



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB de BLIDA

Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie.

Mémoire De Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme

De Master en Biologie

Filière : Valorisation des plantes à caractère thérapeutique(VPT)

Option: Phytothérapie et santé.

Thème

Etude de l'activité antimicrobienne et cicatrisante de l'huile essentielle des feuilles d'orange(*Citrus sinensis*) et du citron (*Citrus limonum*) et sa mise en évidence dans un produit cosmétique.

Présenté par : Date de soutenance : 12/12/2013

M^{elle} Ould Terki Safia

Devant le jury composé de :

M^{me} KHEDDAM H.

MA(A) (USDB)

Présidente

M^r BOUKHATEM M N.

MA(A) (USDB)

Examineur

M^{me} BENMANSOUR N.

MA(A) (USDB)

Examinatrice

M^{me} BELGUENDOZR.

MA(A) (USDB)

Promotrice

M^{elle} MAMMOUY.

RLCQ (Venus)

Co-Promotrice

Promotion 2013/2014

Remerciements

Je tiens remercier tout d'abord le dieu toutpuissant de nous avoir donné le courage, la force et lapatience pour réaliser ce travail.

Par la suite j'exprime mes profondes gratitudees à Mme BELGUENDOZ. Rmaitre assistante chargé de cours (A) à l'université Saad DAHLEB de Blida, qui a bien voulu diriger mon travail, merci pour votre confiance.

Co-promotrice M^{elle} MAMOU Yesminer responsable du laboratoire demicrobiologie de la société Venus SAPECO, pour ses orientations, sa gentillesse et ses conseils.

Je remercie Mr MOUALHI Cherif, le directeur d'ITAFV ainsi que tous les agents de l'I.T.A.F.V

Je remercie aussi l'ensemble du jury:

Mme KHEDDAM H. maitre assistante (A) à l'USDB qui a accepté de présidé mon jury.

Mr BOUKHATEM M N. maitre assistante (A) à l'USDB et

Mme BENMANSOURN. Maitre assistante (A) à l'USDB, qui ont prie le temps d'examiné mon travail et j'ai profité de leursavoir scientifique.

Je remercie tous les équipes de laboratoire de l'hôpital de Boufarik.

Enfin, un grand merci à toute personne ayant participé de prés ou de loin à la réalisationde ce modeste travail.

Dédicaces

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.

Et à ceux à qui je dois tant

A mes parents : Rabéa et Mohamed pour leur amour et leur support continu. Votre

Affection sans limites, m'a accompagnée tout le long de la réalisation de cette

Œuvre. Je ne pourrai jamais vous en remercier assez.

A Mes frères: Abd elrahim, Walid, Salah éddine et mon adorable sœur Soumia. Vous

Avoir à mes côtés représente un bonheur pour moi.

A mon fiancé Azzedine : qui a toujours été à mes côtés, qui n'a jamais cessé de

m'encourager et m'aider dans mes études.

A toute ma famille et mes amies.

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance

pour tout ce que vous avez fait pour moi.



Safia

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	page
01	Les principales caractéristiques de la variété	04
02	Les principales caractéristiques de la variété <i>Washington navel</i>	07
03	Microorganismes testés	20
04	La distribution des lapins et les produits testés	35
05	Rendement en huiles essentielles	38
06	Propriétés physicochimique des deux huiles essentielles « <i>Citrus sinensis</i> » et « <i>Citrus limonum</i> »	40
07	Diamètre des zones d'inhibition (ZI) montrant l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles	41
08	Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de citronnier (Concentration de 4%)	47
09	Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d'oranger (Concentration de 4%)	50
10	Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle d'oranger (Concentration de 4,5%)	51
11	Résultats de l'effet antimicrobiens des deux HES dans « Roll-on » après 5 jours de conservation	53
12	Résultats de l'effet antimicrobiens des deux HES dans « Roll-on » après 30 jours de conservation	54
13	Résultats du contrôle physicochimiques du « Roll-on » après 30 jours de conservation	55
14	les longueurs des plaies superficielles chez les lapins	Annexe 5

Liste des planches

Planche	Titre	Page
01	L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Citrus limonum</i>	43
02	L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle <i>Citrus sinensis</i>	45
03	Résultats de la CMI des microorganismes de l'HE de citronnier à 4%	49
04	Résultats de la CMI des microorganismes de l'HE d'oranger à 4%	50
05	Résultats de la CMI des microorganismes de l'HE d'oranger à 4,5%	52

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Aspect morphologique des feuilles et du fruit de <i>Citrus limonum</i>	5
02	Aspect morphologique des feuilles et du fruit d'oranger	8
03	Feuilles de citron	21
04	Feuilles d'oranger	21
05	Les étapes de l'extraction de l'HE	23
06	Préparation de la gamme de dilution de l'HE	30
07	Contrôle microbiologique de « Roll-on »	33
08	les produits testés sur les lapins	36
09	les deux témoins testés sur les lapins	36
10	Plaie superficielles réalisées	37
11	a: HE de citron, b: HE d'oranger	39
12	Graphique présente l'évolution des plaies superficielles	56
13	Evaluation de l'activité cicatrisante de la plaie superficielle	57

Liste des abréviations

HE : Huile essentielle.

D/E : Bouillon de neutralisation.

GN: Géluse nutritive.

Gélose PCA: Plate Count Agar.

AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

IR : Indice de réfraction.

IA : Indice d'acide.

IS: Indice de saponification.

IE : Indice d'ester.

ITAFV: Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne.

LBV : Laboratoire de bactériologie de Venus.

LBF : Laboratoire de bactériologie de Frans fanon.

ZI : Zone d'inhibition.

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I.Synthèse bibliographique	
I.1.Etude de la plante.....	3
I.1.1.Le citron : <i>Citrus limonum</i>	3
I.1.2. L'oranger : <i>Citrus sinensis</i>	6
I.1. 3. Domaine d'application et intérêt phytothérapie.....	8
II. Les huiles essentielles (HEs).....	9
II.1.Définition.....	9
II.2. Composition chimique.....	9
II.3. Propriétés physiques.....	9
II.4. Classification des huiles essentielles.....	10
II.5. Caractéristiques organoleptiques.....	10
II.6. Le rôle des huiles essentielles.....	11
II.7. Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	11
II.8. En aromathérapie.....	12
II.9. Activité biologique des huiles essentielles.....	12
II.10. Les huiles essentielles et les bactéries.....	13
III. Les produits cosmétiques.....	14
III.1. Définition.....	14
III.2. Classification.....	14
III.3. Composition.....	15
III.4. Déodorants et anti transpirants.....	16
III.5. Contrôle microbiologique d'un produit cosmétique.....	16
III.6. Cosmétique bio.....	17
Chapitre II. Matériel et méthodes	
II.1. Matériel biologique.....	19

II.2. Matériel non biologique.....	21
II.3. Méthodes de travail.....	21
II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	26
II.4.1. Evaluation qualitative : l'aromatogramme.....	26
II.4.2. Evaluation quantitative : Concentration minimale inhibitrice.....	28
II.5. Etude de l'effet antimicrobien des deux HEs dans le « Roll-on ».....	31
II.6. Contrôle physicochimique et organoleptique du « Roll-on ».....	34
II.7. Etude de l'activité cicatrisante.. ..	35

Chapitre III. Résultats et discussions

III.1. Rendement en huiles essentielles.....	38
III.2. Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles.....	39
III.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	41
III.4.1. Evaluation qualitative: Aromatogramme.....	41
III.4.1. Evaluation quantitative : Concentration minimale inhibitrice.....	47
III.5. L'effet des huiles essentielles dans le « Roll-on».....	53
III.6. Contrôle physicochimique et organoleptique des « Roll-on».....	55
III.7. L'activité cicatrisante.....	56
Conclusion.....	59

Références bibliographiques

Annexes

Résumé: Etude de l'activité antimicrobienne et cicatrisante de l'huile essentielle des feuilles d'orange (*Citrus sinensis*) et du citron (*Citrus limonum*) et sa mise en évidence dans un produit cosmétique.

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques, nous nous sommes intéressées à étudier l'huile essentielle de deux espèces d'agrumes *Citrus limonum* et *Citrus sinensis*, possédant plusieurs effets thérapeutiques reconnus. L'étude a été réalisée dans le but de mettre en évidence leur effet antimicrobien, cicatrisant et leur efficacité comme conservateurs dans un produit cosmétique fini : le « Roll-on ». L'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau, a donné un rendement en huiles essentielles de feuilles de 0.13% chez le citronnier et de 0.26% chez celles de l'oranger. Les tests physico-chimiques ont révélé que l'HE de citronnier est plus acide (3,37) que celle d'oranger (2,24). L'indice de réfraction d'HE d'oranger inférieur aux normes AFNOR, ce qui lui donne la position de choix d'être utilisé dans le domaine cosmétique, par contre, celui de citronnier est dans les normes. L'indice de saponification est élevé chez le citronnier ce qui lui offre le choix d'être incorporé au détergents et produits hygiéniques. L'indice d'ester il est de 24.68 chez le citronnier et 11.785 chez l'oranger, considéré normal du moment qu'il est en relation avec l'indice de saponification et l'indice d'acide. L'HE de citronnier présente une activité sur les bactéries à Gram⁺ (*E. faecalis*, *S. aureus*) et la levure *C. albicans*, *C. geotrichum* ainsi que la moisissure *A. niger*. Cependant aucun effet inhibiteur sur les bactéries à Gram⁻ (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Par contre l'HE de l'oranger présente une activité sur les bactéries à Gram⁺ (*E. faecalis*, *S. aureus*) et quelque bactérie à Gram⁻ (*E. coli*). Cependant aucun effet inhibiteur sur la *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *A. niger*. La concentration minimale inhibitrice de l'HE de citronnier est de 2% pour *E. faecalis*, 1% pour *S. aureus*, *A. niger* et de 0.5% pour *C. albicans*, *C. geotrichum*. Celle de l'HE d'oranger est de 4,5% pour bactéries à Gram⁺ et à Gram⁻ et de 2,25% pour *Candida albicans*. L'étude de l'effet conservateur du « Roll-on » durant un mois et à température ambiante (25°C), est meilleur à la concentration 0.3% de l'HE de citronnier, l'HE d'oranger et le mélange des deux huiles; et le « Roll-on » reste conforme aux normes adoptées par le laboratoire VENUS. Cependant, l'HE de citronnier a montré une meilleure activité cicatrisante des plaies.

Mots clés: Huile essentielle, *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, Activité antimicrobienne, Activité cicatrisante, Conservateurs.

**Abstract: A study of antimicrobial activity and healing essential oil
the orange (*Citrus sinensis*) and the lemon (*Citrus limonum*) and demonstrated in a
cosmetic product.**

As part of promotion of medicinal and aromatic plants, we are interested in studying the essential oil of two *Citrus sinensis* and *Citrus limonum* species with multiple therapeutic effects recognized. The study was conducted in order to highlight their antimicrobial effect, healing and efficacy as preservatives in cosmetic finished product: the "roll-on". The extraction by steam distillation of water, gave a yield of essential oils from leaves of 0.13 % in the lemon and 0.26 % of those of the orange. The physico-chemical tests revealed that essential oil Lemon is more acidic (3.37) than orange (2.24). The refractive index of essential oil orange substandard AFNOR, which gives the position of choice to be used in cosmetics, for cons, the lemon is in the standards. The saponification is high among the lemon which gives him the choice to be incorporated in detergents and hygiene products. The ester value it is 24.68 in lemon and orange at 11,785, considered normal as long as it is related to the saponification and acid. The essential oil lemon this activity on Gram + bacteria (*E. faecalis*, *S. aureus*) and yeast *C. albicans*, *C. Geotrichum* and mold *A.niger*. However, no inhibitory effect on bacteria Gram - (*E. coli*, *P. aeruginosa*). As against the essential oil orange, has activity on Gram + bacteria (*E. faecalis*, *S. aureus*) and a Gram - (*E. coli*). However, no inhibitory effect on *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *A.niger*. Minimum inhibitory concentration of lemon is 2% for *E. faecalis*, 1% for *S aureus* and 0.5% for *C. albicans*, *C. Geotrichum*. Cele of essential oil orange is 4.5 % for Gram + and Gram- and 2.25 %. For *Candida albicans*. The study of the preservative effect of the " Roll-on " for one month at room temperature (25 ° C) is better at 0.3 % concentration of lemon essential oil, essential oil orange and the mixture two oils and a " roll-on " remains consistent with the standards adopted by the VENUS laboratory. However, essential oil lemon showed better healing activity like me.

Keywords: Essential Oil, *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, antimicrobial activity, healing activity, Conservatives.

الملخص: دراسة نشاط مضادات الميكروبات و النشاط الشفاء من الزيوت الأساسية لأوراق الليمون *Citrus limonum* البرتقال *sinensisCitrus* ظهور فعاليتها في منتجات التجميل.

في إطار تثمين النباتات الطبية و العطرية اهتمنا بدراسة الزيت الأساسي لنوعين من الحمضيات *Citrus sinensisCitrus limonum* التي تشمل الكثير من الآثار العلاجية. الدراسة تتضمن التأثير على الميكروبات و الشفاء و تظهر فعاليتها كمادة حافظة في مستحضرات التجميل منتهية المنتج " Roll-on ". استخراج الزيت الأساسي عن طريق التقطير ببخار الماء أعطت لنا مردودة 0.13% من الزيت الأساسي للليمون و 0.26% للبرتقال. أظهرت الاختبارات الفيزيوكيميائية للزيوت الأساسية على أن الليمون أكثر حموضة (3.37) مقارنة بالبرتقال (2.24).

معامل الانكسار للزيت الاساسي للبرتقال دون المستوى ، والذي يعطي موقف اختيار لاستخدامها في مستحضرات التجميل، أما الليمون هو في المعايير. و التصبين عالية عند الليمون الذي يعطي له الخيار لإدراجها في المنظفات الصناعية ومنتجات النظافة. قيمة استر هو 24.68 في الليمون و البرتقال في 11،785 ، يعتبر طبيعيا طالما تعلق الأمر إلى التصبين و الحامض. الزيت الأساسي يمثل للليمون نشاط على غرام + البكتيريا (*S. aureus.E.. faecalis*) و الخميرة *E. coli*, *C. albicans*, *C. géotrichum*. و العفن *A. niger*. ومع ذلك ، أي تأثير مثبت على البكتيريا غرام- (*E. coli*, *P. aeruginosa*). و مع العكس الزيت الاساسي للبرتقال، له نشاط في غرام + البكتيريا (*E. faecalis S.aureus*) و غرام - (*E. coli*) . ومع ذلك ، أي تأثير كبح بشكل خاص على *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *A. niger*. تركيز المثبطة الحد الأدنى للزيت الأساسي للليمون من *E. faecalis* هو 1.2% ل *A. niger* و 0.5% ل *S. aureus* و *C. albicans*, *C. géotrichum*. مع الزيت الاساسي للبرتقال هو 4.5% للبكتيريا غرام + و الغرام- و 2.25% ل *C. albicans*.

دراسة تأثير المواد الحافظة من "Roll-on" لمدة شهر في درجة حرارة (25 درجة مئوية) هو أفضل في تركيز 0.3% من الليمون. الزيت الأساسي للبرتقال و الخليط اثنين من الزيوت و "Roll-on" يظل منسجما مع المعايير المعتمدة من قبل المخبر VENUS ومع ذلك اظهر الليمون النشاط الشفاء.

الكلمات المفتاحية: الزيت الأساسي. *Citrus limonum* و *sinensisCitrus* مضادات الميكروبات . النشاط الشفاء .المواد الحافظة.

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses et cosmétiques. Elles peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires, ou encore servir à la préparation de boissons hygiéniques (tisane). Pour ces diverses utilisations, il s'agit soit des mêmes parties de plantes, soit de parties différentes **(Küdjüed- bünneton ,1989)**. Par ailleurs, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90 % de la médecine traditionnelle en Afrique (OMS, 2003).

Parmi les plantes aromatiques et médicinales occupent le premier rang des productions fruitières nos agrumes avec 81 millions de tonnes dans le monde en 1994 **(Cambon, 1989)** et 6803450 tonnes en Algérie 2006. (ITAFV, 2007).

Les produits cosmétiques fabriqués en grande majorité à partir d'ingrédients synthétiques, englobent une grande famille de produits tels que : les crèmes, les poudres, les produits d'hygiène et les parfums etc. Toute fois, ces molécules chimiques de synthèse utilisées sont nocives et toxiques pour la santé et l'environnement **(DEMANGE et SERRANO, 2007)**.

Les « cosmétiques bio » désignent une famille de produits composés d'ingrédients d'origine naturelle. Ces produits commencent actuellement à prendre largement la place des substances synthétiques pouvant entraîner des effets nocifs sur l'utilisateur. La majorité d'ingrédients sont issus du monde végétal et sont exploités sous différentes formes (huiles essentielles, huiles végétales, poudres et extraits), mais aussi des substances d'origine animale produites naturellement **(LACHARME, 2011)**.

Parmi les extraits naturels les plus utilisés, nous avons les huiles essentielles qui possèdent des applications importantes en médecine, soit pour leurs qualités odorantes ou bien pour soulager la douleur **(ALLOU, 2005)**. Ces huiles essentielles sont utilisées comme conservateurs, parfums naturels et agents actifs efficaces dans les produits « cosmétiques bio », pour leurs incroyables vertus **(DEMANGE et SERRANO, 2007)** en phytothérapie qui est à la fois la plus ancienne et la plus moderne.

Ces dernières années, la prise en charge des soins des plaies par les procédures de cicatrisation, est devenue une préoccupation au niveau mondial et l'utilisation des plantes médicinales ayant une activité cicatrisantes sont amplement recherchées **(ADENOT, 2000)**.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est:

L'étude comparative du pouvoir antimicrobien, anti cicatrisant, et l'efficacité de ces deux huiles essentielles de *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* comme conservateurs dans le « Roll-on ». Le choix de ces espèces s'est basé sur leurs propriétés médicinales et antiseptiques démontrées par plusieurs études antérieures et dans différents domaines.

Dans la première partie, nous procédons à faire une synthèse bibliographique sur les plantes utilisés, leur huiles essentielle ainsi que leur activités antimicrobienne et anti cicatrisante.

Dans la deuxième partie nous abordons les étapes expérimentales notamment l'extraction des huiles essentielles par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau, l'étude des caractéristique physicochimique, évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme, l'activité cicatrisante sur des lapins et la mise en évidence de l'efficacité de ces huiles essentielles comme conservateurs de « Roll-on ».

Chapitre I : Synthèse bibliographique**I.1. Etude de la plante :****I.1.1. Le citron : *Citrus limonum***

Le citron a été autrefois appelé « limon », terme emprunté à l'italien limone, qui venait lui-même de l'arabo-persan limûn. Le mot est apparu dans la langue française en 1351. De là vient le mot « limonade ». Le terme « citron », né en 1398, est dérivé du latin *citrus*, il a graduellement remplacé « limon » dans la langue populaire. (ANONYME, 2007).

Le citronnier est le premier agrume introduit dans le nouveau monde d'Island à Haïti, évidemment par Christophe Colomb lors de son second voyage en 1493 (WEBBER, 1948).

I.1.1.1. Systématique :

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

Embranchement : Spermaphytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Sous classe : Dialypétales.

Série : Dixiflores.

Sous série : Diplostémones.

Ordre : Térébenthales.

Sous ordre : Zygophyllacées.

Famille : Rutaceae.

Sous famille : Auranthioideae.

Genre : *Citrus*.

Espèce : *Citrus limonum* L (Var. *Eureka*).

I.1.1.2. Principales caractéristiques de la variété *Eureka* :

Cette variété est introduite en Algérie dans les années quarante à partir de la Californie (REBOUR, 1950).

Elle est la plus cultivée du fait de sa mise à fruits rapide et de ses floraisons très remontantes permettant la production des fruits au printemps et en été.

Ses fruits, de calibre moyen, sont pourvus d'un mamelon apical peu prononcé et se localisent à l'extrémité des rameaux.

Sa pulpe donne un jus clair, acide et bien parfumé, (LOUSSERT, 1987).

Tableau I : Les principales caractéristiques de la variété (MEDJDOUB, 2002):

Espèce	Variété	Caractéristiques
<i>Citrus limonum</i>	<i>Eureka</i>	<p>Fruits : écorce légèrement rugueuse devenant jaune vif.</p> <p>Fruits très remontant qui produit au printemps et en été.</p> <p>-calibre moyen, pourvus d'un mamelon apical peu prononcé.</p> <p>Pulpe : donne un jus clair acide et bien parfumé.</p> <p>Floraison : Fleur très nombreuse, blanc rosé et très parfumées.</p>

I.1.1.3. Description botanique :

D'après LOUSSERT (1989) et BÄRTELS (1998), *Citrus limonum*(famille des Rutacées) est un petit arbre persistant de 2 à 7m de haut, rameaux plus ou moins couverts d'épines courtes, épaisses et rigides.

- **Les feuilles** sont persistantes, oblongues ovales, à sommet aigu, plus ou moins dentées. Le limbe est de couleur verte. Le pétiole est ailé et étroit.
- **Les fleurs** solitaires ou fasciculées, bourgeons teintés de rougeâtre, les pétales sont de couleur blanchâtre et leur extérieur est teinté de pourpre. L'androcée est formé de 20 à 40 étamines.
- **Les fruits** sont de forme ovale (7 à 12cm de long et 5 à 7cm de large). Ils sont renflés ou en forme tétine.
- **L'écorce** est rugueuse à presque lisse, verte à jaune blanchâtre et spongieuse à l'intérieur, renfermant 7 à 10 loges contenant des pépins ovales (**Figure n° 1**).

Le système racinaire est essentiellement localisé dans les premiers 100cm de profondeur. Il ancre solidement l'arbre au sol en se développant jusqu'à 1 ou 2 m de profondeur.

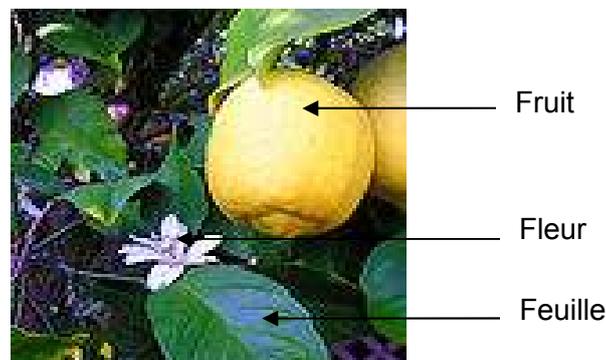


Figure n°1:Aspect morphologique des feuilles et du fruit de *Citrus limonum*(ANONYME, 2012)

I.1.2. L'oranger : *Citrussinensis*

L'aire d'origine de l'oranger est probablement le Nord de l'Inde ou les régions proches de Chine, où ils ont été cultivés et sélectionnés durant de nombreux siècles, avant que l'orange du Portugal soit introduite en Europe, au tout début du XVI^{ème} siècle (ANONYME, 2005).

L'oranger est un agrume très décoratif, pouvant atteindre 10m environ, avec un feuillage vert sombre persistant.

Il existe plusieurs manières de classer les groupes d'oranges mais les groupes les plus couramment évoqués sont :

- ✓ les navels, dénomination d'origines Anglaise.
- ✓ Les blondes qui regroupent les oranges communes.
- ✓ les sanguines.

L'oranger est un agrume moyennement résistant au froid mais peut tout de même résister à des gelées brèves de l'ordre de -7 °C à -8 °C. Sa culture est généralement délimitée autour du bassin Méditerranéen (ANONYME, 2005).

Selon LOUSSERT (1987) Washington navel appartient au premier groupe qui est celui des orange blondes navels.

I.1.2.1. Systématique :

La classification botanique de l'oranger (JUDD *et al.*, 2002)

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : dicotylédones.

Ordre : Sapindales.

Famille : Rutaceae.

Genre : *Citrus*.

Espèce : *Citrus sinensis* (Var. *Washington navel*).

I.1.2.3. Principales caractéristiques de l'oranger : *Citrus sinensis* Var. *Washington navel* :

Washington navel est la variété la plus cultivée et la plus appréciée des consommateurs pour sa précocité, elle se récolte de novembre à février et fait l'objet d'un important commerce d'exportation (LOUSSERT,1987).

Le fruit est relativement gros (200 à 250 g), de forme sphérique.

L'extrémité où apparaît le navel est légèrement proéminente sa peau, d'épaisseur moyen (5mm), assure au fruit une bonne résistance aux transports, sa chair croquante, fine, sans pépins, renferme peu de jus mais de saveur très agréable.

Elle est appréciée pour sa précocité, elle se récolte de novembre à février et fait l'objet d'un important commerce d'exportation (LOUSSERT,1987).

Tableau II : Les principales caractéristiques de la variété *Washington navel*(MEDJDOUB, 2002):

Espèce	Variété	Caractéristiques
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Washington Navel</i>	<ul style="list-style-type: none"> -le port de l'arbre en pépinière est retombant -la couleur de la feuille de plus de 6 mois est d'un vert foncé mais plus clair pour les jeunes pousses. -la longueur de la feuille est de 10 à 12cm. -la largeur de la feuille est de 3 à 7cm. -la pointe du limbe est douce (légèrement arrondie). -à l'aisselle de chaque feuille pousse une épine qui disparaît avec l'âge. -le pétiole est d'environ 20 mm muni d'une bractée pas très large, mais apparente.

I.1.2.4. Description botanique :

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ (LOUSSERT (1987))

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

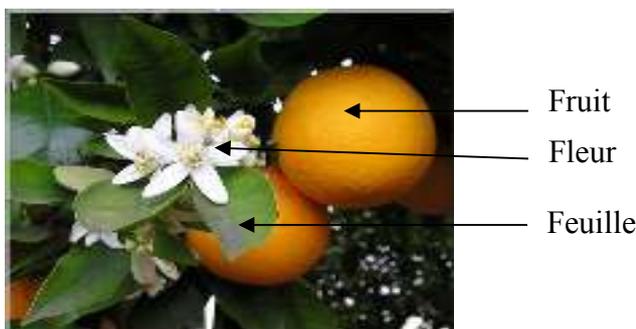


Figure n°2 : Aspect morphologique des feuilles et du fruit d'oranger (ANONYME, 2012)

I.1.3. Domaine d'application et intérêt phytothérapie :

Les HEs de *Citrus* sont utilisées pour la préparation des parfums, les savons, désodorisant, les bougies parfumées, en industries alimentaires comme aromatisants, en confiseries, pâtisseries, les glaces. En aromathérapie avec les essences d'HEs de *citrus*, il est recommandé pour traiter :

Les insomnies, l'anxiété, il calme les palpitations, les rides et est un vasodilatatrice.

L'HE de Citron est employée comme désaltérant, possédant des propriétés antimicrobiennes, tonique, stimulante, stomachique, carminative, diurétique, entretien de la peau et soins, obésités, antispasmodique, fébrifuge, coliques, états fiévreux, spasmes (BARDEAU, 2009).

II. Les huiles essentielles (HEs):

Elles sont apparues relativement tard dans l'arsenal du thérapeute et du parfumeur, suite aux travaux des alchimistes qui contribuèrent pour une large part au développement de l'art de la distillation (**DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002**).

II.1. Définition :

Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leurs caractères hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (**TEUSHER et al., 2005**).

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**).

II.2. Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène) et les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène etc...) (**CROTEAU et al., 2000**).

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**).

II.3. Propriétés physiques :

Les HEs possèdent 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 généralement incolores ou jaune pâle lorsqu'elles viennent d'être préparées.
- 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. (**CATIER et ROUX, 2007**).

II.4. Classification des huiles essentielles :

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

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

II.5. Caractéristiques organoleptiques:

BRUNETON(1999), cite les principales caractéristiques organoleptiques des HEs :

- L'aspect :

L'aspect d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Il peut apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide-liquide.

- L'odeur :

L'odeur est un sens chimique très sensible, de plus d'après la nature une substance pour être sentie doit être volatile.

- La couleur :

Les HEs sont généralement incolores et peuvent peu à peu prendre une coloration jaune plus ou moins foncée, avec quelques exceptions :jaune rougeâtre (Cannelle),vert (Absinthe) bleu (Camomille).

II.6. Le rôle des huiles essentielles :

Leur rôle dans la plante est mal connu, reste que certains auteurs pensent qu'elles auraient un rôle :

- ✓ D'Attractifs vis-à-vis des insectes afin de vaporiser la pollinisation.
- ✓ De Barrière contre l'évaporation.
- ✓ Protecteurs par leur action antiseptique vis-à-vis de certains micro-organismes comme les champignons.
- ✓ Ainsi qu'une action répulsif sur les prédateurs (**PARIS et al., 1981 ;MAINBEAU, 1994**).

II.7. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

II.7.1. En thérapeutique

Les HEs sont très riche en composées biologiquement actifs (**PRABUSEENIVASAN et al.,2006**). Elles possèdent des propriétés antibactériennes (**HAMMER et al., 1999**), antifongiques (**SOKOVIC et al., 2006**), anti oxydantes (**KORDALI et al., 2005**) et insecticides (**YANG et al., 2005**).

Grace à leurs pouvoirs curatifs, elles ont des effets: spasmolytique, antispasmodique (**GILANI et al., 2008**)anti cancer (**SYLVESTRE et al., 2006**), anti-inflammatoire, anti-ulcère (**DORDEVIC et al., 2007**), antivirale (**SCHNITZLER et al., 2007**).....etc.

II.7.2. En cosmétologie

Les HEs sont largement utilisées dans la fabrication des produits cosmétiques tels que les parfums, savons, lotions et pommade de soins. (WILSON, 2002 ; WORWOOD, 2001 ; AQUINO, 2002).

D'après DEMANGE et SERRANO (2007), les huiles essentielles sont connues depuis des millénaires pour leurs incroyables vertus, elles sont utilisées comme conservateurs, parfums naturels et agents actifs efficaces dans les produits cosmétiques bios. Cependant, étant des produits actifs très concentrés, il est nécessaire de respecter le dosage.

Elles sont destinés à être utilisées sous forme diluée dans les produits cosmétiques (ANTON et al., 2006).

II.8. En aromathérapie:

C'est une technique médicale naturelle de soins par les huiles essentielles, méthode visant à soigner la maladie, et à soulager le malade. (SCIMECA et TETAU, 2005).

- **L'aromatogramme**

L'aromatogramme (Du grec, *arôma* signifiant «arôme», et *gamma* signifiant «lettre, écriture»), est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (BELAICHE, 1997) et identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques (BENJILALI, 1986 et SATRANI, 2007).

II.9. Activité biologique des huiles essentielles :

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergique entre ses composants. Sa valeur tient à son «**Totum**», c'est-à-dire, non seulement à ses composés majoritaires mais aussi à l'intégrité de ses constituants (LAHLOU, 2004).

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins en moins sensibles, aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ses derniers. La nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour. L'usage des huiles essentielles grâce à leur forte action antimicrobienne développé depuis plus d'une vingtaine d'année, constitue un sérieux substitue aux traitements par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses (PIBIRI, 2006).

II.10. Les huiles essentielles et les bactéries :

Il est souvent nécessaire de contrôler la multiplication des bactéries afin de prévenir ou traiter les maladies infectieuses ou, pour limiter la croissance de microorganismes indésirables responsables par exemple de la dégradation d'aliments ou de produits industriels (**ARNIE et FRANÇOISE, 2001**). Les chercheurs étudient toujours de nouvelles substances antimicrobiennes, notamment les HEs qui ont fait l'objet de plusieurs recherches.

L'étude de **DEANS et RITCHIE (1987)**, sur l'effet de 50 HEs de plantes sur 25 genres de bactéries, indique qu'elles inhibent au moins un genre bactérien. Les neuf HEs qui ont manifestées les propriétés inhibitrices sur plus de 20 genres de bactéries testées sont celles de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amère, de la marjolaine, du piment et du géranium.

Cette étude, ainsi que beaucoup d'autres, comme celles de **CANILLAC et MOUREY (1996)**, (**MORRIS et al., 1997**), confirment les propriétés antibactériennes de certaines HEs. Cependant, elles sont souvent des mélanges complexes de différents composés dont certains sont dotés de propriétés antimicrobiennes. Il est donc important de séparer et d'identifier les composants actifs présents dans une huile possédant des pouvoirs inhibiteurs. En effet, **KATAYAMA et NAGAI (1960)** ; **KNOBLOCK et al. (1989)** ; **ADAM et al. (1998)** et **INOUYE et al. (2001)**, ont démontré que différents constituants d'HEs possèdent des activités antimicrobiennes. Ces composants sont classés selon leur degré d'inhibition.

✓ Mécanisme d'action des HEs sur les cellules microbiennes :

Les mécanismes d'action des produits antimicrobiens autre que les antibiotiques restent encore généralement peu connus. L'intérêt de leur étude est apparu particulièrement avec la mise en évidence accrue des souches résistantes aux antiseptiques (**FLURETTE et al., 1995**).

Selon leur nature et la concentration utilisée, les HEs peuvent avoir une ou plusieurs cibles. Mais dans la majeure partie des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle à la fois physique et chimique. **SALTON (1968)** a décrit les étapes de l'action des agents antimicrobiens :

- Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi.

- Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation,
- Sortie des composants de faible poids moléculaire du cytoplasme,
- Lyse de la paroi causée par des enzymes autolytiques.

III. Les produits cosmétiques:

III.1. Définition :

Plusieurs définitions ont vu le jour depuis la loi française de 1975. La définition inscrite à la 7^{ème} directive cosmétique européenne du 27 Février 2003 définit les produits cosmétiques comme suit: «On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaires, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, et/ou de corriger les odeurs corporelles, et/ou de les protéger ou les maintenir en bon état» (MARTINI, 2008).

III.2. 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 (shampooings, savons.....etc.).
- ❖ **Les produits de parure :** permettent les modifications de l'aspect de la peau, on retrouve dans ce groupe les produits de maquillage, les teintures capillaires....etc.
- ❖ **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, antisolaireetc.

III.3. 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.

III.4. Déodorants et anti transpirants :

Ces produits, répandus dans tous les circuits de distributions, ont pour but soit seulement de supprimer les odeurs corporelles, soit d'empêcher une trop forte sécrétion des glandes sudorales.

Les odeurs corporelles proviennent principalement de la décomposition de la sueur apocrine et secondairement encrine. La décomposition de la sueur est due à la présence sur la peau de microorganismes tels que *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, avec formation d'acides gras à chaîne courte, acides valérianique, caprylique, caprique. Le film hydrolipidique se décompose également et les composants responsables de l'odeur sont principalement ceux du sébum, le cholestérol et les esters de cholestérol (MARTINI, 2006).

III.4.1. Définition d'un anti-transpirant :

D'après MARTINI (2006), les antitranspirants, appelés aussi antisudoraux, sont destinés à supprimer ou à limiter la production excessive de sueur axillaire et palmoplantaire. Il existe plusieurs types d'anti transpirants à savoir les sticks et les «Roll-on».

✓ **Le « Roll-on »:**

est composé principalement par des solutions d'ACH qui sont souvent hydroalcooliques et peuvent atteindre des concentrations élevées, de 20 à 25%. Elles sont conditionnées en flacons munis d'une large bille ou « Roll-on » qui dispense, lors du frottement sur la peau, la quantité désirée. Le produit est irritant et l'on recommande de ne l'appliquer que pendant trois ou quatre jours consécutifs suivis d'une interruption de plusieurs jours ou de ne l'appliquer qu'un jour sur deux. Il est déconseillé aux peaux fragiles, aux peaux sensibles ou réactives, aux sujets ayant eu des antécédents de dermatite atopique(MARTINI, 2006).

III.5. 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**).

Selon le même auteur, 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*.

III.5. 1. L'agent conservateur :

La présence des conservateurs est indispensable dans la plus part 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**).

III.6. Cosmétique 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**).

III.6.1. Les 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**).

III.6.2. 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 action antirides, les huiles et les beurres de massage se conservent naturellement dans des bouteilles de verre teintées. Ce mode de conditionnement est fréquemment utilisées en cosmétique bio, les crèmes hydratantes contiennent une part importante d'eau et sont donc plus difficile à conserver (**DEMANGE et SERRANO, 2007**).

- **Lieu et période de stage :**

Notre travail a été réalisé durant la période s'étalant du début du mois de Mars jusqu'à la fin du mois de Septembre 2013.

L'étude expérimentale de notre projet a été effectuée au niveau de quatre centres :

- ❖ L'université Saad Dahleb-Blida, département d'agronomie au laboratoire de la phytopharmacie : pour l'extraction des huiles essentielles.
- ❖ L'entreprise VENUS SAPECO de Blida : laboratoire de microbiologie et physicochimie, pour l'activité antimicrobienne, les tests physico-chimiques et pour le contrôle microbiologique. Parmi les produits des laboratoires de Vénus, les shampoings, les dentifrices, les crèmes, les gels coiffants, les crèmes écrans totaux, les gels amincissants et les déodorants.
- ❖ L'hôpital de Boufarik : laboratoire de bactériologie pour l'évaluation quantitative (CMI).
- ❖ Station vétérinaire de l'USDB : pour l'effet cicatrisant.

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal:

Les plantes choisies comme modèle d'étude sont : *Citrus limonum* Var. *Eureka* et *Citrus sinensis* Var. *Washington navel*, un seul échantillon est utilisé pour les deux espèces.

Ces espèces ont été choisies en raison de leur disponibilité en grande quantité dans la région de la Mitidja et de leur importance économique dans plusieurs domaines. Elles sont classées comme des plantes médicinales et aromatiques, après leur utilisation principale pour l'alimentation.

Les parties végétales choisies pour réaliser cette étude sont les feuilles à l'état frais.

II.1.2. Matériel animal

Le matériel animal sur lequel nous avons testé l'effet cicatrisant est constitué de 5 lapins (2 femelles et 3 males), âgés de 1an et avec un poids variant de 2 à 3kg.

❖ Les conditions d'élevages

- ✓ Alimentation : Aliment en granulés (Ceregran).
- ✓ Boisson : l'eau du robinet

❖ Les conditions d'élevages

- Température de la sale: 20-24°C
- Humidité de la sale : 50-55g, Eclairage : 12h /jour

II.1.3. Microorganismes :

Le support microbien utilisé est composé de sept souches de références fournies dans des milieux de conservation (GN) par le laboratoire de bactériologie au niveau de l'hôpital de France-Fanon à Blida et laboratoire de bactériologie de Venus (Tableau III).

Tableau III : Microorganismes testés.

Microorganismes testés	Gram	Souches	Référence	Source
Bactéries	Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	L.B.F
		<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	L.B.F
	Gram-	<i>Escherichia Coli</i>	ATCC 25922	L.B.F
		<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	ATCC 27853	L.B.F
Champignon	Levure	<i>Candida Albicans</i>		L.B.V
	Levure	<i>Candida Géotrichum</i>		L.B.V
	Moisissure	<i>Aspergillus Niger</i>		L.B.V

L.B.F : Laboratoire de bactériologie de France-Fanon, L.B. V : Laboratoire de bactériologie de Venus

II.2. Matériel non biologique :

Le matériel non biologique utilisé renferme l'appareillage, la verrerie et les produits chimiques. (Voir Annexes 1, 2).

II.3. Méthodes de travail :

❖ Echantillonnage :

La récolte des feuilles d'oranger et de citronnier est réalisée le 02 Mars 2013 à 10h du matin, au niveau de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière de Boufarik (I.T.A.F). (Figure n° 03,04).



Figure n° 03 : Feuilles de citron **Figure n° 04 :** Feuilles d'oranger

II.3.1. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction a été faite au niveau du laboratoire de phytopharmacie au département d'agronomie par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Mode opératoire :

- Mettre environ **400 g** de matière végétale fraîche coupé en petit morceau dans un perçoir.
- Remplir d'eau distillée dans une cocote environ un litre.
- Déposé le perçoir au-dessus de l'eau puis fermé la cocote (sans contact direct avec la matière végétal).

- Chauffer à l'aide d'une plaque chauffante à 300°C pendant 30 min, après ébullition de l'eau en diminuer la température jusqu'à 200°C.
- La vapeur d'eau entraîne les constituants volatiles dans le tube principal, pour ensuite se condenser dans un serpentin du réfrigérant qui est rempli d'eau.
- Ouvrir le robinet de la burette graduée pour récupérer l'hydrolat goutte à goutte dans une fiole, l'HE reste dans la burette jusqu'à l'obtention de la quantité maximale de l'HE (après 2 heures).

La conservation des huiles essentielles se fait à une température de 4°C, à l'abri de la lumière, dans des flacons en verre. En se référant aux normes **AFNOR (2000)**, le rendement est calculé comme suit :

$$Rdt_{HE} = \frac{\text{Masse phase organique}}{\text{Masse de matière végétale fraîche}} \times 100$$

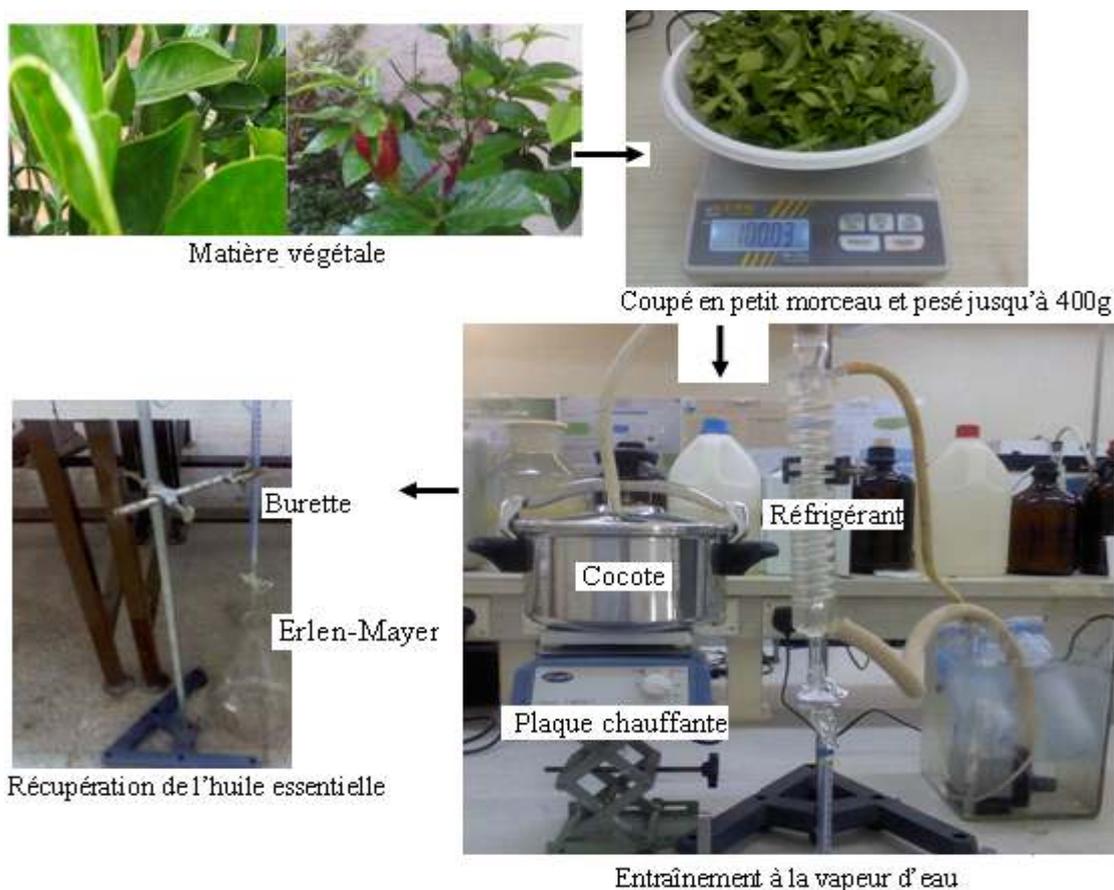


Figure n° 5 : Les étapes de l'extraction de l'HE

II.3.2. Les caractéristiques physicochimiques des deux HEs :

Nous avons mesuré deux indices chimiques, l'indice d'acide et l'indice de saponification ainsi qu'un indice physique de réfraction.

II.3.2.1. Détermination de l'indice d'acide (I.A): (AFNOR,2000).

Principe :

C'est le nombre en mg d'hydroxyde de sodium (NaOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution éthanolique titrée de NaOH.

Mode opératoire et calcul :

- Introduire 2,5g de l'HE pour le citron et 2,5g pour l'oranger dans des ballons de 250ml.
- Ajouter 5 ml d'éthanol (95°) et 5 gouttes au maximum d'indicateur coloré (solution rouge de phénol).
- Titrer le liquide avec une solution de NaOH (0,5 mol/l), jusqu'à obtention d'un virage de couleur de la solution persistant pendant 30 sec.
- Noter le volume de solution de NaOH utilisé.

Le calcul de l'IA est donné par l'équation suivante :

$$IA = \frac{56.1 v c}{m}$$

V: volume (ml) de NaOH utilisé pour le titrage (V_1 (citron)=0.3ml), V_2 (oranger)=0.2ml)

C : concentration (mol/l) de NAOH (0.5mole/l).

m : masse (g) de la prise d'essai.

II.3.2.2.Indice de saponification:(ISO 3657:2002(F))

Principe :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier la matière grasse dans les conditions opératoires spécifiées dans la présente Norme internationale.

Mode opératoire :

-Peser une quantité déterminé d'huile essentielle de feuilles de citronnier (M= 2g) et d'oranger(M= 2g) dans une fiole conique.

-Ajouter à la prise d'essai 25ml de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) et quelques régularisateurs d'ébullition (bulles de verre).

-Relier le réfrigérant à reflux à la fiole, placer la fiole sur le dispositif de chauffage et faire bouillir doucement, en agitant de temps en temps, pendant 60 min.

-Ajouter, à la solution chaude, 0.5 ml à 1 ml de la solution de phénolphaléine et titrer avec l'acide chlorhydrique (HCl) jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur, le volume de HCl ajouté est noté (V_1).

Essai à blanc :

Effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire, avec volume de l'acide chlorhydrique $V_0=22\text{ml}$.

Utiliser également de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH), mais en omettant la prise d'essai.

*Expression des résultats

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

$$IS = 28.05 \frac{(V1_{blanc} - V2)}{m}$$

Avec :

V_0 : volume de l'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc. ($V_0=22\text{ml}$)

V_1 : volume de l'acide chlorhydrique + titrage

C: concentration de l'acide chlorhydrique $C=28.05\text{mol/l}$

M: masse, en grammes, de la prise d'essai.

II.3.2.3.L'indice de réfraction (IR) :**Principe**

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

Mode opératoire et calcul :

-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.

II.3.2.4.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 1 g d'huile essentielle.

-Calcul

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

$$I_E = I_S - I_A$$

II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'évaluation quantitative et qualitative de l'activité antimicrobienne de notre HES, nous avons utilisé respectivement la méthode de l'aromatogramme et la méthode de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

II.4.1. Evaluation qualitative : l'aromatogramme

Nous avons testé l'activité avec l'huile essentielle sur les bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et la levure *Candida albicans*, *Candida géotrichum* et le moisissure *Aspergillus niger* par la mesure du diamètre

d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné de différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de microorganismes étudiés. Le travail est réalisé sous la hotte à flux laminaire.

❖ Protocole expérimental :

II.4.1.1. Revivification et repiquage des germes :

La revivification des souches microbiennes est réalisée par la méthode de stries sur gélose PCA pour les bactéries et sur milieu Sabouraud pour les levures et moisissures. Les cultures sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et pendant 5 jours à 25°C pour les levures et les moisissures. Les souches obtenues sont repiquées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MH (bactéries) et Sabouraud (levures et moisissures) puis incubées. La composition des milieux de culture utilisés est représentée dans l'annexe 3

II.4.1.2. Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure et jeune de germes (bactéries, levures et moisissures) à tester sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette pasteur, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger la pipette pasteur dans 5ml d'eau physiologique stérile.
- Agiter la suspension microbienne (bien homogénéiser) à l'aide d'un agitateur. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc pour les bactéries et environ 1,5 Mc pour les levures et moisissures. (mesurer à l'aide d'un McFarland densitomètre).
- Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort. **(BENJILALI, 1986 et SATRANI, 2007).**
 - ✚ Etaler 1ml de chaque tube contenant les suspensions bactériennes ou fongiques, sur le milieu PCA ou Sabouraud, respectivement.
 - ✚ Eliminer l'excès du liquide puis laisser sécher les boîtes de pétri pendant 15min à 35°C.

- ✚ D'autre part, imbiber les disques préalablement préparés et stérilisés par les HES de l'oranger et du citron, tout en gardant les boîtes pétries les contenant fermées.
- ✚ Fixer bien les disques imbibés par les HES sur des boîtes contenant la gélose PCA et correspondantes aux 4 souches bactériennes et des boîtes contenant le milieu Sabouraud correspondantes aux 3 souches fongiques. Ainsi, nous obtenons 6 boîtes pour les souches bactériennes et 4 boîtes pour les souches fongiques.

Les boîtes correspondantes aux souches bactériennes ont été incubées à 37°C pendant 3 jours.

Les boîtes correspondantes aux souches fongiques ont été incubées à 25°C pendant 5 jours.

❖ Lecture de l'aromatogramme :

La lecture de l'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle simple.

MEENA et SETHI (1994) ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes (disque de 9mm):

- ✓ Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28mm.
- ✓ Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre 16 et 28mm.
- ✓ Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre 10 et 16mm.
- ✓ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre est inférieur à 10mm.

II.4.2. Evaluation quantitative : Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le but de la concentration minimale inhibitrice consiste à déterminer la plus faible concentration de l'HE inhibant la croissance des germes.

1) Principe :

La CMI représente les différents degrés d'inhibition des HE vis-à-vis du germe étudié.

L'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne (CMI) de notre HE se fait par inoculation de milieux de culture sous différentes concentrations d'huile (HAMMER et al., 1999).

2) Mode opératoire :

Du fait de la non miscibilité des HEs dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant (Tween +80) a été nécessaire pour la réalisation de cette étude. De même que nos essais ont révélé que ce tensio-actif n'exerce aucune inhibition sur la croissance des germes testés. (NCCLS, 2002).

3) Préparation de l'émulsion d'HE :

Une solution mère d'HE de 40 mg/ml (HE/milieu de culture) (environ 4%) a été préparée comme suit :

Pour la CMI des bactéries :

- Mélanger 800 mg d'HE (environ 0,8 ml) avec 0,8 ml de tween 80
- Ajouter 20 ml de milieu M-H a ce mélange
- Agiter le tout jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène

Pour la CMI des levures et moisissures :

Le même procédé a été appliqué avec 800 mg d'HE et 20 ml de milieu Sabourand

Une série de dilution de chaque HE est préparée avec un intervalle de concentrations en HE qui varie entre 40 mg/ml (4%) à 0,031%.

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

- Verser la moitié du premier flacon (Solution mère) dans une boîte Pétri.
- Ajuster la moitié qui reste avec 10 ml de milieu gélosé pour obtenir une la dilution de 10 mg/ml.
- Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0,031% .La gamme de concentration finale est : 4, 2, 1, 0.5, 0.25 ,0.125 ,0.062, 0.031(%). (figure n°6)



Figure n°6 : Préparation de la gamme de dilution de l'HE

La préparation de l'inoculum a été faite de la même manière que l'aromatogramme.

L'ensemencement de la souche microbienne se fait à l'aide d'un écouvillon.

L'incubation se fait dans les mêmes conditions décrites auparavant.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne .La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit

pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

II.5. Etude de l'effet antimicrobien des deux HEs dans le « Roll-on » :

L'étude de l'effet antimicrobien des HEs dans le « Roll-on » doit d'abord garantir la sécurité du consommateur et assurer une bonne qualité hygiénique du produit lors de son utilisation.

Les deux HE ont été rajoutés au « Roll-on » comme conservateur à différentes concentrations (0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%) pour l'HE de feuilles de citronnier, (0.9% , 3%) pour l'HE de feuilles d'oranger et (0.5%, 1%) pour la synergie (50% de l'HE de citron + 50% de l'HE d'oranger). Leur activité antimicrobienne a été testée sur les germes aérobies mésophiles et les levures et moisissures. De plus nous avons estimé cette activité après 5 jours et 30 jours de conservation du produit fini.

Préparation du « Roll-on » fini:

- Prendre des boites stériles et fumés et mettre dans chaque boite 100g de « Roll-on ».
- Ajouter un volume d'huile essentielles de citronnier ou d'oranger selon les concentrations dans chaque boite.
- Conserver ses boites à la température ambiante 25°C.

❖ Recherche des germes aérobies mésophiles :(Figure n°7)

- Le test microbiologique a été réalisé dans des conditions d'asepsie sous hotte à flux laminaire.

_ Introduire 10 g de chaque boite (préalablement préparée) dans des flacons stériles.

_ Ajouter à chaque flacon 90 g de bouillon de neutralisation (D/E) servant à la neutralisation des désinfectants. Bien homogénéiser le mélange.

_ À partir de chaque flacon préparé, prélever 1ml et l'introduire dans une boite de pétri.

_ Un volume de 10 à 15ml du milieu PCA porté à une température de 25°C est ajouté à chaque boîte.

_ Faire des mouvements circulaires pour une bonne dispersion du mélange avec le milieu PCA.

_ Les boîtes sont incubées après solidification à 37°C±2°C au minimum 48 heures.

_ Un témoin ne contenant pas le produit à analyser est inclus, tout développement microbien sur le témoin rend le test non valable.

Lecture :

L'apparition de colonie correspond à une contamination du produit « Roll-on ».

❖ Recherche des levures et moisissures :

La même procédure a été appliquée pour la recherche des levures et moisissures, sauf que c'est le milieu Sabouraud qui a été utilisé au lieu du milieu PCA.

_ Les boîtes sont incubées après solidification à 25°C, pendant 05 jours.

Un témoin ne contenant pas le produit à analyser est inclus, tout développement microbien sur le témoin rend le test non valable.

Lecture :

L'apparition de colonie correspond à une contamination du produit « Roll-on ».

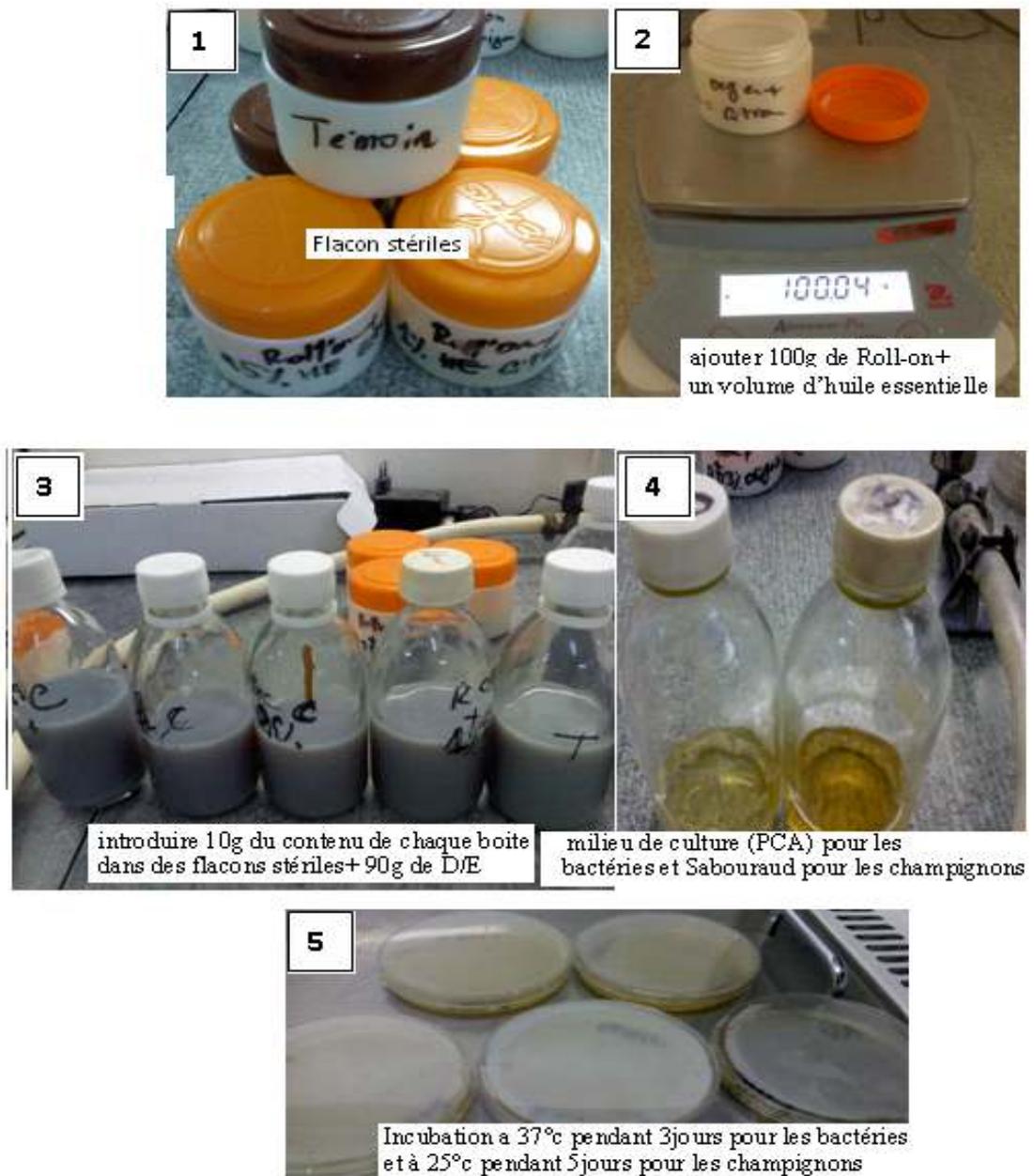


Figure n°7 : Contrôle microbiologique de « Roll-on »

II.6. Contrôle physicochimique et organoleptique du « Roll-on » après un mois de conservation

Afin de déterminer la qualité du produit suite à l'utilisation des HEs nous avons calculé sa densité relative à 20°C (d 20) ainsi que son pH et sa viscosité. L'aspect organoleptique (odeur, consistance et couleur) a été également noté.

II.6.1. Détermination de la densité relative à 20 °C (d 20) : (AFNOR, 2000)

Principe

C'est le rapport de la masse d'un volume de « Roll-on » à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C.

Mode opératoire et calcul

- Remplir un pycnomètre avec l'eau distillé à 20°C.
- Peser le pycnomètre, muni de son bouchon
- Vider le pycnomètre, puis le rincer et le sécher
- Effectuer les mêmes opérations, en remplaçant l'eau par le « Roll-on ».

La densité relative, est donnée par la formule suivante :

$$D_{20} = (M_{\text{produit}}/M_{\text{eau}}) + (0.00073 \times (T_{\text{échant}} - 20)).$$

M : masse en gramme. ($M_{\text{eau}}=23\text{g}$)

$T_{\text{échant}}$: température en °C=20°

II.6.2. Mesure du potentiel d'Hydrogène (pH)

Cette mesure est effectuée à l'aide d'un pH mètre.

II.7. Etude de l'activité cicatrisante :

But :

Le but de notre travail est de tester l'effet cicatrisant de l'HE de citronnier, de l'oranger et du mélange des deux huiles essentielles en comparant avec un médicament « Madicassol® ».

II .7.1.Principe:

Le principe consiste en l'application des traitements sur des plaies préalablement provoquées, les applications se feront de façon quotidienne jusqu'à la disparition complète de la plaie (environ 15 jours).

Dans notre cas nous avons utilisé des pommades (HE de citron + vaseline, HE d'oranger plus vaseline, mélange des deux HEs plus la vaseline) et madicassol®.

II.7.2. Mode opératoire :

Nous avons utilisé 5 lapins, 2 femelles et 3 mâles, dont l'âge moyen est de 1 an.

Ils sont répartis en 5 lots : un lapin par lots.

Tableau IV: La distribution des lapins et les produits testés.

Les lots	Lot N°1	Lot N°2	Lot N°3	Lot N°4	Lot N°5
Nombre d'animaux	1 lapin	1 lapin	1 lapin	1 lapin	1 lapin
Le produit testé	pommade à base de l'HE d'oranger	pommade à base de l'HE de citron	pommade à base de mélange des deux l'HE	Madicassol®	L'eau physiologique (témoin)
Préparation du produit	Mélange 1g de l'HE d'oranger avec 40g de vaseline (utilisé 1g)	Mélange 1g de l'HE de citron avec 40g de vaseline (utilisé 1g)	Mélange (0.5g de l'HE d'oranger + 0.5 g de l'HE de citron) avec 40 g de vaseline (utilisé 1g)	Un tube de 10 g (utilisé 0.5g)	Un flacon de 180 ml (utilisé 1ml)



Figure n°8 :Les pommades testés sur les lapins



Figure n°9:Les deux témoins testés sur les lapins

II.7.3.Préparation de l'animal :

Pour provoquer des plaies superficielles sur le lapin, nous avons fait des incisions

L'opération est réalisée selon les étapes suivantes :

Epilation des lapins par une tondeuse électrique pour dégager une surface d'environ 5×5cm .

- Désinfecter les régions tondues avec de l'alcool chirurgical à 70%.
- Marquer la zone pour faire l'incision.

❖ Réalisation de la plaie superficielle :

Après la préparation des lapins, on a effectué pour chaque lapin à l'aide d'une lame de scalpel, une scarification peu profonde, espacées de 0.5cm et de 2cm de longueur (figure n°10).



Figure n°10 : Plaie superficielles réalisées

II.7.4. Application des traitements

Nous avons appliqué quotidiennement les cinq traitements deux fois par jour, pendant 15 jours. (La quantité de pommade est de 1g)

Conclusion

Les huiles essentielles reconnues pour leur pouvoir parfumant et leurs propriétés de conservation, constituent l'un de ces principes actifs extraits des plantes les plus exploitées en cosmétique bio.

Notre étude s'est axée sur l'étude des huiles essentielles (HEs) de deux plantes, *Citrus sinensis* et *Citrus limonum*, en vue de leur utilisation comme conservateurs dans un produit cosmétique fini le « Roll-on ».

Ces HEs obtenues par la technique d'entraînement à la vapeur, ont été l'objet d'une étude physicochimique. L'HE des feuilles de l'oranger a montré une acidité faible, ce qui favorise son introduction dans les produits cosmétiques de soins pour la peau, par contre celle de feuilles de citronnier est acide, ce qui nous permet de dire que son introduction dans la fabrication des produits hygiéniques et sanitaires est plus convenable.

L'huile essentielle de *C. sinensis* présente une activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram⁺ (*E. faecalis*, *S. aureus*) et la bactérie à Gram⁻ (*E. coli*) ainsi que la levure *C. albicans*. Cependant aucun effet inhibiteur sur *P. aeruginosa*, *C. géotrichum* et *Aspergillus niger*. La CMI est de 4,5% pour les bactéries, et de 2,25% pour *Candida albicans*.

L'huile essentielle de *C. limonum* s'est montrée non inhibitrice pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Mais elle semble fortement inhibitrice pour *S. aureus* avec ($\Theta=35\text{mm}$), *Candida géotrichum* ($\Theta=34\text{mm}$) et légèrement inhibitrice pour *Aspergillus niger* ($\Theta=16\text{mm}$). La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de citronnier est de 2% pour *E. faecalis*, 1% pour *S. aureus*, *A. niger* et de 0.5% pour *C. albicans*, *C. géotrichum*.

L'étude de l'effet antimicrobien de mélange de ces deux HEs utilisées a révélé qu'elles sont inhibitrices à faibles concentrations (0.3%), pour tous les germes pathogènes testés.

L'incorporation de ces huiles essentielles dans les « Roll-on » a assuré une bonne qualité microbiologique, organoleptique et physicochimique du produit après un mois de conservation à température ambiante. Ce qui nous permet de dire que ces huiles peuvent être incorporées dans un programme de conservation de produits cosmétiques.

Par contre, l'huile essentielle de *Citrus limonum* peut être envisagé comme traitement pour la guérissant des plaies.

Comme perspectives et en vue de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait intéressant également de :

- Faire des analyses chimiques des huiles pour identifier leurs composés chimiques responsables de l'effet antimicrobien, anti cicatrisant et de conservation.
- Poursuivre l'étude de la durée de conservation du produit cosmétique traité "Roll-on" par ces huiles, pour déterminer leur efficacité optimum comme conservateurs biologiques.
- Etudier sa toxicité sur l'animal.
- Tester l'activité antimicrobienne de ces HEs sur d'autres microorganismes néfastes pour la peau.

- **ADAM K, SIVROPOULOU A., KOKKNI S., LANARAS T. AND ARSENAKIS M., 1998** : Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *Menthastraca*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. agric. Food chem.*, vol 46, n°6 : 1739-1745.
- **ADENOT MARC, 2000** : Initiation à la chimie médicinale : les voies de la découverte des médicaments Edition Ellipses. 223p.
- **AFNOR.2000** : Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, 661-663.
- **ALLOU, FZ 2005** : étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'une plante médicinale *Centaurea pullata*. Mémoire d'ingénieur. Département de biologie U.S.D.B. pp 20,21.
- **AQUINO R.** « Arômes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéenne ». *Journal of Cosmetic Sciences* 53 (Nov-déc.), 2002, pp: 321-335.
- **ANTON J.C., WENIGER B., ANTON R.2006** : Huiles essentielles p 189-229 in *Actifs et additifs en cosmétologie* 3ème édition, Lavoisier Tec et Doc, Paris.
- **ARI R. ET SEZONOV G., 2008**- Biologie et génétique de *Escherichia coli*. Ed. Belin, 361 page.
- **ARNIE C., FRANÇOISE P. 2001** : Le préparateur en pharmacie. Paris : Techniques et documentations.
- **BARDEAUX F,2009** : Les huiles essentielles, découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Ed LANORE (33,34,161)pp.
- **BÄRTELS A, 1998** : Guide des plantes du bassin méditerranéen. Ed Eugen Ulmer, 5. Paris. France. 432P.
- **BELAICHE P ; 1997** : Traité de phyto-aromathérapie. Ed Masson. pp : 55-56.
- **BENJILALI B., TANTAOUI-ELARKI A., ISMAILI-ALAOUI M., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plant. Méd. Phytothér.*, 20: 155-167.
- **BENNET R-J. ET JOHNSON A-D., 2005**- Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59 :233-255.

- **BRUNETON J.,1999.**Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale.Tech& doc – Lavoisier, Paris ,585p.
- **CANILLAC N. et MOUREY A., 1996 :** Comportement de *Listeria* en présence d’huiles essentielles de sapin et de pin. *Sci. Aliments*, vol.16, pp :403-411.
- **CATIER O.et ROUX D., 2007 :**Botanique, pharmacognosie et phytothérapie, 3ème édition, Walter’s Kluwer, Paris, page 112.
- **CHAO S.C., YOUNG D.G. et OBERG G.J., 2000:** Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.*, 12:639-649.
- **CRETE P.,1965 :** Précis de botanique ,systématique des angiospermes,Tome 2,édition Masson,Paris , pages 218 ,219, 220 .
- **CROTEAU R., KUTCHAN T.M. & LEWIS N.G. 2000:** Natural products (Secondary metabolites).
- **CAMBON A.,1989.**Science ,Technique.Technologie,11,4-10.
- **DEANS S.G et RITCHIE G. 1987:** Antimicrobiol properties of plant essential oils. *Int.J. of Food Microbiol.*, 5: 165_180.
- **DE FEO V., BRUNO M., TAHIRI B., NAPOLITANO F et SENATORE F., 2003:** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Thymus spinulosus*. *J. Agric. Food chem.*, 51: 3849-3853.
- **DEGRYSE A.C., DELPLA I et VOINIER M.A. 2008 :** Thèse du Génie sanitaire, Ecole des hautes études de santé publique, « Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles».
- **DELAQUIS P.J., STANISH K., GIRARD B. et MAZZA G., 2002 :**Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food microbial.*, 74: 1001-109.
- **DEMANGEE.etSERRANOS. 2007 :** consultante en cosmétique naturelle. Réalisé par les éditions Plume de carotte pour les magasins Nature & Découvertes.
- **DORDEVIC S., PETROVIC S., DOBRIC S., MILENKOVIC M., VUCICEVIC D., ZIZIC S etKukicJ.,2007:** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlinaacanthifolia* root essential oil’’, *Journal of Ethnopharmacology* , V.109, Issue 3, , 458–463.
- **ELGAYYAR M., DRAUGHON F.A. GOLDEN D.A et MOUNT J.R., 2001:** Antimicrobial activity of Essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic Microorganisms. *J. Food protects*, 64: 1019-1024.

- **FARAG R.S., DAW Z. Y., HEWEDI F.M. et ELBAROTY G.S.A., 1989:** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food protects*, 52:675-679.
- **FARBOOD M. I., MARCNELIL J.H et OSTOVAR K., 1976:** Effects of rosmary spice extractive on Growth of micro organisms in meats. *J. Milk food technol.*, 39:675-679.
- **FLURETTE J., FRENEY J et REVERDY M.E., 1995 :** Antisepsie et désinfection. Paris: ESKA. 639p.
- **GILANI A. H., MEHMOODA M.H., JANBAZ K.H., KHAN A-U et SAEED S. A., 2008:** “Ethnopharmacological studies on antispasmodic and antiplatelet activities of *Ficus carica*”, *Journal of Ethnopharmacology*, V. 119, n° 1, 1–5.
- **HAMMER K.A., CARSON C.F., RILEY T.V.,1999:**“Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.”, *Journal of Applied Microbiology*, V.86, Issue 6,985–990.
- **HUSSEIN A.M.S., 1990:** Antibacterial and antifungal activity of some Libyan aromatic Plants. *Plantamedica*, 56:644-649.
- **INOUYE S., TAKISWA T. and YAMAGUCHI H., 2001:** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. of Antimi. Chemo.*, 47 :565-573.
- **JAY J.M., 1996:** Microorganisms in fresh ground meats : the relative safety of product With low versus high numbers. *Meat Sci.*, 43: S59-S66.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P. (2002);** botanique systématique une perspective phylogénétique. Edition De Boeck université.s.a.paris, p : 333.
- **KATAYAMA T et NAGAI I., 1960:** Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative viewpoint- IV: structure and antibacterial activity of terpenes. *Bull. Jap. Soc. Sci. fish.*, 26:29-32.
- **KANKO C., SAWALIHO B.E., KONE S., KOUKOUA G., N’GUESSAN YT., 2004 :**Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». *Comptes rendus Chimie* 7 1039–1042.
- **KAWAHARAJO K., HOMMA J.Y., AOYAMA Y., OKADA K. ET MORIHARA K., 1975-** Effects of protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skim. *Jpn. J. Exp. Med.* 45 :79-88.

- **KNOBLOCH K., PAULIA., IBER L., WEIGAND H and WEIS N., 1989 :** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. Essent, oil. Res. 1 : 119_128
- **KOBA K, SANDA K, RAYNAUD C, MANDIN D, MILLET J, CHAUMONT JP., 2003 :**Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*L, *C. nardus*L et *C. schoenanthus*. Journal de Mycologie Médicale, Vol 13, N° 4 -, pp : 175-180.
- **KORDALI S., KOTAN R., MAVI A., CAKIR A., ALA A et YILDIRIMA.,2005:**“ Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *A. santonicum* and *A. spicigera* essential oils”, Journal of agriculture and food chemistry, V.53, 9452-9458.
- **KUDDJUED-BUNNETON J-F.,1989.**Pharmacien phytochimique chargé de cette étude pour L’orstom Dr :Possibilité de valorisation de plante médicinales et aromatiques en Gyrane Dr.
- **KVANÇ M et AKGUL A., 1986:** Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flav and fragr. J. 1 :175-179.
- **LACHARME F., 2011 :** , thèse pharmacie, Université de Grenoble, « Les produits cosmétiques biologiques : Labels, composition et analyse critique de quelques formules ».
- **LAHLOU M. 2004:** Methodes to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy research 18-(435_448).
- **LE LOURANT P. 1994.**Guide pratique de l’aromathérapie: Mieux être, mieux vivre par l’aromathérapie. Ed :Devecchis S.A Paris. 13 p.
- **LOUSSERT R., 1987.**Les agrumes ,l’arboriculture.Ed. Lavoisier, Vol. 1, paris, 80p.
- **LOUSSERT R, 1989 :**Les agrumes (1 Arboriculture). Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris, France. 177P.
- **MANN J.,1987:** Secondary metabolism. Clarendon Press. Oxford. 374 p.
- **MAINBEAU P., 1994:**La nouvelle aromathérapie, 2ème édition, Jakin, Paris, page 28.
- **MARINO M., BERSANI C. et COMI G., 1999 :**Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* L. Measured using a bioimpedometric method. J. Food Protects. 62:1017-1023.

- **MARTINI M.C., 2006** : Cosmétologie et dermatologie, esthétique, conservateurs, Ed. Masson. Paris.
- **MARTINI M.C., 2008** : Cosmétologie BTS esthétique-cosmétique, 2^{ème} Ed Masson, pp : 6-8.
- **MARTINI M.C. et SEILLER M., 2006** : Actifs et additifs en cosmétologie. 3^{ème} Ed. Lavoisier. Paris.
- **MEENA M.R. et SETHI V., 1994**: Antimicrobial activity of the essential oils from spices. J. Food Sci and Tech. Mysore. 31:68-70.
- **MEDJDOUB J C., 2002**.Reconnaissance visuelle de quelques variétés d'agrumes- CNCC-juin.
- **MORRIS J.A., KHETTRY A et SEITZ E.W., 1997**: Antimicrobial activity of aroma chemical and essential oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 56:595-603.
- **OUSSALAH M., CAILLET S., SAVCIRR L .&LACROIX M.(2007)**. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria :*E.coli*O157: H7, *Salmonella thymurium*, *Staphylococcus aureus* et *listeria monocytogenes*. Food Control, 18, 414 – 420.
- **PIBIRI M.C 2006** : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Thèse no 3311. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.
- **PARIS M. et MURABIELLE H., 1981** : Abrégé de matière médicale pharmacognosie, Tome I, édition Masson, Paris, pages 181 et 194.
- **Pharmacopée européenne, 2001**: Indices physico-chimique.
- **PRABUSEENIVASAN S, JAYAKUMAR M etIGNACIMUTHU S.,2006**:« In vitro antibacterial activity of some plant essential oils ». BMC Complementary and Alternative Medicine, 6:39.
- **REBOUR H., 1950** – Les agrumes en Afrique du NORD ,union des syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, pp 498-502 .
- **REGA B., FOURNIER N., GUICHARD E. & RUSSELLE R .(2003)**. Citrus flavour .journal of Agricultural and Food Chemistry , 51, 117- 133.
- **SATRANI.SATRANI B., FOUGRACH H., BOURKHISS B., BOUSTA D., TALBI M.,2007**.Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthusmixtus*. Bull. Soc. Pharm.Bordeaux, 146: 85-96.
- **SALLE J L. 1991** : Les huiles essentielles, Edition Frison-Roche, Paris.

- **SALTON MRJ., 1968** : Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability
Gen physiol., 52: 227-252.
- **SAMSON R –A., HOUBRAKEN J., SUMMERBELL R-C-, FLANNIGAN B. ET MILLER J-D., 2001-** Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: Microorganisms in Home and Indoor Work Environments. New York, pp: 287-292.
- **SCHNITZLER P., KOCH C et REICHLINGJ.,2007:** “ Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop, and Sandalwood “ , American Society for Microbiology, Antimicrobial agents and chemotherapy, V. 51, n° 5, 1859–1862.
- **SCIMECA ET TETAU. 2005** : Votre santé par les huiles essentielles. Ed. Roche, Paris.94p.
- **SOKOVIC M., VAN GRIENSVEN L.J.L.D.,2006:** “Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*”, European Journal of Plant Pathology, V.116, n° 3, 211–224.
- **SYLVESTRE M., PICHETTE A., LONGTIN A., NAGAU F et LEGAULT F., 2006:** “Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe”, Journal of ethnopharmacology, V. 103, 99-102.
- **TASSOU C.C. et NYCHAS G.J.E., 1995** : Antimicrobial activity of the essential oil of Mastic gum on gram positive and gram negative bacteria in broth and in Model food system. Int. Biodeterioration and biodegradation. 36:411-420.
- **TEUSHER E., ANTON R. & LOBSTEIN A. 2005** : Plantes aromatiques. Epices, Aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.
- **THIERS S, 1986** : Les cosmétiques. Ed. Masson.
- **VALNET J. 2005** : L’aromathérapie Ed. Maloine S. A ISBNE : 2-253-03564-5.
- **VEKIARI S.A., PROTOPAPADAKIS E.F., PAPADOUPPOULOU P., PAPANICOLAOU D., PANOU C.& VAMVAKIAS M.(2002).** Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 5(1), 147_153.
- **WEBBER HJ., 1948** – The citrus industry, vol.1. History. Botany and Breeding, 11p.
- **WILSON R., « Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty ».** Avery éd, New York 2002, pp: 75-76.

- **WORWOOD VA.**, « Aromatherapy for the Beauty Therapist ».Cengage Learning EMEA, NewYork, 2001, pp: 30-35.
- **YANG Y-C., LEE H-S., Marshall Clark J etJoonAhn.Y., 2005:** “Ovicidal and adulticidal activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura : Pediculidae)”, International Journal for Parasitology, V.35, Issue 14, 1595-1600.
- **ZAIKA L.L., 1988:** Spices and herbs: their antibacterial activity and its Determination. J. Food Saf 23:97-118.
- **Anonyme, 2005.** La protection phytosanitaire des agrumes en Algérie .Ed. sonatrach, 159p.
- **Anonyme, 2007 :** Wikipédia, 2007 [http:// le citron_ citronnier, citron jaune.htm](http://le citron_ citronnier, citron jaune.htm)
- **Anonyme, 2012:** Wikipedia.

Fiche descriptive de la variété Washington Navel
clone 251 greffée sur Citrange Carrizo

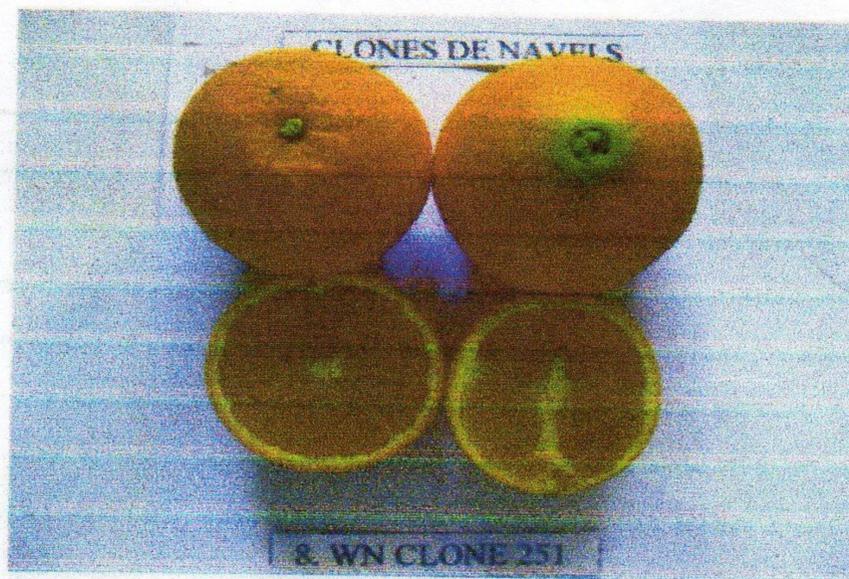
Espèce : Oranger

Variété : Washington Navel

Clone : 251

Origine : Station Boufarik

Localisation : Site annexe I (parcelle C3)



I. Caractères morphologiques de l'arbre :

- Vigueur : moyenne
- Port : érigé
- Feuille : longue, large, couleur vert-foncée
- Productivité : moyenne

II. Caractères phénologiques :

- Epoque de la floraison : mars, avril
- Epoque de la maturité : décembre
- Echelonnement de la récolte : 2 mois

III. Caractères pomologiques :

- Base : superficielle
- Cavité pédonculaire : superficiel
- Peau : lisse
- Forme : arrondie
- Adhérence de la peau : peu adhérente
- Nombre de quartiers : 10
- Calibre : 68,6mm
- Poids moyen : 202,7g
- Coloration : orange claire
- Couleur de la peau : jaune dorée
- Nombre de pépins : 0

IV. Caractères technologiques :

- Qualité gustative : sucrée, légèrement acide
- Taux de jus : 51,49%
- Arôme : parfumée
- Indice de maturité : 10,71

V. Appréciations générales :

- Aptitudes à la manipulation : bonne
- Aptitudes à la conservation : bonne
- Résistance au transport : bonne
- Destination : en frais

Titre : **BULLETIN D'ANALYSE**

 Date d'application :
 03/03/13

LABORATOIRES VENUS
- SAPECO -
DOCUMENT AUTORISÉ

 Nom du produit : Deo Rollon floral
 Date d'analyse : 24/04/2013
 N° de lot : 01(conditionné site 2)

1) Produit semi-fini

ESSAIS	SPECIFICATIONS	Repère de l'appareil	METHODES	RESULTATS
Aspect	liquide laiteux		contrôle visuel	conforme
Couleur	blanche		contrôle visuel	conforme
Odeur	caractéristique		contrôle olfactif	conforme
PH	3,50 - 4.50	pH 0115 pH 0117 pH 0123 pH 0332	NA 367\\Servenus\ariba meriem\Norme1\NA. pH 367-1990	4.17
Viscosité à 23±0,2°C	1000 - 4000cPs (mPa*s)mobile:02 vitesse:10	VI 0120 VI 0121 VI 0122 VI 0333	NA 376\\Servenus\ariba meriem\Norme1\NA 376.pdf	1640

2) Produit fini

ESSAIS	SPECIFICATIONS	Repère de l'appareil	METHODES	RESULTATS
Aspect	liquide laiteux		contrôle visuel	Conforme
Couleur	blanche		contrôle visuel	Conforme
Odeur	caractéristique		contrôle olfactif	Conforme
Contenance	50± 2ml		volumétrique	
PH	3,50 - 4.50	pH 0115 pH 0117 pH 0123 pH 0332	NA 367\\Servenus\ariba meriem\Norme1\NA . pH 367-1990	
Viscosité à 23±0,2°C	1000 - 4000cPs (mPa*s)mobile:02 vitesse:10	VI 0120 VI 0121 VI 0122 VI 0333	NA 376\\Servenus\ariba meriem\Norme1\NA 376.pdf	
Densité à 20±0,2°C	1,060 - 1,10		NF T 020- 053\\Servenus\ariba meriem\Norme1\NF T20-053.pdf	

Observation produit conforme
Visa analyste
 BOUDISSA Med Hichem

Visa Responsable laboratoire

 Responsable du Laboratoire
 Contrôle Qualité PH
SIDHOU M.O.

Fiche Descriptive de la Variété

Espèce : Citronnier.

Variété : Eureka.

Clone : SRA 4.

Origine : Corse (France).

Localisation : Site An. I. Bouamrous Parcelle P.N°:26

I) Caractères Morphologiques de l'Arbre :

- Vigueur : Forte.
- Port : Semi – Erigé.
- Feuille : Large, pennée et bien dentée, vert- foncée.
- Productivité : Forte.

II) – Caractères Phénologiques :

- Epoque de la floraison : Février à Octobre.
- Epoque de maturité : Janvier à Décembre.
- Echelonnement de la récolte : Toute l'année.

III) – Caractères Pomologiques :

- Calibre : 65,00 mm.
- Poids moyen : 164,80 g.
- Coloration : Jaune.
- Forme : Ovale.
- Cavité pédonculaire : Superficielle.
- Base : Petit mamelon.
- Peau : Lisse.
- Adhérence de la peau : Adhérente.
- Nombre de quartiers : 09.
- Couleur de la Pulpe : Jaune – Claire.
- Nombre de pépins : 02.

IV) – Caractères technologiques :

- Qualités gustatives : Acide.
- Taux de jus : 49,67 %.
- Arôme : -
- Extrait soluble : 10,0.

V) – Appréciations Générales :

- Aptitudes à la manipulation : Bonne.
- Aptitudes à la conservation : Bonne.
- Résistance au transport : Bonne.
- Destination : Jus et cosmétique.



Annexe 1 : Appareillage et petit matériel.



Réfrigérant



Balance de précision



Ph Metre



Agitateur magnétique



Densitometre



Bec benzen

Annexe 2 : Le matériel non biologique.

1. Les équipements :

- Autoclave à 121°C.
- Bain marie.
- Balance de précision.
- Etuve à 37°C.
- Etuve à 44°C.
- Hotte à flux laminaire.
- Réfrigérateur.

2. Les consommables :

- Les milieux de cultures :

- Bouillon de neutralisation D/E.
- Gélose Agar de Sabouraud.
- Gélose PCA: Plate Count Agar.
- Gélose nutritive.
- Gélose Muller Hinton.

3. Verreries :

- Anse de platine.
- Boîtes pétri.
- Disque stérile.

- Des pinces.
- Pipettes.
- Portoir de tubes à essai.
- Tubes à essai.
- Balance
- Madicassol, vaseline 40 g, eau physiologique
- Instrument de chirurgies
- Les lapins

4. Solutions :

- Alcool.
- Eau de javel.
- Eau physiologique.

5. Les conservateurs :

- L'huile essentielle de *Citrus limonum*.
- L'huile essentielle de *Citrus sinensis*

6. Le « Roll-on ».

Annexe 3 : Composition des principaux milieux de cultures :**1/Gélose de dextrose de Sabouraud : (g/l)**

Peptone.....	10,0g.
D(+)-Glucose.....	40,0g.
Agar – Agar.....	15,0g.

2/Composition de PCA: (g/l)

Peptone de caséine.....	5,0g.
Extrait de levure.....	2,5g.
D(+)-Glucose.....	1,0g.
Agar-Agar.....	14,0g.

3/Bouillon de neutralisation: D/E

Formule approximative par litre :

Digestion pancréatique de caséine.....	5,0g.
Extrait de levure.....	2,5g.
Dextrose.....	10,0g.
Thioglycolate de sodium.....	1,0g.
Thiosulfate de sodium.....	6.0g.
Bisulfite de sodium.....	2,5g.
Polysorbate 80.....	5,0g.
Lécithine.....	7,0g.
Poudre de bromocresol.....	0,02g.

5/Gélose nutritive :

Macération de viande.....	1 litre.
(Ou eau distillé + extrait de viande q.s)	
Peptone trypsique.....	15g.
Nacl ou Kcl.....	5g.
Agar.....	15 à 20g.

6/Gélose Muller Hinton :

Eau distillée (1litre pour 38g du mélange).....	1 litre.
Peptone de caséine	17,5g.
Infusé de bœuf	300 ml.
Agar.....	17g.
pH.....	7,4.

Annexe 4 : Les analyses statistiques.

Calcul les indices physiques et chimiques d'HE des plantes étudiées :

Indice de réfraction (IR) :

La norme = 1,4730_ 1,4760

IR_{citron} = 1,474

IR_{oranger} = 1,470

Indice d'acide (IA) :

L'indice d'acide (IA) est calculé par la formule suivante :

$$IA = \frac{56.1 \text{ v c}}{m}$$

$$IA = \frac{56.1 \text{ v c}}{m}$$

$$IA_{\text{citron}} = \frac{56.1 \times 0,3 \times 0.5}{2.5}$$

$$IA_{\text{citron}} = 3,37$$

$$IA_{\text{oranger}} = \frac{56.1 \times 0,2 \times 0.5}{2.5}$$

$$IA_{\text{oranger}} = 2,24$$

Indice de saponification (IS) :

L'indice de saponification (IS) est calculé par la formule suivante :

$$IS = 28.05 \frac{(V1 \text{ blanc} - V2)}{m}$$

$$IS_{\text{citron}} = 28,05 + \frac{(22 - 20)}{2}$$

$$IS_{\text{citron}} = 28,05$$

$$IS_{\text{oranger}} = 28,05 + \frac{(22 - 21)}{2}$$

$$IS_{\text{oranger}} = 14,025$$

Indice d'ester (IE):

$$IE = IS - IA$$

$$IE_{\text{citron}} = 28,05 - 3,37$$

$$IE_{\text{citron}} = 24,68$$

$$IE_{\text{oranger}} = 14,025 - 2,24$$

$$IE_{\text{oranger}} = 11,785$$

Annexe 5

Tableau XIV : Les longueurs des plaies superficielles chez les lapins.

traitements temps	HE/ Oranger	HE/ Citronnier	HE/ Mélange	Référence	Témoin
	La dimension des plaies				
Le1^{er} jour Avant traitement	2 cm	2 cm	2cm	2cm	2 cm
Le4^{eme} jours/T	1.3	1.2	1.35	1.2	1.45
Le8^{eme} jours/T	1.1	0.3	0.9	0.2	0.9
Le12^{eme} jours/T	0.2	00	00	00	0.5
Le15^{eme} jours	00	00	00	00	00

Annexe 6 : Généralités sur les souches microbiennes utilisées.

Microorganismes	Caractères généraux	Origine de contamination	Habitat	Pouvoir pathogène
<i>Escherichia coli</i> (Ari et Sezonov., 2008).	Gram négatif. Famille : <i>Enterobacteriaceae</i> . Forme : colibacille. Immobile. Fermentation du glucose. Production d'indole à partir du tryptophane. Oxydase négative.	Contamination fécale.	Bactérie intestinale.	Gastro-entérites, Infections urinaires. Méningites. Septicémies.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Kawaharajo et al., 1975).	Gram négatif. Famille : <i>Pseudomonadaceae</i> . Forme : Bacille. Aérobie stricte. Mobile ou immobile. Sporulée. Absence de capsule. Oxydase positive. Lactose négative.	A partir de l'eau.	Ubiquitaire.	Infections nosocomiales Infection de l'œil, des plaies et des urines. Méningites. Leucémie.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif. Famille : <i>Staphylococcaceae</i> . Forme : coque en amas. Immobile. Asporulée. Aérobies. Catalase positive. Oxydase négative.	Contamination de l'aliment. Une mauvaise conservation. Présence d'une entérotoxine dans l'aliment.	Commensale de l'homme. Ubiquitaire.	Pouvoir invasif. Pouvoir toxique.

<p><i>Enterococcus faecalis</i></p>	<p>Gram positif. Famille : <i>Enterococcaceae</i> Non-mobile, Anaérobie Facultatif. Fermente le glucose sans production de gaz et ne produit pas de réaction catalase en présence de peroxyde d'hydrogène</p>	<p>Contamination de l'aliment Une mauvaise conservation. Présence d'une entérotoxine dans l'aliment.</p>	<p>Tube digestif des humains et d'autres mammifères.</p>	<p>Peut causer des infections mortelles chez l'homme et le singe. Infection de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme.</p>
<p><i>Candida albicans</i> (Bennet et Johnson., 2005).</p>	<p>Famille : <i>Saccharomycetaceae.</i> Levure unicellulaire ou filamenteuse. Souvent pathogène.</p>	<p>Par contact direct avec la peau.</p>	<p>Commensal saprophyte (sur la peau, bouche et le tube digestif de l'être humain).</p>	<p>Infections fongiques (muqueuses digestive et gynécologique).</p>
<p><i>Candida geotrichum</i></p>	<p>Famille : <i>Saccharomycetaceae.</i> Levure unicellulaire ou filamenteuse.</p>	<p>Par contact direct avec la peau.</p>	<p>Commensal saprophyte</p>	<p>Infections fongiques</p>
<p><i>Aspergillus niger</i> (Samson et al.,2001).</p>	<p>Famille : <i>Trichocomaceae.</i> Champignon filamenteux.</p>	<p>Par inhalation des spores.</p>	<p>Sur les fruits et légumes. Dans le sol.</p>	<p>L'aspergillose.</p>

Annexe 7 : Résultats de l'effet antimicrobiens des deux HEs dans « Roll-on »



HE de citron



HE d'oranger



Le mélange des deux huiles

Recherche des levures et moisissures dans le « Roll-on » après 30 de conservation.



HE de citron



HE d'oranger



Le mélange des deux huiles

Recherche des germes aérobies mésophiles dans le « Roll-on » après 30 de conservation

Chapitre I

Synthèse

bibliographique

Chapitre II

Matériels et

méthodes

Chapitre III

Résultats et

discussions

Références

bibliographiques

Annexes

Conclusion

Introduction