

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT AGRO ECOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE

LABORATOIRE DE PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences de la nature et de la vie.

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

THEME

Étude phytochimique du citronnier et incorporation de l'huile essentielle du fruit et la poudre de ses feuilles dans un produit

Réalisé par :

Soutenue le : 14/07/2022

Melle CHAOUATI MERIEM HIBA

Melle TALEB HALIMA YOUSRA

Devant le jury composé de :

Mr. ABBAD M.

MAA (USDB)

President

Mme. GHANAI R.

MCB (USDB)

Examinatrice

Mr. BENDALI A.

MCA (USDB)

Promoteur

Promotion : 2021/2022



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A la mémoire de mon très cher papa

*Je ne saurais mon grand chagrin a ton absence, j'aurais aimé que tu sois à
mes côtés ce jour.*

*A ma très chère maman qui m'a encouragé durant toutes mes études, je te
remercie énormément pour tes prières, ton soutien, et qui sans elle ma
réussite n'aura pas eu lieu que dieu te garde pour nous.*

A ma très chère sœur « Hayet » pour son encouragement et son aide.

*A mes très chers frères « Djihad » et « Hichem » pour leur aide et soutien
moral.*

A ma très chère nièce et neveu.

A ma très chère binôme « Meriem » et a toute sa famille.

A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail.

A tous ceux que j'ai omis de citer.

Yousra

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Moi-même, qui n'a jamais baissé les bras. Qui est resté forte aux moments durs, et qui garde le sourire, la bonne énergie et la bonne humeur tout le temps. Merci de rester brillante dans tous les états. Très fière de moi, et de la personne dont je suis devenue aujourd'hui. Une personne qui aspire toujours à s'améliorer pour le mieux.

A mon très cher papa qui a sacrifié tellement de choses pour m'offrir le meilleur et qui était toujours là à mes côtés, merci d'avoir m'encourager à poursuivre mes rêves, et encore m'aider à les réaliser tous.

A ma chère maman qui m'a encouragé tout au long de mon parcours, pour son soutien et ses prières, tous les remerciements du monde ne peuvent exprimer ma gratitude à ton égard.

A ma chère tante « Dalila » pour ses prières, son soutien moral et son aide, je te remercie énormément.

A ma sœur « Abir » et mon frère « Mohamed » pour leur encouragement et leur aide.

A toutes les personnes de ma grande famille.

A ma sœur et ma chère binôme « Yousra » et à toute sa famille.

A ma copine et ma sœur « Hanen », à ma meilleure amie d'enfance « Yousra », à ma bestie « Yousra », à « Sarah », « Maroua », « Anfel », « Zola », je vous remercie pour votre encouragement, votre soutien moral et aide, pour les bons moments et la bonne compagnie surtout.

A tous ceux que j'ai oublié de citer.

Meryem

Remerciements

*Au terme de ce modeste travail, on tient à exprimer notre gratitude et remerciements
à :*

*Notre promoteur Mr **BENDALI A**, pour nous avoir dirigé et guidé tout le long de
notre travail,*

son aide, sa présence et ses conseils, un grand merci pour vous monsieur.

*On remercie également les membres de jury, d'avoir accepté d'examiner ce travail, et
tout*

*Particulièrement Mr **ABBAD M**, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider le
jury de*

*notre mémoire, Mme **GHANAI R**, d'avoir accepté d'examiner notre
travail, pour son aide et participation dans nos recherches.*

On remercie vivement :

*Mr **GHRIBI Y** et Mme **ZEHNANE G**, de nous avoir permis d'effectuer l'extraction
de l'huile essentielle.*

*Monsieur **BOUDISSA H**, chef de laboratoires **VENUS**, pour sa*

*Collaboration et son aide pour la réalisation des analyses physicochimiques et
l'application des test microbiologiques. Nous vous sommes très reconnaissantes pour
avoir consacré une partie de votre temps précieux.*

*Nos vifs remerciements sont adressés pareillement à tous nos enseignants de
l'université **Saad Dahleb Blida 1**.*

Résumé

La présente étude porte sur l'étude phytochimique de l'épicarpe des fruits du citronnier et l'évaluation de l'activité antioxydante de son huile essentielle et de l'extrait de la poudre des feuilles de la plante récoltées dans la wilaya de Blida dans la région de bab el khouikha au moi de mars.

Le but de ce travail est de formuler de nouveaux produits cosmétiques d'origine végétale. L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau. Le rendement obtenu est faible (0.33%). Les résultats des analyses physicochimiques de l'huile essentielle (pH, l'indice d'acide, indice de réfraction, densité relatives, indice de saponification et l'indice d'ester) montrent leurs conformités à la norme (AFNOR). L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que l'huile essentielle du citron est moins efficace (457,52) que celle de la poudre des feuilles (213,19) et l'acide ascorbique (419,18). Tandis que l'extrait de la poudre présentent un pouvoir antioxydant plus important que l'acide ascorbique.

Le screening phytochimique de la poudre des feuilles révèle la présence des grands groupes chimiques tels que les anthocyanes, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les glucosides et les mucilages. Les tests microbiologiques des produits cosmétiques (crèmes hydratante) ont été réalisés sur quatre souches bactériennes et deux souches fongiques. Les résultats obtenus ont prouvé que les produits formulés ne sont pas contaminés, et qu'ils sont conformes aux normes européennes. Les tests toxicologiques des produits cosmétiques formulés ont été appliqués sur des lapins albinos, ces derniers ont montré que les produits ne sont pas irritants, ni toxiques, et sains pour la peau.

Mots clés :

Citrus limon, phytochimie, activité antioxydante, test microbiologique, test toxicologique, formulation.

Abstract

This study focuses on the phytochemical study of the peel of lemon fruit and the evaluation of the antioxidant activity of its essential oil and the powder of the leaves of the plant harvested in the wilaya of

Blida. The purpose of this work is to formulate new organic cosmetic products of plant origin. The extraction of essential oils was carried out by water vapor training. The yield obtained is low (0.33%). The results of physicochemical analyses of essential oil (pH, acid index, refractive index, relative density, saponification index and ester index) show their compliance with the standard (AFNOR). The study of antioxidant power by the DPPH free radical trapping method has showed that the essential oil of lemon is less effective than that of leaf powder and the ascorbic acid. Thus, the latter (HE, leaf powder) have a higher antioxidant power than ascorbic acid.

Phytochemical screening of leaf powder reveals the presence of large chemical groups such as anthocyanins, tannins, flavonoids, alkaloids, glucosides and mucilage. Microbiological tests of cosmetic products (moisturizing creams) were carried out on four bacterial strains and two fungal strains. The results obtained have proven that the formulated products are not contaminated, and that they comply with European standards.

Key words:

Citrus limon, phytochemistry, antioxidant activity, microbiologic tests, toxicologic tests, formulation.

ملخص

يركز عملنا على الدراسة الكيميائية لقشور فاكهة الليمون وتقييم النشاط المضاد للأكسدة لزيتها الأساسي ومسحوق أوراق النبات الذي تم قطفه في ولاية البلدة. الغرض من هذا العمل هو صناعة منتجات تجميل طبيعية من أصل نباتي تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق تقطير البخار. المرود الذي تحصلنا عليه منخفض (0.33%). نتائج التحليلات الفيزيائية والكيميائية للزيوت الأساسية (رقم الهيدروجيني، مؤشر الحمض، معامل الانكسار، الكثافة النسبية، مؤشر التصبين ومؤشر الإستر) تظهر امتثالها للمعيار AFNOR. ثم قمنا بإجراء نشاط المضاد للأكسدة وفقا لاختبار الجذور الحرة DPPH. أظهر أن زيت الليمون الأساسي أقل فعالية من مسحوق الأوراق. وبالتالي، فإن هذا الأخير أقل من حمض الأسكوربيك، أما بالنسبة لمسحوق الأوراق فإنه أكثر فعالية. أظهر التحليل الكيميائي النباتي لمسحوق الأوراق عن وجود مجموعات كيميائية كبيرة مثل الأنتوسيانين والعفص والفلافونويدات والقلويدات والجلوكوزيدات والصبغ. أجريت الاختبارات الميكروبيولوجية للمنتجات التجميلية (الكريمات المرطبة) على أربع سلالات بكتيرية وسلالتين فطريتين. أثبتت النتائج التي تم الحصول عليها أن المنتجات المركبة ليست ملوثة، وأنها تتوافق مع المعايير الأوروبية. تم تطبيق الاختبارات السمية لمستحضرات التجميل المركبة على الأرانب البيضاء، والتي أظهرت أن المنتجات ليست مؤذية وغير سامة وصحية للبشرة.

الكلمات المفتاحية

Citrus limon ، الكيمياء النباتية، نشاط مضادات الأكسدة ، الاختبارات الميكروبيولوجية ، اختبارات السموم ، المستحضرات.

TABLE DES MATIERES

Dédicace

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION

Chapitre 1: Etude bibliographique

1.Chapitre 1 : Étude bibliographique.....	3
1.1 Généralités sur le citronnier	3
1.1.1 Classification botanique.....	3
1.1.2 Description botanique.....	3
1.1.3 Culture et entretien.....	5
1.1.4 Parasites et maladies.....	5
1.2 Généralités sur les huiles essentielles.....	5
1.2.1 Définition.....	5
1.2.2 Rôle physiologique	6
1.2.3 Répartition et localisation.....	6
1.2.4 Composition chimiques	7
1.2.5 Notion de chemotype.....	9
1.2.6 Propriétés physiques des huiles essentielles.....	9
1.2.7 Classification des huiles essentielles.....	10
1.2.8 Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles	10
1.2.9 Domaine d'application des huiles essentielles	10
1.2.10 Méthodes d'extractions des huiles essentielles.....	11
1.2.11 Toxicité des huiles essentielles.....	11
1.4 Généralité sur les produits cosmétiques	11
1.4.1 Définition	11
1.4.2 Principaux composants.....	11
1.4.3 Classification.....	12
1.4.4 Composition.....	13
1.4.5 Origine des produits cosmétiques	14
1.4.6 Définition d'une crème hydratante.....	15

1.4.7	Contrôle microbiologique d'un produit cosmétique	16
-------	--	----

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 2 : matériel et méthodes

2.Chapitre 2 : Matériel et méthode	21
2.1 Matériel	21
2.1.1 Matériel non biologique.....	21
2.1.2 Matériel biologique.....	21
2.1.3 Matériel microbiologique	22
<hr/>	
2.2 Méthodes	23
2.2.1 Préparation de la poudre de citron.....	23
2.2.2 Extraction de l'huile essentielle du citron.....	25
2.2.3 Tests du Screening phytochimique	31
2.2.4 Activité antioxydante de l'extrait de la poudre et de l'huile essentielle.....	32
2.2.5 Formulation des deux crèmes cosmétiques.....	33
2.2.6 Tests microbiologiques des produits cosmétiques.....	35
2.2.7 Analyses toxicologiques des produits cosmétiques.....	35

_Toc108394128

Chapitre 3: Résultats et discussion

3.Chapitre 3 : Résultats et discussion	41
3.1 Analyses physicochimiques de l'huile essentielle.....	41
3.1.1 Les analyses physico-chimiques.....	42
3.1.2 Screening phytochimiques.....	43
3.1.3 Activité antioxydante de l'huile essentielle extraites et de la poudre des feuilles du <i>Citrus limon</i>	46
3.2 Caractéristiques organoleptiques des crèmes	49
3.3 Tests microbiologiques.....	50
3.4 Les tests toxicologiques	51

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion.....	54
------------------------	-----------

REFERENCES

ANNEXES

Liste des abréviations :

Abs contrôle : absorbance du contrôle

Abs test : absorbance de l'extrait

AFNOR : Association Française de normalisation

AFFAPS : Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé

ATCC : Collection américaine des cultures type (American Type Culture Collection).

C.limon : *Citrus limon*

CE : Concentration efficace

d²⁰ : densité relative

DO : densité optique

DPPH: 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

Ech: Echantillon

GN : gélose nutritive

HE : huile essentielle

IA : indice d'acide

IC : concentration inhibitrice

I_E : indice d'ester

INRS-IAF : Institut national de la recherche scientifique Armand Frappier

IR : indice de réfraction

I_S : indice de saponification

LCQ : laboratoire de contrôle de qualité

NF ISO : Norme française Organisation Internationale de Normalisation

PI : pourcentage d'inhibition

V : volume

Liste des tableaux :

Tableau 1: Microorganismes testés.....	23
Tableau2: Les composants des deux crèmes formulées.....	35
Tableau 3: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle <i>Citrus limon</i> 1.....	42
Tableau 4: Résultats du screening phytochimique de la poudre du <i>Citrus limon</i>	43
Tableau 5: Propriétés organoleptiques de la crème à base de l'huile essentielle du <i>Citrus limon</i>	49
Tableau 6: Propriétés organoleptiques de la crème à base de la poudre des feuilles de citronnier...	49
Tableau 7: Inhibition qui montre l'activité microbologique des deux crèmes formulées par la méthode diffusion sur gélose.....	50

Liste des figures :

Figure 1 :Aspect morphologique du fruit de citron.....	3
Figure 2: le citronnier.....	3
Figure3: aspect morphologique des fleurs du citronnier	4
Figure 4: aspect morphologique du fruit du citron	4
Figure 6: Schéma représentant la structure de la peau.....	13
Figure 7: Mise en forme d'un produit cosmétique	14
Figure 8: contenance d'un produit bio.	16
Figure 9: les composants de base d'un produit cosmétique.....	17
Figure 10: Étapes de la préparation de la poudre.....	24
Figure 11: Schéma représentant du processus d'extraction d'HE par entrainement à la vapeur d'eau.	26
Figure 12: Les crèmes formulées	34
Figure 13: Le flanc rasé.	37
Figure14: Rasage du flanc du lapin.	37
Figure 15: Application du produit.....	38
Figure16: pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'HE de <i>C.limon</i> , l'extrait de la poudre des feuilles de citron et l'acide ascorbique.	46
Figure 17: Comparaison de la valeur IC50 de HE de <i>C.limon</i> , l'extrait de la poudre des feuilles de citron et l'acide ascorbique.	48
Figure 18 : Observation des tests d'irritation effectués sur les lapins d'Albinos.....	51

INTRODUCTION

Introduction

Le mot « agrume » qualifie à la fois des fruits et de petits arbustes faisant partie de la famille des Rutacées. Le genre *Citrus* divisé en plusieurs espèces et variétés, compose principalement cette vaste famille.

La collaboration entre la cosmétologie et la dermatologie a favorisé, à travers un effort de recherche considérable de l'industrie cosmétique, le développement des connaissances sur la peau et sur les effets des cosmétiques. Petit à petit la cosmétologie devient une science à part entière, non seulement réservée aux chimistes et aux formateurs mais impliquant à part entière les biologistes. De ces recherches est issue la certitude que l'application d'un cosmétique sur la peau modifie la biologie cutanée, dans un sens permettant une meilleure prévention et une meilleure réparation.

L'organisation des essais en vue de faire ressortir les différentes influences que peuvent porter ces agents sur les propriétés de nos produits et de dégager une formule optimale, nécessite au préalable une démarche basée sur l'utilisation d'une méthodologie des plans d'expériences.

Par ailleurs, on fera appel à des analyses physicochimiques, screening chimique, activité antioxydante pour identifier les molécules, des tests toxicologique et microbiologique pour vérifier la sécurité d'utilisation des produits cosmétiques à base de citronnier [1].

L'objet de notre travail est développé en deux parties :

La première partie :

Est purement bibliographique dans laquelle nous avons exposé des informations scientifiques, trouvées dans la littérature, en commençant par la première partie dans lequel nous avons abordé l'étude de la plante *Citrus limon*, la seconde sur les huiles essentielles, la troisième a été consacré sur des généralités sur la peau, enfin la dernière sur la présentations de la peau.

La deuxième partie :

Elle a fait l'objet de la méthodologie du travail en : matériel et méthodes utilisés, et discussion des résultats,

Le mémoire s'achève par une conclusion générale.

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1.1 Généralités sur le citronnier

1.1.1 Classification botanique

Citrus limon est une espèce de la famille des Rutacées, connu sous le nom vernaculaire Citron [2].

La classification botanique est comme suit [3].

Règne : *Plantae*

Embranchement : *spermaphytes*

Sous embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Eudicotylédones*

Sous classe : *Archilomydeae*

Ordre : *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Sous famille : *Aurantoideae*

Tribu : *Citreae*

Sous tribu : *Citrineae*

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus limon*



Figure 1 : Aspect morphologique du fruit de citron

(Originale, 2022)

1.1.2 Description botanique

Le Citronnier du nom latin *Citrus Limon* de la famille Rutacées, d'origine D'Asie. C'est un arbre fruitier, épineux, agrume à fruits comestibles. Peu rustique, il ne supporte pas des températures inférieures à -5°C. Ses feuilles sont persistantes, ovales, brillantes et vert plus ou moins foncé. Il se multiplie en semis, bouturage, greffage et marcottage.

Il est cultivé dans un jardin fruitier et d'agrément, serre, véranda. Culture en pot dans les régions froides, et dans un sol humifère, sablonneux et surtout bien drainé. Il ne supporte absolument pas les terres calcaires [4].



Figure 2: le citronnier
(Originale,2022)

Pour une bonne fertilisation un apport de fumier ou de compost décomposé au printemps et en automne est indispensable. Effectuer des apports d'engrais "spécial agrumes" du mois d'avril au mois d'octobre. En règle générale, on compte trois apports par an. Le premier fin février/début mars ; le second en juin ; le dernier en septembre/octobre.

Il doit être exposé au soleil chaud et à l'abris du vent.

Cet arbre est d'une hauteur de 4 à 6 mètres avec une croissance assez rapide. Il a un étalement d'environ 4 mètres. Le trou de plantation doit mesurer environ 100 cm de profondeur et de diamètre. Le point de greffe ne doit pas être enterré mais affleurer le sol. La floraison du citronnier est remontante et les bouquets de fleurs apparaissent presque toute l'année avec une couleur blanche rosée.

Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes persistantes et alternatives, vert profond et luisantes, plus pâles sur leur revers. Elles ont une forme en fuseau, de 6 à 11 cm de long et leur pétiole est parfois ailé. Les feuilles sont très odorantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visibles à l'œil nu [5]

Les Fleurs ont des pétales blancs de petites tailles, à teinte blanc violacée (à 5 pétales blancs),

axillaires réunies en petits groupes. Légèrement cireuse d'aspect, elle dégage un parfum très agréable. Leurs fruits, les citrons jaunes sont plus ou moins acides en fonction de la variété Selon les espèces, la fleur se transforme en fruit mur.

Les fruits sont juteux, acides et très parfumés de forme ovale (8-12 cm) de long sur (5-6 cm) de diamètre, avec un mamelon plus au moins apparent à son extrémité.

La peau (l'écorce) fine est d'épaisseur variable, colorée en jaune ou verte à maturité du fruit ; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe est généralement riche en acide citrique et juteuse avec quelques pépins, ce qu'il lui donne sa saveur acide .Le citron reste longtemps sur l'arbre sans que le goût s'altère.

Les plus estimés sont dits « première fleur » (primofiori) (récolte d'octobre à décembre) et « seconde fleur » (mars, avril). Ils se conservent de 6 à 8 mois La fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre), il produit de 30 à 40 t/ha[6] .



Figure 3: aspect morphologique des fleurs du citronnier
(Originale, 2022)

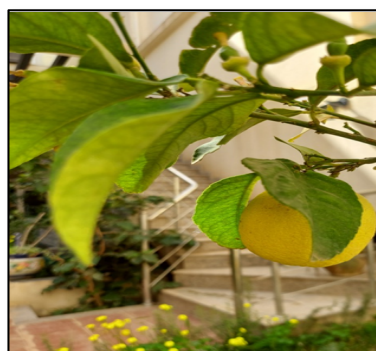


Figure 4: aspect morphologique du fruit du citron

(originale,2022)

1.1.3 Culture et entretien

Les semis s'effectuent au printemps et sous abri chaud. Ils sont très longs à lever et surtout aléatoires. Pour une germination plus rapide, il est recommandé de semer des graines fraîches. Les bouturages se font du mois d'avril au mois de septembre. Les marcottages aériens se pratiquent entre le mois d'avril et le mois de mai.

Pendant la période de végétation l'arrosage doit être régulier et surtout en été et en cas de grande chaleur.

Pour les cultures en pot, ne jamais laisser d'eau stagner dans les soucoupes.

Pour conserver une belle forme au citronnier et lui permettre de bien se ramifier, il est indispensable de procéder, surtout les premières années à plusieurs tailles tout au long de l'année[7] .

1.1.4 Parasites et maladies

Parasite(s) : Mineuses des Feuilles, Mouches Méditerranéennes des Fruits et Pucerons et Teignes du Citronnier.

Les sujets cultivés en serre ou véranda peuvent être attaqués par des Aleurodes, Araignées rouges et Cochenilles Farineuses.

Maladie(s) : Anthracnose, Fumagine, Gommose, Mal Sec ou Mal Secco et tristezza [8] .

1.2 Généralités sur les huiles essentielles

1.2.1 Définition

Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (Pharmacopée Européenne).

Selon **Bernard et al., (1988)** le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

Les huiles essentielles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles. Elles sont de très faibles masses moléculaires, très odorantes et de nature hydrophobe : elles sont totalement solubles dans l'alcool et les huiles (végétales ou minérales) mais pas dans l'eau. Bien qu'on les appelle huile, ces substances ne contiennent aucun corps gras : contrairement à une huile végétale, une goutte déposée sur un papier s'évaporerait sans laisser de trace (**Degryse et al. 2008**).

Les huiles essentielles et l'essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) Feuilles/épicarpe) sont connues et utilisées depuis très longtemps aussi bien en usage alimentaire que cosmétique et thérapeutique. Les études récentes sur le d-limonène, présent entre 65 et 70 % dans ces produits, confortent les activités traditionnelles (anti-infectieuse, cholagogue, antinauséuse, tonique...) et mettent en avant de nouvelles propriétés (hypocholestérolémiante, lipolytique, hypoglycémiant, ulcéroprotectrice, anxiolytique...).

De nouveaux traitements contre des pathologies métaboliques pourraient donc être envisagés. L'huile essentielle du fruit de citronnier est riche en biomolécule qui intervient à la régénération des tissus [10] .

1.2.2 Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires. Ces derniers ne sont pas essentiels pour la croissance des plantes (**Croteau et al.2000**). Dernièrement, des études ont montré que dans les plantes, les huiles essentielles ont pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs ou repousser les insectes hostiles. Un certain nombre d'entre elles ont également des propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides (**Carson et Hammer, 2011**) [11].

1.2.3 Répartition et localisation

➤ Répartition

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées, Poacées. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleuries (lavande, menthe...), mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), dans les écorces (cannelles), le bois (camphrier), les fruits (poivres), les graines (Muscade) (**Mann, 1987**).

➤ localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, localisées dans la plante : cellules à huile essentielle (Lauracée), poils sécréteurs (Lamiacées), poches sécrétrices (Rutacées) ou des canaux sécréteurs (Apiacées) **Bruneton, 1993**).

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des Rutaceae qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique, ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels; ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (**Goris, 1967**). [12].

1.2.4 Composition chimiques

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir (**Bacls, 1999**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoides (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

D'après **Mondello et al, (2005)**, Les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges comportant plus de 200 composés qui peuvent être regroupés en fractions non volatile (1-15%) et volatile, les flavonoïdes retrouvent dans des huiles de *Citrus* et composent la partie non volatile des huiles et ils sont utiles dans la différentiation entre les espèces d'agrumes. [13]

➤ Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (CH). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprénique en monoterpènes

formés de deux isoprènes (CH), les diterpènes, les sesquiterpènes, forme de trois isoprènes (CH), les diterpènes, formes de quatre isoprènes (CH). Les tétra terpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les poly terpènes (CH) Loun peut être de 9 à 30 (**Hernandez-Ochoa, 2005**).

Les terpenoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool aldéhyde stone wide etc.)

Les monoterpènes sont volatiles entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HEs, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone, B-vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate a-terpinyle).

Concernant les sesquiterpènes, il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple: B. caryophyllène, B. bisabolène, a humulène, a-bisabolol, famesol (Bruneton, 1999; Hernandez- Ochoa, 2005). 1-3-4-2-Les composé aromatiques:

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpenoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol et bien d'autres. Ils plus fréquents dans les HEs d'Apiaceae (anis, fenouil, cannelle, basilic).

➤ Les composés d'origine diverses

Ils existent un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléiques et a- linoléiques en (3-eis hexanol, décanal, B-ionone) .

1.2.5 Notion de chemotype

Le chemotype d'une HEs est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HEs C'est l'élément qui permet de distinguer des HEs extraites d'une même vanète botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les HEs pour une utilisation plus précise, plus sur et plus efficace Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces telles que hymi ilgar Mentho spacom Origanum vulgare il est important de noter que les HEs a chemotypes différents présentent seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (**Pibirs,2006**)

Les HEs de *C. limon* pourrait être de chimotypes B-pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, citronellal, terpineol et décanal (**Smith et al., 2001**).

Les composés chimiques ayant une efficacité à large spectre antibactérien et antifongique sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques (**Valnet, 2005**) [14].

1.2.6 Propriétés physiques des huiles essentielles

Selon Catler et Roux, (2007) les HEs possède en commun un certain nombre de propriétés physiques qui permettent avec leur composition chimique de les identifier :

Elles sont généralement liquides à température ordinaire. Elles sont volatiles et entraînaient à la vapeur d'eau. Elles sont peu solubles dans l'eau mais lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques. Elles sont sensibles à l'oxydation et donc de conservation limitée [15].

1.2.8 Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée (**Besombes, 2008**).

Les conditions externes soient géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences (**Olle et Bender, 2010**). Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (**Aprotosoale et al., 2010**).

Les citrus ont une teneur importante en HE lorsque la température est élevée (**Bruneton, 1999**). [17]

1.2.9 Domaine d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons détergents) alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (**Grysole, 2005**). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Aprotosoale et al., 2010**). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (**Grysole, 2005**).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation et due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydants (**Conner, 1993; Hammer et al., 1999**). Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (**Bisignano et al., 2011**).

Certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant (**Hellal, 2011**) [18].

1.2.10 Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite. Le rendement « HE/matière première végétale » peut être extrêmement variable selon les plantes (**Desmares et al., 2008**).

Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation et une méthode d'expression à froid

- L'entraînement à la vapeur de l'eau.
- L'hydrodistillation
- L'expression à froid (cas particulier des agrumes)[19] .

➤ Entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable, qui traverse les végétaux et emporte avec elle les molécules aromatiques. La vapeur chargée de l'arôme se condense alors en traversant une cuve réfrigérante pour être récupérée en phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) où l'huile essentielle est séparée de l'eau par décantation (**Smadja, 2009**)

➤ Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors la décantation (**Lagunez Rivera, 2006**) [20].

1.2.11 Toxicité des huiles essentielles

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques. Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (**Bernadet, 1983**).

Les huiles essentielles de Citrus sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photo sensibilisante. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus limon* extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aigue ni chronique (**Robert et Labstein, 2005**). [21].

1.4 Généralité sur les produits cosmétiques

1.4.1 Définition

On entend par produit cosmétique toute substance ou un mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles[24] .

1.4.2 Principaux composants

Un produit cosmétique se compose d'un ou plusieurs principes actifs et d'excipients, l'ensemble étant contenu dans un récipient (figure 7).[25]

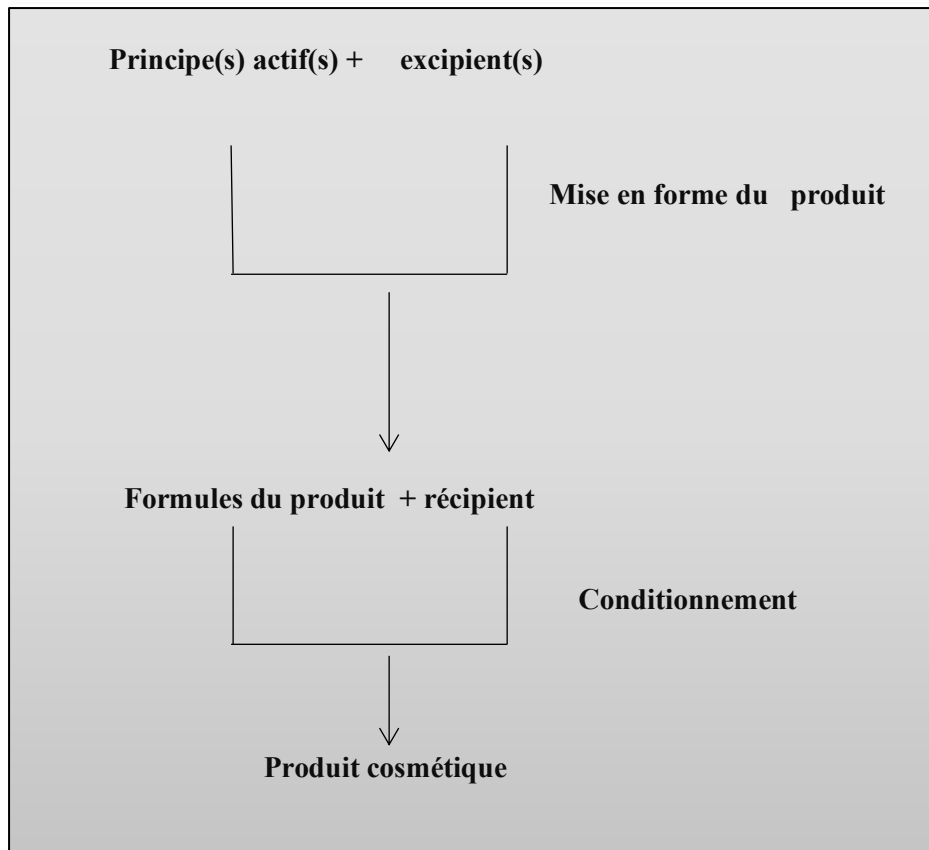


Figure 7: Mise en forme d'un produit cosmétique

1.4.3 Classification

Selon LACHARME (2011), La première classification a été établie en 1990 et reste la plus utilisée. Les produits cosmétiques définis par les différentes législations ont des fonctions spécifiques et peuvent être regroupés en trois catégories :

- ✓ **Les produits d'hygiène** : dont le but est de nettoyer la peau et ses annexes, les dents et les muqueuses (démaquillant, dentifrice, déodorant, savon, shampoing...)
- ✓ **Les produits de soin** : ils ont pour fonctions de protéger la peau, les phanères et d'en corriger certaines altérations considérées comme non pathologiques (crème hydratante, crème de jour, crème de nuit, lait de beauté, baume pour les lèvres...).

- ✓ **Les produits de soins** : ils ont pour fonctions de protéger la peau, les phanères et d'en corriger certaines altérations considérées comme non pathologiques, Exemples : formulations hydratantes, protectrices, antisolaire[26].

1.4.4 Composition

Selon **THIERS (1986)**, Les produits cosmétiques sont, en général, composés de :

A. Les molécules insolubles et inertes chimiquement : elles sont incorporées à des poudres, des crèmes et dentifrices. Leur caractère essentiel est l'insolubilité dans l'excipient, qu'elles soient organiques (les laques) ou minérales (oxyde de zinc).

B. Les molécules hydrophobes : elles peuvent se solubiliser l'une dans l'autre sous des conditions précises. On peut les disperser et de façon stable dans leur ennemie naturelle, l'eau.

Parmi ses molécules nous pouvons citer :

Les carbures d'hydrogène : qualifiés à tort d'huile ou graisse sous prétexte qu'ils sont onctueux au doigt. Exemple : vaseline, paraffine, liquide ou solide.

Les diglycérides : les graisses animales ou végétales sont des esters de glycérol et d'acide gras saturés ou non, telles que : les huiles végétales naturelles et les cérides.

C. Les molécules hydrophiles : hydrosolubles, ces molécules permettent d'incorporer dans l'eau une molécule hydrophobe. Exemple : La lanoline.

D. L'eau : presque toujours présente, mais elle est coûteuse et difficile à obtenir car elle doit être chimiquement pure et stérile, elle ne doit pas être confondu avec l'eau potable.

E. Les molécules assurant la stabilité de l'émulsion : cette stabilité est assurée par l'intermédiaire d'une énergie mécanique. Exemple :

Les tensioactifs : seuls un petit nombre est toléré par les téguments et par la conjonctive oculaire.

Les colloïdes protecteurs dont la viscosité stabilise l'émulsion : naturels (gommes, alginates) ou de synthèse (Dérivés de cellulose).

Les humectant stabilisant la teneur en eau du produit, quel que soit l'hygrométrie des milieux cosmétiques et atmosphériques : glycérol ...etc.

F. Les antioxydants : naturels ou de synthèse.

G. Les conservateurs antimicrobiens : ils empêchent la contamination microbienne ou mycélienne du produit cosmétique pendant sa fabrication ou à la cour de son usage.

H. Les colorants : ils posent toujours des problèmes de haute technicité et révèlent d'une véritable spécialisation.

I. Les molécules odoriférantes : toujours complexes parfois dangereuses.

J. L'excipient : un cosmétique intervient par son excipient que ses qualités distinguent de l'excipient pharmaceutique[27] .



Figure8: contenance d'un produit bio.

1.4.5 Origine des produits cosmétiques

➤ Les produits cosmétiques d'origine naturelle

La cosmétique naturelle évite au maximum l'utilisation d'ingrédients chimiques. Les principaux actifs de beauté naturels sont issus des végétaux. Les fabricants sont également soumis à une réglementation différente, notamment s'il s'agit de produits certifiés biologiques. En cosmétique naturelle, les produits ne sont pas testés sur les animaux et contiennent des matières premières d'origine naturelle, souvent issues de cultures plus respectueuses de l'environnement. En termes de composition, les additifs dérivés du pétrole et les conservateurs synthétiques sont également exclus.

➤ Les produits cosmétiques d'origine synthétique

Les produits cosmétiques synthétiques rassemblent tous les soins de beauté dont les additifs et les composants chimiques qu'ils renferment s'élèvent à plus de 50%. Ces ingrédients sont issus, soit d'un procédé de transformation de matières naturelles d'origine végétale, animale ou organique, soit d'une recherche expérimentale. Tous les composants présents dans ces soins de beauté sont quasiment le même que ceux trouvés dans les produits cosmétiques naturels. Ces ingrédients chimiques ont été élaborés afin d'offrir les mêmes bienfaits thérapeutiques apportés par les matières naturelles[28].

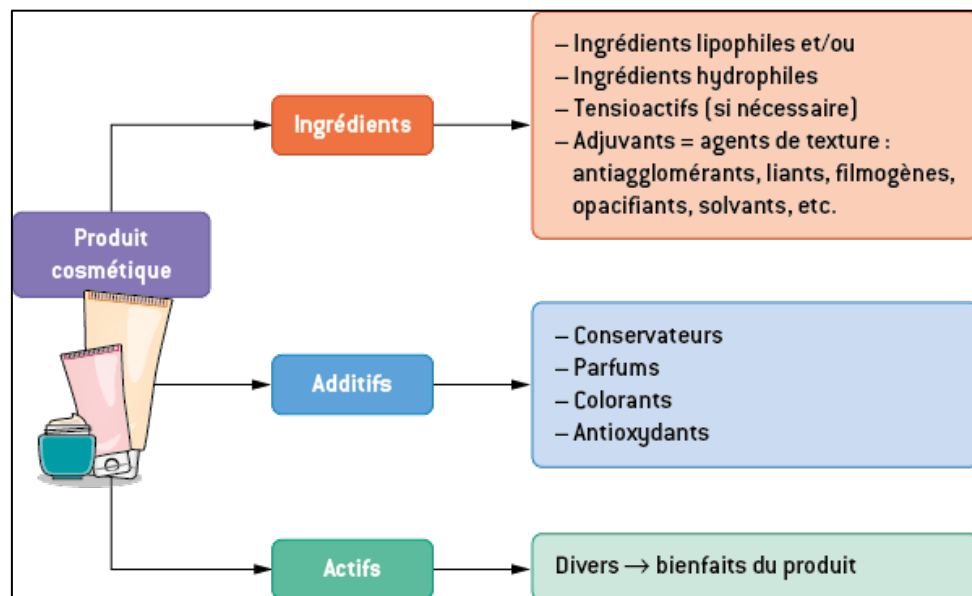


Figure 9: les composants de base d'un produit cosmétique

1.4.6 Définition d'une crème hydratante

Les crèmes hydratantes sont des émulsions cosmétiques contenant une phase aqueuse et une phase grasse. Elles permettent de reconstituer le film naturel hydrolipidique de la peau. Ce film recouvre la peau et se constitue de sébum et de sueur. Il permet de protéger la peau contre diverses agressions extérieures. Les crèmes hydratantes aident à prévenir la déshydratation de la peau.

Toutes les crèmes, de nuit, **de jour**, solaires, antirides... sont des crèmes hydratantes auxquelles on a ajouté un principe actif spécifique[29].

1.4.7 Contrôle microbiologique d'un produit cosmétique

La propreté microbiologique d'un produit cosmétique est assurée d'abord par l'application des bornes pratiques de fabrication (propreté des matières premières, du matériel, des locaux, et du personnel) et par la présence des conservateurs (**MARTINI,2008**).

Pour les produits cosmétiques et les autres produits topiques, la détection de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* peut être justifiée car ceux-ci peuvent engendrer des infections cutanées ou oculaires. La recherche d'autres sortes de microorganismes peut aussi présenter un intérêt car ceux-ci (y compris des indicateurs de contamination fécale, par exemple : (*Escherichia coli*) laissent penser à une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication (**MARTINI,2008**).

Le contrôle concerne en une numération des germes éventuellement présents dans le produit et en une recherche des germes dits pathogènes. Le produit cosmétique ne doit pas renfermer de germes pathogènes, tels que : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

➤ L'agent conservateur

La présence des conservateurs est indispensable dans la plupart des produits cosmétiques (**MARTINI et SEILLER,2006**).

La directive européenne cosmétique entend par agents conservateurs « les substances qui sont ajoutées comme ingrédient à des produits cosmétiques principalement pour inhiber le développement de microorganismes dans ces produits ».

Toutefois, certains conservateurs synthétiques se sont avérés nocifs pour la santé publique comme :

- ✓ Le formol, formaldéhyde ou les libérateurs de formaldéhyde, reconnus comme allergisants, modificateurs de protéines et de l'ADN.
- Les conservateurs trop puissants comme le Triclosan qui détruisent la flore naturelle protectrice de la peau (**DEMANGE et SERRANO, 2007**) [30].

➤ Cosmétiques bio

Appelée communément les « cosmétiques bio » regroupent une grande famille de produits de beauté dont le principal point commun est la composition à base d'un maximum d'ingrédients naturels, ainsi que, le refus d'utiliser des matières synthétiques nocives ou non

➤

biodégradables et les ingrédients obtenus par des procédés chimiques lourds (**DEMANGE et SERRANO,2007**).

➤ **Conservateurs naturels**

La cosmétique bio cumule différentes techniques pour optimiser la conservation des produits de manière naturelle, sans ajout de conservateurs. Les huiles végétales se conservent bien à l'abri de l'air et de la lumière, tandis que les HEs possèdent des propriétés antibactériennes (**DEMANGE et SERRANO,2007**).

Le pouvoir des principes actifs naturels incorporés aux « cosmétiques bio » se cumule donc avec ceux contenus dans la base et renforcent l'action générale du produit. Dans un produit de cosmétique bio, tous les ingrédients sont actifs et agissent en synergie. Par exemple, les huiles essentielles ont à la fois un pouvoir parfumant, des propriétés de conservation et une action sur la peau (**DEMANGE et SERRANO,2007**).

➤ **Conservation des produits finis contenant les huiles essentielles :**

Tous les produits de soins à base d'huiles végétales et d'huiles essentielles comme les huiles à l'action antirides, les huiles et les beurres de massage se conservent naturellement dans des bouteilles de verre teintées. Ce mode de conditionnement est fréquemment utilisé en cosmétique bio, les crèmes hydratantes contiennent une part importante d'eau et sont donc plus difficile à conserver (**DEMANGE et SERRANO,2007**). [31].

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 2 : matériel et méthodes

Notre étude s'est établie sur une période de 4 mois, de mars jusqu'à juin 2022. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Laboratoires de la station expérimentale de l'Université de Blida 1 pour l'extraction de l'HE à l'échelle de laboratoire.
- Laboratoires de physico-chimie LCQ VENUS pour la détermination des paramètres physico-chimiques de l'HE et pour l'étude microbiologique des produits cosmétiques.
- Laboratoires des plantes aromatiques et médicinales du département de biotechnologie (Université de Blida 1) pour accomplir le screening chimique de la poudre végétale et pour l'évaluation de l'activité anti-oxydants de la poudre végétale et l'HE.
- Laboratoires PASTEUR service de toxicologie pour l'exécution des analyses toxicologiques des produits cosmétiques.

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel non biologique

Le matériel utilisé aux laboratoires « l'appareillage, la verrerie, et les réactifs » est énuméré en Annexe I.

2.2.2 Matériel biologique

➤ Matériel végétale

La plante choisie comme modèle est : *Citrus limon*. La partie végétale choisie pour réaliser cette étude est les feuilles à l'état secs, récoltées au niveau de la wilaya de Blida dans la région de Bab el khouikha au mois de Mars 2022 pour la poudre, et l'épicerpe du fruit pour l'extraction de l'HE.

➤ Matériel animal

Le matériel animal sur lequel nous avons appliqué les tests microbiologiques est constitué de 4 lapins albinos (2 femelles et 2 mâles), âgés de 1 an et avec un poids variant de 2 à 3kg.

- **Les conditions d'élevages**

- ✓ Alimentation : granulés (Ceregan) environs 50mg/kg/j.
- ✓ Boisson : l'eau du robinet estimée de 50 à 100mg/kg/j.
- ✓ Température de la salle : 20-24°C.
- ✓ Humidité de la salle : 50-55g
- ✓ Éclairage : 12h/j

2.1.3 Matériel microbiologique

Lors de cette étude, les deux produits cosmétiques (crèmes) réalisés ont été testée in vitro sur :

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

Ces germes pathogènes font partie de la collection ATCC et ont été délivrées par le laboratoire Venus **(Tableau I)**.

Ces espèces sont souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents 24 antimicrobiens. Les souches bactériennes sont des souches hospitalières isolées à partir des prélèvements sur des malades.

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

Tableau 1: Microorganismes testés.

Gram	Souches bactériennes
Bactéries à Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus ceureus</i>
Bactéries à Gram(-)	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Levures	<i>Candida albicans</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
Champignon	<i>Sacar</i>

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation de la poudre de citron

Afin d'identifier les propriétés des feuilles de citronnier, il fallait préparer une poudre, et de faire les tests et analyses nécessaires, afin de la valoriser en cosmétologie.

➤ Étape de la préparation de la poudre

- ✓ Récolte : est considérée l'étape la plus importante, il est conseillé de récolter les feuilles la période de floraison.
- ✓ Lavage : consiste à éliminer la terre et les insectes à l'aide de l'eau du robinet.
- ✓ Séchage : consiste à déshydrater les feuilles. Il faut que la température reste stable entre 30 et 40°C, et que l'humidité soit minimale avec une bonne aération.

- ✓ Broyage : le broyage est effectué à l'aide d'un broyeur propre, pour faciliter la macération des feuilles du citron.
- ✓ Conservation : la conservation de la poudre se fait dans des bocaux en verre bien fermer.

Les étapes de la préparation de la poudre sont présentées dans la figure 10.

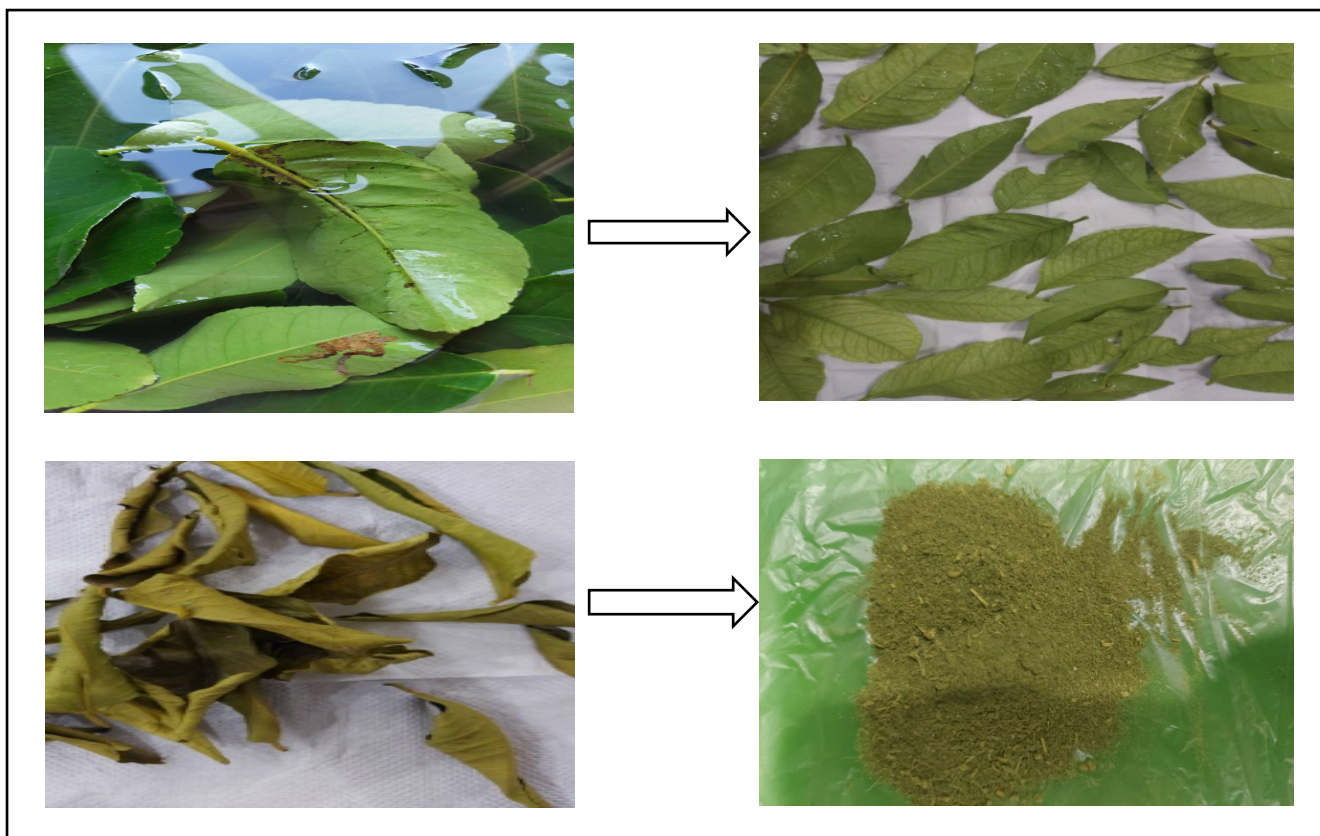


FIGURE 10: ÉTAPES DE LA PREPARATION DE LA POUDRE.

➤ Préparation du macérat

Nous avons choisi de valoriser la poudre des feuilles de citron en la macérer dans l'huile d'amande douce, puis incorporer le macérat dans un produit cosmétique.

La macération au chaud : cette méthode consiste à verser l'huile végétale sur les plantes de manière à les recouvrir entièrement. Il faut chauffer légèrement à une température de 25 °C son huile infusée de plantes pour accélérer la libération des actifs. Laisser le macérat infusé 3 jours.

Moins longue qu'une macération sur plusieurs semaines, elle présente toutefois le risque d'altérer un peu les actifs de la plante si la chauffe est trop forte.

2.2.2 Extraction de l'huile essentielle du citron

L'extraction a été faite par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Principe

Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable, qui traverse les végétaux et emporte avec elle les molécules aromatiques. La vapeur chargée de l'arôme se condense alors en traversant une cuve réfrigérante pour être récupérée en phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) où l'huile essentielle est séparée de l'eau par décantation (**Smadja, 2009**)

❖ Mode opératoire

- Mettre environ **300 g** de l'écorce coupé en petit morceau dans un perçoir.
- Remplir avec **1 L** d'eau dans une cocotte.
- Déposer le perçoir au-dessus de l'eau puis fermé la cocotte (sans contact direct avec la matière végétal).
- Chauffer à l'aide d'une plaque chauffante à **300°C** pendant 30 min, après ébullition en diminue la température jusqu'à **200°C**.
- La vapeur d'eau entraîne les constituants volatiles dans le tube principale, ces derniers vont se condenser dans le serpentin du réfrigérant remplis d'eau.
- Ouvrir le robinet de la burette graduée pour récupérer l'hydrolat goutte à goutte dans une fiole, l'HE est récupérer dans la burette jusqu'à l'obtention de la quantité maximale d'huile essentielle.

La conservation des huiles essentielles se fait à une température de **4°C**, à l'abri de la lumière dans un flacon en verre.

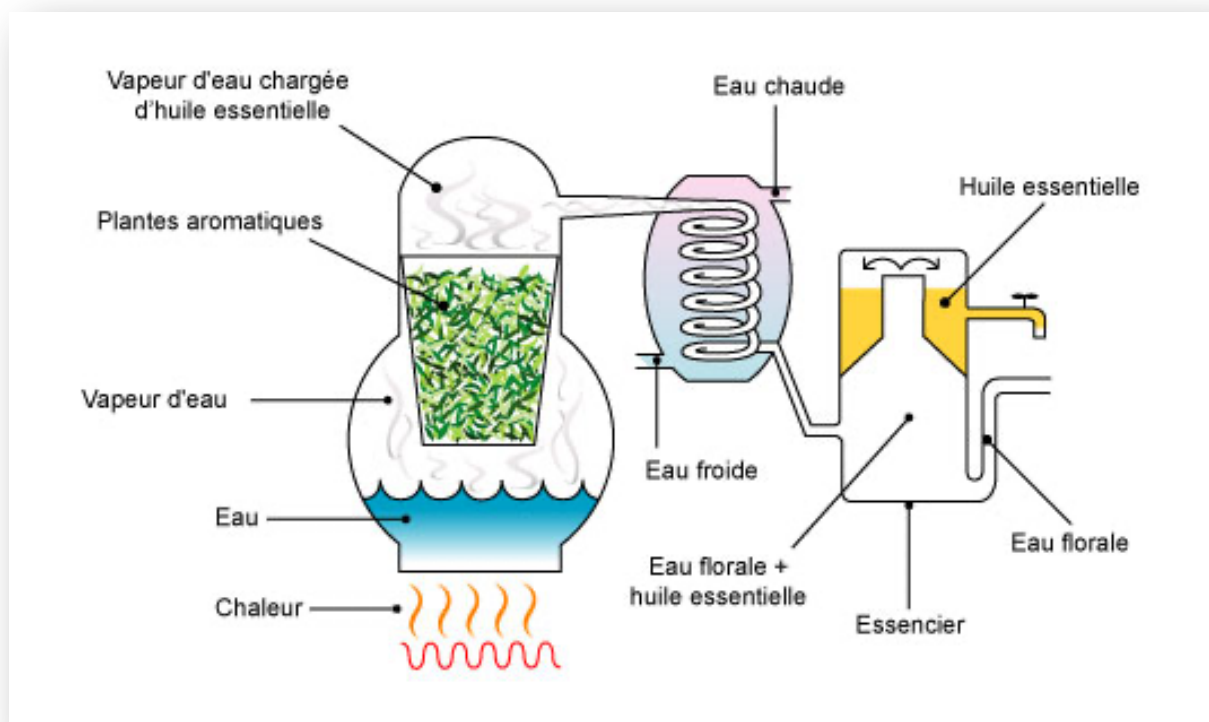


Figure 11: Schéma représentant du processus d'extraction d'HE par entraînement à la vapeur d'eau.

➤ Rendement en huile essentielle

Méthode de calcul (selon AFNOR)

Le rendement en huile essentielle (R), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée.

Il est exprimé en pourcentage par la formule suivante :

$$R = \left(\frac{m_{HE}}{m_v} \right) \times 100$$

R : rendement en huile essentielle des graines.

m_{HE} : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

m_v : masse de la matière végétale utilisée en gramme

➤ **Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle**

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, odeur, couleur) de l'HE ont été notées en concentration. Mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

➤ **Propriétés physico-chimiques**

L'HE obtenue par la méthode d'extraction mentionnée précédemment doit être contrôlée et analyser par les méthodes physico-chimiques en mesurent les paramètres suivants :

➤ **Détermination du pH**

Le pH ou « potentiel hydrogène » mesure l'activité chimiques des ions hydrogènes H^+ en solution. Le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Cette méthode décrit l'acidité ionique du produit analyser.

***Principe**

Consiste à introduire l'électrode du pH mètre dans le produit après le réglage de la température d'étalonnage.

La lecture se fait directement sur le pH mètre.

➤ **Détermination de l'indice d'acide (IA)**

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution éthanoïque titrée de KOH (AFNOR,2000).

❖ Mode opératoire

Dissoudre 1g de la substance à examiner ou la quantité prescrite en mg dans 50ml d'un mélange à volume égaux d'alcool et d'éther, le solvant doit être neutralisé, au préalable par l'hydroxyde de potassium 0.1M et 5 gouttes au maximum d'indicateur coloré (Phénophtaléine). La titration du liquide se fait avec la solution d'hydroxyde de potassium 0.1M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins.

Il est calculé par la formule suivante :

$$I_A = \frac{v \times 5,61}{M}$$

I_A: Indice d'acide

V: Le volume en ml de la solution de KOH utilisé pour le titrage.

M: La masse en gramme de la prise d'essai.

➤ Indice de réfraction (IR) ISO 280 :1999 (75-112))***Principe**

C'est le rapport entre le sinus des angles d'indice et de réfraction d'un rayon lumineux, de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE.

❖ Mode opératoire et calcul

L'indice de réfraction a été déterminé par la lecture directe de l'angle de réfraction à l'aide du réfractomètre, en employant la lumière diffuse.

-Régler le réfractomètre en mesurant l'IR de l'eau distillée qui doit être de 1.333 à une température de 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, nous déposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal. Enfin, nous fermons délicatement le prisme secondaire.

➤ **Détermination de la densité relative à 20°C (d^{20})**

Principe

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20°C, à la masse d'un volume égale d'eau à 20°C. Elle constitue un point de repère important. Sa valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'HE (AFNOR,2000).

❖ **Mode opératoire et calcul**

Un volume de 1ml de HE a été prélevé à l'aide d'une micropipette et pesé avec une balance analytique de précision en précision en prenant en considération le coefficient de température

$$d^{20} = \frac{(m2-m0)}{(m1-m0)} + (0,00073 \times (T^{\circ} Ech - 20)$$

m_0 : la masse en gramme de la fiole vide.

m_1 : la masse en gramme de la fiole remplis d'eau .

m_2 : la masse en gramme de la fiole remplie d'HE .

$T^{\circ} Ech$: température en °C.

➤ **Indice de saponification I_s (pharmacopée européenne, 2001)**

***Principe**

C'est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance.

Mode opératoire et calcul

- Dans une fiole conique de 250 ml et muni d'un réfrigérant à reflux, introduire la prise d'essai.

Ajouté 25 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0.5 M quelques billes de verre.

Adapter le réfrigérant et chauffer à reflux pendant 30 min.

- Ajouter à la solution chaude, 0.5 ml à 1 ml de la solution phénolphthaléine et titrer immédiatement avec l'acide chlorhydrique (HCl) 0.5 M jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur, le

volume de HCl ajouté est noté (n_1).

- Effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire (n_2 ml d'acide chlorhydrique 0.5 M).

L'indice de saponification I_S est donné par la formule suivante :

$$I_S = 28,05 \times \frac{(n_2 - n_1)}{m}$$

I_S : indice de saponification.

n_1 : Volume en ml d'acide chlorhydrique 0.5M utilisé pour l'essai à blanc.

n_2 : Volume en ml d'acide chlorhydrique 0.5M utilisé pour la détermination de l'indice

m : la masse en gramme de la prise d'essai

➤ **Indice d'ester (Pharmacopée européenne, 2001)**

L'indice d'ester (IE) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1g d'huile essentielle.

Il est calculé à partir d'indice de saponification I_S et l'indice d'acide I_A .

$$I_E = I_S - I_A$$

2.2.3 Tests du Screening phytochimique

Le but de ces tests est de connaître la composition en métabolites secondaires, ils sont effectués soit sur la poudre du broyat, soit sur un infusé (BOUYER, 1996).

➤ Préparation de l'infusé

- A 10 g de poudre végétale, sont ajoutés 100 ml d'eau distillée bouillante, laissé infuser pendant 15 min avec agitation de temps en temps, après filtrer.

➤ Identification de quelques métabolites secondaires

* Les anthocyanes

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés quelques gouttes d'ammoniaque ½.

L'apparition d'une couleur rouge, indique la présence des anthocyanes.

*Les tanins

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés quelques gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 5%.

La réaction donne une coloration bleue noir en présence des tanins.

✓ Les tanins catéchiques

15 ml d'infusé, sont additionnés à 7 ml de réactive de Stiasny (10 ml de formol a 40% et 5 ml d'HCL concentré).

La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchiques.

✓ Les tanins galliques

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de $FeCl_3$.

La réaction donne une coloration bleu foncé en la présence des tanins galliques.

*Les flavonoïdes

A 5 ml d'infusé, sont additionnés 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isoamylique.

La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

*Les alcaloïdes

Introduire 1g de poudre végétale dans un tube à essai, ajouter 10ml d'acide sulfurique (10%)

Agiter énergiquement pendant 2 mn et filtrer, ajouter 2 gouttes du réactif de Dragendorff.

Résultats : apparition d'un précipité rouge orangé.

*Les glucosides

A 2 g de poudre végétale, sont ajoutées quelques gouttes d'acide sulfurique.

La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides.

*Les mucilages

On introduit 1ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5ml d'éthanol absolu, l'obtention d'une précipitation floconneuse indique la présence des mucilages.

2.2.4 Activité antioxydante de l'extrait de la poudre et de l'huile essentielle

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'extrait de la poudre et l'HE a été effectuée selon la méthode de piégeage des radicaux libres de DPPH.

• Piégeage du radical libre DPPH

* Principe

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (**Gachkar et al., 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH, pour une concentration en extrait donné et un temps donné. Le test de réduction du DPPH permet aussi de calculer la CEso (**Dongmo et al., 2010**). La valeur CEso est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH. (**Simionatto et al., 2007**).

❖ Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire de l'extrait de la poudre et de l'HE a été mesurée par la méthode décrite par **Bentabet et al. (2008)**. Le pouvoir antioxydant de l'extrait de la poudre et de l'HE a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse (acide ascorbique).

Une solution de 0.25% (25 mg/100ml) de DPPH dilué dans le méthanol a été préparé et stockée dans l'obscurité jusqu'à son utilisation.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de l'huile essentielle et l'extrait de la poudre (de 80 à 849 µg/ml dans le méthanol) ont été mélangés avec 1.95 ml de la solution méthanolique de DPPH dans des tubes à essai secs.

Après 30 min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm. Le contrôle négatif est composé de 50 µl du méthanol et de 1.95 ml de la solution de DPPH (Solution de contrôle).

Une expérience de contrôle a été effectuée en utilisant l'acide ascorbique dont les concentrations varient entre 200µg/ml et 1000 µg/ml.

➤ Expression des résultats

Calcul des pourcentages d'inhibitions

Le pourcentage d'inhibition **I%** est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs test}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Abs contrôle : absorbance du contrôle négative.

Abs test : absorbance de l'extrait.

Calcul des concentration « IC50 »

Le IC50 (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle, nous permet de calculer le paramètre CEso. La CEso « Concentration Efficace » est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (ou de la vitamine C) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Plus la valeur de CEso est basse, plus l'activité anti-radicalaire est élevée, et vice versa (**Gramza et al., 2005**).

2.2.5 Formulation des deux crèmes cosmétiques

Dans cette étude, nous avons cherché à optimiser une formulation de deux crème cosmétiques de soins de type hydratant d'une phase grasse aqueuses en introduisant l'HE et la poudre des feuilles du

Citrus limon. La composition détaillée des crèmes formulées est représentée dans le tableau ci-dessus :

Tableau 2: Les composants des deux crèmes formulées.

Matières premières	Pourcentage	(g)	Effet sur la peau
Huile d’amande douce	30 %	60 g	- Adoucissante - Fortifiante - Émolliente
Huile de coco	20 %	40g	- Hydratante - Antioxydante - Apaisante
Huile d’olive	10 %	20 g	- Nourrissante - Anti âge - Réparateur puissant
Cire d’abeille	40 %	80 g	- Anti-inflammatoire - Facilite la cicatrisation
Parfum miel	0.1 %	0,2 g	- Enlève l’odeur de l’huile d’olive

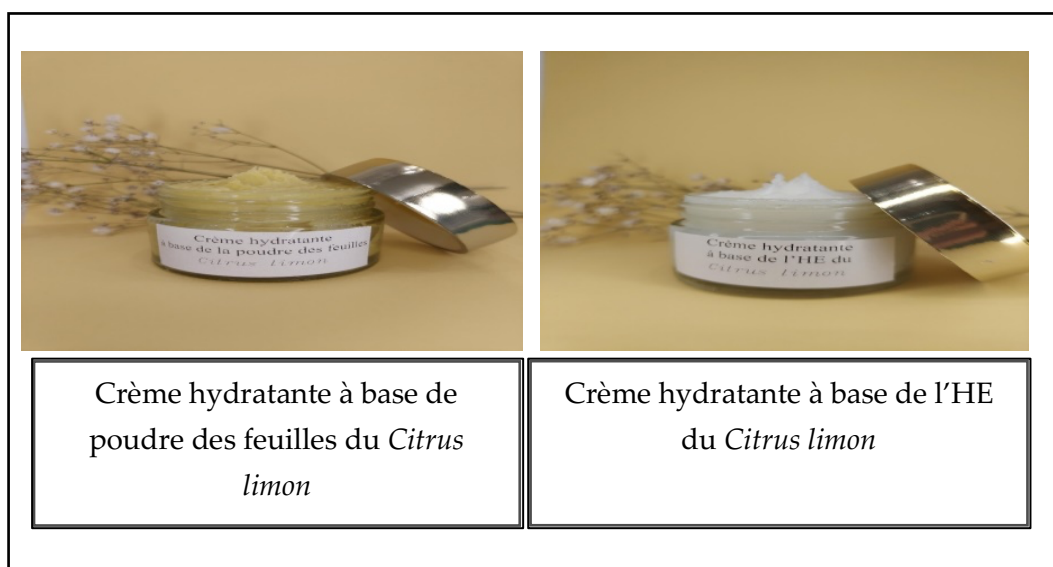


Figure 12: Les crèmes formulées

2.2.6 Tests microbiologiques des produits cosmétiques

Principe

Les contrôles microbiologiques doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et marchande du produit fabriqué, et minimisent les pertes dues aux mauvaises conditions de fabrication.

Ces tests s'effectuent au niveau du laboratoire de microbiologie, en mettant les produits dans des milieux de culture en présence des différentes souches bactériennes, levures et moisissures, afin de savoir si les produits formulés sont contaminés ou pas.

❖ Mode opératoire :

L'essai a été effectué dans des conditions d'asepsie a un endroit exempt de contamination (lampe UV). Les manipulations ont et accomplies sous une hotte a flux laminaire.

La préparation des dilutions (1/10) s'effectue par dissolution de 10 g de chaque crème hydratant à analysé dans un flacon contenant 90 ml de diluant (solution tampon) .on a ajouté 10 à 15 ml de milieu de culture (PCA et Sabouraud), en suite on aensemencé, en profondeur les 4 boites Petri stériles, dont 1 ml dans chacune.

Une bonne homogénéisation du milieu doit être effectuer afin d'assurer une bonne dispersion. Les essais d'incubation ont été réalisées dans deux type de boites de pétris, la première boite de Pétri est incubée à 32°C pendant 72+06 heures pour détecter les bactéries aérobies mésophiles (milieu de culture sélectif Agar Plate- Count), l'autre boite est incubée à 22°C pendant 5 jours pour détecter les levures et moisissures (milieu sélectif Agar SABOURAUD).

2.2.7 Analyses toxicologiques des produits cosmétiques

➤ Les tests toxicologiques

Cette étude s'inscrivant dans le cadre de la réalisation d'un mémoire de fin d'étude, a pour objet l'évaluation de la toxicité (cutanée et oculaire) de deux produits cosmétiques réalisés.

Lors de cette étude, les deux produits cosmétiques (crèmes) réalisés ont été testés in vivo sur des lapins, au niveau du laboratoire de l'institut Pasteur d'Alger.

La première partie de ce travail portera sur la description du protocole expérimental, ainsi que des conditions de réalisation de celui-ci. Puis, les résultats des tests effectués et leurs interprétations seront présentés dans un second temps.

➤ Irritation et corrosion cutanée et oculaire

L'irritation est un phénomène collectif d'apparition rapide, en effet l'évaluation des lésions se fait dans les heures suivant l'application de la substance à tester. Ces réactions sont généralement réversibles.

Dans le cas de l'irritation oculaire, la réversibilité peut être appréciée dans les 21 jours suivant l'instillation de la substance d'essai dans l'œil. La corrosion, quant à elle, désigne des dommages, le plus souvent, irréversibles qui se manifestent par des nécroses, ulcères et saignements.

Dans le cas de l'œil, la symptomatologie est le plus souvent bruyante : douleur, larmoiement, photophobie, irritation intense, voire une baisse visuelle aboutissant à un effet incapacitant allant jusqu'à la cécité.

1- Oculaire

Le principe de ce test est d'instiller la substance dans l'un des deux yeux de l'animal sujet à l'essai, l'autre œil intact servira de témoin. La conjonctive, la cornée et l'iris seront observés à des intervalles prédéfinis et un score basé sur la gravité de leurs lésions permettra d'évaluer l'irritation ou la corrosion oculaires.

2- Cutané

L'objectif de ce test est d'identifier les substances possédant un effet irritant qui se manifeste, après leur application sur la peau, par des réactions caractéristiques comme une rougeur, une urticaire ou encore une nécrose.

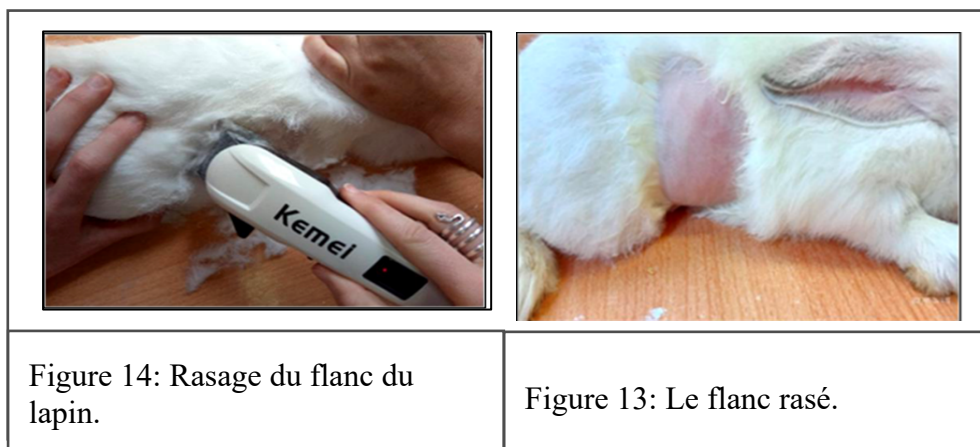
❖ Mode opératoire

Les produits compris dans le test d'irritation cutanée sont : la crème hydratante à l'HE de citron, et la crème à base de la poudre des feuilles de citron.

Cet essai regroupera deux séries de tests qui seront conduits sur douze lapins albinos.

Les lapins prévus pour le test seront tendus au niveau des deux flancs, sur une surface d'environ

7×7cm, à l'aide d'une tondeuse électrique puis rasés (**Figure 13**), 24h avant l'application du produit. Seuls les lapins dont la peau est parfaitement saine et glabre seront sélectionnés pour la suite de l'essai (**Figure 14**).



Le jour de l'essai, on procédera à trois scarifications au niveau du flanc gauche de chaque animal à l'aide d'un vaccinostyle stérile. Celles-ci seront espacées de 0.5cm et longues de 2cm. Elles doivent abraser la couche cornée sans provoquer de saignement. Le flanc droit, quant à lui, restera tel quel. On prélèvera une quantité de 0.5 ml pour les produits liquides et 0.5 g pour les produits solides qu'on déposera ensuite sur une compresse stérile de 2.5×2.5cm, avant de l'appliquer de manière uniforme sur les deux flancs. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau en utilisant un pansement. L'ensemble sera recouvert par du sparadrap perforé tout en faisant en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse (**Figure 15**).

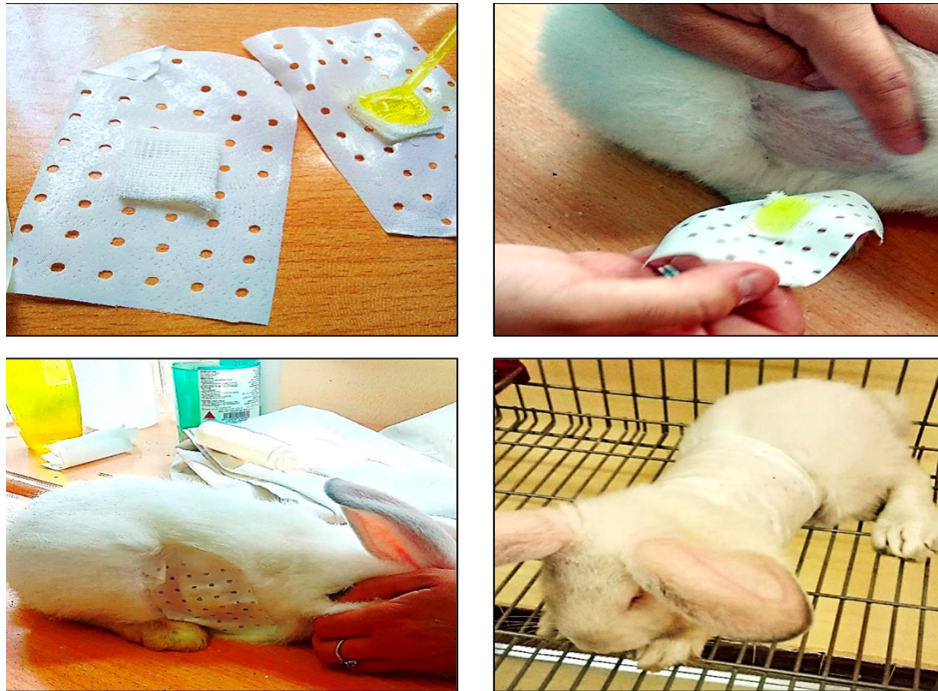


Figure 15: Application du produit

➤ **Observation et interprétation des résultats**

Les pansements seront retirés 4 heures plus tard. La première observation se fera 24 heures après l'application du produit à tester, suivie par deux autres lectures qui se feront à un intervalle de 24 heures (à 48 et 72 heures).

Les lapins seront par la suite examinés à la recherche de signes d'érythème ou d'œdème attribuant une cotation en accord avec chaque observation[33] .

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1 Analyses physicochimiques de l'huile essentielle

➤ Détermination du rendement d'extraction

L'extraction de l'HE par entrainement de la vapeur du *Citrus limon l* a donner un rendement de 0,33%

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'HEs. Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats qui ont obtenu des rendements compris entre 0.2 et 0.6% pour *C. limon* et se rapprochent des résultats En effet ont observé des rendements allant de 0.7 à 0.996 pour l'HE de *C. limon*. Ont rapporté que les rendements en HEs chez les Citrus diffèrent selon l'espèce et ont signalé des rendements de 1 à 3 %. Cette différence pourrait être expliquée par le choix du la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'HE, le climat, la zone géographique, génétique de la plante l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la méthode d'extraction employé etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en HEs.

➤ Caractères organoleptiques

L'HE de l'espèces *C.limon* présentent un aspect liquide , limpide de couleur jaune clair verdâtre, avec une odeur très forte, les résultats des caractéristique organoleptiques obtenus de l'HE sont conformes aux normes d'AFNOR (2000).

3.1.1 Les analyses physico-chimiques

Le tableau (2) regroupe les résultats des mesures réalisées.

Tableau 3: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle Citrus limon l.

	HE <i>C.limon</i>	Norme AFNOR
Ph	5,25	-
Indice d'acide (IA)	1,06	< 2
Densité relative à 20°C (d²⁰)	0,864	< 0,876
Indice de saponification (<i>Is</i>)	26,92	-
Indice d'ester	25,86	-
Indice de réfraction	1,473	1,470- 1,478

Les propriétés physico-chimiques tels que : le pH, la densité relative, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester constituent un moyen de vérification et de contrôle de l'huile essentielle.

Un indice d'acide inférieur à deux (2), est une preuve de bonne conservation de l'huile. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acide libre. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters. Nous avons obtenu dans notre étude un indice d'acide inférieur à deux pour l'huile essentielle étudiée.

L'indice d'acide permet de donner une appréciation sur le taux d'acides libres. Dans l'intervalle 1.470 à 1.478 l'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et les dérivés oxygénés une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Ce qui le cas de notre dans notre étude.

Plusieurs investigations. Ont démontré que, généralement l'HE de Citrus sont constituées principalement de composés monoterpénique (97%). Alors que les autres composés comme les alcools, les aldéhydes et les esters ne sont représentés qu'avec des teneurs faibles allant de 1,8 à 2,2 %.

La détermination de la densité relative peut être considérée comme un critère de pureté qui indique la présence de corps étrangers, la densité des huiles essentielles est inférieure à celle de l'eau et selon l'Association Française de Normalisation, les HEs appartenant aux espèces Citrus doivent

avoir une densité maximale de 0.876, ce qui le cas pour notre huile essentielles (0,864 respectivement).

D'autre part et pour mieux caractériser la qualité de notre huiles essentielle nous avons mesuré l'indice d'ester qui est égale à 25,86. Les huiles essentielles de très bonnes qualités renferment une très grande quantité d'esters. L'indice d'ester renseigne sur la quantité des acides gras liés La majorité des paramètres physico-chimiques de notre huile essentielle sont en accord avec l'Association Française de Normalisation [31].

3.1.2 Screening phytochimique

Le screening phytochimique de la poudre des feuilles de citron nous a permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires (alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, des anthocyanes, glucosides, et les mucilages). La détection de ces composés chimiques est basée sur des réactions de précipitation, un changement de couleur. Tous les résultats des tests phytochimiques effectués sont présentés dans les tableaux qui suivent :

Tableau 4: Résultats du screening phytochimique de la poudre du Citrus limon.

Les anthocyanes	Les tanins	Les tanins catéchiques	Les tanins galliques	Les flavonoïdes	Les alcaloïdes	Les glucosides	Les mucilages
++	+++	-	+++	+	++	+++	++

(+ + +) : **fortement positif**

(+ +) : **moyennement positif**

(+) : **faiblement positif**

(-) : **négatif**

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur les feuilles de Citrus limon L présentes dans le (Tableau n°4) montrent que la présence des tanins galliques est plus marquée que les autres métabolites. L'étude complète du screening phytochimique met en évidence la présence d'autres composés chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes, notamment des substances polyphénoliques (Flavonoïdes, Anthocyanes et glucosides).

Il s'agit :

- **Des anthocyanes** : le test des anthocyanes est marqué moyennement positif.
Les anthocyanes sont des pigments naturels solubles dans l'eau, sont caractérisées par leurs propriétés antioxydantes, favorables à la santé et surtout contre le vieillissement cellulaire en perfectionnant l'élasticité et la densité de la peau. Ils évitent aussi les rougeurs en renforçant la résistance des petits vaisseaux sanguins de l'épiderme.
- **Des tanins** : le test des tanins est marqué fortement positif.
Sont des composés complexes pouvant être solubles dans l'eau ou l'alcool, ils ont des propriétés surtout astringentes. Les tanins sont principalement utilisés en usage externe en particulier contre des blessures, plaies.
- **Des flavonoïdes** : le test des flavonoïdes est marqué faiblement positif. Souvent présentés comme anti-inflammatoire, anti-allergique, hépatoprotecteur, antispasmodique, hypocholestérolémiant, diurétique, antibactérien, antiviraux in vitro.
- **Des alcaloïdes** : Les tests des alcaloïdes sont marqués moyennement positifs dans l'extrait préparée.

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote.

Représentant les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ou toxiques connues parfois depuis l'Antiquité, ils ont joué un rôle important dans la découverte des médicaments chimiques (morphine, quinine, cocaïne, atropine...).

- **Des glucosides :** le test des glucosides est marqué fortement positif.
Ce sont des substances d'origine végétale, présente dans de nombreux végétaux, les Glucosides laissent la peau souple et élastique.
- **Des mucilages :** le test des mucilages est marqué moyennement positif.
Ce sont des polysaccharides ayant des pouvoirs thérapeutiques incontestables.
Ils sont émollients. Ils hydratent la peau en apportant l'eau nécessaire et en maintenant l'hydratation naturelle de la peau.

3.1.3 Activité antioxydante de l'huile essentielle extraites et de la poudre des feuilles du Citrus limon

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'HE de *C.limon l* et l'extrait de la poudre à été faite en comparaison avec celle de l'acide ascorbique. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes, à partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeurs d'IC50. Les résultats sont représentés dans les tableaux (Annexe 4) et la figure 16.

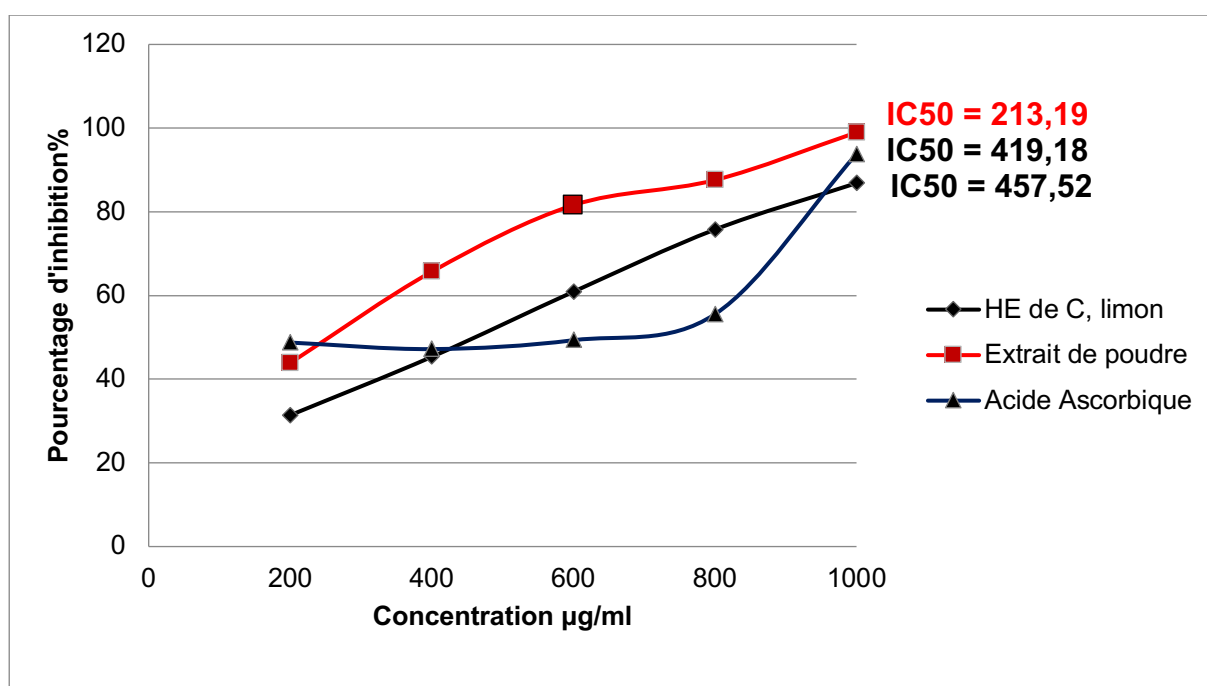


Figure 16: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'HE du *C.limon*, extrait de la poudre des feuilles de citron et l'acide ascorbique.

➤ Pourcentage d'inhibition

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure n° 16) révèlent que l'huile essentielle testée et l'extrait de poudre ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence, sont des anti-radicalaires.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le standard ou pour l'HE *C. limon* et l'extrait de la poudre.

Le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé a été observé pour l'extrait de la poudre suivi par l'HE .

Nous remarquons aussi que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle de *C. limon* est inférieur tandis que l'extrait de poudre, est supérieur à celui de l'acide ascorbique.

➤ Détermination des IC50

L'IC50 est lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre à 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

L'huile essentielle de *C. limon* a transformé le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl de la couleur violet au diphenylpicrylhydrazine de couleur jaune avec un IC50 de (457,52 µg/ml) , quand à l'extrait de la poudre de citron avec un IC50 de (213,19 µg/ml) montrant ainsi une activité antioxydante largement supérieure à celle de l'acide ascorbique avec un IC50 de (419,18 µg/ml) (Figure n°17).

Il apparaît selon ces résultats que l'acide ascorbique est l'antioxydant le plus efficace par rapport à l'HE et l'extrait de la poudre étudiée.

En remarquons une différence assez importante entre l'extrait de la poudre (213,19) par rapport à l'HE (457,52). On constate que l'extrait de poudre a une meilleure activité antioxydante que l'huile essentielle du *C. limon*.

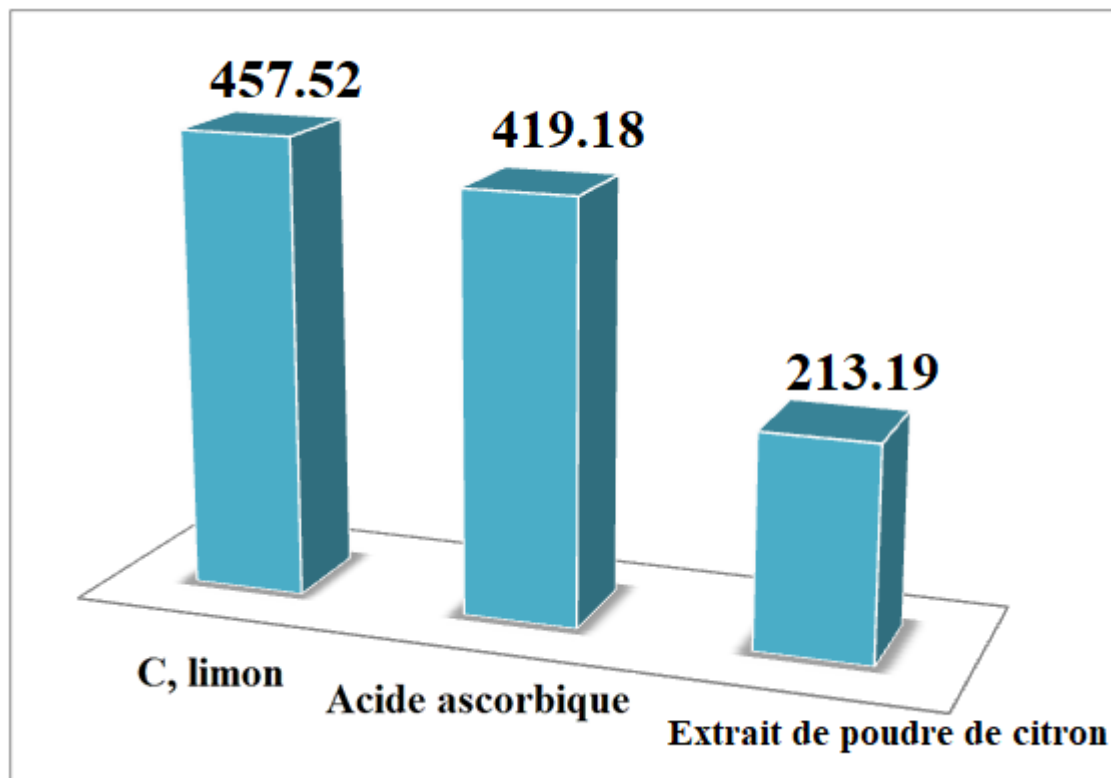


Figure17: Comparaison de la valeur IC50 de HE de C.limon, l'extrait de la poudre des feuilles de citron et l'acide ascorbique.

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles où l'application par vaporisation en surface des aliments, contribue à les préserver des phénomènes d'oxydation. Parmi ces huiles, les huiles essentielles des Citrus. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes dont le *d*-limonène est le constituant majeur, jouant un rôle principal dans l'activité antioxydante.

L'activité antioxydante de l'HE testée est probablement liée aux composants majoritaires qui sont principalement les monoterpènes notamment le D- limonène, le β -pinène et le γ -terpinène .

Le β -pinène et le limonène présentent des propriétés anti-oxydants importantes ; ils ont minimisé le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyle.

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent

Interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres.

3.2 Caractéristiques organoleptiques des crèmes

Les caractéristiques organoleptiques d'un produit cosmétiques (couleur, odeur, aspect, application) sont très importantes pour l'évaluation de la bonne qualité du produit.

Les propriétés organoleptiques des deux crèmes formulées sont représentées dans les tableaux ci-dessus :

Tableau 5: propriétés organoleptiques de la crème à base de l'HE du *C.limon*

Couleur	Blanche
Odeur	Citronnée, légère
Aspect	Belle texture, épaisse, un peu huileuse
Application	Haute hydratation

Tableau 6: propriétés organoleptiques de la crème à base de l'HE du *C.limon*

Couleur	Jaune
Odeur	Citronnée, forte
Aspect	Légèrement épaisse, un peu huileuse
Application	Haute hydratation

3.3 Tests microbiologiques

Tableau 7: Inhibition qui montre l'activité microbiologique des deux crèmes formulées par la méthode diffusion sur gélose.

Gram	Souches bactériennes	Produit à base de l'HE du citron	Produit à base de la poudre des feuilles de citron
Bactéries à Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>Bacillus ceureus</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
Bactéries à Gram(-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
	<i>Candida albicans</i>	-	-
Levures	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-
	Champignon	-	+

Les résultats des tests microbiologiques ont montré que les deux crèmes formulées ne sont pas contaminées, et qu'elles sont conformes par rapport aux normes Européennes.

3.4 Les tests toxicologiques

Les yeux traités par les deux crèmes sont indemnes de toute atteinte oculaire, tout au long de la période d'observation. Les notes attribuées à la fin de la période de lecture en se rapportant à l'échelle numérique du test d'irritation oculaire de Draize étant nul, le produit est placé dans la catégorie des substances non irritantes.

Les flancs traités par les deux crèmes ne sont pas inflammés, tout au long de la période d'observation. Les tests d'irritation cutanée effectués montrent que le produit est placé dans la catégorie des substances non irritantes.

Donc, les tests d'irritation effectués sur les lapins d'Albinos ont montré que les deux crèmes formulées ne sont pas irritantes, ni toxiques, et qu'elles sont conformes par rapport aux normes appliquées sur les produits cosmétiques[32] .

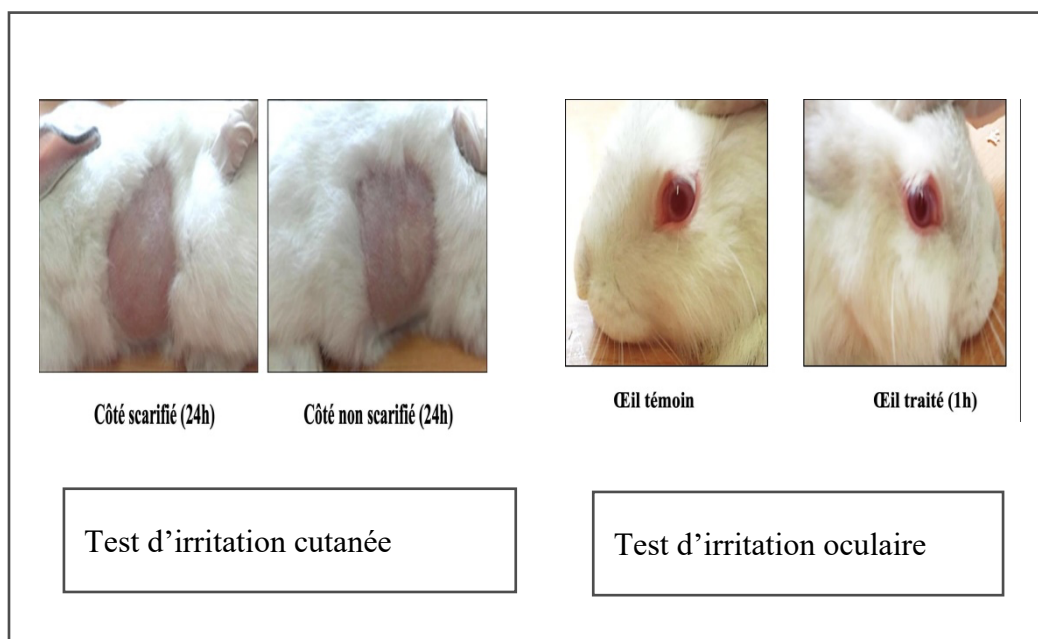


Figure 18 : Observation des tests d'irritation effectués sur les lapins d'Albinos

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Notre étude s'est axée sur l'étude de l'huile essentielle (HE) du *Citrus limon*, ainsi que la poudre de ses feuilles, en vue de leur utilisation dans un produit cosmétique.

Cette HE obtenue par la technique d'entraînement à la vapeur, ainsi que la poudre préparée, ont été l'objet d'une étude physicochimique.

L'HE de l'épicerpe du *Citrus* a montré une forte acidité, ainsi qu'une faible activité antioxydante avec un IC50 de 457,52 et un rendement de 0,33%. Ce qui ne favorise pas son introduction dans un produit cosmétique, mais seulement quelques gouttes pour parfumer le produit. Elle est déconseillée pour une peau sensible, ou celle qui a des plaies ou un problème d'exéma, car elle est irritante pour la peau. Par contre à la poudre des feuilles du *Citrus*, qui a montré une meilleure activité antioxydante avec un IC50 de 213,19 le screening phytochimique effectué sur la poudre à révéler la présence de nombreux métabolites secondaires (les tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, anthocyanes...). Ce qui favorise son introduction dans les produits cosmétiques de soins pour la peau.

Alors, on peut dire que l'HE de citronnier est acide et le contact direct avec la peau porte de mauvaises conséquences. Ce qui nous permet de dire que son introduction dans la fabrication des produits hygiéniques et sanitaires est plus convenable.

Les produits cosmétiques réalisés sont deux crèmes hydratantes qui portent une odeur agréable. La 1ère avec quelques gouttes de l'HE du *Citrus*, et la 2ème avec la poudre des feuilles du *Citrus* utilisé en macération.

L'incorporation de l'HE du *Citrus* et la poudre de ses feuilles dans deux différents produits cosmétiques a donné de bons résultats, les crèmes formulées ont une odeur agréable, une texture parfaite, et une très bonne hydratation, sans laisser du gras dans la peau.

Les tests effectués sur les produits ont montré qu'ils ne sont pas irritants, ni contaminés, et qu'ils sont conformes par rapport aux normes applicables sur les produits cosmétiques.

Dans la lumière de compléter ce travail par :

- Effectuer plus de recherches et tests sur la poudre, comme la chromatographie par exemple.
- Identifier les composés chimiques de la poudre.
- Il est recommandé d'isoler les molécules qui portent le principe actif.
- La valorisation de l'HE et les feuilles du *Citrus* n'est pas limitée dans la cosmétologie, elles doivent être valorisées en plusieurs domaines : pharmaceutique, alimentaire, hygiène et sanitaire.

REFERENCES

Références :

- 1-DIDI.A et YAKOUBI, Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citrons, bio-industrie analyse et contrôle , diplôme de Master ; 2021 ,Constantine, page 16.
- 2-KEHAL, utilisation de l'huile essentielle de citrus limon comme agent conservateur Et aromatique dans la crème fraiche, biochimie et technologie alimentaire, mémoire de Magister, Constantine, 2013, p 19.
- 3-HAMDANI.S, Etude chimique et activité antioxydante des huiles essentielles des Agrumes cultivés, chimie des produit naturels, tlemcen, 2018, p17.
- 4-LIMAM.F, Etudes phytochimique et pouvoir antoxydantes de l'ecorce d'orange Et citrons, mémoire de master ,nutrition et pathologie, 2018,p 17.
- 5-HIMED.L, évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citrons,Thèse de Doctorat, science alimentaires, 2018 , p 4.
- 6-HIMED.L, évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citrons, Thèse de Doctorat, science alimentaires, 2018 , p 5.
- 7-HIMED.L, évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citrons, Thèse de Doctorat, science alimentaires, 2018 , p 6.
- 8-HIMED.L, évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citrons, Thèse de Doctorat, science alimentaires, 2018 , p 6-7.
- 9-HIMED.L, évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citrons, Thèse de Doctorat, science alimentaires, 2018 , p 12-13.
- 10-BENABDELKADER.T, biodiversité , bioactivité et biosynthèse des composes terpénique volatifs des lavandes ailées, biologie et ecophysologie végétale, 2012, p 28-29.
- 11-DIDI.A et YAKOUBI, Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citrons, bio-industrie analyse et contrôle,diplôme de Master ; 2021 ,Constantine, page 13.
- 12-DIDI.A et YAKOUBI, Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citrons, bio-industrie analyse et contrôle, diplôme de Master ; 2021 ,Constantine, page 13-14.
- 13-DIDI.A et YAKOUBI, Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citrons, bio-industrie analyse et contrôle , diplôme de Master ; 2021 ,Constantine, page 17.
- 14-HIMED.A, évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron thèse de Doctorat, science alimentaires, 2018, p 13.

15-DERRAS.M et BECHLAGHEM.M, Essais de mise au point de formulation d'une crème cosmétique, 2017, p9-10.

16-DERRAS.M et BECHLAGHEM.M, Essais de mise au point de formulation d'une crème cosmétique, 2017, p15.

17-Introduction à la cosmétologie, présentation ITM nov.08, Michèle DECLERCQ,2003, p 5.

18-Introduction à la cosmétologie, présentation ITM nov.08, Michèle DECLERCQ,2003, p 18.

19-Introduction à la cosmétologie, présentation ITM nov.08, Michèle DECLERCQ, 2003,p 5.

20-Mémoire de fin d'étude sur les produits cosmétiques, voir le site, <http://dspace.univ-bouira.dz>, p21-22.

21-KHODHEIR.N, Evaluation du risque microbiologique de certains produits cosmétique, 2020, p14-27.

22-DIDI.A et YAKOUBI, Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citrons, bio-industrie analyse et contrôle ,diplôme de Master ; 2021 ,Constantine, p 13.

23-CHAPITRE 6. Propriétés physiques des HE , 2017 , p 37-38.

24-Aujardin info, Citronnier (citron), Limonier, site internet, voir le site, <https://www.Aujardin.info/plantes>.

25-Maladie parasitaire- fiche et actualité, site d'internet, voir le site, <https://sante.lefigaro.fr>.

26- Le figaro.fr santé, voir le site, **Erreur ! Référence de lien hypertexte non valide..**

27-Voir le site , <https://www.techno-science.net>> Hu....

28-Voir le site , <https://www.toujours-belle.com/produits-cosmetiques-naturels-et-synthetiques-comparaison/Mesure-pH>.

29-Entrainement –a-la-vapeur-wiki-fr, voir le site, <https://www.vaucanson.org>.

30-Voir le site, <https://www.techno-science.net>.

31-Voir le site, <https://stringfixer.com>> half-maxim...

32-33 – BENNEOUALA Celina, BERCHICHE Lydia, MELLAZ Nouria, Toxicité des produits cosmétiques,2021, p 46-47-48.

ANNEXES

Annexe 1

Appareillage, verrerie et consommables :

- Appareillage
 - Agitateur
 - Agitateur magnétique
 - Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau)
 - Bain marie
 - Balance de précision
 - Centrifugeuse
 - Incubateur bactériologique (25°C,37°C)
 - Ph mètre
 - Plaque chauffante
 - Réfractomètre
 - Réfrigérant
 - Réfrigérateur
 - Spectromètre

- Verrerie et consommable
 - Barreaux magnétiques
 - Béchers
 - Billes de verre
 - Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
 - Burette
 - Cuves
 - Eppendorf
 - Éprouvettes
 - Erlenmeyer
 - Fioles
 - Flacon avec bouchon
 - Les lapins
 - Micropipette

- Para-filme
- Pipette graduée stériles
- Poire
- Portoire
- Seringues
- Tube à essai

- Solutions et réactifs

- 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Acide ascorbique
- Acide chloridrique
- Acide sulfurique (10%)
- Acétate de sodium
- Alcool chirurgical
- Alcool isoamylique
- Ammoniaque
- Cire d'abeille
- Cire blanche
- Éthanol (96%)
- F_2CL_3 (5%)
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Huile d'amande douce
- L'eau distillée
- L'eau physiologique
- Méthanol
- Phénolphtaléine
- Réactive de Stiasny (10 ml de formol a 40% et 5 ml d'HCL concentré)

Annexe 2

Le rendement de l'huile essentielle :

	Ech1	Ech2	Ech3	Ech4
Poids de la matière fraîche en g	300	300	300	300
masse de l'huile essentielle en g	0,99	0,97	0,99	0,98
Rendement %	0,33	0,32	0,33	0,32
Rendement moyen	0,33			

Annexe3

Résultats de l'activité antioxydante

- L'HE du *Citrus.Limon*

Absorbance contrôle = 0,8746

µg/ml	200	400	600	800	1000
DO	0,600	0,478	0,342	0,212	0,115
% inhibition	31,39	45,34	60,89	75,76	86,85

- L'extrait de la poudre des feuilles citron

Absorbance contrôle = 0,8746

µg/ml	200	400	600	800	1000
DO	0,49	0,30	0,161	0,11	0,009
% inhibition	43,87	65,69	81,59	87,42	98,97

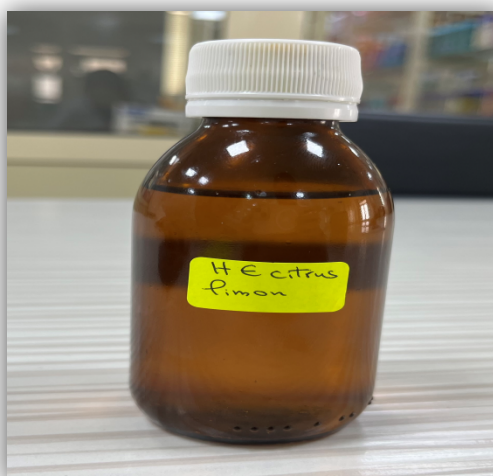
- Acide ascorbique

µg/ml	200	400	600	800	1000
DO	1,07	1,044	1,002	0,879	0,12
% inhibition	48,75	47,19	49,31	55,53	93,82

Annexe4

L'huile essentielle des fruits du *Citrus limon*

Obtenue par entrainement à la chaleur



Annexe 5

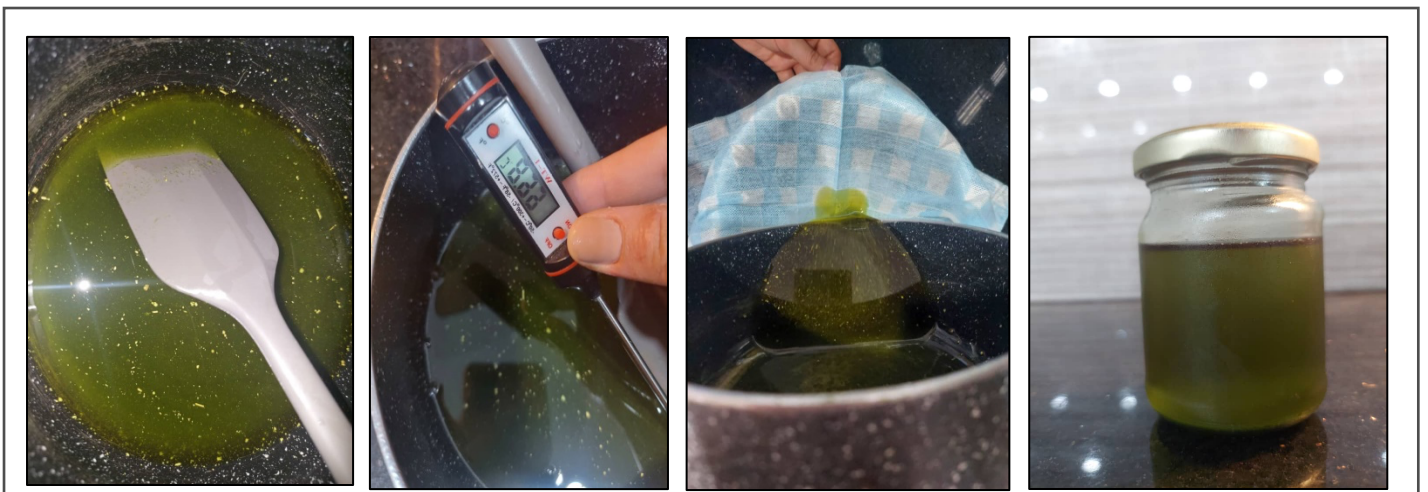
Étapes de préparation de la poudre



Figure: Étapes de la préparation de la poudre des feuilles du citronnier

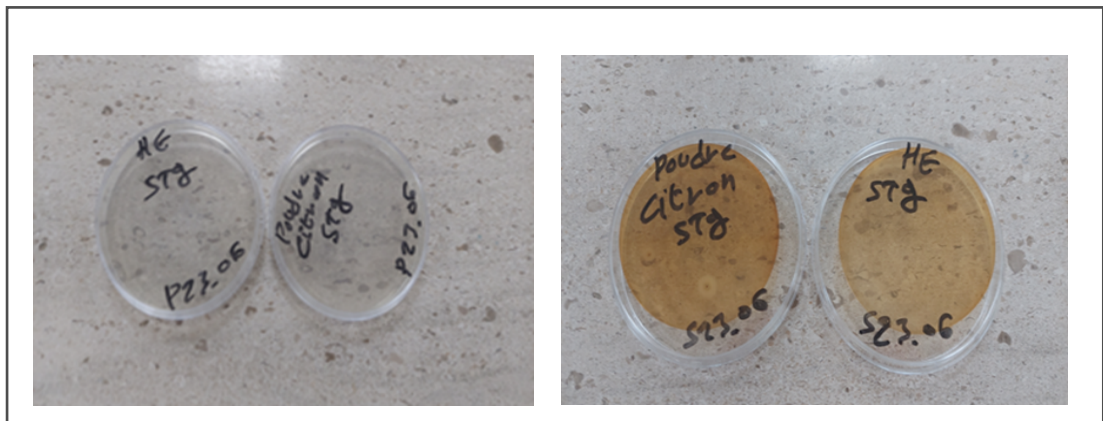
Annexe 6

Étapes de macération



Annexe 7



Photos montrant l'effet des deux crèmes (à base d'HE du *C.limon* et la poudre de ces feuilles) sur :
Staphylococcus aureus, *Bacillus ceureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*,
Aspergillus flavus, *Sacar*.



Annexe 8

Screening chimique de la poudre des feuilles du *Citrus limon*

Les anthocyanes	
Les tannins	
Les flavonoïdes	
Les alcaloïdes	

Les glucosides	
Les mucilages	

Annexe 9

Rapport des tests toxicologiques effectués au niveau de l'institut Pasteur d'Alger.

	DEPARTEMENT DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT	REF:NA
		Version C
	RAPPORT D'ANALYSE	Date: 16/01/2022
		Page: 1/1

N° 140 SL/DG/CNT/2022

Nom de la société

Nom de Personne de contact

Adresse

Adresse e-mail

Numéro de téléphone

N° Enregistrement

Nom du produit à analyser

Nature du produit Crème

Categorie de produit crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau (les mains, le visage, les pieds...):

PARAMETRE / TECHNIQUE D'ANALYSE	RESULTAT
Test d'irritation cutanée sur lapin OCDE 404	Non irritant
Test d'irritation oculaire HETCAM HETCAM	Pratiquement non irritant

CONCLUSION

Le produit "Crème dépigmentante et hydratante Meryskin" est non irritant pour la peau et pratiquement non irritant pour les yeux, selon les tests effectués sur l'échantillon reçu.

Visa du Chef de service Visa du Chef de département Visa du Directeur Général





Centre National de Toxicologie
Direction
Laboratoire de Chimie Analytique



المركز الوطني
للسمية
والطب
البيئي
بجامعة
الجزائر
الغربية

Date de remise de rapport 19/05/2022

Centre National de Toxicologie - Route petit Staouli Dely Brahim Alger, Tel : +21321367517 www.cnt.dz

	DEPARTEMENT DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT	REF:NA
		Version C
	RAPPORT D'ANALYSE	Date:16/01/2022
		Page: 1/1

N° 133 SL/DG/CNT/2022

Nom de la société
 Nom de Personne de contact
 Adresse

Adresse e-mail
 Numéro de téléphone

N° Enregistrement
 Nom du produit à analyser

Nature du produit : Crème
 Catégorie de produit : crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau (les mains, le visage, les pieds...);

PARAMETRE / TECHNIQUE D'ANALYSE	RESULTAT
Test d'irritation cutanée sur lapin OCDE 404	Non irritant

CONCLUSION

Le produit "Crème hydratante et cicatrisante, citron Meryskin" est non irritant pour la peau, selon les tests effectués sur l'échantillon reçu.

Visa du Chef de service

Visa du Chef de département

Visa du Directeur Général



Centre National de Toxicologie
 Algérie - Annexe
 Micro-Analyse et Chimie Analytique



Date de remise de l'analyse : 19/05/2022

Centre National de Toxicologie - Route petit Staouali Dely Brahim Alger, Tel : +21321357217 www.cnt.dz

	DEPARTEMENT DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT	REF:NA
		Version C
	RAPPORT D'ANALYSE	Date:16/01/2022
		Page: 1/1

N° 140 SL/DG/CNT/2022

Nom de la société
 Nom de Personne de contact
 Adresse

Adresse e-mail
 Numéro de téléphone

N° Enregistrement : 22c/592
 Nom du produit à analyser : Crème dépigmentante et hydratante Meryskin

