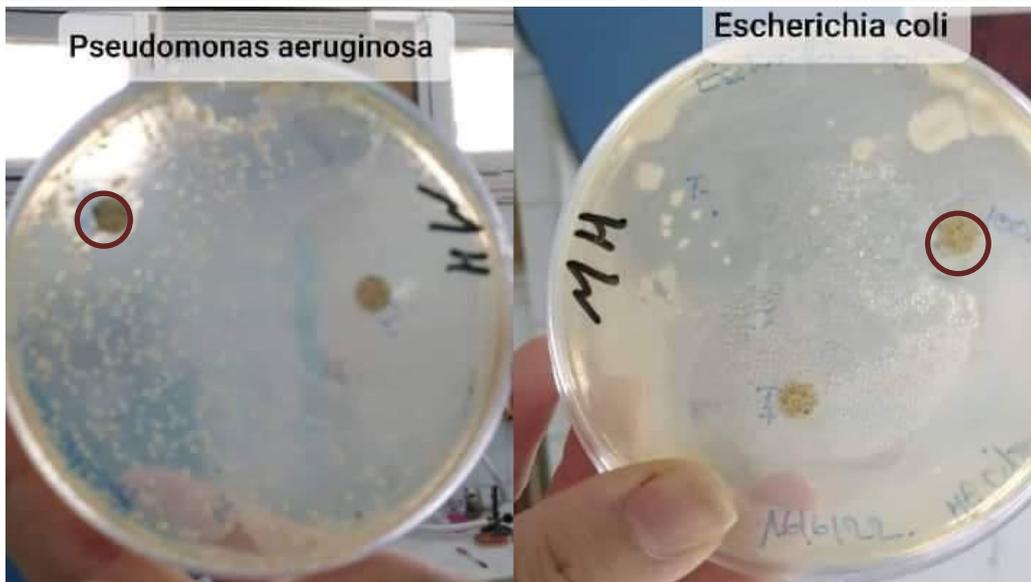


Figure 27 : Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Limonum contre les souches bactériennes à Gram -

### 3.1.2.2 L'activité antibactérienne de l'huile essentielle

#### de Citrus Limonum sur les bacteries à Gram + :

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus Limonum contre les souches à Gram+ sont regroupés dans les tableaux suivant :

Tableau 14 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Bacillus ceureus

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	11 mm	38 mm	0
<b>La sensibilité</b>	Sensible	Extremement sensible	Résistante

Tableau 15 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la bactérie Staphylococcus aureus

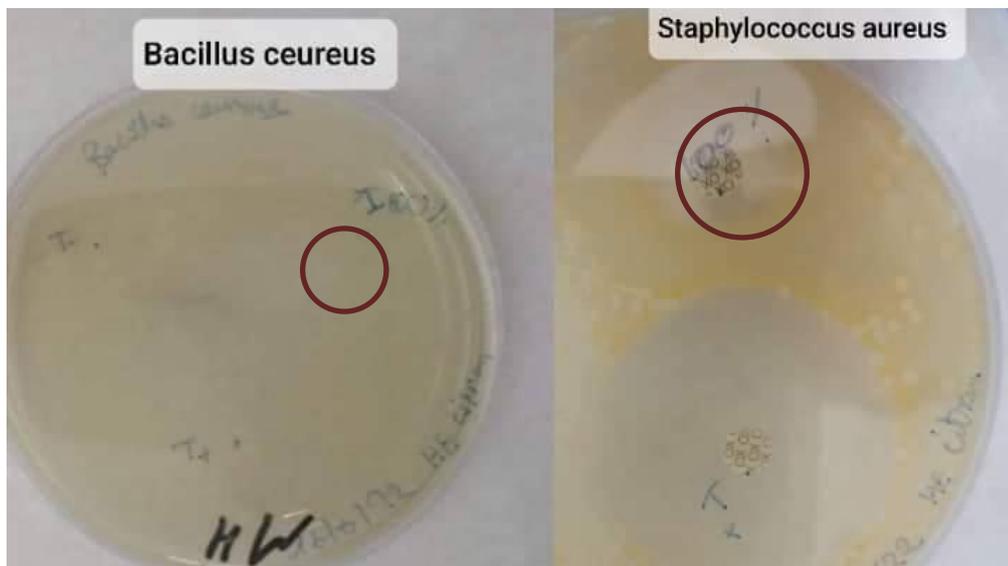
	HE 100%	Témoin+	Témoin-

## CHAPITRE V : Résultats et discussion

<b>Diamètre d'inhibition</b>	17 mm	39mm	0
<b>La sensibilité</b>	Très sensible	Extrêmement sensible	Résistante

La bactérie *S. aureus* montre une zone d'inhibition importante à l'H.E de Citrus Limonum donc elle est très sensible à cette HE comparé par la bactérie *Bacillus*, vis à vis leurs témoins positifs.

La bactérie *S. aureus* est la plus sensibles à l' HE de Citrus Limonum.



**Figure 28 : Effet inhibitrice de l'huile essentielle de Citrus Limonum contre les souches bactériennes à Gram +**

### 3.1.3 Etude de l'activité antifongique :

Les résultats de l'étude de l'activité antifongiques sont regroupés dans les tableaux suivants :

**Tableau 16 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Sinensis contre la levure *Candida albicans***

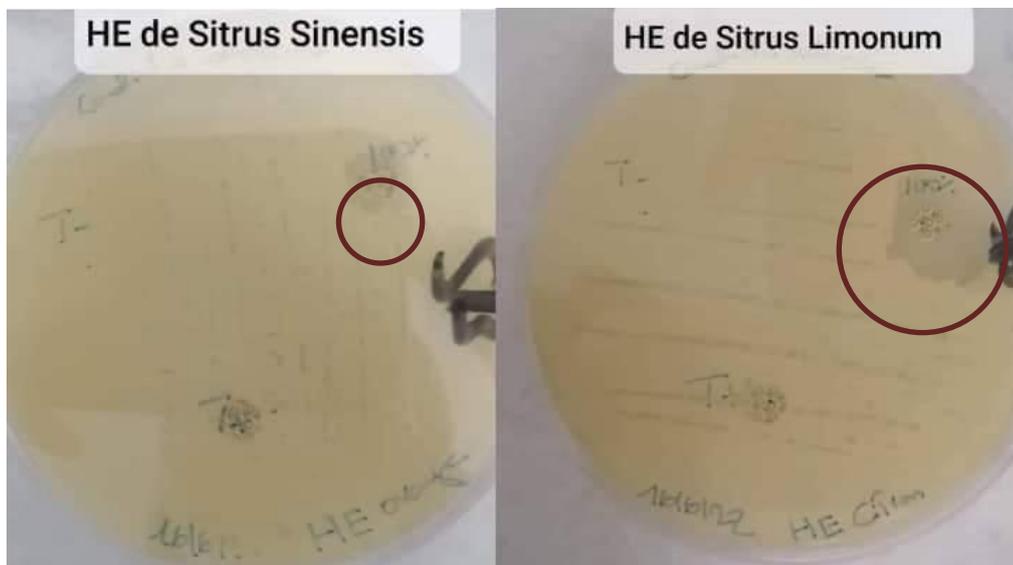
## CHAPITRE V : Résultats et discussion

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	11mm	0	0
<b>La sensibilité</b>	Sensible	Résistante	Résistante

Tableau 17 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle de Citrus Limonum contre la levure *Candida albicans*

	HE 100%	Témoin+	Témoin-
<b>Diamètre d'inhibition</b>	22 mm	0mm	0
<b>La sensibilité</b>	Extrêmement sensible	Résistante	Résistante

La levure *Candida albicans* est plus sensible à l'HE de Citrus Limonum que l'HE de Citrus Sinensis vis à vis leur témoins positif.



### **Figure 29 : Effet inhibitrice des huiles essentielles de Citrus Sinensis et Citrus Limonum contre la levure Candida albicans**

Les deux H.E testées ont présenté un large spectre d'action; agissant aussi bien sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-.

Néanmoins les diamètres des auréoles d'inhibitions des deux H.E n'ont pas dépassé 22 mm.

Notons que le pouvoir antibactérien de l'H.E de Citrus limonum s'est révélé plus important que celui de Citrus sinensis.

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

Selon Kalemba et Kunicka (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend de la propriété de l'huile essentielle et de microorganisme lui-même. (Nikaido et al,1996 ;Tepe et al,2005 ;Gilles et al,2010) confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-.

En fait les Gram- possèdent une résistance aux agents biocides avec la nature de leur paroi bactérienne.

En revanche, *S.aureus* a manifesté une sensibilité modérée vis-à-vis de l'HE.

Boudries et al. (2017) ont rapporté que *S.aureus* a présenté une sensibilité variable envers les HEs de quelques espèces de Citrus.

L'observation a montré que les deux H.E ont induit des zones d'inhibition, à noter qu'elles sont plus efficaces vis-à-vis de *Candida albicans*.

D'après Kalemba et Kunicka (2003) la sensibilité d'un microorganisme dépend des propriétés de l'HE et du microorganisme lui-même. Selon plusieurs auteurs (Poole, 2001 ;Burt, 2004 ; Busatt et al., 2008) la grande résistance des bactéries Gram négatif aux HEs est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire

## **CHAPITRE V : Résultats et discussion**

---

de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram positif.

## Conclusion

---

### Conclusion :

Notre travail a été mené principalement en deux volets, le premier présente des études bibliographiques sur les deux espèces; Citrus Sinensis (l'orange) et Citrus Limonum (citron), ainsi que l'extraction, les caractérisations et les activités biologiques de leurs huiles essentielles.

Le deuxième volet est une étude expérimentale concernant l'extraction des huiles essentielles d'orange et de citron par hydrodistillation type Clevenger, cette méthode montre un rendement de 0,23% de l'HE de Citrus Sinensis et 0,18% celle de Citrus Limonum.

Suivie par l'estimation de leurs activités antimicrobiennes sur plusieurs souches; 2 bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *Bacillus*) et 2 bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*) ainsi qu'une levure (*Candida albicans*), en utilisant la méthode d'aromatogramme.

Les résultats obtenus sont très encourageants, les expériences montrent une inhibition très importante de la croissance des bactéries testées, même pour la levure *Candida albicans*, la sensibilité vis-à-vis des deux H.E est très importantes.

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

Ce dernier peut être responsable du fort pouvoir fongicide de ces H.E sur la croissance des bactéries testées.

Donc l'HE de Citrus Limonum semble constituer un excellent produit à activité bactéricide.

### Références bibliographique :

- [1] Abou Zaid, E. N. Aromatic and medicinal plants—their agricultural and medicinal products. El-Dar El-Arabia for Publishing, Cairo, (1988).
- [2] AFNOR, "association française de normalisation française : huile essentielle, Ed, Afnor", Paris, (2000).
- [3] AFNOR . Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris, (1986):57 p.
- [4] ANTON J.C., WENIGER B., ANTON R. 2006 : Huiles essentielles p 189-229 in Actifs et additifs en cosmétologie 3ème édition, Lavoisier Tec et Doc, Paris
- [5] Alliouane F. Extraction de limonène à partir des épicarpes d'orange. [Mémoire]. Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri.
- [6] Beckman, Kenneth B., and Bruce N. Ames. "The free radical theory of aging matures." *Physiological reviews*, (1998).
- [7] Belaïche P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Ed. Maloine SA., tome 1. 9-128.
- [8] Belaïche P. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme* Tome I, Edition Maloine (1979).
- [9] Blondel L., 1978. *Fruits*, 33, 695.
- [10] Bouamer A. BELLAGHIT M. et MOLLAY AMERA. Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe verte et la menthe poivrée de la région de Ouargla ; Mémoire DES. Unive. Ouargla, 2004 p 2-5 ; 10 ; 19 ; 21-22.
- [11] Bouanane N, Boussehel N, contribution agroécologique aux essais d'introduction de la menthe poivrée (menthe piperata L) dans la région de Ouargla en vue de l'utilisation de ses huiles essentielles en thérapie mémlng. Univ. Ouargla 2005- p22-23 ; 28

## Références bibliographiques

---

[12] Bouguerra M A. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill.2012.

[13] BOUSBIA N., Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat: Chimie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 2011

[14] Boyle W (1955). Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfumer Essent. Oil Rev.* 66:25\_28.

[15] BRUNETON J. Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales. 4e éd. Paris : Tec &Doc,2009. 1269

[16] BRUNETON J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris, (1999).

[17] BRUNETON, Jean. "Pharmacognosie : photochimie plantes médicinales, Ed : Lavoisier, Ed : Lavoisier, 2èmeEdition", (1993):42-387.

[18] Brunton, J.Pharmacogenosie phytochimie plante médicinales. 3ème édition, Tec & Doc et EM inter, (1999 ) :1120.

[19] Buchbauer G., Jäger W., Jirovetz L., ilmberger J., Dietrich H. Therapeutic properties of essential oils and fragrances. In: *Bioactive Volatile Compounds from Plants*, (R Teramishu, R G Buttery and H Sugisawa, eds). ACS Symposium Series 525Washington DC: American Chemical Society,(1993): 159-165.

[20] Burgot G., Burgot J. L., Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications :Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, 3ème Edition Tec & Doc Lavoisier, 2011, p.10, ISBN : 978-2-7430-1337-0.

[21] Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods.

[22] CARSON C F., RILEY T V. (1995). Activité antimicrobienne des principaux composants de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*. *Journal applied bacteriol* 78 (3), 264-9.

## Références bibliographiques

---

- [23] CARSON C.F., RILLEY T.V et BOSQUE F. (2002). Antimicrobial activity of the major component of essential oil of melaleuca alternifolia. Journal of applied Bacteriology, 78 (3), 264-269.
- [24] Chanchal Cabrera, "Clinical aromatherapy : The medicinal value of volatile oils,MNIMH, AHG", (2001):1-18.
- [25] CHAUMONT J.P et LEGER D. (1998). Plantes Medecinales. Phytotherapie, 23, 124.
- [26] Chemat, F., Abert-Vian, M., & Fernandez, X. (2013). Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Food Engineering Series, Springer, New York, USA.
- [27] Couic-Marinier F., Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques ,(2013); 52 (525): 18-21.
- [28] Couic-Marinier, F. "Huiles essentielles : l'essentiel. Conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotidien." (2013).
- [29] CRETE P.,1965 : Précis de botanique ,système des angiospermes,Tome 2,édition Masson,Paris , pages 218 ,219, 220 .
- [30] Di Giacomo A, Rapisarda P, Safina G., Les produits dérivés de l'industrie des agrumes. Station expérimental industriel dérivé des agrumes. Italie. 1992.
- [31] DJILANI A ET DICK A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. Nutrition. Well- Being and health 7, 156-173.
- [32] DJILANI A ET DICK A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. Nutrition. Well-Being and health 7, 156-173.
- [33] Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of Plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308-316
- [34] Dung N.X., Pha N.M., Thien N.H., and Leclercq P.A., 1996. Chemical Investigation of the fruit peel oil of Citrus medica L. var. sarcodectylis (Noot.) Swingle from Vietnam, J.Essent.Oil Res., 8, 15-18.

## Références bibliographiques

---

- [35] D. Festy. Je ne sais pas utiliser les huiles essentielles : spécial enfants. Editions Quotidien Malin Paris ; 2013.
- [36] EDJDOUB J C., 2002.Reconnaissance visuelle de quelques variétés d'agrumes-CNCC-juin.
- [37] Elhaib A. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse. 2011.
- [38] France-Ida J. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence ,(1996); 3:5-6
- [39] Gabriela Beirão and Gabriela Bernardo-Gil, Beirão ARB. And Bernardo-Gil MG, "Antioxidants from Lavandu la luisieri.2ndMercosur Congress Engineering. on Chemical Portugal", (2006):8p.
- [40] Glidewell, Christopher. "Monoterpenes: An easily accessible but neglected class of natural products."Journal of Chemical Education 68.3 (1991): 267.
- [41] Goris A.L., Liot A., Janot M.M., et Goris A., 1949. Pharmacie galénique. Masson et Cie éd., Paris.
- [42] Hammer et al., 1996; Hammer et al.,1999; Yu et al., 2004; Preuss et al., 2005)
- [43] Hendrix C.M. et Redd J.B., 1995 : Chemistry and Technology of Citrus Juices and By- Products. In : Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.Guimaraes R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa m. J., Carvalho A.M. et Ferreira I.C.F.R., 2010 : Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food Chem. Toxicol., Vol. 48, pp : 99 – 106
- [44] Hubert, R. (1992). Epices et aromates. Edition Tec & Doc, Lavoisier, France.

## Références bibliographiques

---

- [45] HUETE A. Huiles essentielles pour tous les jours. Editions Artémis, (2012) : 223p.
- [46] HUETE A. Huiles essentielles pour tous les jours. Editions Artémis, (2012) : 223p.
- [47] Jacques G.Paltz s.a. « le fascinant pouvoir des huiles essentielles ». Fascicule du laboratoire « jacque paltz ».1997
- [48] Jean-François Cavalli. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Autre. Université Pascal Paoli, 2002.
- [49] Jouant s . 2012. La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université de lorraine. Faculté de pharmacie. France 137p.
- [50] Kimbaris, A.C.; Siatis, N.G.; Daferera, D.J.; Tarantilis, P.A.; Pappas, C.S.; Polissiou, M.G.Ultrasonics Sonochemistry, (2006),13, 54-60.
- [51] KIM D.K et LEE C.Y.(2004). Comprehensive study on vitamin c equivalent antioxydant capacity of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 253-273.
- [52] Lagunez-Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, (2006).
- [53] LAHLOU M. 2004: Methodes to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy research 18-(435\_448).
- [54] Lamendin H. Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. Chir. Dent. Fr (2004): 1185: 78-80. [11] Rafi A., Tasneem U S., Ashfaq A. The essential oils. Hamdard Medicus, (1995); XXXV(1): 108.

## Références bibliographiques

---

- [55] Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M (1995) Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
- [56] LE LOURANT P. 1994. Guide pratique de l'aromathérapie: Mieux être, mieux vivre par l'aromathérapie. Ed :Devecchis S.A Paris. 13 p.
- [57] LOUSSERT R., 1987. Les agrumes ,l'arboriculture. Ed. Lavoisier, Vol. 1, paris, 80p.
- [58] LOUSSERT R. (1989). Les agrumes-2-Productions. Lavoisier, 1er Ed., Paris.
- [59] LOUSSERT R. (1989). Les agrumes. 2. Production Edition Lavoisier, Paris, 157.
- [60] Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall International Editions
- [61] Mann J. Secondary metabolism. Second edition, Clarendon press, Oxford, (1987):p.374.
- [62] Meullemiestre, A.; Breil, C.; Abert-Vian, M.; Chemat, F. «Modern Techniques and solvents for the Extraction of Microbial Oils», Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability, (2015):p. 52.
- [63] MODZELEWSKA A., SUR S., KUMAR K.S et KHAN S.R. (2005). Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents, 5, 477-499.
- [64] MORO BURONZO E. (2005). Grand guides des huiles essentielles (santé, beauté, bien-être). Hachette pratique, 1er Ed., Italie.
- [65] MOUFIDA S. & MARZOUK B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. Phytochemistry, 62 (8), 1283-1289.
- [66] N. Purchon. Huiles essentielles, initiation à l'aromathérapie. Editions de Noyelles; Paris ; 2008.

## Références bibliographiques

---

- [67] Ouis, Naouel. "Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil". Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger, (2015).
- [68] Paris M, et al Abrégé de matière médicale, pharmacogénosie. Tome I, Masson, Paris, (1981):339.
- [69] PATRICE DE BONNEVAL et FRANK DUBUS, Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien, édition Déslris, paris 2014
- [70] Pauli, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents . Int J. Aromather, ( 2001):11, 126-133. PATRICE DE BONNEVAL et FRANK DUBUS, Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien, édition Déslris, paris 2014
- [71] PELERIN P. Supercritical fluid extraction of natural saw materials for the flavor and perfume industry. Perfum. Flavor 16(4) (1991): 37-39.
- [72] PIBIRI M.C 2006 : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Thèse no 3311. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.
- [73] PIERRE M., JACET D., JEAN K., FABRICE FEKAN B., DANIEL D., FRANÇOIS D., PAUL H., CHANTEL M. ET JEAN MARIE B. (2001) Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. Fruits, 57, 95–104.
- [74] PIERRE M., JACET D., JEAN K., FABRICE FEKAN B., DANIEL D., FRANÇOIS D., PAUL H., CHANTEL M. ET JEAN MARIE B. (2001) Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. Fruits, 57, 95–104.
- [75] Porter N. Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39(2001).

## Références bibliographiques

---

- [76] Praloran J.C., 1971. Les agrumes, Maisonneuve G. P et Larose, Paris.  
Fleisher Z., and Fleisher A., 1991. The Essential Oil of Ethrog (*Citrus medica* L. var. *ethrog* Engl). *Aromatic Plants of the Holy Land and Sinai*, part VI, *J.Essent.Oil Res.*, 3, 377-379. Dung N.X., Pha N.M., Thien N.H., and Leclercq P.A., 1996. Chemical Investigation of the fruit peel oil of *Citrus medica* L. var. *sarcodectylis* (Noot.) Swingle from Vietnam, *J.Essent.Oil Res.*, 8, 15-18.
- [77] Praloran J.C., 1971. Les agrumes, Maisonneuve G. P et Larose, Paris.
- [78] REBOUR H., 1950 – Les agrumes en Afrique du NORD ,union des syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, pp 498-502.
- [79] REBOUR H., 1950 – Les agrumes en Afrique du NORD ,union des syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, pp 498-502.
- [80] Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Fès .12-13p.
- [81] Robert G. Les Sens du Parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris, (2000) : 224 p.
- [82] Sell C. The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer. 2<sup>nd</sup> edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, (2006): 329p.
- [83] Svoboda, Katya P., and Janice B. Hampson. "Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities." *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW16* (1999): 1-7.
- [84] VIRBEL-ALONSO C. (2011). Citron et autres agrumes. Eyrolles, 1er Ed., Paris.
- [85] Vinatoru Mircea, Toma Maricela. et al, "ultrasonics Sono chemistry", 177,4,135.

## Références bibliographiques

---

[86] Teuscher B., (2005). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z Lebensmittel-Untersuchungund Forschung*, (200): 3-13.

[87] Y. VINCENT., LA CHIMIURGIE DES ECORCES D'AGRUMES. *Fruits --* Vol.17,n' 9.1962.

**(reference)** PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C et ROURA S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of food science and technology*, 36, 679-684.