

République Algérienne Démocratique Et populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur De La Recherche Scientifique



UNIVERSITE SAAD DAHLAB.BLIDA 1

Faculté Science de La Nature Et De La Vie

Département De Biotechnologie et Agro écologie

Mémoire fin d'étude

En Vue de l'Obtention Du Diplôme De Master Académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Et Valorisation Des Plantes

Domaine : Science De La Nature Et De La Vie

Thème

**Caractérisation physico-chimique des Huiles Essentielles
du Bigaradier *Citrus Aurantium L* (Feuilles et Fruits) de La
Région de La Mitidja et évaluation de Leur activité
antioxydante**

Présenté par :

Mlle Saidani Ahlem

Mlle Hamdaoui Siham

Mlle Talbi Kamar

Soutenu le 16/07/2023 devant le jury composé de :

Mr. ABBAD M.	MCA	Président	Université Blida-1-
Mme. GANAI R.	MCB	Examinatrice	Université Blida-1-
Mr. BENDALI A.	MAA	Promoteur	Université Blida-1-

Année universitaire : 2022-2023

Remerciement :

Tout d'abord, nous rendons grâce a **ALLAH**, le créateur le tout puissant de nous avoir donnée la santé et la volonté pour accomplir notre mémoire.

On exprime d'abord nos profonds remerciements à notre **promoteur MR : BENDALI ABDELAZIZ**. Merci pour votre confiance, Pour tous les conseils et précieuses informations qu'il nous a fournis, son aide durant toute cette période.

Nous tenons également à remercier les membres de jury pour l'honneur que nous a fait en acceptant de siéger à notre soutenance **MR : ABBAD MOUHAMED, ET MM : GANAI RAFIKA**.

Nous remercions **MR. CHIKHI HAMID** et toute son équipe pour l'extraction des huiles.

Nous remercions le chef service du laboratoire d'hygiène **MR. TEFAHI DJAMEL**, pour son soutien et son aide dans l'objet de réalisation de l'activité antibactérienne.

Nous remercions laboratoriste **IHSSAN** pour leur gentillesse et soutien pour terminer notre analyse.

Sont oublier de remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre travail et nous aidée de près ou de loï lors la rédaction ce mémoire.

Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :

Ma chère maman « **Safia** », ma joie mon bonheur tu es tout ce que j'ai de plus chers au monde .Je voulais te remercier infiniment pour tout ce que tu a fais pour moi étant petite jusqu'à maintenant. Merci pour ton prières qui ne finit jamais, tes conseil qui ma rendu ce que je suis aujourd'hui, votre soutenu dans les tempêtes de la vie. Que dieu prolonge ta vie.

Mon père« **Mohammed** », mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussi, qui a toujours voulu ce qu'il y'a de mieux pour moi, tu es un modèle de force et de courage. Merci pour tous ce que tu as fait tout au long de ma vie.

Mes chers frères « **Abderaouf, Chemsedinne, Riad** ». Je voulais juste de dire merci pour tout le soutien, vous êtes un pilier pour moi, vous êtes ma source de joie et de bonheur et je suis tellement reconnaissante de vous avoir dans ma vie.

Ma meilleure amie **Rania**, ma moitié. Merci pour ce que tu m'apporteront les jours, merci pour ton soutien, ton aide. Tu été toujours la a mes coté quand il faut. Je suis tellement chanceuse d'avoir une amie comme toi.

Mes chères amies « **Ahlem et Siham** » pour l'agréable moment qu'on a passé ensemble, pour ses patiences, leurs courages et ses collaborations.

A tous ceux qui m'estiment et me porte dans leur cœur

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU de m'avoir donné la force et le courage de mener ce modeste travail. Je tiens à dédicé ce modeste travail :

À la source de mon énergie, de mon espoir et de mon bonheur, à ma précieuse mère «**Aïcha**» que dieu la protège. Ce travail est le fruit de son labeur et de ses sacrifices,

À mon père pour son soutien continu pour l'achèvement de ce travail.

A mes frères et sœurs.

À mon petit frère **YASSIN**, que Dieu le protège.

À mes chers amis : **AHLEM, KAMAR, MARIEM.**

À tous les personnes qui nous avons rencontrées et qui a contribué à semer l'espoir et le bonheur en nous, à tous ceux qui nous aiment.

SIHAM

Dédicace

Tout d'abord et avant tous c'est grâce au « DIEU »

Je dédie ce travail à la chère qui m'a donné naissance « **RABEA** » et au cher qui mon nom s'est terminé avec lui « **BELKACEM** » qui m'ont toujours poussé et motivé, et qui n'a jamais dit non à mes exigences.

Tout ce que je dis et fais, je ne peux pas répondre à vos efforts, votre soutien et vos encouragements tout au long de ma scolarité.

Pour mes chers frères « **YOUCEF** » et « **ABD ELRRAHMANE** » mes pilier de force et ma source d'énergie.

À mon adorable petite sœur « **RAHMA** » qui sait toujours comment un procureur de joie et le bonheur pour tout la famille.

A mes amis qui j'aime beaucoup « **KAMAR, SIHAM ET RANIA** ».

Ames cher grands pères, ma grand-mère.

AHLEM

Résumé :

Bigaradier (*Citrus aurantium L*) est un arbre, de la famille des Rutacées l'une des plus importantes familles d'agrumes en Algérie, caractérisé par son goût amer et non comestible. Il est utilisé comme un arbre ornemental, représentant une source riche en composant phénolique.

Ce travail est consacré sur l'étude physico-chimique des HE de *Citrus Aurantium L.* (Feuille et fruit) de la région de Mitidja et évaluation de leur activité antibactérienne et antioxydante détermination des composés phytochimique.

L'obtention des HE par la méthode de l'hydrodistillation à partir des fruits et feuilles de *Citrus Aurantium L* a donné un rendement de 0.23% pour fruits et 0.20% pour feuille.

Les résultats des Analyses physico-chimiques sont conformes avec les normes internationales. Le pH entre 4 et 6 (**Daniele 2011**) ; l'indice de réfraction entre 1,495 et 1,513 (**AFNOR 2005**).

Le test phytochimique (screening) a mis en évidence la présence de différents composés chimiques testés.

Les résultats de l'activité antibactérienne par la technique d'aromatogramme sur les quatre bactéries testées montrent que HE des feuilles révèle un effet antibactérien important avec une zone d'inhibition qui varie entre 13.75 mm et 19.5 mm par rapport HE de fruits est très faible chez les bactéries de gram +.

Les résultats d'étude de l'activité antioxydante vis-à-vis le DPPH ont montré un pouvoir antioxydant de l'huile essentielle des feuilles avec un IC₅₀ = 0,0548 mg/ml très proche de celui de l'acide ascorbique 0,0514mg/ml.

Mots clés :

Citrus Aurantium L, test phytochimique, huile essentielle, étude physicochimique, activité antibactérienne, activité antioxydant, DPPH.

Abstract:

The bitter orange is a tree, from the Rutaceae family, one of the most important citrus families in Algeria, characterized by its bitter and inedible taste. It is used as an ornamental tree, representing a rich source of phenolic component.

This work is devoted to the physico-chemical study of essential oils of *Citrus Aurantium L.* (Leaf and fruit) from the Mitidja region and evaluation of their antibacterial and antioxidant activity, determination of phytochemical compounds.

Obtaining essential oils by the method of hydrodistillation from the fruits and leaves of *Citrus Aurantium L.* gave a yield of 0.23% for fruits and 0.20% for leaves.

The results of the physico-chemical analyzes comply with international standards.

The phytochemical test (screening) revealed the presence of the different chemical compound tested.

The results of the antibacterial activity by the aromatogram technique on the four bacteria tested shows that HE of the leaves reveals a significant antibacterial effect with a high zone of inhibition varying between 13.75 mm and 19.5 mm compared to the HE of fruits which is very low. in gram + bacteria.

The results of the study of the antioxidant activity vis-à-vis the DPPH showed an antioxidant power of the essential oil of the leaves with an $IC_{50} = 0.0548$ mg / ml very close to that of ascorbic acid 0.0514 mg / ml.

Key words :

Citrus Aurantium L., phytochemical test, essential oil, physicochemical study, antibacterial activity, antioxidant activity, DPPH.

ملخص:

البرتقال المر هو شجرة ، من عائلة Rutaceae ، إحدى أهم عائلات الحمضيات في الجزائر ، تمتاز بطعمها المر وغير الصالح للأكل. يتم استخدامه كشجرة زينة ، ويمثل مصدرًا غنيًا للمكونات الفينولية. هذا العمل مخصص للدراسة الفيزيائية والكيميائية للزيوت الأساسية من *Citrus Aurantium L*. (الأوراق والفاكهة) من منطقة Mitidja وتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا ومضادات الأكسدة ، وتحديد المركبات الكيميائية النباتية. أعطى الحصول على الزيوت العطرية بطريقة التقطير المائي من ثمار وأوراق *Citrus Aurantium L* عائد 0.23 للفواكه و 0.20 للأوراق. تتوافق نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية مع المعايير الدولية. كشف الاختبار الكيميائي النباتي (الفرز) عن وجود مركب كيميائي مختلف تم اختياره. أظهرت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة تقنية التصوير العطري على البكتيريا الأربعة المختبرة أن HE لأوراق يكشف عن تأثير مضاد للجراثيم مع منطقة عالية من التثبيط تتراوح بين 13.75 مم و 19.5 مم مقارنةً بالفاكهة منخفضة جدًا. في الجرام + البكتيريا. أظهرت نتائج دراسة النشاط المضاد للأكسدة مقابل DPPH قوة مضادات الأكسدة للزيت العطري للأوراق مع $IC_{50} = 0.0548$ مجم / مل قريبة جدًا من حمض الأسكوربيك 0.0514 مجم / مل.

الكلمات الدالة :

Citrus Aurantium L ، اختبار كيميائي نباتي ، زيت عطري، دراسة فيزيائية كيميائية ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للأكسدة ، DPPH .

Tables des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 01

Synthèse bibliographique

1- Généralité sur l'espèce étudiée (Bigaradier)	02
1-1- Description de l'orange amère	02
1-1-1- Identité	02
1-1-2- Description botanique de l'orange amère	02
1-1-3- Classification botanique	04
1-2- Composition chimique de bigaradier	04
2- Généralité sur les huiles essentielles	04
2-1- Répartition et localisation	05
2-2- Composition chimique des huiles essentielles	05
2-3- Rendement des huiles essentielles	06
2-4- Méthodes d'extraction	06
3- Généralité sur le contrôle de qualité	07
3-1- Propriétés organoleptiques	07
3-2- Propriétés physicochimiques	07
3-3- Le contrôle microbiologique	07
4- Activités biologiques des huiles essentielles	08

Matériels et méthodes

1- Matériel biologique	10
1-1- Matériel végétal	10
1-2- Les souches bactériennes utilisées	10
2- Méthodes	11
2-1- Etude phytochimique de la plante	11
2-1-1- Détermination de la teneur en eau	11
2-1-2- Préparation des extraits	11
2-1-3- Screening chimique	11
2-2- Extraction des huiles essentielles	13
2-2-1- La récolte de la plante	13
2-2-2- Méthode d'extraction	13
2-2-3- Conservation des huiles	14

2-2-4- Rendement en huile essentielle	14
2-3- Contrôle de qualité	14
2-3-1- Propriétés organoleptiques	15
2-3-2- propriétés physicochimiques	15
2-3-3- Contrôle microbienne	17
2-4- Activités biologiques	17
2-4-1- Activité antibactérienne	17
2-4-2- Activité antioxydante	

Résultats et discussion

1- Résultats de l'étude phytochimique	23
1-1- Détermination de la teneur en eau	23
1-2- Test phytochimique	23
2- Résultats d'extraction des huiles essentielles	24
2-1- Rendement de l'extraction	24
3- Résultats de contrôle de qualité	25
3-1- Propriétés organoleptiques	25
3-2- Analyse physicochimique	25
3-3- Contrôle microbienne	27
4- Résultat de l'activité antibactérienne	27
5- Résultats de l'activité antioxydante	29
Conclusion générale	31
Références Bibliographiques	33
Les annexes	

Liste des abréviations :

H.E : huile essentielle.

AFNOR : L'association française de normalisation.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

PE : Pharmacopée européenne.

USP : United states pharmacopée.

JP : Japanese pharmacopoeia.

E. Coli : *Escherichia coli*.

Staph : Staphylococcus aureus.

R. HE : Rendement en Huile Essentielle.

μl : Microlitre.

PH : Potentiel Hydrogène.

IR : Indice de Réfraction.

IA : Indice D'acide.

IS : Indice de saponification.

D : Densité.

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.

ABS : Absorbance.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

I(%) : Pourcentage d'inhibition.

MH : Mueller - Hinton.

PCA : Plate Count Agar.

Liste des figures :

Figure01 : Coupe transversale d'une orange amère.	03
Figure 02 : Modes d'extraction des huiles essentielles.	06
Figure03 : Partie aérienne de <i>Citrus aurantium L.</i>	10
Figure04 : Séchage des feuilles de bigaradier.	10
Figure05 : Les feuilles et les fruits de <i>Citrus aurantium L.</i>	13
Figure06 : Montage d'hydrodistillation.	14
Figure07 : Réaction radicalaire du DPPH avec un agent antioxydant (AH ; piègeur de radicaux libres) et formation d'une forme stable.	21
Figure08 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles du <i>Citrus aurantium L</i> et de l'acide ascorbique.	29

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Systématique botanique de bigaradier.	04
Tableau02 : Les souches microbiennes utilisées.	11
Tableau03 : Méthodes d'analyse phytochimique.	12
Tableau04 : Préparation des dilutions de l'huile essentielle.	19
Tableau05 : Classement des zones d'inhibition.	20
Tableau06 : Préparation des dilutions à partir de la solution mère.	21
Tableau07 : Teneur en eau contenue dans <i>Citrus aurantium L.</i>	23
Tableau08 : Résultats de tests phytochimique de l'espèce étudié <i>Citrus aurantium L.</i>	23
Tableau09 : Rendement des huiles essentielles extraites.	24
Tableau10 : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles des feuilles et des Fruits du <i>Citrus aurantium L.</i>	25
Tableau11 : Résultats d'analyse physicochimique des huiles essentielles du <i>Citrus aurantium L.</i>	26
Tableau12 : Valeurs des zones d'inhibition des deux huiles sur les souches étudiées.	28
Tableau 13 : Valeur des IC50 des huiles et de l'acide ascorbique.	30

Introduction générale :

Introduction générale

Les plantes aromatiques et médicinales connues par leurs propriétés biologiques intéressantes sont utilisées dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie, en cosmétologie et en agriculture. Les activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés sont dues essentiellement à la fraction d'huile essentielle et aux composés phénoliques contenues dans les plantes. **(Jdidi, 2015)**. Les huiles essentielles sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des Végétaux qu'ils les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme Sous-produits du métabolisme secondaire. **(Bruneton, 1999)**.

Le secteur des huiles essentielles et des plantes aromatiques connaît un grand intérêt dans le monde entier en raison de l'importance de ce domaine, en Algérie, beaucoup reste à faire pour développer ce créneau et donc est loin d'une exploitation optimale de ses ressources biologiques, L'objectif principal de notre travail se concentre principalement sur l'un des types d'agrumes qui est le *Citrus aurantium L* de la famille des rutacées, car il est considéré comme l'une des plantes aromatiques importantes et très connues de la région de Mitidja.

Ce travail porte sur les caractérisations physico-chimiques à partir de l'extraction de l'huile essentielle de notre plante (feuilles et fruits) et évaluation d'activité antioxydant et activité antibactérienne.

Notre travail est divisé en deux parties :

Partie bibliographie : dans cette partie on s'intéresse sur :

- L'espèce étudiée et leur description botanique
- Généralité sur les huiles essentielles et leur composition chimique et technique d'extraction
- Contrôle de qualité et activité biologique

Partie pratique : cette partie consiste sur :

- Le matériel végétal et le matériel biologique
- L'étude phytochimique et le processus d'extraction
- Les analyses physico-chimiques de notre huile extraite, ainsi les activités biologique (antibactérienne et antioxydante).

A la fin, présentation de nos résultats et discussion, et on a terminé notre travail avec une conclusion générale.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

1- Généralité sur l'espèce étudiée (bigaradier) :

L'oranger amer ou Bigaradier est un arbre vigoureux, de la famille des Rutacées, qui peut atteindre 7 à 8 mètres en pleine terre. Ses feuilles persistantes sont ovales, vert foncé, brillantes et le pétiole un peu ailé. Au printemps (mars – juin) ses fleurs blanches s'épanouissent et diffusent un parfum envoutant. Les fruits sont de petites oranges à la forme un peu aplatie et à la peau épaisse, riche en huiles essentielles. **(Hadrich et al. 2008)**

1-1- Description de l'orange amère :

1-1-1- Identité :(Cerdagne.2004)

*dénomination latine :

Citrus Aurantium L. var. Amara Link

Citrus Vulgaris Risso – *Citrus bigaradia* Duhamel

Le nom de cet arbre correspond à l'espèce décrite par Carl Von Linné (L) professeur de botanique à Uppsala en Suède

Cette dénomination repose sur une nomenclature binaire basée sur :

Genre : Citrus

L'espèce : Aurantium

*Dénomination commune :

Orange amer - Bigaradier - Oranger sauvage

1-1-2 Description botanique d'orange amère :

A-Fruit : Le fruit est formé de trois parties constituant le péricarpe :

***Épicarpe** : épiderme externe. Il est coriace et comporte de nombreuses poches sécrétrices contenant de l'huile essentielle. Ces poches sont bien visibles à l'œil nu, colorées en jaune par les caroténoïdes.

***Mésocarpe** : constitue la partie intermédiaire du fruit communément appelé pulpe quand il s'agit de fruit charnu, il forme une couche spongieuse blanche.

***Endocarpe** : épiderme interne. Il permet notamment de différencier une baie d'une drupe parmi les fruits charnus. **(Benlaksira.2016)**

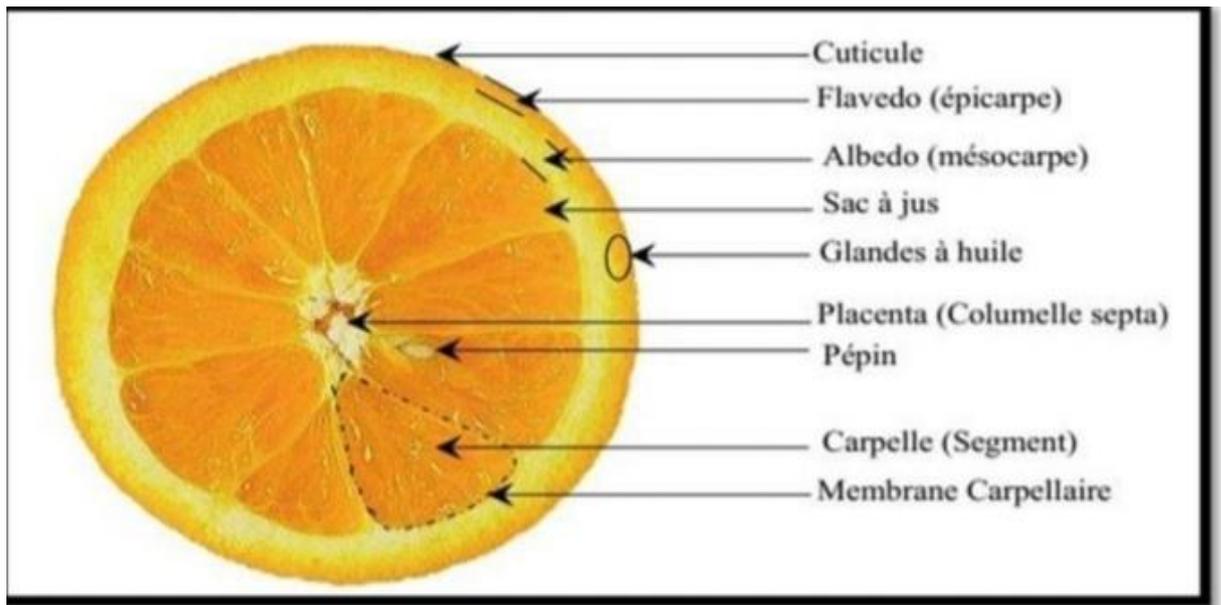


Figure 01 : coupe transversale d'une orange amère. (Hendrix et Redd. 1956)

B-Feuille :

La feuille de bigaradier est vert brillant, coriaces, persistante, simple à disposition alterne (une feuille par nœud). Elle constituée d'une manière générale d'un limbe et d'un pétiole. La présence d'un appareil sécréteur rend la feuille fortement odorante après froissement elle est de saveur aromatique et amère, après dessiccation la feuille de bigaradier s'enroule sur elle-même.

C-Fleur :

- Elle est regroupés par glomérule de 2 ou 3 et prennent naissance à l'aisselle des feuilles, elles sont dites axillaires.
- Elle s'épanouit de la fin d'avril au début de juin.
- Elle est de couleur blanche et exhalent un parfum aromatique caractéristique de l'espèce. Après dessiccation la fleur devient jaunâtre et moins odorante, la fleur peut atteindre 25 mm long pour un diamètre maximal de 10 mm Elle possède un pédoncule rigide de 5 à 10 mm de longueur. Ce dernier est surmonté d'un calice court et d'une corolle beaucoup plus haute. L'ensemble de ces deux pièces forme le périanthe de la fleur d'allure général oblongue. (Ben Seddik et al.2021)

1-1-3-Classification botaniques :

D'après (Sidana et al, 2013) la position systématique du bigaradier est comme suite :

Règne :	Plantae
Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous- classe :	Rosidées
Ordre :	Sapindales
Famille :	Rutacées
Tribu :	Citreae
Sous -tribu :	Citrinae - agrume
Genre :	Citrus
Espèce :	Citrus Aurantium L

Tableau 01 : Systématique botanique de bigaradier.

1-2 composition chimique de bigaradier :

L'écorce des fruits des oranges se compose principalement de la cellulose, l'hémicellulose, de substance picro, des pigments chlorophylliens. Le limonène est considéré comme le principal composé Volatil de l'écorce de l'orange amère et l'huile essentielle. Il on contient aussi de l'amidon, des fibres, des protéines et des vitamines. Les concentrations les plus élevée de flavonoïdes se produisent dans l'écorce.

Les feuilles son très riche on chlorophylle qui son responsable de leur pigmentation verte. Et sont une source importante de composés bioactif, notamment des antioxydants tels que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les composés phénoliques. (Ben Mouloud. 2021)

2- Généralité sur les huiles essentielles :

Le terme huile essentielle remonte au XVIe siècle et dérive du médicament Quintaessentia, nommé par Paracelse vonHohenheim de Suisse. Les huiles essentielles ou « essences » doivent leur nom à leur inflammabilité. L'Agence Française de Normalisation (AFNOR) donne la définition suivante (NF T 75-006) : « L'huile essentielle est le produit

obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe.

D'agrumes, ou distillation « sèche ». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des moyens physiques. **(Wissal et al, 2016)**.

L'huile essentielle (HE) est un liquide huileux parfumé à forte odeur, également appelé huile volatile ou huile d'éther, limpide et rarement coloré, soluble dans les solvants organiques et insoluble dans l'eau. Ce sont des mélanges naturels très complexes de substances lipophiles qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations variables. **(Eristanna et al, 2013)**.

2-1 Répartition et Localisation :

Les huiles essentielles ne se trouvent que dans les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante : les fleurs, les feuilles et moins souvent les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines.

Si tous les organes d'une même espèce peuvent contenir une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation. Dans le cas de l'orange amère, par exemple, le zeste fournit l'« *essence de Curaçao* », la fleur fournit l'« *essence de Néroli* » et les feuilles, ramilles et petits fruits l'« *essence du petit grain bigaradier* ». Cependant, la composition de ces trois huiles essentielles sont différentes **(Lucette couderc, 2001)**

Les huiles essentielles sont localisées dans le cytoplasme de certaines sécrétions de cellules végétales, qui se trouve dans un ou plusieurs organes de la plante ; à savoir, les poils sécrétoires ou trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétoires internes et les poches sécrétoires. **(Wissal et al, 2016)**.

2-2 Composition chimique des huiles essentielles :

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle. **(Françoise et lobster, 2013)**

Les composants chimiques des huiles essentielles végétales diffèrent selon les espèces. Certains facteurs pouvant affectés ces composants comprennent la situation géographique, l'environnement et le stade de maturité. Cette différence chimique est directement liée aux différences d'activité antimicrobienne contre divers micro-organismes pathogènes. **(Mallappa et al, 2016)**

Les huiles essentielles sont constituées de mélanges extrêmement complexes. Les Constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur Voie de biosynthèse : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes **(Buchanan et al, 2000)**. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du Processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils **(Bruneton, 1999)**

2-3 Rendement des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont généralement obtenues avec de faibles rendements (< 1 %) calculés par Rapport à la masse sèche du matériel végétal. Le rendement dépend de plusieurs facteurs, comme la Méthode de récolte, la fréquence de la moisson, la taille des Plantes à la récolte, la saison et les Conditions climatiques lors de la récolte, mais aussi les paramètres lors de la distillation (temps, Pression, température) (**Singh et al, 1999 ; Flamini et al, 2013**)

2-4 Méthodes d'extraction :

Extraire l'essence de la plante n'est pas aisé, car l'extraction des huiles essentielles (HEs) est forcément un processus complexe et délicat. Il est destiné à capter et collecter les produits les plus volatils, délicats et fragiles fabriqués par les plantes, sans en altérer la qualité (**Lahlou, 2004**).

L'extraction des huiles essentielles s'effectue généralement par deux techniques principales : la distillation aéotropique (hydrodistillation, hydrodiffusion et distillation à la vapeur) et l'extrait avec des solvants. Cependant, afin de réduire le temps d'extraction et d'améliorer la qualité des huiles essentielles, de nouvelles techniques d'exploitation ont été développées, telles que l'extrait assisté aux micro-ondes, l'extraction au solvant sous pression, l'extraction au fluide supercritique et l'extrusion assistée par ultrasons. (**Elyemni et al, 2019**)

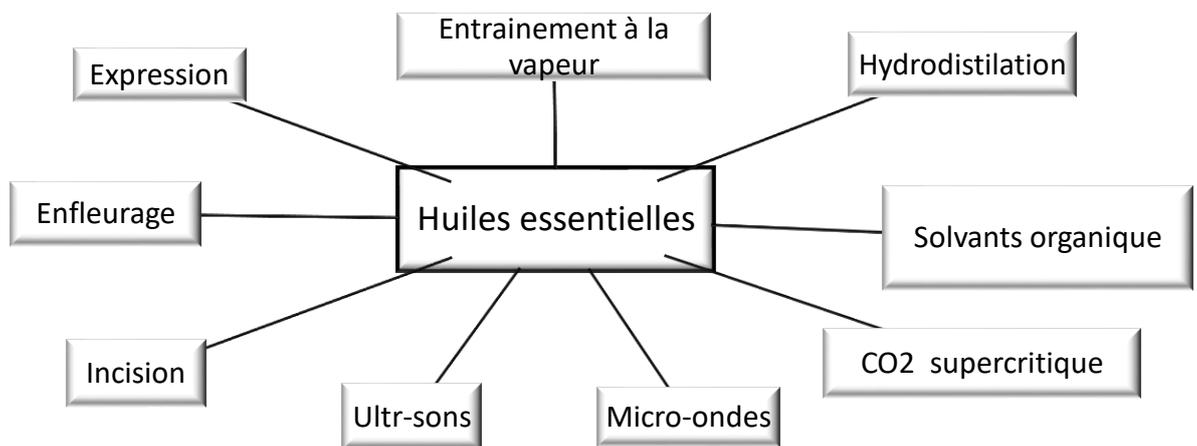


Figure 02 : Modes d'extraction des huiles essentielles (**Ouis, 2015**)

3- Généralité sur le Contrôle de qualité :

Le contrôle de qualité est un aspect de la gestion de la qualité.

Le contrôle est une opération destinée à déterminer, avec des moyens appropriés, si le produit contrôlé est conforme ou non à ses spécifications ou exigences préétablies et incluant une décision d'acceptation, de rejet ou de retouche. **(Alain et al. 2011)**

Une fois le contrôle effectué, il doit établir un rapport détaillé incluant des recommandations (contrôle organoleptique ; analyse physico-chimique ; contrôle microbienne ; ...)

Après le rapport du contrôleur, le produit est considéré comme : Conforme à la norme ; Non conforme, mais peut être modifié ; Non conforme et détruit.

3-1 Propriétés organoleptiques :

Les propriétés sensorielles sont les aspects de la nourriture, de l'eau ou d'autres substances qui créent une expérience personnelle à travers les sens, y compris le goût, l'aspect, l'odorat et le toucher. **(Yi, Zhou et al. 2011) (Chauhan et al. 2003)**

3-2 Propriétés physico-chimiques :

Nous définissons globalement les propriétés physicochimiques comme des propriétés physiques, des propriétés de solvation liées aux interactions avec différents milieux et des propriétés ou des attributs moléculaires qui définissent la réactivité chimique intrinsèque. Les propriétés physicochimiques d'intérêt pour l'évaluation des alternatives chimiques peuvent être utilisées pour identifier les dangers physiques et pour comprendre ou prédire le devenir environnemental, la toxicité humaine ou l'écotoxicité d'un produit chimique. **(National Academy of Sciences.2014)**

3-3 Le contrôle microbiologique :

La détermination de la qualité microbiologique comprend généralement l'analyse de la contamination produit (dans la plupart des cas par des tests de routine en compte les spécifications quantitatives et qualitatives comme l'absence de germes spécifiés) et leur robustesse contre la contamination microbiologique, déterminée en évaluant le système de conservation du produit (Challenge test).

Eurofins accompagne ses clients en proposant une gamme complète de tests et de services, conformément aux normes de l'industrie et aux réglementations en vigueur (ISO, EP, USP, JP ou normes locales/clients). **(Eurofins Scientific en 2022)**

4- Activités biologiques des huiles essentielles :

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs, Les huiles essentielles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales et antiparasitaires. Dû à leurs vastes utilisations dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, cosmétique. Néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois (**Grib.k ; Boumaaza, A en 2018**)

1. Activité antioxydante par test DPPH : Le test DPPH permet de mesurer le **pouvoir anti radicalaire** de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. La réduction du DPPH° est facilement mesurée par spectrophotométrie à 515 nm (λ_{max} DPPH°). La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature de l'antioxydant, et la quantité de DPPH-H formée dépendra de la concentration en antioxydant. (**Fondée en 2007**)
2. Activité antibactérienne par la méthode de diffusion en gélose :

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

Objectif et lieu de stage :

Notre expérimentation s'est étalée sur la période allant du mois de février au mois de juin 2023. Notre travail consiste à l'étude phytochimique d'extrait des feuilles sèche ; l'étude physicochimique d'huile essentielle des feuilles et de fruits de bigaradier (*Citrus aurantium L*) et l'évaluation de quelques activités biologique.

Pour réaliser cette étude nous avons fixé les objectifs suivants :

- **Au niveau de l'Institution BIO.EXTRAPAMAL d'Oued el Alleug :**
L'extraction des huiles essentielles.
- **Au niveau du laboratoire de PFE du département de biotechnologie université Blida 1 :**
Screening phytochimique de la poudre de la plante.
Etude de l'activité antioxydant.
- **Au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida :**
Etude de l'effet antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus Aurantium L*.
- **Au niveau du laboratoire Venus Ouled Yaich Blida :**
L'analyse physicochimique et le contrôle microbienne

1- Matériel biologique :**1-1- Matériel Végétal :**

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne de l'espèce *Citrus aurantium L* (les feuilles ; les écorces ; les fruits).



Figure 03 : Partie aérienne de *Citrus aurantium L.*

Période et Lieu de récolte :

L'échantillon de la plante ont été récoltes au stade de fructification,

La 1^{ère} récolte : utilisée pour l'extraction d'HE le 25 février 2023 pour l'échantillon de Bab Dzair BLIDA qui est une Plante Ornementale, elle a environ 50 ans; le 05 mars 2023 pour l'échantillon d'Oued Alleug Blida qui est une Plante de Ferme, elle a environ 70 ans.

La 2^{ème} récolte : utilisée pour la préparation des extraits 21 mai 2023 pour les deux échantillons.

Séchage et stockage :

Après la récolte, les échantillons ont été nettoyés et étalés sur du papier, pour le séchage à l'étuve à température 40°C pendant 48h ; ainsi l'échantillon séchées ont été broyé et mis dans des sachets.



Figure 04 : séchage de plantes récoltée

1-2- Les souches bactériennes utilisées :

Le support microbien utilisé est composé de quatre bactéries fournis par le laboratoire d'hygiène de Blida présentées dans le tableau ci-après :

Tableau 02 : Les souches microbiennes utilisées (laboratoire d'hygiène. BLIDA 2023)

La Bactérie	Le code	Gram +/-
<i>E. coli</i>	ATCC 8730	Gram (-)

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram (+)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gram (+)
<i>Salmonella abony</i>	NCTC 60 17	Gram (-)

2- Méthodes :

2-1- Etude phytochimique de la plante :

2-1-1- Détermination de la teneur en eau T%:

La teneur en eau (T) est la quantité d'eau contenue dans un échantillon de matériau, elle est considérée comme indicateur de stress, calculée comme suit :

$$T = (PF - PS) / PF \cdot 100$$

T : teneur en eau en pourcent.

PF : masse de l'échantillon avant séchage.

PS : masse de l'échantillon après séchage dans l'étuve.

2-1-2- Préparation des extraits :

L'extraction est la séparation des parties actives de plantes en utilisant des solvants sélectifs au moyen de procédures standard. Les produits ainsi obtenus à partir de plantes sont des mélanges relativement complexes de métabolites, à l'état liquide ou semi-solide ou (après élimination du solvant) sous forme de poudre sèche, et sont destinés à être utilisés par voie orale ou externe. Ceux-ci comprennent des classes de préparations connues sous le nom de décoctions, infusions, extraits fluides, teintures, extraits (semi-solides) ou des extraits en poudre.

Extrait aqueux : Consiste à introduire 1g de poudre végétale dans 20 ml d'eau bouillante qu'on laisse infuser pendant 15 minutes. Ensuite, on filtre et on rince avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 20 ml de filtrat.

Extrait Méthanoliques : Consiste à introduire 1g de matériel végétal dans 20 ml de méthanol puis on le laisse macérer pendant 24h.

2-1-3- Screening chimique :

Le but de ce test, est de connaître la composition et les métabolites secondaires présents dans les deux plantes **A** et **B** (A: Bigaradier de Oued Alleug, **B**: Bigaradier de Bab Dzair).

Le mode opératoire :

Le tableau suivant repris les différentes méthodes d'analyse phytochimique. (EL-Haoud et al. 2018) **Tableau 03** : méthodes d'analyses phytochimique

Flavonoïdes	5ml d'éthanol chlorhydrique (4ml éthanol + 1ml HCl) additionnés deux à trois copeaux de Mg (15mg Mg)
Alcaloïdes	Introduire 10 g de poudre végétale sèche dans un erlenmeyer, à laquelle 50ml de H ₂ SO ₄ dilué au 1/10 avec de l'eau distillée est ajouté. Ce mélange a été agité et macéré pendant 24 h. Ensuite, dans 1ml du filtrat, 5 gouttes de réactif de Drangendroff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité orange, révèle la présence d'alcaloïdes
Glycosides cardiaques	Deux ml de chloroforme est ajouté à 1 ml de l'extrait, l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H ₂ SO ₄ indique la présence des glycosides cardiaques
Composés réducteurs	Leur détection consiste à introduire 2ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 2ml de la liqueur de Fehling sont ajoutés. Ensuite, l'ensemble est porté au bain-marie bouillant durant 8 min. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs
Tannins	La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl ₃ diluée à 1% L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins. L'apparition d'une coloration verte foncée indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleue-verte indique la présence des tanins galliques
Saponines	Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2,3,...,10ml de la solution à analyser préparer par infusion. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer la hauteur de la mousse produite dans chaque tube. L'indice de mousse (I) est calculée par la formule suivante $I = 1000 / N$ N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm
Huiles essentielles	1 g de matériel végétal a été introduit dans 10 ml de dichlorométhane puis l'extrait a été évaporé à sec. Le résidu a été ensuite dissous dans 3 ml d'éthanol. Puis, la solution a été évaporée à sec de nouveau. La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles
Substances extractibles par l'eau	Introduire dans un ballon 1 g de poudre et 20 ml d'eau distillée, puis faire une décoction pendant 15 mn et laisser refroidir pendant 20 mn. Filtrer sur du papier filtre et peser une capsule vide (n) et mettre le filtrat dans cette capsule, ensuite évaporer à sec et peser la capsule avec le résidu (n'). Substances extractibles par l'eau = (n' - n) x100

2-2- Extraction des huiles essentielles :

Le but de ce processus est d'extraire l'huile essentielle de Bigaradier (*Citrus aurantium L*) et la détermination de rendement en HE.

2-2-1- La récolte de la plante :

Les fruits et les feuilles de bigaradier ont été récoltés dans la ville de Blida (région de Mitidja) dans deux zones différentes, la première récolte de zone de Bab Dzair en mois de Février, et pour la deuxième récolte dans la zone d'Oued Alleug durant la période du mois de Mars 2023.



Figure 05 : Les feuilles et les fruits de *Citrus Aurantium L*

2-2-2- Méthode d'extraction :

Les feuilles et l'écorces des fruits de *citrus aurantium L* fraîchement utilisés pour l'extraction des huiles essentielles. On a utilisé la technique d'hydrodistillation au niveau de l'institution BIO.EXTRAPAMAL pour la distillation des plantes aromatiques et médicinales, selon le mode d'extraction suivant :

On a met notre plante avec l'eau dans l'alambic (chaque 1kg de la plante dans 1 à 2 litres d'eau) et porter le tout à ébullition, avec température [80° à 100°C [

Les vapeurs chargées de substances volatiles sont condensées dans un réfrigérant, puis les huiles essentielles séparées de l'eau dans l'essencier (appareil qui piéger ou séparer l'huile essentielle de l'eau)

Après 4heures de distillation on a obtenu deux phases :

-Une phase huileuse : huile essentielle.

-Une phase aqueuse : hydrolat.



Figure 06 : Montage d'hydrodistillation

2-2-3- Conservation des huiles :

Les huiles essentielles sont fragiles et peuvent se détériorer dans de mauvaises conditions de stockage. Elles doivent donc être conservées dans leurs contenants en verre d'origine. Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF 75-002, 1996) dans un endroit frais à l'abri de la lumière et des sources de chaleur. Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons. Évitez de vous allonger sur les bouteilles afin que les huiles essentielles n'entrent pas en contact avec le compte gouttes en plastique pendant une longue période car les huiles ont un effet corrosif sur le plastique (**Jouault, 2012**)

2-2-4- Rendement en Huile Essentielle :

En se référant aux normes **AFNOR (2000)**, le rendement en huile essentielle est défini par le rapport entre la masse d'huile essentielle (MHE) et masse de la matière végétale (MV). Il est exprimé en % et donné par la relation ci-dessous :

$$R_{HE} = (M_{HE} / M_{V}) \cdot 100$$

Avec :

R_{HE} : Rendement en Huile Essentielle en %.

M_{HE} : la masse d'huile essentielle en (g).

M_V : masse de la matière végétale en (g).

2-3- Contrôle de Qualité:

Le but de contrôle de qualité est de détecter, évaluer et Améliorer la qualité d'un produit. Notre contrôle elle est effectuée au niveau de laboratoires venus.

Le contrôle de qualité est divisé en :

2-3-1- Propriétés organoleptiques :

Les propriétés organoleptiques d'une HE jouent un rôle primordial avant consommation, et peuvent être évaluées lors d'une analyse sensorielle.

Les principales caractéristiques sont : l'aspect visuel, la couleur, l'odeur,...

2-3-2- Propriétés physicochimiques :

Les propriétés physiques et chimiques du produit permettent de déterminer le comportement physico-chimique d'une HE; les principaux paramètres sont: le PH, la densité, l'indice d'acide, l'indice de réfraction, l'indice de saponification,...

LE pH :

Le pH des huiles essentielles se situe entre 4 et 6. C'est effectivement légèrement acide **(Daniele festy en 2011)**

MODE OPERATOIRE :

Lorsque l'on dépose une goutte de HE dont on veut déterminer le pH, il change de couleur et il suffit alors de comparer cette couleur avec l'échelle de teinte inscrite sur l'emballage.

Densité relative à 20 °C :

Rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20 °C, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20 °C. **(ISO 279:1998(fr))**

$$d = \rho(\text{HE}) / \rho(\text{eau}) = (m(\text{HE}) / V) / (m(\text{eau}) / V) = m(\text{HE}) / m(\text{eau})$$

d : la densité

$\rho(\text{HE})$: la masse volumique d'HE

$\rho(\text{eau})$: la masse volumique d'eau

V : le volume

m (HE) : la masse d'un volume d'HE

m (eau) : la masse d'un volume d'eau

L'indice de réfraction IR :

Les indices de réfraction (n) des huiles essentielles sont mesurés avec un réfractomètre CONVEX. Ce réfractomètre est basé sur le principe de la déviation angulaire provoquée par la réfraction de la lumière. **(C. Kanko et al 2004)**

L'indice d'acide de l'huile :

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de matière Grasse ; tandis que l'acidité d'un corps gras est le pourcentage d'acides gras libres exprimé conventionnellement en acide oléique. L'acidité se déduit de l'indice d'acide et est une expression conventionnelle du pourcentage d'acides gras libres. Ces deux indicateurs chimiques ont été déterminés suivant la norme NFV 03-906 (AFNOR, 1984)(**K. M. NOVIDZRO et al en 2019**).

Mode opératoire :

Dans une fiole on met un gramme de l'huile essentielle on y ajoute 50 ml d'éthanol 96% et 2 gouttes d'indicateur coloré Phénolphthaléine on les titrer par le KOH à 0,1N jusqu'à l'apparition du coloré rose, on lire le volume de KOH après on détermine l'indice d'acide par la formule suivante :

$$I_a = (N \cdot 56,1 \cdot V) / m$$

I_a : Indice d'acide.

N : la normalité de KOH.

56,1 : la molarité de KOH.

V : volume de KOH.

m : masse d'HE.

Indice de saponification de l'huile :

L'indice de saponification (InS) se définit comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour saponifier un gramme de matière grasse. Ce paramètre a été déterminé suivant le protocole décrit par la norme NF T 60-206 (AFNOR, 1984) (**NOVIDZRO. K. M. et al. 2019**)

Mode opératoire :

Dans une fiole liée avec un système de refroidissement on met 2g de HE + 25ml de la solution alcoolique on la met dans un bain d'eau à T≈90 C° pendant 1h après 1h on récupère notre fiole et on ajoute 2 à 3 gouttes de phénolphthaléines et titrer par HCL 0,5N sous l'agitateur magnétique jusqu'à la disparition de la couleur. On lire le volume de HCL après on détermine l'indice de saponification par la formule suivante :

$$I_{\text{sap}} = (N \cdot 56,1 (V_t - V_e)) / m$$

I sap : Indice de saponification.

N : Concentration d'HCL en mol.

56,1 : Molarité de KOH.

V_t : Volume d'HCL versé témoin en ml (donne $V_t=22,4$ ml).

V_e : Volume d'HCL versé essai en ml.

m : masse d'huile en gramme.

Indice d'ester de l'huile :

Défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier les esters d'acides gras dans un gramme d'huile. On détermine l'indice d'ester par la formule suivante :

$$\text{L'indice d'ester} = \text{Indice de saponification} - \text{Indice d'acide}$$

2-3-3- Contrôle microbienne :

L'objectif de ce test est la vérification de la qualité intrinsèque de notre HE et la détermination des germes totaux.

Mode opératoire :

Préparation des échantillons : Placer 1 ml d'HE dans 9 ml de diluant et incuber pendant 15 minutes.

Après les 15 min on étaler quelques gouttes de notre dilution sur boîtes pétri qui contient le milieu de culture; pour l'identification des bactéries on utilise milieux PCA et mettre incuber à T 32°C pendant 3 jour; pour les levures et moisissures on utilise le milieu sabouraud et mettre

2-4- Activités Biologiques :

2-4-1- Activité antibactérienne :

L'objectif de cette analyse est d'évaluer l'activer antibactériens des huiles essentielles par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion sur les disques (Aromatogramme).

Principe :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible et apprécie par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Matériel et produit utilisé :

Milieu de culture (Gélose Meuler Hinton), Eau physiologique, DMSO, HE, boîte de Pétri, Tube à essai, Écouvillon, Disques de (6mm).

Mode opératoire :

1- Préparation des souches bactériennes :

Dans un endroit stérile et à l'aide d'une anse on prend une clone de la souche, on les diluée dans 10 ml d'eau distillée stérile, on laisse incubé 15 à 30 min.

2- Coulage des boîtes de pétri :

Après la fonte de gélose par autoclave à 120°C pendant 15 à 20 min, tous ont coulé aseptiquement une couche de 04 mm d'épaisseur dans des boîtes de pétri en plastique stérile et rondes, de 90 mm de diamètre, ces derniers doivent être séché durant 30 minutes à une température ambiante, au laboratoire, avant leur emploi.

3- Préparation des dilutions de l'HE :

Une série des dilutions de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L* dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde) a été réalisée, on prépare 3 dilutions : 50%, 25%, 12,25% dans des tubes en verre stériles :

Tableau 04 : Préparation des dilutions de l'huile essentielle.

Les dilutions	Mode de préparation
100%	1ml de l'huile essentielle seul.
50%	500 µl de tube 100% + 500 µl de DMSO
25%	500µL de tube 50% + 500 µl de DMSO
12,25%	500µL de tube 25% + 500 µl de DMSO

4- L'ensemencement :

-Le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton (MH), qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (évite la contamination).

- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

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

- Répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

5- Imprégnation des disques :

Dépôt des disques, Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques préalablement préparés sont disposés sur la surface de la gélose dans des conditions stériles, à raison de quatre disques par boîte de pétrie pour les différentes dilutions, à

L'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Puis, ils ont été imbibés par les dilutions qui on à préparer.

Les témoins : (T+) c'est la Gentamicin ; (T-) c'est le DMSO.

Incubation des souches dans l'étuve à température 37° pendant 24 heures pour les bactéries.

6- Lecture des résultats :

L'huile essentielle possède une activité antibactérienne, si le diamètre de la zone d'inhibition obtenu après incubation, dépasse le diamètre du disque. Les diamètres des zones d'inhibition, sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. Ils sont classés en 4 classes :

Tableau 05 : Classement des zones d'inhibition.

La sensibilité	Diamètre
Souche résistante	D=6
Souche sensible	$7 \leq D \leq 11$
Très sensible	$12 \leq D \leq 16$
Extrêmement sensible	$D \geq 17$

2-4-2- Activité antioxydant :

L'évaluation de l'activité antioxydant des deux huiles essentielles extraites à été effectuée selon la méthode de piégeage des radicaux libres de DPPH.

Piégeage du radical DPPH :

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. **(Haddouchi et al, 2016)**

Le DPPH est un radical stable en solution et apparaît de couleur violette absorbant à une longueur d'onde de 517 nm. Ce test est basé sur le principe que le DPPH en acceptant un atome d'hydrogène (H) de la molécule piègeuse, c'est-à-dire un antioxydant, entraîne une réduction du radical libre DPPH en composé stable DPPH ; la couleur violette vire au jaune avec une diminution concomitante de l'absorbance à 517 nm. Le changement de couleur est contrôlé par spectrophotométrie et utilisé pour la détermination des paramètres des Propriétés antioxydants.

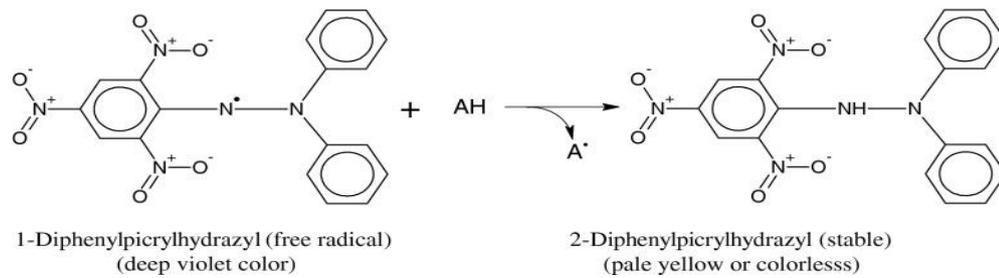


Figure 07 : Réaction radicalaire du DPPH avec un agent antioxydant (AH; piègeur de radicaux libres) et formation d'une forme stable. Les radicaux libres piègeurs sont très stables par rapport aux autres radicaux. (K.Yogesh, SN Jha, et Ahmad. 2014)

Spectrophotomètre :

Le spectrophotomètre est un instrument utilisé systématiquement en recherche scientifique. La spectrophotométrie est la mesure quantitative de lumière qu'une substance chimique absorbe en faisant passer un faisceau lumineux à travers l'échantillon dans un spectrophotomètre.

Dans notre étude, ce test a été évalué par le protocole suivant :

- Préparation d'une solution mère : 2 mg d'HE + 2ml de méthanol. Nous avons testé l'HE des deux plantes étudiées.
- Préparation de 7 dilutions à partir de la solution mère :

Tableau 06 : préparation des dilutions à partir de la solution mère.

100 µg/ml	200 µl de la (S.M) + 1800 µl méthanol
80 µg/ml	160 µl de la (S.M) + 1840µl méthanol
50 µg/ml	100 µl de la (S.M) + 1900 µl méthanol
30 µg/ml	750 µl de la dilution 80 + 1250 µl méthanol
20 µg/ml	500 µl de la dilution 80 + 1500 µl méthanol
10 µg/ml	200 µl de la dilution 100 +1800 µl méthanol
5 µg/ml	100 µl de la dilution 100 +1900 µl méthanol

•Brièvement, 1ml d'une solution méthanolique de DPPH 2,4% (2,4mg du DPPH dans 100ml du méthanol) a été mélangé avec 1ml des dilutions dans des tubes secs. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière, à la température ambiante pendant 30minutes. Puis l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde 517 nm contre un témoin composé de la solution méthanolique de DPPH.

Les échantillons, le témoin : la solution méthanolique de DPPH ; et le blanc : le méthanol ainsi qu'une solution de 2mg de vit c dans 2 ml de méthanol (qui servira de référence) sont préparés dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 517nm.

Expression des résultats :

Le calcul des pourcentages d'inhibition est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Calcul d'IC50 :

L'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. Elle a été par la suite calculée à partir de l'équation des courbes tracées qui déterminent le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations.

Chapitre 03 :

Résultats et discussion

1- Résultats de l'étude phytochimique :

1-1- Détermination de la teneur en eau :

Les valeurs obtenues de la teneur en eau de *Citrus aurantium L.* Présentée dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Teneur en eau contenue dans *Citrus aurantium L*

Espèce	PF (g)	PS(g)	TE(g)	TE(%)
Citrus aurantium L. (A)	250.13	96	154.13	61.61
Citrus aurantium L. (B)	230.86	74	156.86	67.94

PF : Poids frais ; **PS :** Poids sèches ; **TE :** teneur en eau

Le tableau représente les valeurs de teneur en eau de *Citrus aurantium L* (feuille) des deux régions déférentes Oued el Alleug et Bab Dzair .Nous constatons que le *Citrus aurantium L* comme la plupart des végétaux riche en eau où l'on trouve élevé dans la région de Bab Dzair d'un pourcentage de 67.94% par rapport la région de Oued el Alleug on a obtenu 61.61%.

1-2- Test phytochimique (Screening) :

Le screening phytochimique effectué sur la partie aérienne (feuilles) de *Citrus aurantium L.* Dans deux régions déférentes. Les résultats obtenus sont présenté dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Résultats de test phytochimique de plante étudiée *Citrus aurantium L.*

Composées	Echantillon A	Echantillon B
Flavonoïdes	++	-
Alcaloïdes	+++	++
Huiles essentielles	+++	-
Composés réducteurs	++	+
Glucosides cardiaque	++	+
Éléments extractibles pour l'eau	+++	++
Tanins (tanins catéchiques)	+++	++
Saponines	-	+

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : Négatif

Les résultats du tableau révèlent la présence des composés chimiques test que les Flavonoïdes et l'huile essentielle dans la régions de oued el Alleug (échantillon A) par rapport à leur absence dans l'échantillon de la régions de Bab Dzair (échantillon B) , aussi nous remarquons une richesse dans les Alcaloïdes , Composés réducteurs, Glucosides cardiaques , Tanins (Catéchiques) , Élément extractible pour l'eau, Contrairement aux Saponines qui sont présents dans l'échantillon B et son absence total dans L'échantillon A.

2- Résultats d'extraction des huiles essentielles :

2-1- Rendement de l'extraction :

Les résultats de rendement (%) de deux huiles essentielles (feuilles et fruits) extraits sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Rendement des huiles essentielles extraites.

	Echantillon d'oued el Alleug		Echantillon de Bab Dzair	
	HE de fruits	HE des feuilles	HE des fruits	HE des feuilles
Masse d'HE	25,501	21,633	3,4	0
Masse de Mv	11kg (écorce)	11kg	10kg	2kg
Le rendement	0,23	0,20	0,034	/

Le tableau représente les valeurs du rendement en huile essentielle de *Citrus aurantium* L. (fruits et feuilles) pour deux régions différentes de la région de Mitidja, à savoir Oued el-Alleug et Bab Dzair, car les résultats montrent une légère différence dans le rendement en huile essentielle de fruits et de feuilles, où le rendement des feuilles a été estimé à 0,20 et le rendement de fruit était de 0,23. C'est pour l'échantillon d'Oued el Alleug. Quant à l'échantillon de Bab Dzair, le rendement des fruits était estimé à 0,034, alors que nous n'avons enregistré aucun rendement au niveau des feuilles.

D'après les résultats du tableau, il ressort, en général, que le rendement en huile essentielle des plantes de ferme (Oued el Alleug) est supérieur à celui des plantes ornementales (Bab Dzair).

Par comparaison avec d'autres études qui ont été faites sur les huiles essentielles extraites à partir des feuilles de la même espèce, le rendement obtenu 0,20% est inférieure à celui obtenu par Hamdani et Allem. (2017) sur les feuilles de *Citrus aurantium* L (0,73%). tandis que, Hellal, 2011 a obtenu un rendement de (0,60%) sur la même espèce.

Notre résultat de rendement de l'huile essentielle obtenu à partir des écorces (0,23) est inférieur à ceux rapportés par Hosni et al. (2010) sur *Citrus aurantium* tunisien (1,24%). Et celui obtenu par Boumenikhra. (2014) (1,073) récolté en Algérie.

La variabilité du rendement en huiles essentielles pourrait être expliquée par plusieurs facteurs, saison de récolte, localisation géographique, l'organe utilisé, l'espèce, les conditions pédoclimatiques, ainsi la technique d'extraction.

3- Résultats de Contrôle de qualité :

3-1- Propriétés organoleptiques :

Les huiles essentielles de l'espèce de *Citrus aurantium L* présentent un aspect liquide, limpide et mobile, transparent, elles sont caractérisées par une odeur fraîche, fruitée et épicée.

Les caractérisations organoleptiques de nos huiles essentielles extraites de *Citrus aurantium L* sont résumées comme suit :

Tableau 10 : propriétés organoleptique des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Citrus aurantium L*.

		Aspect	Couleur	Odeur
Echantillon Oued el Alleug	HE des feuilles	Liquide, limpide et mobile	Transparent	Fraiche et épicée
	HE des fruits	Liquide, limpide et mobile	Transparent	Fraiche, fruité et épicée
Echantillon de Bab Dzair	HE des fruits	Liquide, limpide et mobile	Jaune très pale à transparent	Fraiche, fruité et épicée

3-2- Analyse physico-chimique :

Les résultats des analyses physico chimique des huiles essentielles de *Citrus aurantium L* (Fruits et feuilles) sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Résultat d'analyse physico-chimique des huiles essentielles extraites de *Citrus aurantium L.*

Spécification	Région d'Oued el Alleug		Région de Bab Dzair	F.Z Hamdani ; R. Allem (2017)
	Huile essentielle des fruits	Huile essentielle des feuilles	Huile essentielle des fruits	
La densité	0,718	0,834	0,853	0,863
Indice de réfraction	1,472	1,459	1,483	1,475
Le pH	5	5	6	HE fruit 4,8 HE feuille 5,2
Indice d'acide	0,561	1,683	/	1,40
Indice de saponification	215,98	237,02	/	/
Indice d'ester	215,418	235,337	/	/

Densité relative :

La densité relative constitue un critère très important pour évaluer la qualité et la naturalité d'une huile essentielle dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, etc.).

A partir du résultat, on remarque que les résultats de la densité de l'HE obtenue sont inférieurs à celui de l'eau (1kg/L), donc, on peut dire que l'huile essentielle de *Citrus aurantium L* extraite à partir des écorces fraîches est conforme aux normes internationales. Selon l'association Française de Normalisation, les HE appartenant aux genres Citrus doivent avoir une densité maximale de 0,876 (Afnor, 2002).

L'indice de réfraction :

L'indice de réfraction c'est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Ce rapport indique la capacité des HE à réfléchir la lumière. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande.

Par comparaison avec d'autres études, les valeurs de l'indice de réfraction de nos huiles essentielles sont proches et similaires à celles obtenues par (Hamdani et Allem, 2017).

(1,475), et aussi à celles obtenues par Hellal, 2011. (1,476). Alors dans notre étude, l'indice de réfraction des deux parties du bigaradier (fruits et feuilles) a été dans les normes internationales.

Le potentielle d'hydrogène pH:

D'après notre analyse par papier pH; le pH des feuille et des fruits de la région de Oued el Alleug estimée à 5 elle est plus acide par rapport au pH des fruits des la région de Bab Dzair estimée par 6.

En comparaison avec Hamdani et Allem en 2017 qui on trouver le pH des feuilles 5,2 et pour le pH des fruits 4,8 sont presque les même valeurs.

L'indice d'acide :

Notre résultat montre que l'indice d'acide de l'huile essentielle des fruits qui il est estimé à (0,56) est plus faible par a port des feuilles (1,69) de *Citrus Aurantium L*

L'indice d'acide de l'huile essentielle des feuilles est estimé à 1,69, ce résultat est supérieur à celui obtenue par Hamdani et Allem, (2017) (1,40) sur les feuilles de même espèce. Tandis que, l'indice d'acide de l'HE des fruits qui est estimé à 0,56 est inférieur à celui obtenue par Boumenikhra, (2014) (1,12) à partir de l'écorce de *Citrus aurantium L*.

Indice de saponification :

A travers les résultats présentés dans le tableau, nous constatons que l'huile essentielle des feuilles de citrus Aurantium révèle un indice de saponification estimé à 237,02 supérieurs à celui révèle par les fruits estimés à 215,98.

Indice d'ester IE :

Dans notre étude l'indice d'ester de l'huile essentielle des fruits (215,419) est inférieur à l'indice d'ester de l'huile des feuilles qui estimé à (235,337).

Les variations des grandeurs physicochimiques peuvent être attribuées à la composition chimique de l'huile essentielle étudiée. **(Bourkhiss et al. 2015).**

3-3- Résultat de contrôle microbien :

D'après les résultats qui on a obtenu notre huile elle conforme (absence des germes)

4- Résultat de l'activité antibactérienne :

Après les analyses qui nous avons faites de l'effet de l'huile essentielle des feuilles et fruits d'Orange amer sur certaines souches bactéries de Gram positives et négatives, nous avons pu dresser le tableau représenté ci-dessous :

Tableau 12 : Valeurs des zones d'inhibition des deux huiles sur les souches étudiées.

	Témoins		HE de fruits				HE des feuilles			
	T+	T-	100	50	25	12,5	100	50	25	12,5
Souches bactérienne										
Escherichia Coli (Gram -)	22	-	10	8	-	-	10	8	-	-
Staphylococcus Aureus (Gram +)	32	-	9	-	-	-	18	17	20	-
Bacillus Subtilis (Gram +)	24	-	10	-	-	-	34	18	16	10
Salmonella Abony (Gram-)	22	-	-	9	8	-	7	7	-	-

D'après les résultats mentionnés dans le tableau suivant, nous possédons une activité antibactérienne haute chez les feuilles envers les *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition 43 mm et les *Staphylococcus aureus* un diamètre de 18 mm et moins envers *Escherichia coli* et *Salmonella abony* entre 10 _7 mm. Et pour les fruits on observe une activité antibactérienne faible pour toutes les souches bactériennes avec un diamètre d'inhibition entre 8 à 10 mm.

Ce qui constate de ces résultats que les bactéries de gram + (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) sont très sensibles vis-à-vis l'huile essentielle de *Citrus aurantium L* des feuilles par rapport l'huile essentielle de fruit sont résistantes et par rapport le gram-, Et aussi nous avons constatés que les bactéries de gram- (*Escherichia coli* et *Salmonella abony*) sont des bactéries résistantes au contact avec l'huile essentielle de feuille et fruits.

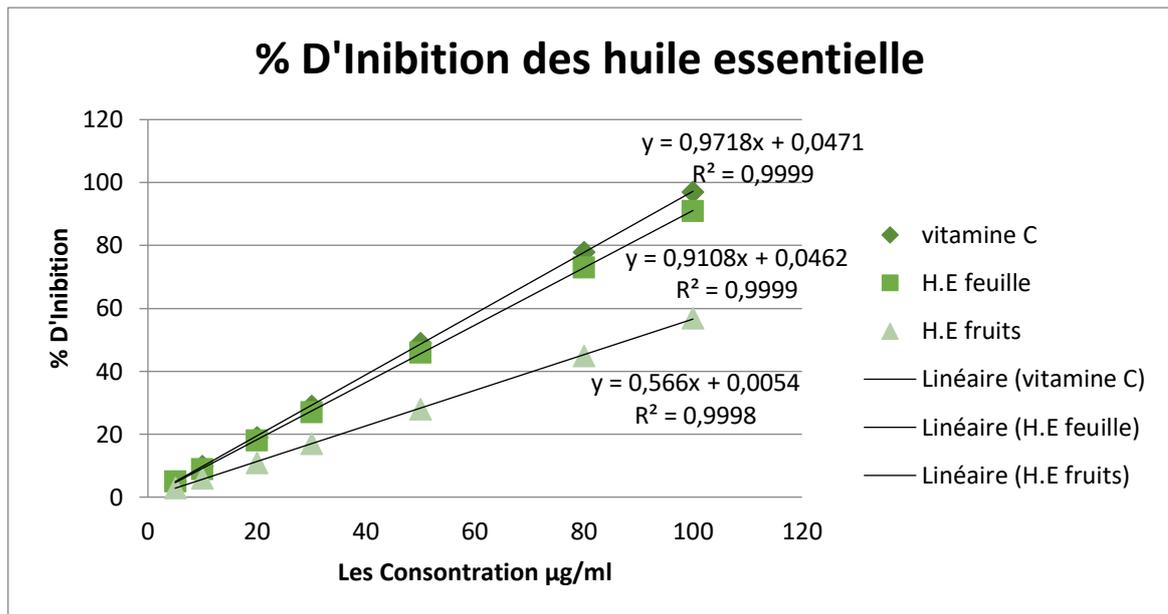
On constate que l'HE des feuilles elle a un effet important par rapport au HE des fruits.

5- Résultat de l'activité antioxydant :

Nous avons évalué l'activité antioxydant des huiles essentielles de *Citrus aurantium L* assavoir les feuilles et écorce des fruits frais de la même plante par cette méthode de DPPH afin de déterminer l'huile ou la partie de la plante la plus active ou l'acide ascorbique et utilisé comme molécule de référence.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées dans la figure suivante qui montre la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos huiles.

Figure 08 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des huiles du *Citrus aurantium L* et de l'acide ascorbique.



D'après les courbes illustrées précédemment, on remarque que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration pour tous les extraits étudiés. Il semble que l'activité anti-radicalaire est fortement dépendante des concentrations des extraits, plus l'extrait est concentré, plus l'activité est élevée. Autrement dit, le pourcentage d'inhibition du radical est proportionnel à la concentration des différents extraits utilisés.

Nous remarquons que l'huile essentielle des feuilles présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé estimé à 91 %, suivi par l'huile des fruits, avec un pourcentage d'inhibition de 57 %, alors que l'acide ascorbique a montré une grande capacité à inhiber le radical DPPH égale à 97 %.

L'étude réalisée par Ben Mouloud en 2021, a montré que l'huile essentielle de fruit de bigaradier de la wilaya d'Ain-Temouchent présente un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 33,04%, cette valeur est inférieure à nos résultats.

Ces différences s'expliquent par les différentes compositions chimiques des mêmes espèces d'agrumes dans différentes régions.

Détermination des IC50 :

Nous avons déterminé à partir des graphes les concentrations correspondantes à 50% D'inhibition (concentration inhibitrice 50) pour chaque huile, c'est-à-dire la concentration requise pour piéger les radicaux DPPH à 50%. Plus la valeur de L' IC 50 est petite, plus l'activité anti radicalaire de l'huile est grande. Les valeurs obtenues classer dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Valeur des IC50 des huiles et de l'acide ascorbique.

Extrais	IC50 (mg/ml)	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Huile des feuilles	0,0548	54,8
Huile des fruits	0,0883	88,3
Acide ascorbique	0,0514	51,4

D'après les valeurs des IC50 obtenues dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que l'huile des feuilles présente l'IC50 (0,0548mg/ml) le plus proche à celui d'acide ascorbique (0,0514mg/ml), suivi par l'huile des fruits (0,0883mg/ml). Cependant, l'huile des feuilles possède le plus faible IC50 par rapport à l'autre huile, alors possède la plus grande activité anti radicalaire.

Les travaux de Korchi et Silmi en 2021 sur HE des feuilles avec une valeur d'IC50=382,88 $\mu\text{g/ml}$ et IC50=350,78 $\mu\text{g/ml}$ pour HE des fruits supérieure à notre résultats.

L'étude réalisée par TOUIL et BOUCEDRA EN 2022 sur l'extrait d'écorce de citron et d'orange de la wilaya de Mostaganem montre une valeur d'IC50 2,943 mg/ml et 0,125 mg/ml ; ces résultats sont proche a celle de nous.

On constate que notre huile essentielle est plus active, ce qui peut être du à sa composition chimique les facteur édaphiques et pédologiques .

Conclusion générale

Conclusion Générale :

L'étude des huiles essentielles est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales.

L'huile essentielle (HE) est l'extrait le plus puissant et évolué du règne végétal. Elle est présente dans les plantes dites « aromatiques ». Sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et antioxydants très intéressantes à mettre à Profit dans la préservation des produits alimentaires.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une évaluation des sous-produits des fruits et feuilles des agrumes de la région de Mitidja, spécialement les huiles essentielles, Par caractérisation physicochimique et le test phytochimique des HE de *Citrus aurantium L* extraites par l'hydrodistillation, et en suit évaluation de leur activité antioxydante et antibactérienne.

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de la partie aérienne de *Citrus aurantium L* révèle un rendement de 0,23% pour les fruits et 0,20% pour les feuilles. Pour le test phytochimique réalisé sur les feuilles du bigaradier, montre la présence de la plupart des composé testés, flavonoïdes, alcaloïdes, composés réducteurs, glucoside cardiaque, tanin, éléments extractibles pour l'eau, En outre, les feuilles de l'orange amère s'est révélé une bonne source en huiles essentielles.

Concernant les caractéristiques organoleptiques et physicochimiques, elles sont comparables aux deux parties (fruits et feuilles) de *Citrus aurantium L*, et demeures conformes aux normes internationales.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Citrus aurantium L* à été réalisée in vitro sur quatre souches microbiennes, les résultats de l'aromatogramme montrent que notre HE des feuilles ont un pouvoir inhibiteur très important contre les bactéries de Gram positive (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) de diamètre d'inhibition 19,5mm_13,75mm respectivement, et un pouvoir inhibiteur faible contre les bactéries Gram négative (*Escherichia coli* et *Salmonella abony*).

Par contre, l'HE des fruits présenté un faible pouvoir inhibiteur contre tous les souches bactériennes, à divers dilutions.

L'étude de l'activité antioxydante des deux huiles de *Citrus aurantium L* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que les feuilles ont un pouvoir très important par rapport aux fruits, avec une faible concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres (0,0548 mg/ml).

Pour mieux valoriser ce type d'études Il serait :

- Etudier d'autres types d'agrumes, et d'extraire leurs huiles essentielles de leurs différentes parties, feuilles, fruits et fleurs, avec différentes techniques.
- Mener le processus d'extraction à différents moments de l'année pour déterminer le moment idéal pour obtenir un bon rendement en huiles.
- Evaluer d'autres activités biologiques telles que l'activité antifongique ; anti-inflammatoire ; anticancéreuse ...
- Etudier d'autre extrait de partie de plante par des solvants différents.

Références Bibliographiques

- **AFNOR. (2000)** « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 661-663.
- **Alain April, Claude Laporte. 2011.** Assurance Qualité Logicielle 1 -concepts de base, Hermes-Lavoisier ; 2011, (ISBN 9782746231474).
- **Benlaksira** Chapitre 7: anatomie végétal /fruit **2016**
https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours_Ligne/cours_21_22/Alimentation_A2/chapitre_7_botanique.pdf
- **Ben Mouloud Fatima Zahra 2021.** « Etude photochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce de bigaradier Citrus Aurantium L.
- **Ben Seddik Khedidja Zohra, Ben Seddik Mustapha Oussama 2021.** « L'effet de méthode d'extraction sur la production d'huiles essentielles a partir de Citrus Aurantium (région de Ghardaïa) » département de Génie des procédés ,université de Ghardaïa .
- **Boumenikhra. K, 2014.** Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles de trois espèces d'agrumes. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Blida 1. Mémoire de master.
- **Bourkhiss .M., Chaouch.A., Ouhssine.M., Bourkhiss.B. et Rassam A., 2015.** ÉTUDE PHYSICOCHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE TETRACLINIS ARTICULATA (VAHL) MASTERS DU PLATEAU CENTRAL MAROCAIN .LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE, Volume 9, N°37.Maroc.
- **Bruneton, J., (1999).** "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". (3^{ème} Ed.). Paris : Editions médicales internationales, éditions Tec. & Doc. Lavoisier, p 1120.
- **Buchanan, B.B., et Gruissem, W., et Jones, R.L., (2000).**Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists : Rockville, MD. P : 1367.
- **Cerdagne Isabelle. 2004.** « thèse pour le diplôme d'État de docteur en pharmacie. » faculté de pharmacie . Université de Limoges
- **Chauhan, Valentina Singh; Sharma, Alka 2003.** « Studies on organoleptic properties of food products from fresh egg and egg powder through principal component analysis ». Nahrung/Food. 47 (2) : 102–05.
- **Coffi Kanko, Bamba El-Hadj Sawaliho, Soleymane Kone, Gérard Koukoua, Yao Thomas N'Guessan. 2004.** Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de Lippiamultiflora, Cym-bopogoncitratu, Cymbopogonardus, Cymbopogongiganteus, Authorlinks open overlay panel.
- **Daniele festy. 2011.** <https://www.danielefesty.com/2011/032/quel-est-le-ph-dune-huile-essentielle-.html>
- **EL-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., et Bengueddour, R., 2018.** SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE : Mentha Spicata L. Université Ibn Tofaïl. Kénitra. Maroc
- **Elyemni, M. , Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M., and Nouredine Eloutassi, 2019.**Extraction of Essential Oils of Rosmarinus officinalis L. by Two Different Methods : Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. The Scientific World Journal.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463580/#:~:text=The%20extrac%20of%20essential%20oils,extremely%20energy%20and%20solvent%20consuming>

- **Eristanna, P., Vito, A. L., & Maria, A. G. (2013).** Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 3042-3049.
- **Eurofins Scientific. 2022.** Evaluation de la qualité microbiologique <https://www.eurofins.fr/cosmetique/services/microbiologi>
- **Fondée en 2007,** AgroParisTech, l'institut national des sciences et industries du vivant et de l'environnement, est un établissement public placé sous la tutelle du ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. <https://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>
- **Françoise Couic-Marinier , Annelise Lobstein, (2013).** Composition chimique des huiles essentielles <http://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.02.006>
- **Grib.k, Boumaaza. A. 2018.** Etude des propriétés pharmacologiques des extraits d'une plante médicinale *Ruta chalepensis* L et formulation pharmacologique ; université Saad Dahlab ; Blida 1.
- **Haddouchi .F., Chaouche T.M., Halla.N.2016.** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique De quatre plantes sahariennes d'Algérie. *ETHNOPHARMACOLOGIE*. Lavoisier SAS 2016.
- **Hadrich.B., Dahak. K., Abdenouri .N. et N. Kechaou .2008.** « Étude de séchage des feuilles de bigaradier » *Revue des énergies renouvelables SMSTS '08 Alger* , (2008) : 145-149.
- **Hamdani F.Z., Allem. 2015.** Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles De Citrus vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. *Phytothérapie* (2017) 15 :263-266
- **HELLAL Z., 2011,** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pulchardus*), *Mém. Mag., univ. Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou*, p. 120.
- **Hendrix, C. M. And J.B. Redd 1956.** « chemistry and technology of citrus, citrus Products and byProducts. » United states department of agriculture.
- **Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., & Sebei, H. (2010).** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.
- **ISO 279 :1998(Fr)** Huiles essentielles — Détermination de la densité relative à 20 degrés C.
- **Jdidi Imen. 2015.** Etude phytochimique et activités biologiques des extraits et des huiles essentielles de *foeniculum vulgare* mill. Institut national agronomique de Tunisie.
- **JOUAULT, S. 2012.** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Université de Lorraine.
- **Lahlou mouhssen. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *PhytotherapyResearch : An International*

Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 18(6), 435-448.

- **Mallappa Kumara Swamy, Mohd Sayeed Akhtar , et Uma Rani Sinniah. (2016).** Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid Based Complement Alternat Med*.
- **National Academy of Sciences 2014. All rights reserved. Bookshelf ID: NBK253956**
- **NOVIDZRO. K. M., WOKPOR. K., AMOUSSOU FAGLA. B., KOUDOUVO. K., DOTSE .K., OSSEYI.E. et KOUMAGLO.KH..2019.** Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments Minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines De *Griffonia simplicifolia*. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 13(4) : 2360-2373, 2019.
- **Ouis, Naouel. (2015).** « Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil ». Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger.
- **Sidana , J., Saini , V., Dahiya , S., Nain ,P., & Bala, S. (2013)** .A review on Citrus – « the Boon of nature » *Int J Pharm. SCI RevRes* , département of pharmaceutical Science . Université Hissar (Haryana) India.
- **Singh, K., Rao, B.R.R., Kaul, P.N., Bhattacharya, A.K., Singh, C.P., 1999.** Yield and quality of three varieties of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by height of harvesting.
- **Véronique, Lucette couderc, (2001).** Toxicité des Huiles Essentielles. Université poul- sabatier de Toulouse, Thèse, 4106, 5p.
- **Wissal Dhifi, Sana Bellili, Sabrine Jazi, Nada Bahloul, and Wissem Mnif.(2016).** Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines (Basel)*. Doi :10.3390/medicines3040025
- **Yi, J; Zhou, L ; Bi, J ; Chen, Q ; Liu, X ; Wu, X. 2016.** « Influence of pre-drying treatments on physicochemical and organoleptic properties of explosion puff dried jackfruit chips ». *J Food Sci Technol.* 53 (2): 1120–29.
- **Yogesh.K ; SN Jha, et Ahmad. 2014.** Potentiel antioxydant de l'extrait aqueux de certaines poudres de céréales alimentaires dans un système de modèle de viande. *Food Sci Technol* 51(11): 3446–3451.

Les Annexes

Les Annexes :

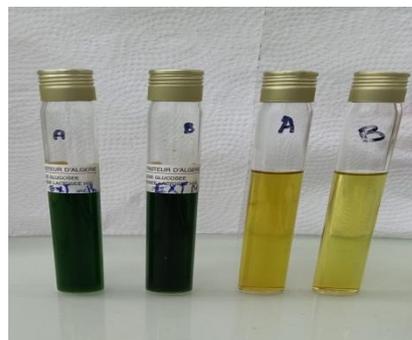


Annexe 1 : La Récolte des feuille et fruits.

Annexe 2 : L'Ecorce de Fruits.



Annexe 3 : Séchage des feuilles.



Annexe 4 : Les extraits méthanolique et aqueuse.

Les Annexes :



Annexe 5 : Résultat de screening phytochimique.

Les Annexes :



Annexe 6 : extraction de l'huile essentielle.



Annexe 7 : Résultat de l'indice de réfraction.

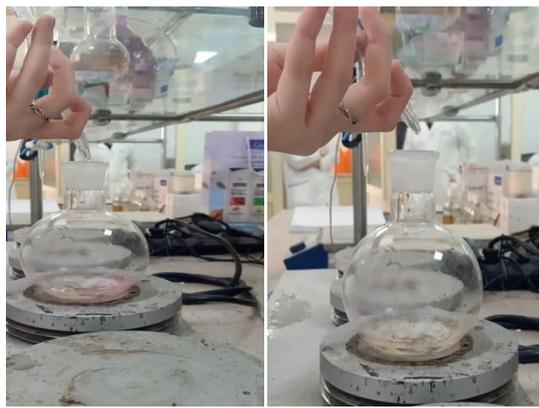


Annexe 8 : Résultat de pH.

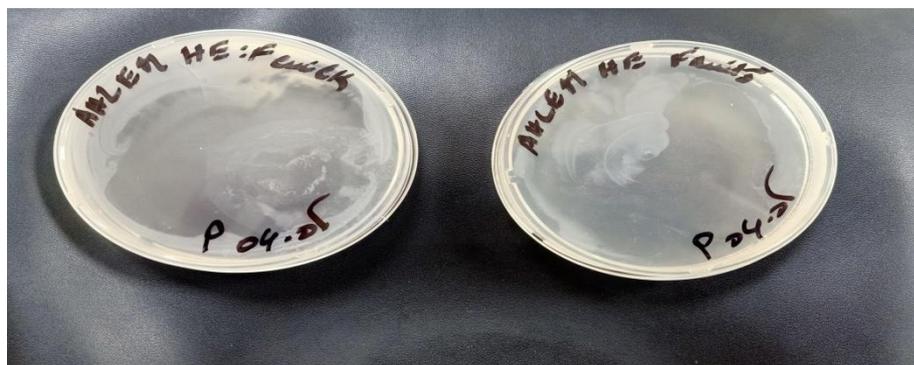
Les Annexes :



Annexe 9 : Résultat de l'indice d'acide.



Annexe 10 : Résultat de l'indice de saponification.



Annexe 11 : Résultat de contrôle bactérienne

Les Annexes :



Annexe 12 :Résultat de contrôle des champings.

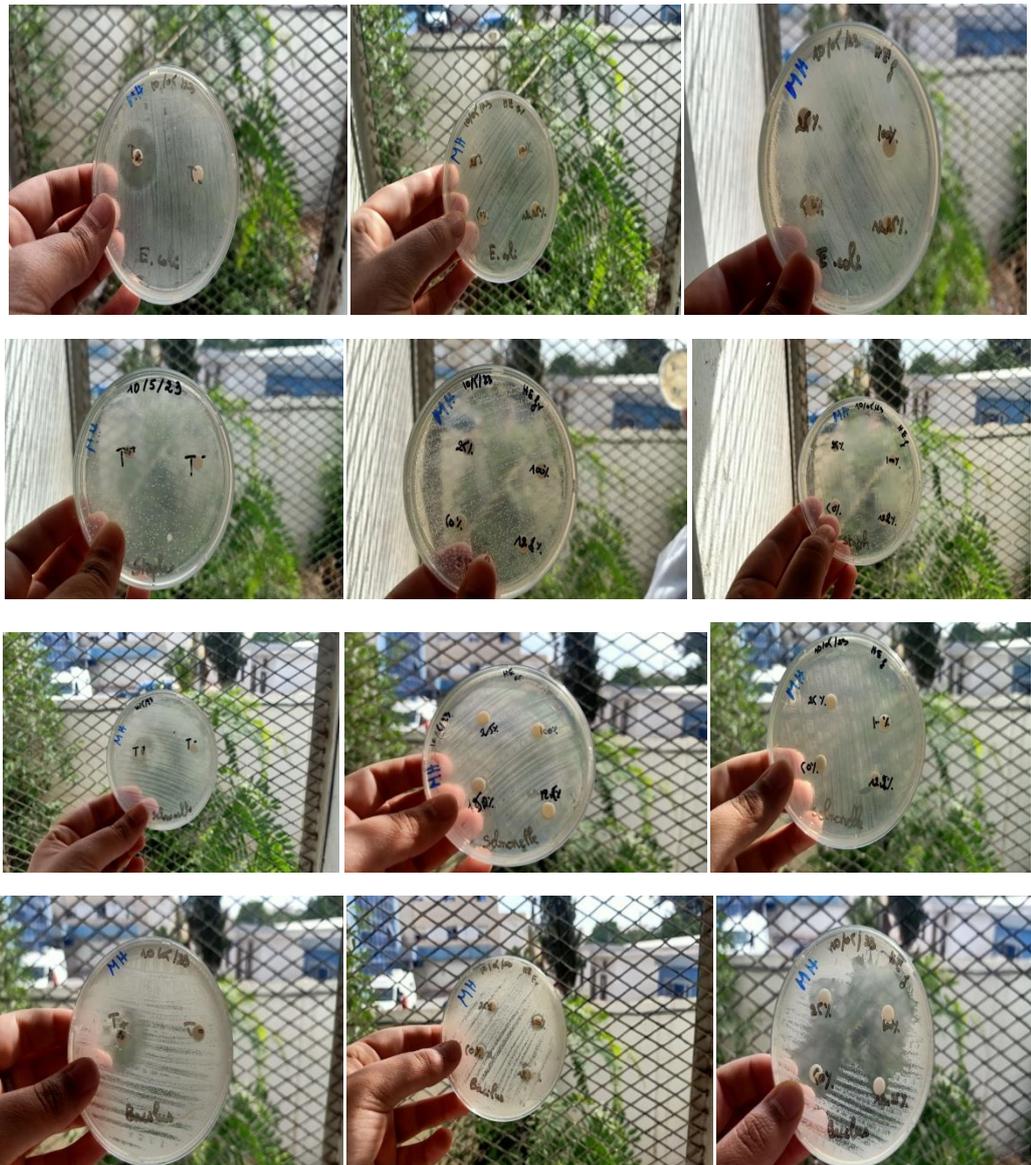


Annexe 13 : Coulage des boites pétries.



Annexe 14 : Ensemencement et Imprégnation des disques.

Les Annexes :



Annexe 15 : Résultat de l'activité antibactérienne.



Annexe 16 : Préparation des déluions de l'activité antioxydant.

Les Annexes :



Annexe 17 : Balance de précision.



Annexe 18 : Spectrophotomètre UV/V