



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahlab « Blida 1 »

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Laboratoire des biotechnologies des productions végétales

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

**Spécialité :** Biotechnologie végétale

**Thème**

**Contribution à la valorisation des déchets de *Citrus reticulata blanco* (Mandarine)  
de la région de Mitidja.**

**Présenté par :**

KHEMILI Ilham

&

ZEBAR Amira

**Devant le jury composé de :**

CHAOUIA Cherifa	Professeur	<b>Président</b>	Université Blida 1
BRAHIMI Latifa	Maître de conférences B	<b>Examineur</b>	Université Blida 1
BENRIMA Atika	Professeur	<b>Promotrice</b>	Université Blida 1
TADJINE Nacéra	Doctorante	<b>Co-Promotrice</b>	Université Blida 1

**Promotion : 2019 – 2020.**

# Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu Allah de nous avoir donné la Forces, la volonté et le courage, ainsi de nous avoir aidées vers le chemin de savoir afin d'accomplir ce travail modeste

Nos profonds remerciements à notre promotrice **Pr. BENRIMA** et notre co-promotrice **Mme Tadjine**

Pour ses encouragements, ces conseils, son aide tout au long de ce travail.

Nous tenons également à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils

Nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance.

Nos sincères remerciements s'adressent au responsable et à tout le personnel du laboratoire Saidal.

Nos remerciements vont également à tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicaces*

## JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL

Aux êtres les plus chers au monde qui je suis très fière de les avoir ou tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte « mes très chers parents », Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur soutien moral et financier, pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir réussir. Que dieu leur procure bonne santé et long vie.

A mes Sœurs Selina lina et Bisma et Mon frère Nour el islam que j'adore et je leur souhaite la réussite dans leur vie

A mes cousins et cousines « Aisha, Imene, Linda, Nawel »

A ma chère binôme Amira et sa famille.

A tous mes amis :

A Narimene, de tous nos moments fantastiques, de toujours me comprendre, et à toutes nos longues discussions.

A Lamia rabeah Sidhom, avec qui j'ai passé des moments inoubliables

A Nour, daouia, Ahlem, Soumia, Linda, Oussama, Reda, Rania, Meriem, Kamira, hocine, Mouir ; de tout le temps passé ensemble à l'université, merci pour les heures d'écoute, pour tous les souvenirs, vous étés les meilleurs

***ILHAM***

## *Dédicaces*

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, ce travail est achevé. Je dédie ce  
modeste travail à :

Mes parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les  
meilleures conditions, pour leurs sacrifices et leurs soutiens.

A mes très chers frères : Islam, Khatim, Naim et Nassim.

A ma chère binôme Ilham et sa famille.

A mes chères copines : Ahlam et Nour El Houda et Amira.

A tous mes enseignants sans exception. A mes camarades de  
promotion et à ceux qui me sont chers.

*AMIRA*

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Partie Synthèse bibliographiques**

### **Chapitre I : les agrumes**

I.1. Généralités sur les agrumes.....	2
I.2. Origine et distribution.....	2
I.3. Les agrumes dans le monde .....	3
I.4. Les agrumes dans l'Algérie.....	4
I.5. Systématique .....	4
I.6. Le genre Citrus.....	5
I.6.1. Citrus reticulata blanco.....	5
I.6.2. Classification Botanique.....	6
I.6.3. Les variétés.....	6
I.6.4. Utilisation et effet thérapeutique.....	7

### **Chapitre II : Les huiles essentielles**

II.1. L'aromathérapie.....	7
II.2. Les métabolites .....	8
II.2.1. Les métabolites primaires .....	8
II.2.2. Les métabolites secondaires .....	8
II.2.2.1. Les composés phénoliques.....	8
II.2.2.2. Les alcaloïdes.....	10
II.2.2.3. Les huiles essentielles.....	10
II.3. Définition d'huile essentielle .....	10
3.1. Répartition et localisation .....	11
3.2. Rôle des huiles essentielles chez les plantes.....	12
3.3. Propriété des huiles essentielles .....	12
II.4. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	13
4.1. Extraction par hydrodistillation .....	13
4.2. Expression à froid.....	14
4.3. Extraction par micro-ondes.....	15
4.4. Extraction par solvants organiques.....	15
4.5. L'extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	16

4.6. Enfleurage.....	16
II.5. Hydrolat aromatique.....	16
II.6. Notion de chémotype: .....	16
II.7. Toxicité des Huiles essentielles: .....	17
7.1. Toxicité par voie orale.....	17
7.2. Toxicité dermique.....	17
7.3. Neurotoxicité: .....	17
7.4. Cancérogénicité .....	18
7.5. Hépatotoxicité.....	18
7.6. Néphrotoxicité.....	18
II.8. Précautions d'emploi .....	19
II.9. Quelques conseils lors d'une intoxication aux HE.....	19
II.10. Contrôle de qualité des huiles essentielles .....	19
II.11. Technique d'analyse.....	20
11.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	20
11.2. Le couplage chromatographie en Phase Gazeuse Spectrométrie de Masse (CPG-SM).....	20
II.12. Composition chimique .....	21
12.1. Groupe des terpénoïdes .....	21
12.1.1. Les Monoterpènes.....	22
12.1.2. Les sesquiterpènes .....	22
12.2. Groupe des composés aromatiques .....	23
12.3. Autres composés d'origine diverses .....	24
II.13. Activités biologiques.....	24
13.1. Activité anti-oxydante.....	24
13.2. Activité antimicrobienne .....	24
13.3. Activité insecticide .....	25
<b>III. Généralités sur les activités étudiées .....</b>	<b>25</b>
1. Activité antioxydante des huiles essentielle.....	25
1.1. Radicaux libres et stress oxydatif .....	25
1.2. Les antioxydantes .....	26
1.3. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants .....	26

1.3.1. La méthode du radical DPPH.....	27
1.3.2. La méthode FRAP.....	27
2. Activité antimicrobienne .....	28
2.1. Les antibiotiques.....	28
2.2. Le mode d'action des huiles essentielles .....	28
2.3. L'antibiogramme .....	28

## **Partie expérimentale**

### **Matériel et méthodes**

#### **I. Matériel**

I.3. Matériels microbiologique.....	31
I.5. Matériel non biologique.....	32
I.6. Milieux de culture .....	32

#### **II. Méthodes**

<b>II.1. Extraction des huiles essentielles .....</b>	<b>33</b>
a) Principe .....	33
b) Mode opératoire: .....	33
II.1.1. Récupération, conditionnement ET conservation d'huile essentielle.....	35
II.1.2. Calcul du rendement en huile essentielle.....	35
II.1.3. Calcul le taux d'humidité .....	35
II.1.4. Analyses des huiles essentielles .....	36
4.1-Propriétés organoleptiques .....	37
4.2-Propriété physico-chimiques .....	37
4.2.1. Indice de réfraction (Ndt) .....	38
4.2.2. La Densité relative .....	39
4.2.3. Indice d'acide .....	39
<b>II.2. Etude de l'activité antioxydante</b>	
<b>II.2.1. Mécanisme d'action.....</b>	<b>40</b>
<b>II.2.2. Le test de piégeage du radical DPPH.....</b>	<b>40</b>
a) Principe.....	40
b) Mode opératoire .....	40
c) Expression des résultants .....	41
<b>II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE.....</b>	<b>42</b>

II.3.1. Préparation de milieu de culture.....	42
II.3.2. Préparation des suspensions bactériennes .....	42
II.3.3. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotique.....	42
II.3.4. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielle.....	42
II.3.5. Déterminations des CMI.....	45

## **Partie résultats et discussion**

1- Caractéristiques organoleptiques .....	46
2- Rendement d'extraction .....	46
3- Le taux d'humidité .....	47
4- Evaluation de l'activité antioxydant.....	47

<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>50</b>
--	-----------

<b>Référence bibliographique .....</b>	<b>51</b>
--	-----------

**Annexes**

**Glossaire**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

## Liste des abréviations

**HEs** : les huiles essentielles

**C.reticulata** : Citrus reticulata blanco

**MII** : métabolites secondaires

**REH** : le rendement en huile essentielle

**MHE** : la masse d'huile essentielle extraite

**Ms** : la masse de la matière végétale

**H** : Taux d'humidité

**IA** : Indice d'acide.

**DPPH** : un radical chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**AA** : activité antioxydant

**ERO** : espèces Réactives d'oxygènes

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517nm.

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**IC<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice de 50 % de radicaux

**GN** : gélose nutritive

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : aire de répartition d'origine des agrumes.....	3
<b>Figure 02</b> : Fruit de l'espèce <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	6
<b>Figure 03</b> : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation.....	14
<b>Figure 04</b> : presse hydraulique pour la méthode d'expression à froid.....	15
<b>Figure 05</b> : Montage d'une distillation par micro-ondes.....	16
<b>Figure 06</b> : Le couplage Chromatographe en Phase Gazeuse - Spectromètre Infra-Rouge.....	23
<b>Figure 07</b> : réaction de réduction de DPPH.....	29
<b>Figure 08</b> : le fruit de <i>Citrus reticulata blanco</i> .....	31
<b>Figure 09</b> : l'écorce de <i>citrus reticulata blanco</i> (Mandarine) .....	32
<b>Figure 10</b> : Dispositif d'hydrodistillation utilisé à l'échelle du laboratoire.....	35
<b>Figure 11</b> : L'extraction de l'huile essentielle de <i>Citrus Reticulata Blanco</i> effectuée par hydrodistillation.....	36
<b>Figure 12</b> : Masse des écorces à la stabilisation du poids.....	38
<b>Figure 13</b> : Extrait de l'huile essentielle de <i>Citrus Reticulata Blanco</i> .....	38
<b>Figure 14</b> : Principe de la diffusion sur disque .....	43
<b>Figure 15</b> : Rendement en huile essentielle de <i>Citrus Reticulata Blanco</i> (Mandarine).....	51
<b>Figure 16</b> : le Taux d'humidité d'écorce de <i>citrus reticulata blanco</i> .....	52
<b>Illustration 1</b> : Squelette de base des polyphénols.....	9
<b>Illustration 2</b> : Structure chimique de l'isoprène.....	23
<b>Illustration 3</b> : Exemple d'un monoterpène acyclique à gauche (myrcène) et d'un monoterpène cyclique à droite (p-cimène).....	24
<b>Illustration 4</b> : Structure générale d'un sesquiterpène.....	25
<b>Illustration 5</b> : Structure chimique de quelques composés aromatiques des HE.....	26

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les souches utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne.....	33
<b>Tableau 2</b> : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.....	45
<b>Tableau 3</b> : Couleur, aspect et odeur d'huile essentielle de genre Citrus Reticulata Blanco.....	50

## Glossaire

**Athérosclérose** : est une maladie touchant les artères, consiste en la formation, dans la paroi des artères, de plaques d'athérome

**Auto-guérison**: également appelé auto-équilibre ou auto-régénération, est une ressource naturelle du corps humain, où il est naturellement conçu et structurée biologiquement pour maintenir la santé.

**Bile**, un liquide amer de couleur jaune vert, joue un double **rôle**. Elle sert d'une part de voie de sortie pour certains déchets de l'organisme et, de l'autre, contribue à la digestion et l'absorption des lipides par l'intestin,, C'est là que la **bile** se mélange à nos aliments qui ont déjà subi un brassage et une dégradation dans l'**estomac**. La **bile** sert à digérer les graisses et, en particulier, à en faire passer une grande partie dans le sang

**Dose létale (DL<sub>50</sub>)** : est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai. La DL<sub>50</sub> est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière.

**Glandes surrénales** sont situées, comme leur nom l'indique, au-dessus des reins. Elles ont pour rôle de sécréter des hormones impliquées dans différents processus. La partie externe de la **glande**, la corticosurrénale, sécrète les glucocorticoïdes (cortisone).

**Hépatoprotection** ou antihépatotoxicité est la capacité d'une substance chimique à prévenir les dommages au foie

**Hydrocarbures aliphatiques** : sont des composés constitués de carbone et d'hydrogène. Il peut s'agir de molécules à chaîne ouverte, linéaire ou ramifiée

**Infections nosocomiales** : ce sont les infections contractées au cours d'un séjour dans un établissement de santé (hôpital, clinique...). Elle est aussi appelée infection associée aux soins.

**Maladie opportuniste** : une maladie due à des germes habituellement peu agressifs mais qui sont susceptibles de provoquer de graves complications en affectant des personnes ayant un système immunitaire très affaibli

**Rutaceae** (Rutacées) forment une famille de plantes appartenant à l'ordre des Sapindale

**Sclérose latérale amyotrophique (SLA)**, aussi connue sous le nom de maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative grave qui se traduit par une paralysie progressive des muscles impliqués dans la motricité volontaire. Elle affecte également la phonation et la déglutition.

**Syndrome de détresse respiratoire aiguë** est un type d'insuffisance **respiratoire** (pulmonaire) qui résulte de nombreuses anomalies différentes responsables de l'accumulation de liquide dans les poumons et d'une réduction excessive de l'oxygène dans le sang

**Vasodilatation** est une augmentation de la taille (diamètre) des vaisseaux (vaso-) par dilatation. Cette dilatation est rendue possible par un relâchement des muscles qui composent la paroi des vaisseaux sanguins (artères et veines). Elle peut être provoquée par adaptation du corps.

# **Introduction**

Les plantes qui produisent des huiles essentielles représentent une grande partie de la flore naturelle et une ressource importante dans divers domaines tels que la pharmacie les industries alimentaires et cosmétiques en raison de leur saveur leur parfum et de leur activité biologique (Swamy et al.2016).

Les agrumes, qui sont cultivés dans le monde entier, sont reconnus comme faisant partie des fruits les plus consommés en termes d'énergie, de nutriments et de compléments alimentaires (Tripoli et al, 2007). Leur production mondiale est estimée à plus 90 Mt (USDA, 2016) dont 14 millions de quintaux ont été produits en Algérie (Lagha-Benamrouche et al, 2013). Ils sont de riches sources d'antioxydants naturels, qui sont maintenant largement acceptés comme étant bénéfiques pour santé (Zou et al. 2016). La capacité antioxydante des agrumes a fait l'objet de recherches dans de nombreuses études des littératures (Bocco et al. 1998; Zhang et al. 2014; Lee et al. 2015).

Parmi toutes les espèces d'agrumes, la mandarine « *Citrus reticulata blanco* » est très populaire (Mukhar et al, 2005; Li et al, 2006). Les différentes variétés de *Citrus reticulata blanco* ont été largement utilisées comme médicament par les chinois pendant une longue période en raison de leur activité pharmacologique, (Yu et al, 2009). Des études récentes ont montré que les écorces de *citrus reticulata blanco* sont une source de composés biologiquement actifs. Elles sont riches en vitamine C et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles (Huang Y, 2010 ; Moulehi el al 2012).

L'étude des huiles essentielles reste un sujet brûlant malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. L'importance commerciale de ces produits conduit à des études scientifiques approfondies, du fait de leur composition chimique.

Dans le but de faire connaître les effets bénéfiques de l'huile essentielle on a choisi d'étudier l'huile essentielle de l'écorce de la mandarine (*Citrus reticulata blanco*) de la région de Mitidja , notre travail de recherche est divisé en trois parties, la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les agrumes et l'huile essentiel , dans la deuxième partie, nous aborderons une démarche expérimentale qui porte sur la description du matériel et méthodes utilisés, et la troisième partie a été consacré à une analyse détaillée des résultats et leurs discussion suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

# **Synthèse bibliographique**



## I.1. Généralités sur les agrumes

Le mot agrume provient du latin (aigre) qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (**Benediste et baches, 2002**). Ils sont de trois genres principaux du groupe citrinae dans la famille des Rutacées: Citrus, Poncirus, Fortunella.

Les agrumes sont de petits arbres toujours verts, à feuillage dense et souvent épineux, Leur tronc est assez court et droit (**Barboni, 2006 ; Ramful et al ; 2011**) composées de deux parties : une partie souterraine formée par le porte greffe et une partie aérienne constituée par la variété (**Benttayer, 2003**). Elles sont caractérisées par la présence des poches sécrétrices d'huile essentielle qu'on retrouve à la fois dans les feuilles et l'écorce du fruit (**Escartin, 2011**). Selon **El otmani (2005)**, les agrumes sont généralement classés parmi les espèces végétales pérennes moyennement sensibles au froid.

## I.2. Origine et distribution

Différentes hypothèses ont été élaborées sur l'histoire et l'origine géographique des agrumes, tous les auteurs s'accordent sur le fait que l'original des agrumes a pris naissance au Sud-Est asiatique, bien que sa culture a probablement commencé en Chine (**Peña et al, 2007**) à cause de la diversité des espèces qui s'y trouvent (**Gmitter et al, 2007**). Les études ont suggéré que la diversité des agrumes se structure uniquement autour des 4 taxons :

- Pamplemoussiers ; Citrus maxima (L.) : archipel malais et Indonésie,
- Cédriers (C. medica L.) « Appelé dans l'ancien temps par les grecs : Pomme de Médie » originaire du Nord-est de l'Inde et régions voisines de Birmanie et de Chine,
- Mandariniers (Citrus reticulata blanco) : Vietnam, la Chine du sud et le Japon (**Webber et al, 1967; Scora, 1975**)
- C. micrantha Wester originaire des philippines.

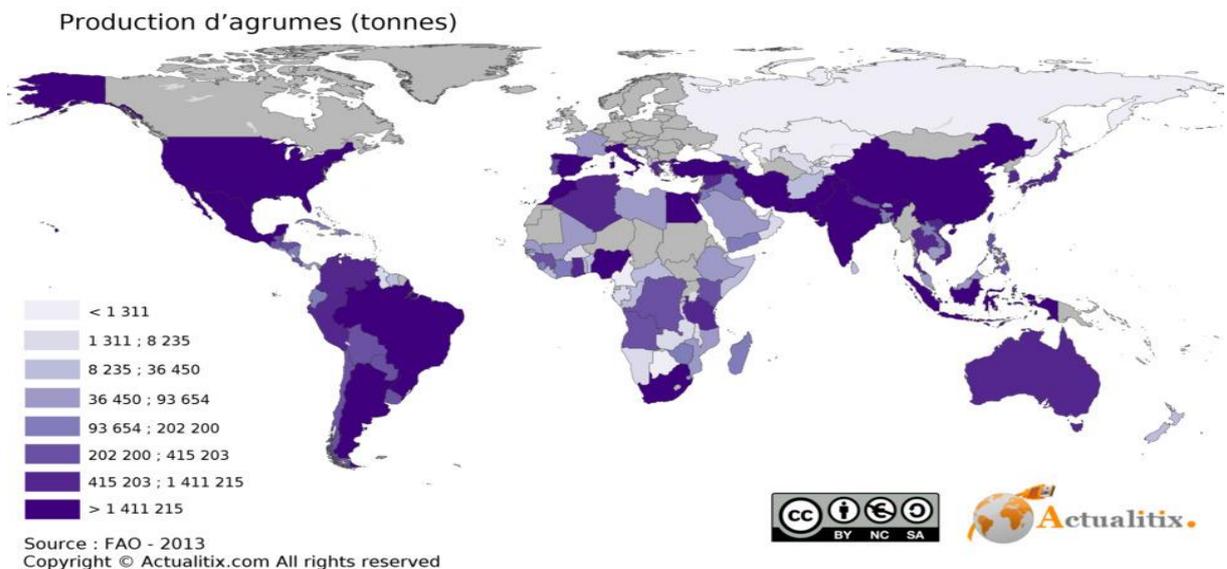
Vers le premier siècle avant JC, les agrumes à l'origine cultivés en Chine, fut apporté en Iran puis dans des pays méditerranéens. (**praloran, 1971**), les navigateurs arabes, les propagent sur les côtes orientales de l'Afrique jusqu'au Mozambique. Christophe Colomb, à l'occasion de son second voyage (1493), les introduits en Haïti, à partir de laquelle la diffusion se fera vers le Mexique (1518), puis les Etats-Unis d'Amérique (1569 à 1890).

Enfin, ce sont les navigateurs Anglo-Hollandais qu'en 1654 introduisent les premiers Agrumes dans la province du Cap en Afrique du Sud (**Loussrt, 1989b**).

Au fur à mesure des mouvements humains ces 4 taxons de base auraient donné lieu à des recombinaisons génétiques par hybridation, créant les autres types d'agrumes que l'on peut rencontrer aujourd'hui.

Les agrumes des genres *Poncirus* et *Fortunella* sont originaires de zones septentrionales de l'Est de la Chine, tandis que ceux du genre *Citrus* ont une origine méridionale entre l'Inde et l'Indonésie (**colombo, 2004**).

Actuellement, les agrumes se poussent dans plus de 130 pays, (**Jackson et Linskens, 2002**). Dont le climat est tropical, subtropical ou méditerranéen, principalement entre les latitudes de 40°N et 40°S (**Gmitter et al, 2007**).



**Figure 01.** Répartition géographique de la production mondiale d'agrumes (**FAO, 2013**).

### I.3. Les agrumes dans le monde

La culture des agrumes a pris naissance il y a probablement 4000 ans, Aujourd'hui la superficie consacrée à cette culture dépasse largement les 3 millions d'hectare.

L'agrumiculture s'observe presque dans toutes les zones du globe, essentiellement dans les régions méditerranéennes et tropicales où cette production est possible (**Benaissat, 2015**).

Selon les données du Département Américain de l'Agriculture USDA, la production mondiale d'agrumes s'élève à plus 90 Mt pour la campagne 2016/2017 dont 73% de la production sont consommés en frais, 21% sont destinés à la transformation et 6% à l'exportation. Cette production est très diversifiée avec 54% Oranges, 31% Tangerines, Mandarines, 8% Citrons, et 7% Pamplemousses (**USDA, 2016**)

Les principaux producteurs d'agrumes dans le monde sont : La Chine est le premier producteur d'agrumes dans le monde avec une part de 34% et un volume de 29,5 millions de tonnes, elle est suivie par le Brésil avec une part de 22%. L'Union Européenne (UE) arrive au 3ème rang suivi par le Mexique (6,7 millions de tonnes) et les Etats unis (4,6 millions de tonnes). Le Maroc occupe le 7eme rang, suivi par la Turquie avec une part de 1,6%. (**USDA, 2016**). Quant à l'Algérie, elle occupe la 19eme place dans le rang mondial, avec une production de 1.2 millions de tonnes par ans (**FAO, 2013**).

#### **I.4. Les agrumes en Algérie**

L'Algérie est l'un des pays producteurs d'agrumes du Bassin Méditerranéen, elle couvre 178 variétés d'agrumes (**BICHE en 2012**). Ils sont cultivés dans trois grandes régions du pays correspondant aux plaines du littoral et sublittoral méditerranéen (**PRALORAN.1971**), où les conditions de sol et de climat sont favorables.

L'agrumiculture concerne 32 wilayas et couvre une superficie globale de 70.503 ha, ce qui représente 11 % de la surface cultivée dans le pays (**Abdelkader, 2018**). Le centre du pays compte 56% de cette surface d'agrumes, 30% se trouvent à l'est du pays, et 14% à l'Ouest. (**Houaoura ,2013**).

Les principales espèces cultivées dans ces régions sont les oranges, les clémentines, les citrons et pomelos (**MADR, 2009**).

En terme production l'Algérie est passée de 7 millions de quintaux en 2010 à plus de 14 millions de quintaux en 2018. Faisant ainsi de notre pays le 19ème producteur d'agrumes au monde, et le 3ème dans l'Union du Maghreb arabe (**Lagha-Benamrouche et al, 2013**).

### I.5. Systématique

D'après **PRALORAN (1971)**, les agrumes appartiennent à :

Règne : Végétale

Embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotes

Sous classe : Archichlomydeae

Ordre : Germinale (Rutales)

Famille : Rutaceae

Sous famille : Auratioideae

Sous-tribu : Citrinae

Les agrumes comprennent trois genres principaux le genre fortunella comprend six espèces et le genre Poncirus ne renferme qu'une seule espèce le Poncirus trifoliata. Elle est utilisée comme porte greffe car ses fruits ne sont pas comestibles. Et le genre Citrus (la majorité des agrumes appartiennent à ce genre) (**Benedicte et Michel, 2011**).

### I.6. Le genre *Citrus*

Citrus : en latin classique qui désigne soit un bois soit un fruit odorant (le cèdre et le cédrat) Le genre de citrus appartenant à la famille des Rutaceae (**Gmitter et al, 2007**) est l'une des cultures les plus largement cultivés dans le monde à cause de leurs bénéfices nutritionnelles (**Zhang et al, 2011**). Ils permettent un apport en vitamine C, acide folique, potassium et pectine (**Rafiq et al, 2018**).

Il contient 130 genres répartis dans sept sous-familles et compte de nombreux genre producteurs de fruits et d'huiles essentielles (**Sidana et al, 2013**).

Le genre *Citrus* comprend plusieurs fruits, les plus importants à l'échelle mondiale étant l'orange doux (*C. sinensis*: 67,8% de la production mondiale d'agrumes), la mandarine (*C. reticulata* : 17,9%), citron (*C. limon*: 6,3%) et pamplemousse (*C. maxima* L: 5,0%). Parmi les

genres d'agrumes mineurs qui constituent la majeure partie des 3,0% restants, on retrouve l'orange amère (*C. aurantium*), et le limettier (*C. aurantifolia*). (Ammad et al. 2018).

### I.6.1. *Citrus reticulata* blanco

*Citrus reticulata* blanco communément appelée « mandarine » elle est l'une des trois agrumes originaux du genre citrus et parmi les agrumes frais les plus commercialisés. C'est un petit arbre épineux au sommet dense de fines branches, qui aurait été introduit au cours du huitième siècle (Apraj et Pandita, 2014). Ses feuilles sont lancéolées, vert foncé, persistantes et brillantes (Barbelet, 2015). Le fruit est sphérique d'environ 6,5 à 7,5 cm de diamètre, de forme aplati (Dugo et Giacomo, 2002). L'écorce est verte au moment de la récolte et devient orange lors de la maturation (Ladaniya, 2011), et elle a une épaisseur moyenne et une surface lisse, dans laquelle se trouvent les glandes remplies d'huiles essentielles (Bousbia, 2011). Elles sont cultivées dans les pays méditerranéens. Elle est beaucoup plus résistante au froid que l'orange douce et l'arbre est plus tolérant à la sécheresse (Lim, 2012).



**Figure 02.** Fruit de l'espèce *Citrus reticulata* blanco localement appelée « mandarine » (Oueslati A, 2010).

### I.6.2. Classification botanique (Hallal, 2011)

Règne : plantae

Sous-règne : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : Citrus L.

Espèce : Citrus reticulata blanco

### I.6.3. Les variétés

Il existe plusieurs variétés de mandarines :

- Mandarine (Citrus reticulata blanco.)
- Mandarine commune (Citrus reticulata « Ponkan »)
- Mandarine clémentine
- Tangerine
- Satsumas (Citrus unshin) : mandarines précoces, déjà mures quand la peau est encore verte.
- Mandarine king (Citrus nobilis) (**BOUSBIA N., 2011**).

### I.6.4. Utilisation et effet thérapeutique

Les fruits *Citrus reticulata* sont riches en flavonoïdes notamment la naringine, l'héspéridine, et la nobiletine et sont utilisés en tant qu'ingrédients antioxydants fonctionnels pour le traitement de l'athérosclérose.....etc. (**Sun et al, 2010**).

La *C. reticulata* est utilisée tant qu'un anti-inflammatoire. Elle permet de stimuler le système immunitaire et lutter contre la fatigue grâce à sa richesse en vitamine C (**Lakshmi et al, 2014**). Et en polyphénols (**Ercan et Al, 2011**).

La consommation du *C. reticulata* ou de leur jus frais semble être associée à une amélioration des profils lipidique sanguins, moins de risque de cancers, l'abaissement de la pression artérielle, ainsi que la réduction des risques d'accident vasculaire cérébral, les maladies cardiaques coronariennes, traiter l'obésité (**Ramful et al, 2011**). Elles ont également des propriétés antiallergique qui sont dues à sa richesse en quercitrine, et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, qui est un neurotransmetteur implique dans les réactions allergiques (**Gonzalez Molina et al, 2010**).

La mandarine est excellente pour les os grâce aux caroténoïdes qui vont stimuler la production de cellules osseuses et stimuler l'absorption du calcium (**Nakayama et al, 2011**).

La peau de *C. reticulata* peut être utilisée dans les formulations de soins de la peau antirides. (**Apraj et al, 2016**).

Les écorces sont utilisées comme agents toniques, astringents, carminatifs et antiscorbutiques

## **II.1. L'aromathérapie**

L'aromathérapie est l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques de plantes (huiles essentielles) dans un but préventif, curatif ou de mieux-être. C'est l'art de soigner par les huiles essentielles (HE) pour l'harmonisation de la santé physique et mentale.

L'aromathérapie utilise les HE pour renforcer le processus naturel d'autoguérison.

## **II.2. Les métabolites**

Chez les plantes, il existe deux grandes classes des métabolites :

### **II.2.1. Les métabolites primaires**

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante (**Scheinvar L, 1995**). Ils sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme. Ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal (**Bediaga, 2011**). Exemple : Les aminoacides, les lipides, les glucides, et les acides nucléiques (**Scheinvar L, 1995**).

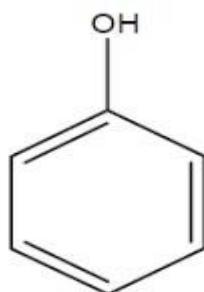
### **II.2.2. Les métabolites secondaires**

Ce sont des molécules organiques complexes synthétisées à partir des métabolismes primaire et résultent des réactions chimiques ultérieures (**Croteau et al, 2000 ; Raven et al, 2000**) et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes (**Lutge et al, 2002; Abderrazak et Joël, 2007**). Elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (**Gravot, 2008 ; Kansole, 2009**). Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés, par action antiherbivore, inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre

la sécheresse et lumière UV. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales (**Gravot, 2008 ; Thomas, 2009**). Les MII constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale (**Newman et Cragg, 2012**).

### II.2.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire, présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**), caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre.



**Illustration 1.** Squelette de base des polyphénols (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

Les polyphénols montrent une large gamme des effets biologiques incluant les activités antibactérienne, anti-inflammatoire, antiallergique, hépatoprotection, antivirale, anticancéreuse et de la vasodilatation (**Middleton et al., 2000**). Ils sont largement distribués avec plus de 8000 structures ont été identifiées chez les végétaux (**Waksmundzka-Hajnos and Sherma 2010**), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (**Dai and Mumper 2010**).

Les polyphénols sont subdivisés en 03 classes principales : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Tapiero et al, 2002**).

#### a- Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques rares dans la nature (**Budić-Leto and Lovrić 2002**). Ils sont formés de deux catégories : les acides hydroxybenzoïques qui sont des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque qui par monohydroxylation et/ou polyhydroxylation forme des acides phénoliques et des acides polyphénoliques respectivement l'acide gallique et l'acide protocatéchique et les acides hydroxycinnamiques qui sont des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique. De même avec l'acide cinnamique, l'hydroxylation conduit à l'acide pcoumarique et à l'acide caféique (**Haslam, 1994**).

#### **b- Flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal (**Marfak, 2003**). Ce sont des composés naturels appartenant à la famille des Polyphénols (**Seyoum, Asres et al, 2006**), souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.

Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes telles que l'activité antimicrobienne (**Ulanowska, Tkaczyk et al. 2006**), antifongique (**Ortuño, Báidez et al.**

**2006**), anti inflammatoire (**Park, Lee et al. 2008**).

#### **c-Tanins**

Ce sont des polyphénols polaires utilisés pour tanner les peaux (**Berthod et al, 1999**), ils existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 (**Cowan, 1999**) et ils peuvent avoir plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antitumorale, antivirale (**Bruneton, 1999**).

#### **II.2.2.2. Les alcaloïdes**

Ce sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique, ils peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits (**Harborne et Herbert, 1995**).

#### **II.2.2.3. Les huiles essentielles**

#### **II.3. Définition d'huile essentielle**

Ils sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (**Cseke et Kaufman, 1999**).

Les essences ou huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles (**Durvelle, 1930**). Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur fortes, avec une densité inférieure à celle de l'eau, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s'altèrent facilement à l'air, elles sont liquides à température ordinaire, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques (**Belaïche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et Anthon, 1999**).

La norme française AFNOR (**2000**) définit l'huile essentielle comme : «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero, 1996**).

La composition des huiles essentielles est très complexe, il contient des molécules aromatiques dont l'action bénéfique sur la santé est étudiée et mise en pratique par l'aromathérapie. Les plus fréquemment rencontrés sont les alcools, les cétones, les aldéhydes terpéniques, les esters, les éthers, les terpènes et les oxydes (**Meynadier et Raison, 1997**).

Pour être de qualité optimale, une huile essentielle doit être 100% naturelle (c'est-à-dire non dénaturée par des molécules de synthèse chimique), 100% pure (c'est-à-dire non mélangée avec d'autres huiles essentielles ayant des caractéristiques proches) et 100% intégrale (c'est-à-dire que le distillateur aura recueilli la totalité des molécules contenues dans la matière végétale distillée). La détermination du chémotype permet de la garantir (**Chassaing, 2006**).

Les teneurs en huiles essentielles sont généralement très faibles et estimer 1% (**Guignard, 1995**). Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle, à l'exception de celle du bouton florale du giroflier où le rendement en huile essentielle atteint largement les 15 % (**Makhlouf, 2002**).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les HE ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs).

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « Essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

### **3-2 : Répartition et localisation des huiles essentielles**

Les HEs se trouvent au cœur des plantes aromatiques, sous forme d'essence (**FESTY, 2014**). Dans certaines plantes, l'essence est produite dans le cytoplasme des cellules sécréteurs dans d'autres, elle se trouve en liaison glucosidique à l'intérieur des tissus et ne se manifeste que lorsqu'on froisse, écrase, sèche ou distille la plante. (**Schauemberg et Paris, 2010**) et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, ou des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs (**Bruneton, 1999 ; Hazzit, 2002; Boz et al ; 2009**), Sur le site de stockage, les gouttelettes d'HE sont entourées de membranes spéciales constituées d'ester d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des HE ainsi que leur oxydations à l'air (**ANTON et LOBSTEIN, 2005**). Et même ils peuvent être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs (bergamotier, rose,..), les feuilles (citronnelle, eucalyptus,...), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre,...), les fruits (anis, badiane,...), le bois (bois de rose, santal,...), ou les graines (muscade,...), dans des écorces (**Oussala et al, 2006**).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (**Belkou et al, 2005**).

### **3-3 : Rôle des huiles essentielles chez les plantes**

D'après **Fouché et al, (2008)** les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leurs environnements et assurent leurs ultimes défenses chimiques contre les microorganismes.

Elles repoussent les parasites et protègent la plante de certaines maladies grâce à leurs propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes ou insectifuges.

Elles attirent au contraire les insectes pollinisateurs (fleurs parfumées, fécondées par certains insectes butineurs) et permettent ainsi à la plante d'assurer sa reproduction.

Elles représentent une réserve d'énergie mobilisable ex.: en cas de conditions climatiques défavorables (conservation d'humidité dans des climats désertiques).

Elles servent aussi à réguler la température à l'intérieur de la plante lui permettant ainsi de mieux supporter la chaleur.

### **3-4 : Propriété des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont utilisées dans de nombreux produits, tels que cosmétiques, préparations médicales, aliments, comme aromatisants ainsi que dans l'aromathérapie. **(Boughendjioua et boughendjioua, 2017; Dosoky et Setzer, 2018).**

L'huile essentielle possède des propriétés antibactériennes très importantes : elle est utile pour lutter contre les infections respiratoires. Elle prévient et soigne les infections de la gorge.

- Elle favorise la digestion, stimule la production de bile, évite les fermentations intestinales, calme les douleurs gastriques d'origine nerveuse, et les crampes abdominales. Elle agit aussi contre les parasites intestinaux.

- Avec son parfum frais, piquant et herbacé, elle stimule les glandes surrénales.

- Diluée et utilisée en massages, elle tonifie en cas de fatigue physique et intellectuelle, permet de lutter contre le stress et renforce le système immunitaire. En diffusion dans l'air ambiant, elle stimule les capacités intellectuelles **(Buronzo, 2008).**

- En médecine dentaire, plusieurs HEs ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries **(Paul G et al, 2012).**

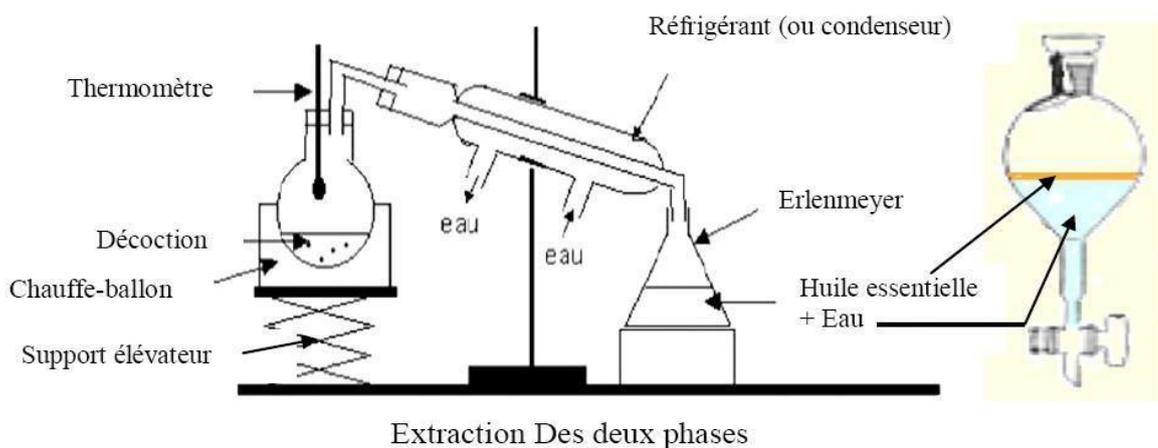
### **3-5: Procédés d'extraction des huiles essentielles**

L'extraction des huiles est une étape nécessaire qui est présente dans de nombreux procédés de fabrication et dans différents domaines industriels relevant de la pharmacie, du cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire **(Chemat, 2011).**

### 3-5-1 : Extraction par hydrodistillation

C'est la méthode la plus utilisée, le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon rempli d'eau distillée placé sur une source de chaleur (**Figure 03**), le tout est ensuite porté à l'ébullition (La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes). La vapeur chargée d'huile ; en traversant un réfrigérant se condense et chute dans une ampoule à décanter et l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité (**El HAIB, 2001**). L'hydrolat s'écoule dans le béc, alors que l'huile essentielle s'accumule dans la burette.

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme le climat, le sol, et les conditions de croissance influence sur la qualité et la concentration des composés dans les huiles essentielles, et par conséquence leur pouvoirs thérapeutique (**Mirmostafa et Rasooli, 2002**).



**Figure 03.** Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation (**Lagunez, 2006**)

### 3-5-2 : Expression à froid

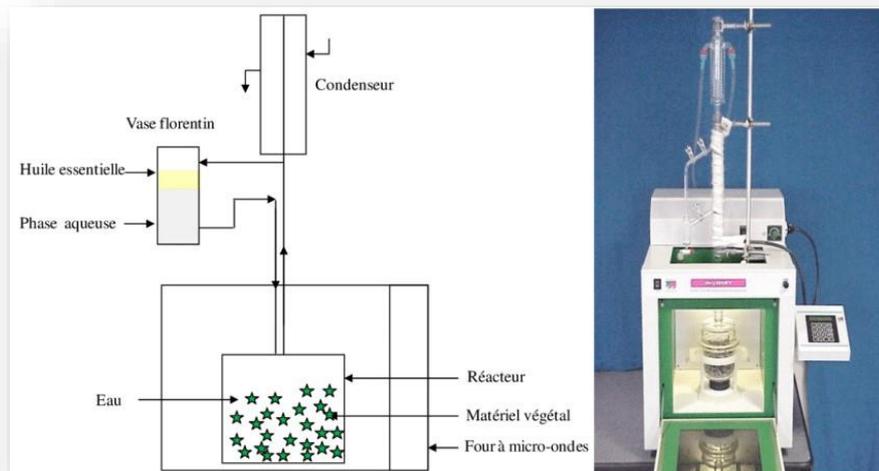
C'est le procédé le plus ancien et le plus simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire leurs huiles essentielles. Cependant, il reste limité car il ne s'applique qu'aux agrumes dont le péricarpe des fruits possède des poches sécrétrices d'essences. (**Baudoux et al, 2012**). Cette technique est uniquement mécanique et consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais afin de détruire les poches sécrétrices d'essences et donc de libérer l'essence qu'elles contiennent. L'expression à froid permet de limiter l'oxydation en conservant les antioxydants

naturels présents dans la fraction non volatile de l'essence. Le produit final obtenu est appelé essence car il n'a subi aucune modification chimique lors de son procédé d'extraction (**Roux, 2011**).



**Figure 04.** Presse hydraulique pour la méthode d'expression à froid (**Anonyme, 2014**)  
**3-5-3 : Extraction par micro-ondes**

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (**Menge et al, 1993**). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et se libère ainsi en huile (**Figure 05**).



**Figure 05.** Montage d'une distillation par micro-ondes (EL HAIB, 2011)

### 3-5-4 : Extraction par solvants organiques

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques. Cette méthode est pratiquée au niveau industriel et utilise des solvants comme l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone (Kim, 2002). Le solvant est ensuite éliminé par évaporation.

Elle ne doit pas être employée si l'on veut préparer une huile essentielle à usage thérapeutique car il pourrait rester des traces de solvant (RAYNAUD, 2006).

### 3-5-5 : L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

Il s'agit d'un procédé qui utilise le dioxyde de carbone sous deux états, liquide ou supercritique, l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique consiste à traiter une matière première aromatique végétale et naturelle avec du CO<sub>2</sub>. Dans cet état le CO<sub>2</sub> a la viscosité d'un gaz et la densité d'un liquide, ce qui fait de lui un bon solvant. Il entraîne les molécules odorantes dans un séparateur, la pression est ensuite abaissée afin de séparer le CO<sub>2</sub> de l'extrait, il devient alors gazeux et recircule jusqu'à l'extraction totale de la matière première aromatique. Les molécules odorantes précipitent au fond du séparateur avant d'être recueillies.

Cette technique permet de préserver les qualités organoleptiques de la matière première naturelle puisque la séparation de l'extrait du CO<sub>2</sub> supercritique se fait à température ambiante. Elle est écologique car elle ne génère pas de gaz à effet de serre, ni de polluant (1).

### **3-5-6: Enfleurage**

L'enfleurage est une technique ancienne et assez difficile mettant en contact l'organe producteur avec une graisse qui se sature en huile essentielle après quelques jours on obtient des pommades, cette technique est réservée au organe fragiles (les fleurs violettes, tubéreuse, jasmin), celles-ci sont étalées sur des plaques de verre enduites de graisse qui va absorber les substances volatiles (**Lardry et al, 2007**).

### **3-6: Hydrolat aromatique**

Lors du processus d'obtention des huiles essentielles par entraînement à la vapeur, un sous-produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes, ce produit est l'hydrolat ou hydrosol en anglais (**Price et al, 2004**). Elle est plus ou moins aromatisée selon les plantes distillées car elle se charge de molécules aromatiques au cours de la distillation. Les hydrolats contiennent sous forme dissoute certains composés aromatiques des huiles essentielles (moins de 5%) (**Patricia, 2005**).

### **3-7: Notion de chémotype**

Le chémotype d'une HE est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HE. Il permet de distinguer l'H.E extraite d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente (**Benayache, 2001**). Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante à savoir : l'origine géographique, l'altitude, type de sol, ensoleillement, taux d'humidité, la saison, le climat, et la période de récolte, etc. qui peuvent influencer la composition de l'huile essentielle (**Zhiri et al, 2007**). Il est si important de connaître les chémotypes pour éviter le mauvais usage et même des accidents ayant impact sur notre santé.

Il est important de noter que les HE à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes, mais aussi des toxicités très variables (**PIBIRI, 2005**).

### **3-8: Toxicité des huiles essentielles**

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Comme pour un médicament, il existe pour chaque huile essentielle un équilibre entre le bénéfique et le risque qui doit aussi être envisagé.

La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques et ils provoquent des effets délétères sur plusieurs organes. On distingue les toxicités suivantes :

#### □ Toxicité par voie orale

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : avec des doses létales à 50% (DL 50) supérieures à 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées : (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une toxicité élevée autour des 1.4 g/kg (données observées chez l'animal), tandis que les plus toxiques sont les huiles essentielles avec un DL 50 inférieure à 1g/kg [de Boldo (0,13 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg) ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg)] (**Bruneton J, 1999**). Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits (**Bernadet M, 2000**).

#### □ Toxicité dermique

L'usage des huiles essentielles en application locale, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations, photosensibilisation voire des allergies (**Muther L, 2015**). C'est l'exemple de la Cannelle, le Basilic exotique, la Menthe, le Clou de girofle, le Thym (**Elhaib A, 2011**), et les essences d'agrumes (pamplemousse, citron...) qui sont photosensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil (**Couic-Marinier F, 2013**).

#### □ Neurotoxicité:

Les cétones et dans une moindre mesure les lactones sont agressives pour les tissus nerveux et peuvent développer une toxicité suivant le type de cétone, la dose, la voie d'administration (camphre, thuya, hysope, aneth). Risque de convulsions épileptiforme pour des doses allant de 35 à 70 gouttes avec l'Armoise, le Persil, l'Hysope et le thuya (**Elhaib A, 2011**).

#### □Cancérogénicité

En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter la présence de constituants "allylet propénylphénols" de certaines huiles qui sont capables d'induire l'apparition de cancers chez les rongeurs (**Bruneton J, 1999**).

Les femmes enceintes, les enfants, ainsi que les personnes souffrant d'un cancer hormonodépendant ne doivent pas utiliser les HE riches en sesquiterpènes, par ce qu'ils possèdent une structure moléculaire proche des hormones naturelles produites par le corps humain. Elles miment ainsi l'activité de ces hormones. Exemples d'HE provoquant cet effet : HE d'eucalyptus, de cyprès de Provence (**P. Franchomme et al. 2001 ; E. Miles, 2013 ; P. de Bonneval et al, 2014**).

#### □ Hépatotoxicité

Les HE riches en phénols et aldéhydes possèdent également une toxicité pour le foie lorsqu'ils sont employés à doses élevées sur de longues périodes. Ils doivent toujours être dilués. (**Chabert G, 2013**). D'autre part, des études ont montré qu'une administration prolongée d'HE de fenouil modifie la couleur des tissus hépatiques. L'administration de ces huiles par voie orale est contre indiqué chez la femme enceinte, l'enfant de moins de 10 ans ainsi qu'aux personnes souffrant de troubles hépatiques (**E. Miles, 2013**).

#### □ Néphrotoxicité

Elle peut être causée par l'absorption orale prolongée d'HE riches en monoterpènes. Ces HE stimulent en effet fortement les cellules rénales les néphrons, engendrant parfois une inflammation des reins. Ces HE seront donc à éviter en cas d'insuffisance rénale. Exemples d'HE néphrotoxiques : HE de genévrier, de pins ou encore de cyprès (**Elhaib A, 2011**).

### **3-9: Précautions d'emploi**

Cette huile doit être utilisée sur une période courte, car elle peut irriter la peau, surtout si elle est utilisée pure, elle est interdite aux enfants, et déconseillée aux femmes enceintes, à celles qui allaitent et aux personnes ayant la peau sensible. (**Buronzo, 2008**).

- Eviter l'exposition au soleil après application sur la peau car certaines HE sont photosensibles comme les essences des agrumes (Mandarine, Citron, ...).

- Ne jamais appliquer d'huile essentielle pure sur les yeux, les muqueuses auriculaires, digestives, nasales et urogénitales, sauf sous avis médical ou pharmaceutique.
- Il ne faut jamais injecter d'huiles essentielles par voie intramusculaire ou intraveineuse.
- Il faut faire attention aux interactions avec les traitements des patients, les huiles essentielles peuvent interagir avec un médicament, par exemple l'huile essentielle d'ail stimule la thyroïde alors que celle de fenouil diminue son activité.
- Pour toute utilisation par voie cutanée, l'HE doit être dilué dans une huile végétale, crème, gel ou pommade.

### **3-10: Quelques conseils lors d'une intoxication aux HE**

- En cas d'application trop importante sur la peau ou les muqueuses : éliminer l'excédent à l'aide d'un linge puis appliquer une quantité importante d'huile végétale.
- En cas d'ingestion massive et/ou accidentelle d'une HE : avaler une quantité importante d'huile végétale alimentaire puis appeler le centre antipoison de la région.
- En cas de projection d'HE dans l'œil : rincer abondamment sous l'eau fraîche puis appliquer de l'huile végétale à l'aide d'un coton imprégné (**D. Festy, 2013**).

### **3-11: Contrôle de qualité des huiles essentielles**

Selon la pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme certaines mesures physiques : indice de réfraction, et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants. La meilleure carte d'identité quantitative qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographie en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (**Pibiri, 2006**).

### **3-12 : Technique d'analyse**

L'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (**Joulain D, 1994**).

Plusieurs techniques chromatographiques sont utilisées dans l'analyse des HEs tel que : la CCM, l'HPLC, et le couplage de la CPG à la spectrométrie de masse.

### **1. Chromatographie en phase gazeuse**

Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilisables sans dégradation. Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles. Elle permet d'identifier et de contrôler toutes les molécules aromatiques et ainsi de déterminer le chémotype de l'huile essentielle, elle donne une véritable carte d'identité de l'huile essentielle et permet donc de déceler toutes les fraudes possibles ou encore de mettre en évidence tout problème qualitatif due à une mauvaise fabrication ou un mauvais stockage.

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analyses entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analyses repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

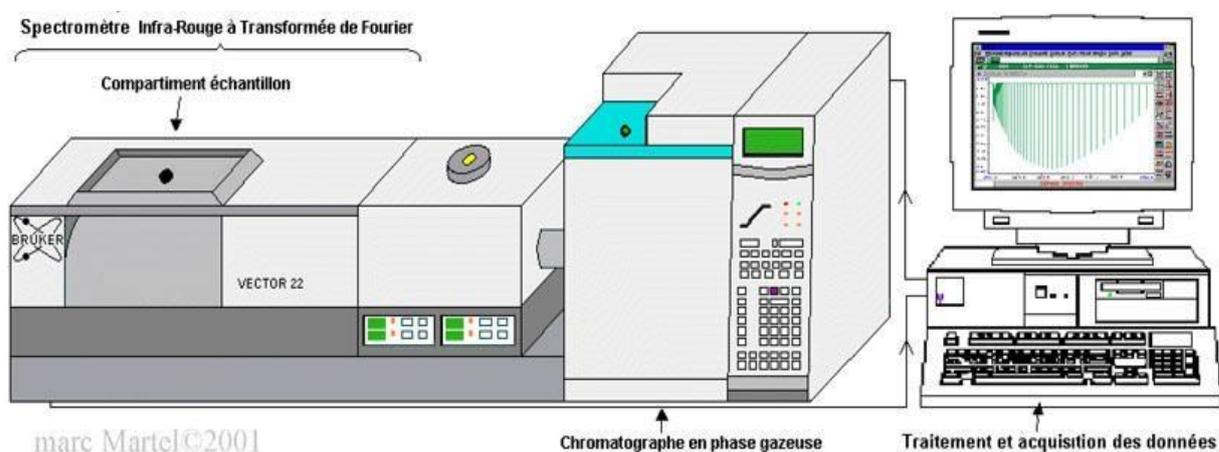
Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse CPG/SM

### **2. Le couplage chromatographie en Phase Gazeuse Spectrométrie de Masse (CPG-SM)**

La spectrométrie de masse par chromatographie en phase gazeuse (CPG/SM) est une technique instrumentale comprenant un chromatographe en phase gazeuse (CPG) couplé à un spectromètre de masse (SM) permettant de séparer, d'identifier et de quantifier précisément de nombreuses substances et les mélanges complexes de produits chimiques. La méthode est basée

sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM. Les spectres de masse obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles, commerciales (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (2)). Cette méthode est idéale pour l'analyse des centaines de composés de poids moléculaire relativement bas trouvés dans les matériaux environnementaux. Pour qu'un composé soit analysé par CPG/SM, il doit être suffisamment volatil et thermiquement stable. De plus, les composés fonctionnalisés peuvent nécessiter une modification chimique avant l'analyse, pour éliminer les effets d'adsorption indésirables qui affecteraient autrement la qualité des données obtenues (Marriott P, 2001).



**Figure 06.** Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie Infra-Rouge

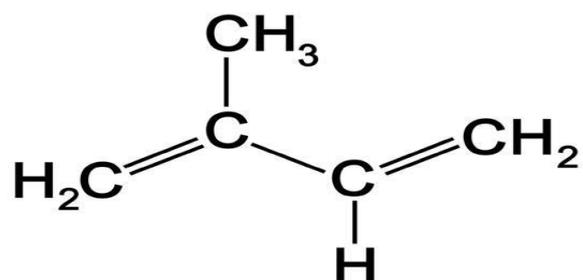
### 3-13 : Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants et des molécules chimiquement qui appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes : Le groupe de terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

(Bruneton, 1999), et d'autres composés d'origines diverses.

#### 1. Groupe des terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de formule générale  $(C_5H_8)_n$ , (T.Folliard, 2014), issus de couplage de plusieurs unités isopréniques.



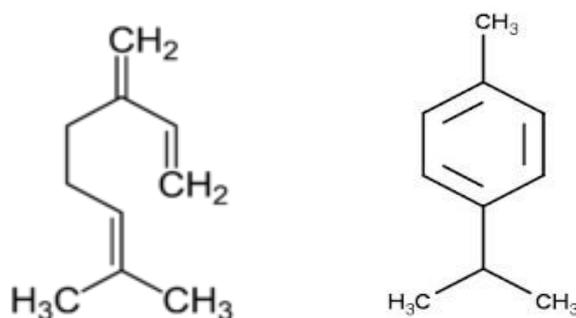
**Illustration 02.** Structure chimique de l'isoprène (Anonyme, 2020)

Les terpènes sont subdivisés selon le nombre de carbones présents dans leur structure en monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les tetraterpènes et les térapénoïdes, qui sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (Bakkali et al, 2008). Seuls les terpènes, mono (C 10) et sesquiterpènes (C 15) sont retrouvés dans la composition chimique des HE, ils sont dite volatile, dont la masse moléculaire est relativement faible (Bruneton, 1999).

C'est le groupe le plus important. Il comprend :

### 1.1. Les Monoterpènes

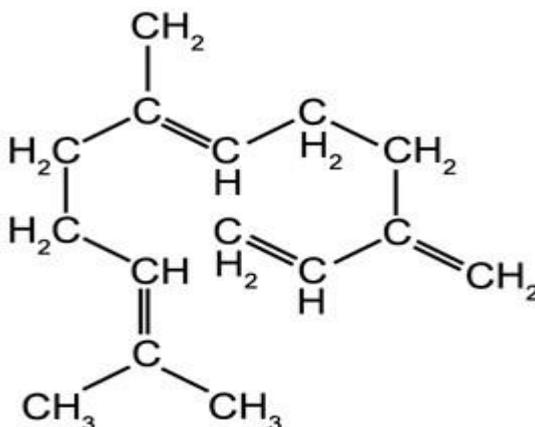
Ils sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> (Rahal, 2004). Ils constituent parfois plus de 90% d'huile essentielle (Bruneton J, 1999). Ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques ( $\alpha$ - et  $\gamma$ -terpinène, p-cymène) et aux monoterpènes bicycliques (pinènes,  $\Delta^3$  carène, camphène, sabinène).



**Illustration 03.** Exemple d'un monoterpène acyclique à gauche (myrcène) et d'un monoterpène cyclique à droite (p-cimène) (**Belfar F, Monsouri N, 2015**).

## 1.2. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont, en termes de fréquence, le deuxième groupe le plus présent dans les huiles essentielles après les monoterpènes (**Thormar H, 2011**). Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (**Belaiche, 1979**). Ce groupe comprend donc un nombre important de structures différentes : plus de 120 squelettes identifiés pour plus de mille composés identifiés (**Figueredo G, 2007**). Ils peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène,  $\alpha$ -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine,  $\beta$ -artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol,  $\beta$ -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cislongipinane-2,7-dione,  $\beta$ -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (**Bruneton, 1999 ; Laouer, 2004**). Ils jouent le rôle d'agent de défense dans les plantes. Ils sont difficiles à extraire des plantes aromatiques car ce sont des molécules dites « lourdes » et elles n'apparaissent qu'en milieu. Ces composants ne seront donc présents qu'au sein des HE de haute qualité, lorsque le producteur respecte le temps total de distillation.

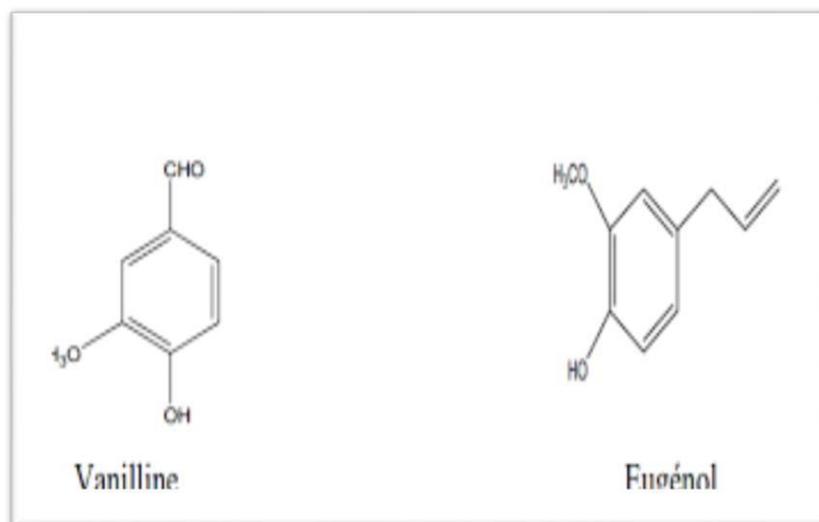


**Illustration 04.** Structure générale d'un sesquiterpène (**SEGHIRI R, 2013**).

## 2. Groupe des composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), dite non volatile, ils sont moins fréquents que les terpènes dans l'HE. Mais ils sont considérés comme un ensemble important car ils sont responsables des caractères organoleptiques (**Teisseire, 1991**). Cette

classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, L'anéthol, l'estragole et bien d'autres (**Illustration 5**) (**Scimeca, 2007 ; Bruneton, 2009**). Généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (**Bruneton, 1999**).



**Illustration 05.** Structure chimique de quelques composés aromatiques des HEs (**Scimeca, 2007 ; Bruneton, 2009**)

### 3. Autres composés d'origines diverses

Certains composés aliphatiques de faible poids moléculaire sont entraînés lors de l'hydrodistillation des huiles essentielles, Ces produits peuvent être azotés ou soufrés (**Teisseire, 1991**).

### 3-14 : Activités biologiques des huiles essentielles

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants (**Lahlou, 2004**).

#### 1. Activité antioxydant

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard, 1992**).

## 2. Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles ont été considérées comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes. Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Toutefois, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1955**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**).

## 3. Activité insecticide

L'effet insecticide des huiles essentielles par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activité insecticide (**Isman, 2000**).

### III : Généralités sur les activités étudiées

#### 1-Activité antioxydante des huiles essentielles

Des nouvelles recherches sont donc menées afin de découvrir de nouveaux antioxydants d'origine naturelle. Dans ce contexte les plantes aromatiques et médicinales et particulièrement leurs huiles essentielles ont fait l'objet de plusieurs recherches.

##### 1-1 Radicaux libres et stress oxydatif

De nombreuses réactions biologiques, nécessaires au fonctionnement normal de l'organisme, se produisent dans les cellules et les tissus du corps, et ces cellules utilisent de l'oxygène pour générer de l'énergie. La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Di Phosphate) en ATP (Adénosine Triphosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales.

D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des radicaux libres (**Delattre J et al, 2005**).

Ces radicaux libres sont des espèces chimiques contenant un électron non apparié dans sa couche externe qui lui confère une grande réactivité chimique. Extrêmement instable, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de 4-10 secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (**André, 1998, Beckman ; Ames, 1998**). Elles comprennent les espèces réactives oxygénées (ERO), les espèces réactives d'azote (ERN) et les espèces réactives de soufre (ERS) (**Taofiq et al. 2016**).

Le corps a généralement des mécanismes pour équilibrer la production et la neutralisation des espèces réactives d'oxygènes mais la plupart du temps, Il peut être affaibli par une production excessive de ROS.

En cas de concentration élevée, elle génère une agression appelée « stress oxydatif » (**Moreno et al. 2006**) ou tous les tissus et toutes leurs molécules peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (**Arausseu, 2002 ; Valko et al, 2006**).

Le stress oxydatif est principale cause initiale de plusieurs maladies: sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aiguë, le diabète, et les rhumatismes (**Favier, 2003**), les inflammations gastro-intestinales (**Atawodi, 2005**). Les maladies d'Alzheimer de Parkinson (**Jha et al, 1995**), et vieillissement prématuré de la peau (**Georgetti et al, 2003**) et le cancer (**Ali et al, 2003**)

Pour échapper à ces graves conséquences du stress oxydatif, l'apport d'antioxydants s'avère nécessaire.

## **1-2 Les antioxydants :**

Les antioxydants sont définis comme étant des substances naturels ou synthétiques, capable lorsqu'elle est présente à une concentration faible par rapport à un substrat oxydable de retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats et de piéger les radicaux libres (**Meziti, 2009; Rezaie et al, 2007**), en bloquant l'initiation ou la propagation des réactions en chaîne oxydante (**Wollinger et al. 2016**). Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (**TANGUY et al, 2009**).

Il existe deux classes d'antioxydants : les endogènes et les exogènes.

Antioxydants endogènes sont des enzymes ou protéines antioxydants (Superoxyde dismutase, Catalase, et Glutathion peroxydase) élaborés par notre organisme à l'aide de certains minéraux, elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (MIKA et al, 2004).

Les antioxydants exogènes qui sont, par définition, apportés de l'extérieur par l'alimentation.

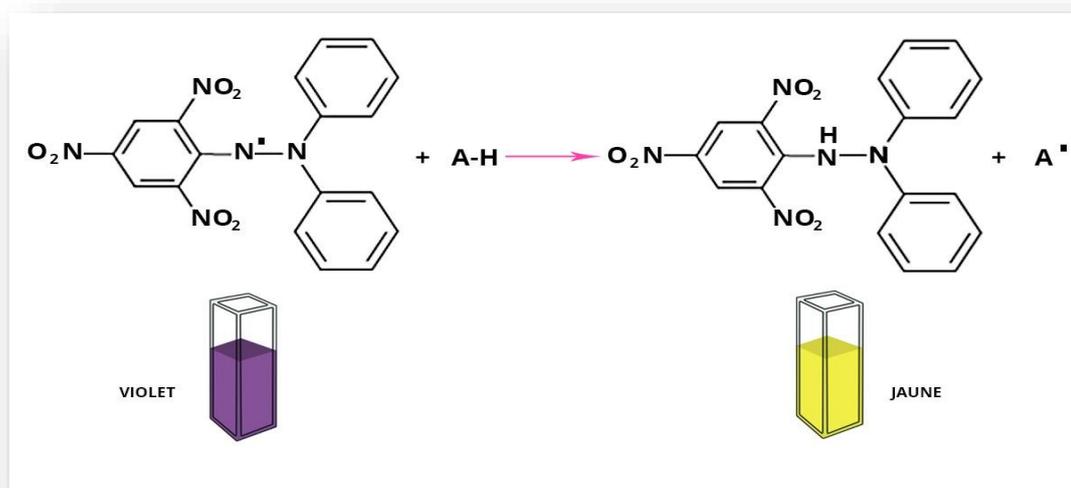
### **1-3 : Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants**

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des systèmes alimentaires et biologiques (Ali et al, 2008 ; Scherer et Godoy, 2009). Elles fonctionnent par deux réactions principales, le transfert d'électrons et le transfert d'hydrogène (prior et al, 2005).

Parmi ces techniques, nous citons :

#### **1-3-1 : la méthode du radical DPPH: Piégeage du radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl**

Il s'agit d'une méthode colorimétrique, qui mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, est un des radicaux azotés organiques les plus stables, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. La réduction du DPPH° est mesurée par spectrophotométrie à 517 nm (Brand w et al, 1995).



**Figure 07.** Réaction de réduction de DPPH (Maillard, 2018)

### 1-3-2 : la méthode FRAP: Puissance antioxydant de réduction du fer

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur la capacité des HE à réduire le fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) (pellegrini et al, 2003). Le complexe perd sa couleur jaune pour un bleu foncé, et les valeurs sont calculées en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 593 nm et en la rapportant à une solution étalon d'ions ferreux ou à une solution étalon d'antioxydants (Tsao et al, 2003).

## 2 : Activité antimicrobienne

### 2-1 : Les antibiotiques

Ce sont des médicaments qui servent à lutter contre les infections dues à des bactéries, ce sont des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries (Van Bambeke et Tulkens, 2008), mais l'utilisation aveugle de médicaments antimicrobiens a provoqué la résistance des microbes (Khan et al, 2009). Face à l'émergence de ces formes de résistance, la recherche de nouvelles molécules inhibitrices contre les micro-organismes est devenue une nécessité (Haddouchi et al, 2013). La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955).

La plupart des huiles essentielles ont un effet sur les micro-organismes, notamment les bactéries de type Gram-positif et Gram-négatif (**Kim et al, 1995**). Les champignons, les levures et les virus.

### **2-2 : Le mode d'action des huiles essentielles**

Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, et une fuite d'ions (K+) (**El amri et al, 2014**). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse des macromolécules l'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides. Le mode d'action des HE dépend aussi du type de microorganismes : En général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe. Les HE modifient la morphologie de la cellule bactérienne et inhibent les processus de respiration, d'absorption et d'excrétion (**Bencheikh, 2017**).

### **2-3 : Aromatogramme et son interprétation**

C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé (Muller- Hinton) qui permet de mesurer et de déterminer la capacité d'un des extraits à base des plantes à inhibé la croissance microbienne in vitro. Il renseigne, par conséquent, sur la sensibilité des germes vis-à-vis des agents anti-infectieux (**Benouda et Tagajdid, 2008**). Cette méthode à l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, et de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée pendant plus 50 ans d'utilisation mondiale (**BOUDJEMAA et al, 2010**). Le résultat est exprimé par la mesure de diamètre d'inhibition où les germes n'ont pas pu se développer (**Zayyad et al, 2014**).

# **Partie expérimentale**

Notre travail a été effectué au sein du laboratoire de centre de recherche et développement (CRD) de SAIDAL. Le laboratoire s'occupe de l'extraction, la caractérisation et l'analyse des huiles essentielles et extraits végétaux des plantes aromatiques ainsi que la détermination de leur activité antioxydante et microbienne. L'objectif de ce travail est l'extraction de l'huile essentielle de *Citrus reticulata blanco*, et l'évaluation de leur activité biologique.



**Figure 08.** Le fruit de *Citrus reticulata blanco*

### **1. Préparation du matériel végétal**

Les fruits récoltés ont été emballés dans des sacs, puis transportés au laboratoire, les écorces ont été récupérées et nettoyées avec un papier mouchoir pour enlever la poussière et autres polluants afin de réaliser l'extraction.



**Figure 09** : l'écorce de *Citrus reticulata* blanco.

## 2. Matériel microbiologique

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, trois souches bactériennes de référence dont une bactérie Gram négatives (*Escherichia coli*) et deux bactérie Gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*). Les souches testées sont impliquées dans les maladies opportunistes ou nosocomiales ainsi que dans toute autre maladie infectieuse.

Et deux champignons (levure du genre *Candida albicans*), elle provoque des infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique et (*aspergillus brasiliensis*). Provoque L'aspergillose.

Les souches microbiennes pathogènes sont d'une collection de culture type Américaine (ATCC). Elles ont été fournies par le laboratoire de contrôle qualité Site de Production GDC(SAIDAL). Le **tableau 1** montre les souches testées + **Annexe V**.

Origine	Références	Souches	Nature des micro-organismes
Institut Pasteur (Paris)	ATCC6633	Bacillus cereus	Bactéries
	ATCC6538	Staphylococcus aureus	
	ATCC8739	Escherichia coli	
	ATCC 10231	Candida albicans	Levure
	ATCC 16404	Aspergillus Brasiliensis	Champignons

**Tableau 1.** Les souches utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne

#### 4. Matériel non biologique

Une liste des appareils et des produits chimiques utilisés est mentionnée dans l'**annexe IV**

#### 5. Les Milieux de culture

Pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, le milieu Mueller Hinton a été utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'huile de *Citrus reticulata blanco*, En effet il s'agit d'un milieu non sélectif qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des antibiotiques. La composition de ce milieu est mentionnée dans l'annexe I.

La gélose Sabouraud est un milieu d'utilisation générale, non sélective, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures.

C'est une gélose glucosée présentant un ph légèrement acide pour favoriser la culture des champignons. Pour la culture des levures, on utilise des géloses coulées en boîte de Pétri (**annexe III**) (**figure 19**).



**Figure10.** Dispositif d'hydrodistillation utilisé à l'échelle du laboratoire

## II. Méthodes

### II.1. Extraction des huiles essentielles

La technique de l'hydro-distillation de type Clevenger est utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle à partir de l'écorce fraîche de la mandarine. Au niveau de laboratoire de CRD (SAIDAL).

Afin de réaliser cette extraction, les étapes suivantes ont préalablement été réalisées :

- ✓ Préparations d'écorces et les mélanger à l'eau dans un ballon de laboratoire
- ✓ Placer ce ballon dans le chauffe-ballon et introduire l'ouverture du Clevenger dans celle du ballon
- ✓ Etablir un équilibre entre les volumes d'eau présents dans les parties basses du Clevenger, en introduisant de l'eau par l'ouverture ✓

Allumer la chauffe ballon.

#### a. Principe

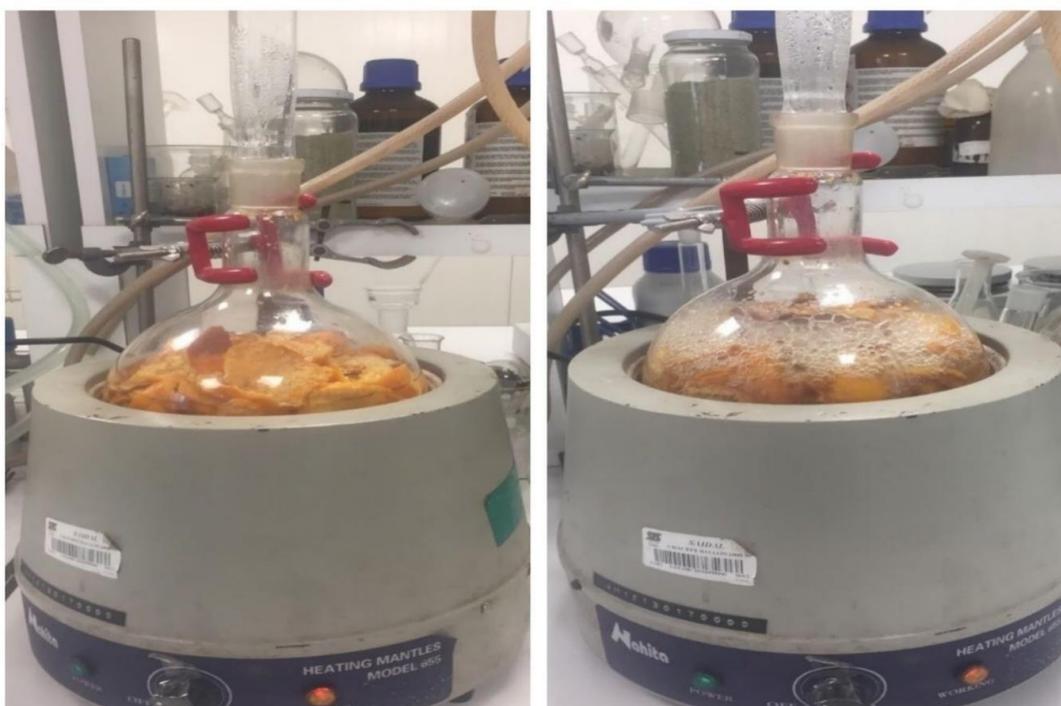
Le procédé consiste à immerger la matière première végétale (écorce de *Citrus reticulata blanco*), dans un ballon rempli d'eau distillée placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition (La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes). La vapeur chargée d'huile ; en traversant un réfrigérant se condense et

---

chute dans une ampoule à décanter et l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité (El HAIB, 2001). L'hydrolat s'écoule dans le bécher, alors que l'huile essentielle s'accumule dans la burette.

### b. Mode opératoire

500g de l'écorce fraîche sont introduit dans le ballon du Clevenger, un volume d'eau représentant les deux tiers du volume du ballon est ensuite ajouté avant de démarrer la distillation et l'ensemble est porté à ébullition. L'extraction dure en moyenne deux heures. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation et l'expérience est refaite plusieurs fois pour avoir une quantité suffisante. La quantité d'HE obtenue est pesée pour le calcul du rendement.



**Figure 11.** L'extraction de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* blanco effectuée par hydrodistillation.

### II.1.1. Récupération, conditionnement et conservation d'huile essentielle:

La conservation d'huile essentielle exige certaines précautions indispensables (**BURT, 2004**). L'huile essentielle récupérée est conditionnée dans un flacon en verre protégé avec de papier d'aluminium, hermétiquement fermé pour éviter tout risque d'altération par la lumière et l'oxygène de l'air. Les flacons sont conservés au réfrigérateur à une température de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Dans ces conditions la durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

### II.1.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Selon les normes AFNOR (1986), le rendement en huile essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée sèche ou humide.

Le rendement (RHE) est toujours exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE \%} = (\text{MHE en g} / \text{Ms en g}) \times 100$$

R : rendement en huile essentielle (%)

MHE : la masse d'huile essentielle extraite en g.

Ms : la masse de la matière végétale en g

### II.1.3. Calcul le taux l'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans une quantité connue de la matière végétale. Il a été déterminé par la méthode physique en introduisant 20 g d'échantillon et en le plaçant dans une coupelle tarée, elle-même positionnée dans une étuve réglée à  $103^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ .

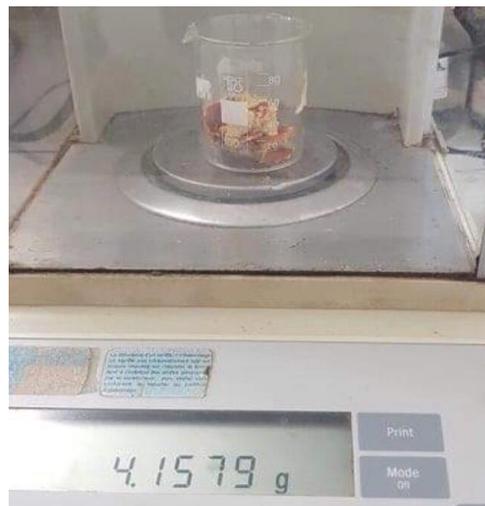
(**Bousbia, 2011**). Le taux d'humidité H de la matière végétale est donné par l'équation (1)

$$(1) \dots\dots\dots H = [(M_f - M_s) / (M_f) * 100]$$

H : Taux d'humidité

M<sub>f</sub> : Masse des «écorces avant introduction à l'étuve M<sub>s</sub>

: Masse des écorces à la stabilisation du poids.



**Figure 12.** Masse des écorces à la stabilisation du poids

#### II.1.4. Analyse de l'huile essentielle

Les HEs, doivent répondre à des caractéristiques analytiques qui sont établies par des commissions nationales et internationales d'experts. Pour connaître la qualité de l'huile essentielle de *C. reticulata* Il faut :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (l'aspect, l'odeur, la couleur)
- Déterminer ses propriétés physiques (densité, indice de réfraction) ainsi que leurs propriétés chimiques (indice d'acide). (**Afnor, 1989**).



**Figure 13.** Extrait de l'huile essentielle de *Citrus reticulata blanco*

#### **4.1 Propriétés organoleptiques**

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles nécessite l'utilisation de nos sens afin d'évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur ainsi la flaveur.

#### **4.2. Propriétés physico-chimiques**

##### **4.2.1. Indice de réfraction (Ndt)**

L'indice de réfraction (Ndt) consiste à déterminer le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile à une température constante (20°C), en utilisant le réfractomètre (**Nait Achour Kh, 2012**). La longueur d'onde spécifiée est (589,3 \* 0,3) nm, correspondant aux radiations D1 et D2 du sodium. = + 0,0004(t' - t) : valeur lue, à la température t', à laquelle a été effectuée la détermination.

- **Principe**

Il est soit pour mesurer directement l'angle de réfraction, soit pour observer la limite de réflexion totale, l'huile étant maintenue dans les conditions d'iso-tropisme et de transparence

### □ Mode opératoire

- ✓ Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C.
- ✓ Ouvrir le prisme secondaire et déposer 2 ou 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme principal.
- ✓ Fermer ensuite doucement le prisme secondaire.
- ✓ L'échantillon s'étale entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince.
  - ✓ Attendre que la température soit stable et effectuer la mesure.
- ✓ Noter la valeur de l'indice de réfraction affiché sur l'écran de l'appareil. (**Mazouz B et al, 2010**).

- **Expression des résultats**

L'indice de réfraction est donné par la formule suivante :

$$Nd_{20} = nd_t + 0,0004(t - 20)$$

$Nd_{20}$  : indice de réfraction à la température 20°C.

$nd_t$  : valeur de lecture à la température à laquelle a été effectuée la détermination.  $t$

: la température à laquelle a été effectuée la détermination.

Notons que pour un même échantillon, la mesure de la réfractométrie est effectuée trois fois et on prend la moyenne des 3 valeurs.

#### 4.2.2. La Densité relative

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau (**AFNOR, 1999**). Elle constitue un point de repère important car sa valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'HE

- **Mode opératoire**

-peser un tube a essais (5ml) propre et sec et faire la tare ; à l'aide d'une balance électronique de précision

-Prendre 1ml d'huile essentielle avec une micropipette, on la pèse afin d'obtenir son poids exact

-Faire la même chose pour 1ml d'eau distillée

- **Expression des résultats**

$$D = (M2 - M0) / (M1 - M0).$$

M0 : la masse de tube vide.

M1 : la masse de tube rempli d'eau distillée.

M2 : la masse de tube rempli d'HE

#### **4.2.3. Indice d'acide**

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme de corps gras (HE). Il consiste à neutraliser les acides libres par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium titrée, en présence de phénolphtaléine. (**Lion, 1955**).

- **Mode opératoire**

1g d'huile essentielle est introduit dans une erlenmeyer de 25ml ;

Ajoute 5ml d'éthanol à 96° neutralisé et 3 gouttes de l'indicateur coloré phénolphtaléine 1%.

Titre avec une solution de KOH 0,1N jusqu'à l'obtention d'un virage de couleur de la solution.

A la fin noter le volume exact de KOH consommé

#### **□ Calcul de l'indice**

L'indice d'acide (IC) est donné par la relation suivante :

$$IA = [(56,1 * VKOH * N)] / mh$$

IA : Indice d'acide.

N : Normalité de la solution de KOH (0,1mole /l)

VKOH : Volume d'hydroxyde de potassium consommé pour la neutralisation en (ml). mh

: Masse d'huile en (g).

## II.2. Etude de l'activité antioxydante

Dans notre travail, nous avons choisi la méthode de piégeage du radical DPPH pour valoriser le pouvoir antioxydant

### II.2.1. Mécanisme d'action

Un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'une autre substance en s'oxydant lui-même plus rapidement que celle-ci

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison. Ils sont capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, et agissent en formant des produits finis non radicalaires (Hellal, 2011 ; Akman et al, 2012).

### II.2.2. Le test de piégeage du radical DPPH

La technique a été réalisée suivant le principe et le mode opératoire suivant :

#### a) Principe

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2-2-diphényl picryl-1-hydrazyl (DPPH) libre, qui possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit la coloration devient jaune pâle, (Sanchez, 2002 ; Chen et al. 2004). Le changement de la coloration est proportionnel à l'AA ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (Moon Et Shibamoto., 2009). Cette décoloration est représentative de la capacité d'huile essentielle de la mandarine à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques.

#### b) Mode opératoire

Nous avons suivie les étapes suivantes (MANSOURI et al, 2011):

- La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2 mg de DPPH dans 50ml de méthanol.
- Le mélange est agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité.
- Un volume de 40mg d'huile essentielle est dilué dans 40ml de méthanol, c'est la solution mère, à partir de laquelle nous réalisons une série des dilutions.
- Un volume de 25µl de différentes concentrations d'huile essentielle (de 100500µl/mg) dans méthanol) ont été mélangés avec 975µl de la solution méthanoïque de DPPH dans des tubes à essai secs. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, le colorimétrique change (de violet intense au jaune clair), quand le DPPH est réduit.
- Les absorbances sont mesurées à 517nm à l'aide d'un appareillage UV/Visible. Contre le blanc (solution DPPH/méthanol).
- La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol.

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence.

### c) Expression des résultants

#### 1. Calcul le pourcentage d'inhibition

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$\% \text{ Activité antioxydant} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517nm.

#### 2. Calcul de la concentration inhibitrice IC50

Le IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % de radicaux libres (aussi appelée la CE50 Concentration Efficace), est la concentration de l'échantillon testé (HE) nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des

fractions testées. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydant est élevée. (SHARIFAR ET *al.*, 2007)

### **II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle**

#### **II.3.1. Préparation de milieu de culture**

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose Mueller-Hinton (M.H) pour l'étude de la sensibilité des bactéries au l'extraits de plante.
- La gélose Sabouraud pour l'isolement et l'entretien des suspensions fongiques et l'étude de leur sensibilité aux extraits.

➤ **Gélose Mueller Hinton (M.H) :**

Suspendre 38.0 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer et agiter jusqu'à la dissolution totale. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

➤ **Gélose Sabouraud :**

Suspendre 65.0 g dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer et agiter jusqu'à la dissolution totale. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

#### **II.3.2. Préparation des suspensions bactériennes**

Les bactéries à tester sontensemencées sur des boites de pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées à 37°C pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. Après incubation, 1 à 2 colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un vortex dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9% de se (NaCl) (Mohammedi, 2006).

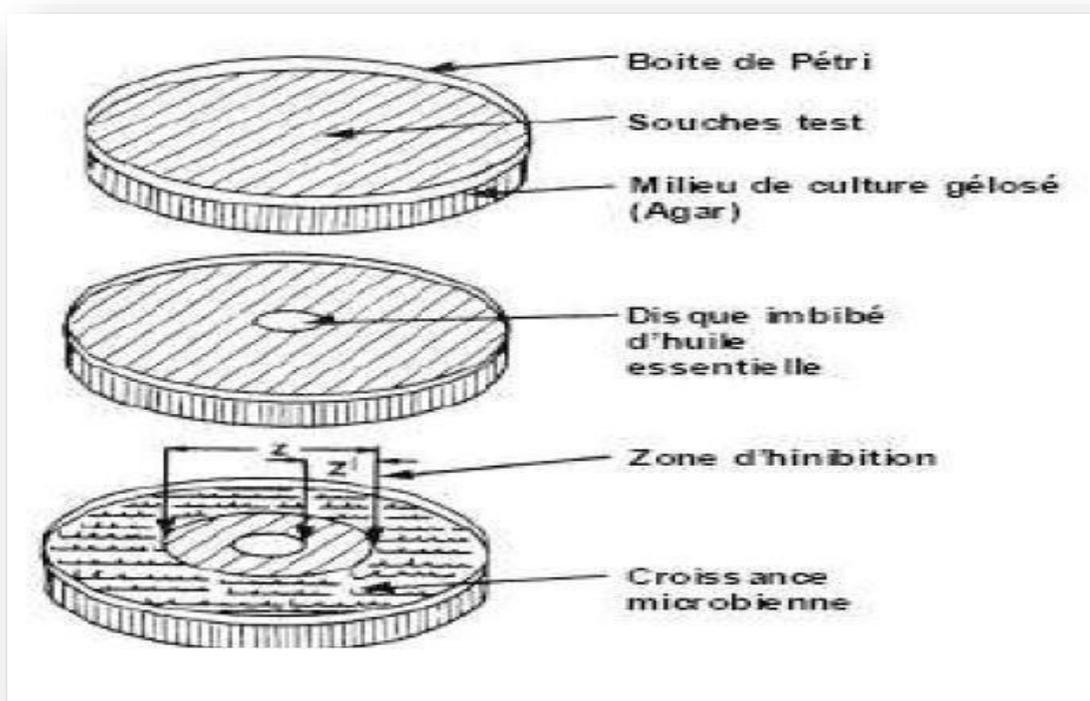
#### **II.3.3. Etude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques**

Cette étude a été réalisée par méthode de disque ou antibiogramme standard. Son principe consiste à déposer des disques de papiers buvard imprégnés des antibiotiques à tester à la surface des milieux de cultures préalablementensemencées avec les suspensions bactériens

#### **II.3.4. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielle**

L'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *citrus reticulata blanco* a été déterminé par la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier (Essawi, T et Srour, M, 2003), qui permet d'évaluation qualitative de notre huile essentielle « effet de l'huile pure », et l'évaluation quantitative de cette dernière, cette méthode a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des germes pathogènes vis-à-vis de notre HE.

Le principe de la méthode repose sur le pouvoir migratoire du composé testé en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de cellulose de 9 mm de diamètre (Whatman N°1) imprégné d'une quantité bien définie d'HE à tester sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne. Après incubation, Généralement, les microorganismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition. La recherche de l'activité antimicrobienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'HE de *citrus reticulata blanco*.



**Figure 14.** Principe de la diffusion sur disque (Kachetel L et al, 2016)

---

## □Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne préalablement préparée
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le charger au maximum
- Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué près d'un bord de la boîte de pétri
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération quatre fois, en tournant la boîte de pétri de 45° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Les boîtes de gélose ainsiensemencées sont laissées pendant 15 minutes à la température du laboratoire.

### • Dépôt des disques :

A l'aide d'une pince stérile, on met sur chaque disque des concentrations différents d'HE, à l'aide d'une pince flambée au Bec Bunsen, les disques sont déposés immédiatement à la surface de la boîte de pétri précédemmentensemencées. À raison de trois disques par boîte de pétrie pour les différentes dilutions et un disque par boîte pour l'huile essentielle pure.

Ensuite, Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48heures pour les levures.

### • Contrôle négatif

Dans chaque boîte de pétri, Un disque de papier buvard a été déposé sans être imbibé

### • Expression des résultats

---

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle , à l'extérieur de la boîte fermée.

<b>Sensibilité</b>	<b>Zone d'inhibition</b>
<b>Non sensible ou résistante (-)</b>	diamètre < 8mm
<b>Sensible (+)</b>	diamètre compris entre 9 à 14 mm
<b>Très sensible (++)</b>	diamètre compris entre 15 à 19 mm
<b>Extrêmement sensible (+++)</b>	diamètre > 20 mm

**Tableau 02.** Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (**Ponce et al ;2003**).

### **II.3.5. Déterminations des CMI**

Cette technique se pratique sur milieu solide, elle consiste à réaliser des dilutions d'huile essentielle, et à les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi, et à tester sur ces milieux les souches bactériennes à étudier. (**Alzoreky et Nakahara, 2003 ; Salie et al., 1996**).

Ce teste détermine la Concentration Minimale Inhibitrice « CMI » (**Hammer et al, 1999**). Qui correspond à la plus faible concentration de l'huile essentielle inhibant toute croissance microbienne visible à l'œil nu. Elle est réalisée, pour chaque espèce ayant montrée une sensibilité à l'égard de l'huile essentielle lors de l'essai précédent, par la technique de dilutions en milieu solide (**BOUALEM S el al, 2016**).



# **Résultats et discussion**

Notre huile essentielle est obtenue par la méthode d'extraction nommé hydrodistillation. Cette huile essentielle, doit répondre à des caractéristiques analytiques qui sont établies par des commissions nationales et internationales d'experts. Les huiles essentielles sont généralement liquides à la température ambiante, d'odeurs aromatiques rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est plus souvent inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé. Elles sont volatiles et entraînaibles par la vapeur d'eau, elles lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, et la plupart de solvants organiques.

### 1. Caractéristiques organoleptiques

Les HES des espèces de *Citrus reticulata blanco* présentent un aspect liquide visqueux, et une couleur blanc transparent. Elle est caractérisée par une odeur fraîche et aromatique

(**Tableau3**). Les mêmes caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *C.reticulata* sont rapportées par la norme **AFNOR (2000)**.

<i>Caractère</i>	<i>Couleur</i>	<i>aspect</i>	<i>Odeur</i>
<b>Citrus Reticulata Blanco</b>	transparent	Liquide visqueux	Odeur caractéristique fraîche, citronnée

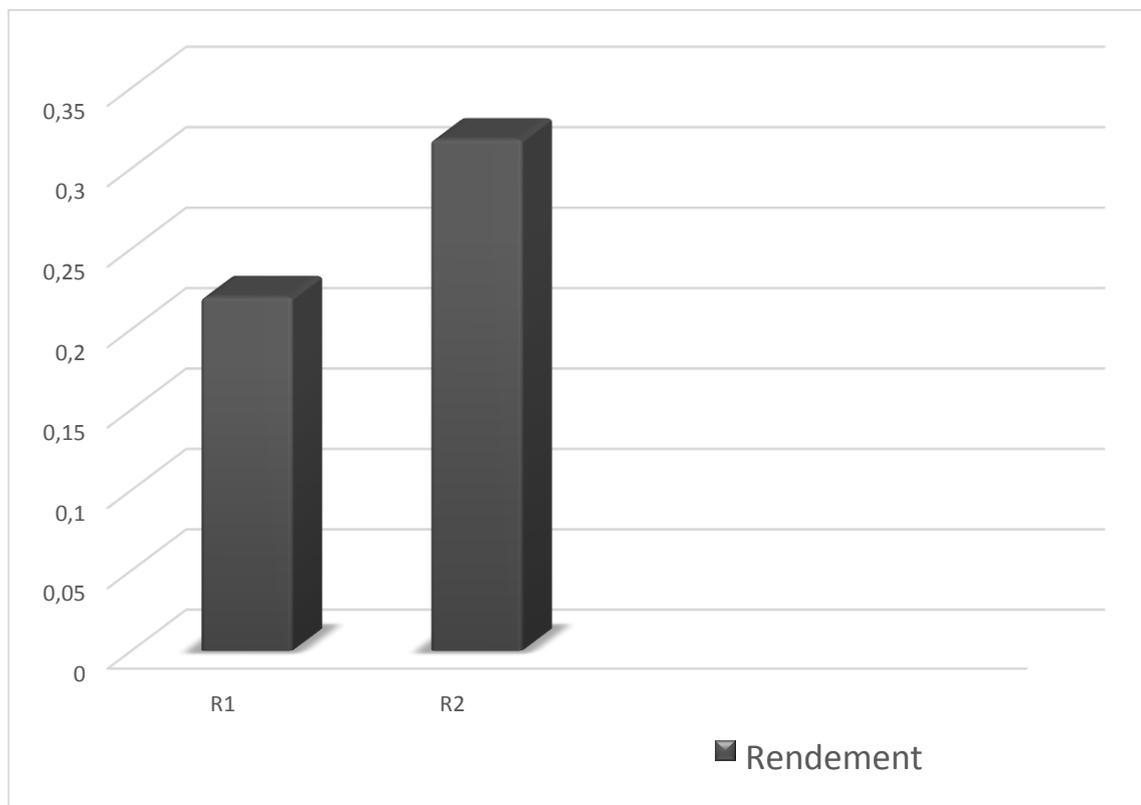
**Tableau 03.** Couleur, aspect et odeur d'huile essentielle du *Citrus reticulata blanco*

### 2. Rendement d'extraction

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite des écorces de *Citrus reticulata blanco* par la méthode d'extraction « hydrodistillation » Le rendement en huile essentielle de la mandarine (*Citrus reticulata blanco*), est exprimé en pourcentage massique (g/500) par rapport à la matière primaire.

$$R = (m \text{ HE} / mS) \times 100$$

$$MS = 500 \text{ g}$$



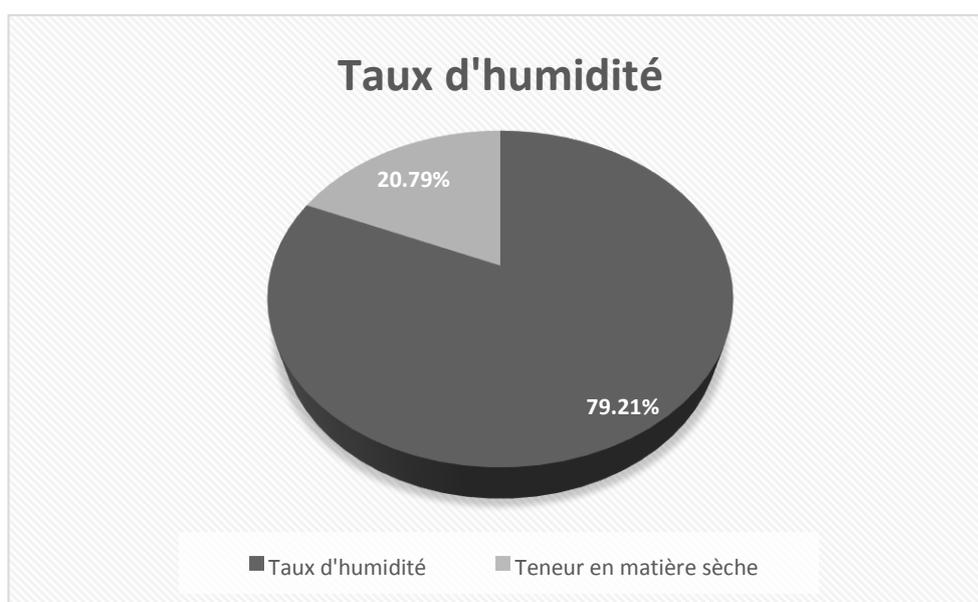
**Figure 15.** Rendement en huile essentielle de *Citrus reticulata blanco* (Mandarine)

D'après cette figure on constate, que le rendement en HE de l'écorce de *Citrus reticulata blanco* est de  $(0,27 \pm 0,01)$  %. En comparant les rendements en HEs obtenus au cours de cette étude, avec ceux rapportés dans la littérature ; les constats suivants ont été révélés : le rendement en HE extraite des écorces de *Citrus reticulata blanco* est inférieur à ceux rapportés pour l'écorce de *C. reticulata* (0,88) (Bouguerra A et al, 2014), et l'écorce de citron frais algérien (0,62%) (Ben Miri et al, 2018).

Le rendement de l'huile extraite dépend de plusieurs facteurs et selon les études précédentes, Cette différence est probablement due à la technique d'extraction des huiles, la période de récolte des agrumes, qui influence le rendement d'extraction (Telli et al, 2010). Et le climat, la géographie, la génétique de la plante, le degré de fraîcheur (Djenane, 2015). De plus la composition en HE, extraite par hydrodistillation, peut être influencé par la quantité en eau, mise dans le ballon de distillation, car certains composés tels que : le terpinèn-4-ol, l' $\alpha$ -terpinéol et le cinéol sont peu solubles dans l'eau (Williams et Lusunzi. 1994).

### 3. Le taux d'humidité

Le taux d'humidité d'écorce de *C.reticulata* est de 79,21%, cette humidité est élevée, ce qui signifie que plus de la moitié du poids d'écorces fraîches de *Citrus reticulata blanco* sont constituées par l'eau et concorde avec les valeurs indiquées dans la littérature **BARTLEY et JACOBS (2011)** et dans la **PHARMACOPEE EUROPEENNE (2010)**.



**Figure 16.** Le Taux d'humidité d'écorce de *Citrus reticulata blanco*

### 4. L'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'huile essentielle de *C.reticulata* a été évaluée par la méthode dupiéage des radicaux libres par le DPPH, parce qu'elle est l'une des méthodes la plus simple, rapide et efficace (**Bozin et al, 2008**). Le DPPH est initialement violet, se décolore (mesurable à 517nm). (**Erkan et al, 2008**).

On n'a pas pu obtenir un résultat dès le premier protocole donc on a refait l'expérience suivant un autre protocole mais toujours pas de résultat on a constaté que la poudre de DPPH fournie par le centre de recherche Sidal était périmée.

L'expérience a été répétée pour la troisième fois et la couleur du dpph a changé du violé vers le jaune. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés d'huiles

essentielles à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc de prouver que notre huile essentielle d'écorce de *Citrus reticulata blanco* possède un pouvoir antioxydant.

# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion et perspectives :

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes très intéressantes

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction des HEs d'écorce de *C.reticulata* et à l'étude des activités antioxydantes (activité anti radicalaire DPPH) et activités antimicrobiennes contenus dans ces huiles. Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser les plus simples techniques analytiques tel que l'extraction des huiles essentielles à partir de la matière végétale par hydrodistillation.

- L'extraction de l'écorce de *c.reticulata* a donné un rendement faible comparé au rendement trouvé dans la littérature existante.
- Nous avons trouvé une humidité élevée, ce qui signifie que la Mandarine est très riche en eau
- l'huile de *Citrus reticulata blanco* confirme qu'il possède une activité antioxydante exceptionnelle. Alors, cette huile peut être considérée comme un agent antioxydant naturel capable d'empêcher l'oxydation et l'altération de certains aliments.

En perspectives il serait intéressant de poursuivre ce travail par :

- Détermination des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de *Citrus reticulata*.
- Détermination de pourcentage d'inhibition IC50 de l'huile essentielle de *Citrus Reticulata Blanco*
- Une évaluation de l'activité antimicrobienne par aromatogramme, et mesure des Diamètres des zones d'inhibition en mm
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de dilution en milieu solide.
- Une analyse chromatographique par CPG (chromatographie en phase gazeuse) afin d'identifier les constituants responsables de l'activité de ces huiles.
- Les propriétés physico-chimiques tels que : la densité relative, Indice de réfraction, Indice d'acide, constituent un moyen de vérification et de contrôle de huile essentielle.

# **Références bibliographiques**

A

- Abderrazak M. et Joël R. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- AbougheAngone S, AworetSamseny R, EyeleMveMba C.2015: Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. *Phytothérapie*, 13: 283–287.
- ADAM K., SIVROPOULOU A., KOKKINI S., LANARAS T. et ARSENAKIS M., 1998 : Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, N°6, pp : 1739-1745.
- AFNOR, "Les huiles essentielles", 3eme Edition, Recueil des normes françaises, Paris, 1989
- AFNOR, 1986- Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR.2000: Huiles essentielles ». Association Française de Normalisation, Paris, p465.
- AFNOR. 1999 : Recueil des normes françaises ; huiles essentielles
- Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A. & Bora U., 2008.- Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International Journal*, 41: 1– 15.
- Amarti, F., et al., Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Journal of Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2010. 14(1): p. 141-148.
- Ammad F, Moumen O, Gasem A, Othmane S, Hisashi KN, Zebib B, Merah O. 2018. The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. *Comptes Rendus Biologies*, 341, 97-101

- 
- Amel OUESLATI (2010) : THÈSE DE DOCTORAT EN BIOLOGIE Spécialité : Génétique & Biologie Moléculaire
  
- André R. (1998) – La maladie de parkinson. Ed. Masson. 16-19
  
- Andrews J.M., (2001)-The Development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. J. Antimic. Chemo., 48 (1): 29-42.
  
- Anonyme. (2014). Les huiles essentielles, une utilisation millénaire. [En ligne]  
: <http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com/pages/i-les-huilesessentielles-uneutilisation-millenaire/definition/b-les-differentes-techniques-dextraction-des-huilesessentielles.html>
  
- Anonyme, (2020) -Ébauche d'évaluation préalable - Terpènes et terpénoïdes - Groupe des monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques, Environnement et Changement climatique Canada Santé Canada.
  
- ANTON R et LOBSTEIN A., 2005 : - Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, p522.
  
- Apraj VD, Pandita NS, 2014. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of Citrus Reticulatablanco peel. In : School of Science, SVKM's NMIMS, Vile-Parle (W), Mumbai 400 056, India. 6(2); 328-33
  
- Apraj, V. D., & Pandita, N. S. (2016). Evaluation of skin anti-aging potential of Citrus 56olonizati blanco peel. Pharmacognosy research, 8(3), 160.
  
- Atawodi S.E. (2005) – Antioxidant potential of African medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 4 (2): 128-133.

- 
- Bakkali, F., et al., Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 2008. 46(2): p. 446-475.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils.  
Rev: *Food. Chem.Toxicol.* 46: 446–475.
- Barboni T. (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie ;Thèse doctorat ; Spécialité : Chimie théorique, physique et analytique ; Università de Corsica – Pasquale Paoli ; pp 287
- Barbelet, S. (2015). Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle, Université de Lorraine.  
Baudoux D., Breda M., Zhiri A., 2012, *Aromathérapie scientifique : Huiles essentielles chémotypées*. 1e éd. Belgique : J.O.M, 98 pages.
- BEDIAGA M., 2011 . etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali . thèse de doctora. Universit de bamako . p 10.
- Bernard, T., Perineau, F., Bravo,P.,Delmas, M.Et Gaset,A.,( informations chimie), n 298,Oct,1988,197.
- Berthod A, Billardello B, Geoffroy S. (1999) Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation 1. *Analisis*. EDP Sciences, Wiley-VCH. 27: 750- 757.
- Belaiche P. (1979) - *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- Bencheikh, S. E. (2017). Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium ssp Aurasianum Labiatae*.

- - Bessesen, D.H. The Role of Carbohydrates in Insulin Resistance. *Journal of Nutrition* (2001)131: 2782S – 2786S.
  - Bernadet M (2000) *Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*, Editions Dangles.
- Benayache, F., Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret.
- Belkou H, Beyoud F, et Taleb bahmed z. (2005). Approche de la composition biochimique de la menthe vert (*Mentha spicata* L) dans la région de O Ouargla, mémoire DES , univ Ouargla. P2-61. Cité par Bessedik M et khenfer, 2014.
  - Benoit G. Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de Vienne [Thèse]. Université de poitiers faculté de médecine et de pharmacie, 2015.
  - Belaiche P.1979. *Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie*. Ed: MALOINE. 18- 35.
  - Ben miri, Y., Arino, A., Djenane, D.(2018). Study of antifungal, antiaflatoxicogenic, antioxidant activity and photo toxicity of Algerian Citrus Limonvar. eureka and Citrus sisensis var. Valencia essential oils, *journal of essential oil bearing plants*, 21:2,345-361.
  - Benouda A., Tagajdid M.R. (2008). Antibiogramme: choix, interpretation et limites; les technologies de laboratoires, 10 : 16-20.
  - BERRIGHI L., 2007 : Etude de la dynamique des populations de la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrilla* STAIN ( Lepidoptera ; Gracillariidae ) dans la commune de Mazagran (Mostaganem)
  - Benaissat, F.Z. 2015. La caractérisation de la sensibilité des variétés d'agrumes aux pourritures en post-récolte. Mémoire de master d'université .Fès. 61p.
  - Beckman K. B. and Ames B. N. (1998) – The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* (78): 574- 581.

- 
- BENEDISTE A. ET BACHES M., 2002. Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96p.
- Benedicte ; Michel B. (2011). Agrumes (comment les choisir et les cultiver facilement), édition Eugen Ulmer, Paris; 6-11, 68-70.
- Benttayer ;(2003) morphologie et physiologie des agrumes.
- Belfar fatima zahra, Monsouri nassima (2015) : Mémoire du diplôme du master ; thème : Etude des propriétés antimicrobienne de Marrubium Vulgare l, et de Teucrium polium, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A , 2015.
- BICHE M., 2012. Les principaux insectes ravageurs des agrumes en Algérie et leurs ennemis naturels. Ed. Institut national de la protection des végétaux et le ministère de l’agriculture et du développement durable et FAO, 36 p.
- Bocco A, Cuvelier M E, Richard H, Berset C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123–2129.
- Boyle W., 1955. Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.* 66: 25-28.

- Bousbia N. (2011).Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. thèse doctorat. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Alger).
- Bona, E., et al., Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of applied microbiology*, 2016. 121(6): p. 1530-1545.
- Boyle W., 1955. - Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*. 66: 25-28.
- Bonkena B., 2001. Analyse et perspectives d'intégration des marchés des oranges (*Citrus sinensis*) dans la ville de Kinshasa (Cas des marchés de Matete et de Rond point Ngaba). Mémoire, Faculté des Sciences Agronomiques, Unikin.
- Boughendjioua Hicham, Zahra boughendjioua. 2017. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oil of Mandarin (*Citrus reticulata*) Cultivated in Algeria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 44: 179-184.
- Bousbia N. (2011).Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse doctorat. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Alger).
- Boizot N., & Charpentier .J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra* . pp 79-82.
- BOUALEM S, BOUMRAR Silia. Formulation d'un gel désinfectant à base de l'huile essentielle de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L) et évaluation de son activité antimicrobienne. [Mémoire] Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou. 2016.
- Bozin B., Mimica-Dukic N. et Samojlik I. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry.*, 111:925–929.

- Boz ,Bekhechi , Atik-Bekkara F et Abdel Ouahid D.E. (2009). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'Origanum glandulosum d'Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153-159.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C., 1995. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 1999, 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Breitmaier E., *Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis*, In John Wiley & Sons. Wiley, VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2006.
- Bruneton J (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentations Lavoisier
- Braverman, J. B. (1949). *Citrus Products: chemical composition and chemical technology* (No. BRA 634.3 (BR 532)). Interscience Publishers Ltd.
- Bruneton J, *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 4ème édition Tec & doc, 2009, p.567-592, ISBN: 978-2-7430-1188-8. Cité par Fekih, 2014.
- Bruneton J. 1999: *Pharmacognosie (Phytochimie, plantes médicinales)*, 3ème Ed. TEC et DOC, Paris, p911.
- Bruneton J (1999). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*, 3ème Edition, TEC et DOC Lavoisier, Paris. P : 483-574.
- Bruneton J. (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3ème Ed Tec & Doc, 1120 p.
- Bruneton J (1993). « *Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales* » 2ème édition, Tech et doc, Lavoisier, Paris.

- Buronzo AM., 2008. Le Grand Guide des Huiles essentielles. Ed : HACHETTE Pratique. P : 235.
- Burt S., 2004.- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94: 223-253.

## C

- Chassaing V., 2006, L'Aromathérapie : les huiles essentielles au service du cheval ; Ed : Violaine Chassaing ; p: 4- 8.
- Chao S.C., Young D.G. & Oberg G.J., 2000- Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.*, 12: 639-649.
- Chabert G. myrtacées et aromathérapie [thèse]. Faculté de pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier, 2013.
- Chemat, F. (2011). Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod.
- CHEN C.N., WENG M. S., WU C. L. et LIN J. K., 2004: Comparaison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources, *Evid. Based Complement Alternat. Med. J.*, 1, pp: 175-185.
- Choi S. , Hee-Chul K. , Soo-Youn K. , Joon-Ho H. , Ji-Gweon P. , Shin-Hae K., Sang- HunH., Su-Hyun .et Se-Jae K.(2007). Correlation between Flavonoid Content and the no Production Inhibitory Activity of Peel Extracts from Various Citrus Fruits.*Biol.Pharm.Bull.*30(4): 772—778.
- Colombo, A. 2004. La culture des agrumes. Vecchi S.A, Paris. 8548.133p.

- Cowan M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564-582.
- Couic-Marinier F., Lobstein A. Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actual pharm* 2013; 52 (525): 26-30.
- CONNER D.E. et BEUCHAT L.R., 1984b : Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, Vol. 49, pp : 429 – 434.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000). Naturel products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biologie of plants*. 1250-1318.
- Cseke, L.J. et P.B. Kaufman. 1999. How and why these compounds are synthesized by plants. Pages 37-90 in P.B. Kaufman, L.J. Cseke, S. Warber, J.A. Duke et H.L. Brielmann (eds.), *Natural Products from Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

## D

- Delattre J, Beaudoux J-L, Bonnefont-Rousselot D.— Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 547 pages.
- Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly, K. et Maiza, A. (2004). Etude des constituants des feuilles de *ziziphus mauritiana lam.*(Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali.*C.R.Chimie*.7 : 1073-1080.
- Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*,4: 208-228.
- Dosoky N & Setzer, W. 2018. Biological Activities and Safety of Citrus spp. essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences*. 19. 10.3390/ijms19071966.
- DURVELLE J.-P., 1893 : Fabrication des essences et des parfums. Editeur J. FRITSCH, Paris.

- DURVELLE J.-P., 1930 : Fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, Girardot et Cie, 807 p.
- Dugo G. et Giacomo A. D. (2002). Citrus: The Genus Citrus. University l'Industria Italy. 1-34.
- **D. Festy**. Je ne sais pas utiliser les huiles essentielles : spécial enfants. Editions Quotidien Malin ; Paris ; 2013

### E

- El\_Adawy, T. A., El\_Bedawy, A. A., Rahma, E. H., & Gafar, A. M. (1999). Properties of some citrus seeds. Part 3. Evaluation as a new source of protein and oil. Food/Nahrung, 43(6), 385391.
- El amri et al.. J. Appl. Biosci. 2014. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Teucrium capitatum L et l'extrait de Silène vulgaris sur différentes souches testées.
- El haib ABDERRAHIM, 2011 : valorisation de terpènes naturelle issus de plantes marocaine par transformations catalytiques : Université Toulouse III Paul Sabatier ; spécialité: Chimie organique et catalyse : thèse de doctorat
- EL OTMANI M., 2005. Les Agrumes, le maraichage, et le froid hivernal. Agadir, Maroc, n° 127, 4 p.
- E. Miles. Les huiles essentielles pour les nuls. Editions First-Gründ ; Paris ; 2013
- Ercan, B. ET Ilhami, G.U. (2011). Polyphénol contents and in vitro antioxydant activites of lyophilised aqueous extract of kiwi fruit (Actinidia deliciosa). Food Research International, 44: 1482-1489.
- Erkan, N., Ayranci, G. &Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary(Rosmarinusofficinalis L.), blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosicacid,rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry. 110: 76-82.

- Escartin I. (2011). Guide des agrumes. Fondation d'entreprise pour la protection Et la valorisation du patrimoine végétal. L'Institut Klorane. (Consulté le 20 mars 2017).
- Essawi, T. et Srour, M., Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J.Ethnopharm.;70, p. 343-349,(2000). [9] : Roques C., Billerbeck V.G. et Bacaria J., Détermination des CMI et QMI des produits air pharma sur des souches bactériennes multi résistantes. Sci. Aliments.; 13, 1-8,(2003).

### F

- FAO., 2013. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home/E>.
  - FAO. 2014. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home/E>
  - Favier A. (2003) – Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.
- Figueredo G. Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse pour le diplôme de docteur d'université (chimie organique). Université Blaise Pascal – Clermont Ferrand II, 2007
- FESTY DANIELE 2014 : les huiles essentielles : le guide visuel, pp 20.
  - Fouché J.G ., Marquet A .et Hambuckers., 2008 – Les plantes médicinales de la plante au médicament: Conception et réalisation

### G

- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. and Fonseca Maria J.V. (2003) – Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. AAPS Pharma.Sci.5 (2), 5p.
- Gmitter G., Chunxian Jr., Chen, Nageswara M. Rao. ET Jaya R. Soneji. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Fruits and Nuts.C. Kole. Florida. 4:CHAP14.

- Gonzalez-molina, E., Dominguez-perles, R., Moreno, D.A. ET Garcia-viguera. (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 327-345
- GRAVOT A., 2008. Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- Guignard j.l., 1995. Abrégé de botanique. Ed. Masson, 285p. Cité par Taleb-Toudert K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques prenant la région de Kabyl (Nord Algérie). Evaluation de leurs effets sur la bruche des niébé *Colossobruchus maculatis* ( Coleoptera : Bruchidae ). The. Doc. Bio ani et vég. Univer Mouloud Mammeri Tezi Ouzou., 160; 2015.

## H

- Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, et al. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem* 141(1): 253–8
- Hammer K.A., Carson C.F. & Rilley T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- Harborne, J. B., & Herbert B. (1995). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis.
- Hazzit. (2002) - Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematic and Ecology*, 30:189-203.
- Huang Y. S. , S. C. Ho, Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel, *Food Chem.*, 119 (2010) 868-873.
- Houaoura(2013)-Production des agrumes : Comment augmenter le rendement ?
- Haslam, E., 1994. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.*, 11, pp 41-66.

## I

- I.T.A.F, 2002 Relevés climatologiques. Manuscrit I.T.A.F., Boufarik, 18 p.
- Isman M.B. 2000.Plant essential oils for pest and disease management.CropProtection., N° 19. pp 603-608.
- i :<https://www.albertvieille.com/fr/lexique/68-type-d-extraction/47-extraction-au-co2supercritique.html> consulté le 06-06-2020

## J

- Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M & Yusuf S., 1995.- The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. Annals of Internal Medicine. 11:860-72.
- John F., Jackson ET Hans F. Linskens. (2002). molecular methods of plant analysis: analysis of taste and aroma. (21). springer. Germany, 269:123-153.
- Joulain D., Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, Perfumer & Flavorist, 1994, 19, 5-17.

## K

- KANSOLE M., 2009. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de Leucas martinicensis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia opposita vahl et Orthosiphon pallidus royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- Kachel L, Sahmi A. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DES FRUITS DE Coriandrum sativum L. [Mémoire]. Université UMMTO, 2016.

- K. Hosni, N. Zahed, R. Chrif, I. Abid, W. Medfei, M. Kallel, N. Ben Brahim, H. Sebei, Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence, *Food Chem.*, 123 (2010)1098–1104.
- Kerboua, M. (2002). L'agrumiculture en Algérie. In: D'Onghia A.M. (ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N. (ed.). Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Bari: CHIEAM, pp: 21-26.
- Kechar K, et Hellal B.2016: Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Ballota hirsuta* Benth du Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 13: 225–279.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A. A., Ali, S. M., & Khan, A. (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14(2), 586-597.
- Khia A, Ghanmi M, Satrani B.2014 : Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc. *Phytothérapie*, 12: 341–347.
- Kim.N.S, D.S. Lee. *J. Chrom. A*. 2002, 982, 31
- kim J M R Marshall et C. ve. 1995 Antimicrobial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens *J.Agric.food Chem.*, vol. 43,p. 2839-2845.

## L

- Ladaniya, M. S. (2011). "Physico– chemical, respiratory and fungicide residue changes in wax coated mandarin fruit stored at chilling temperature with intermittent warming." *Journal of food science and technology* 48(2): 150-158.
- Lagha-Benamrouche, S. and K. Madani (2013). "Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) Cultivated in Algeria: Peels and leaves." *Industrial Crops and Products* 50: 723-730.

- Lagunez –Rivera L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; p. 31-42
- Lahlou M., 2004, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytotherapy Research*, p. 435-448.
- Lakshmi, A., & Subramanian, S. (2014). Chemotherapeutic effect of tangeretin, a polymethoxylated 63oloniza studied in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinoma in experimental rats. *Biochimie*, 99, 96-109.
- Laouer H. (2004) -Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Ammoides pusilla et de Magydaris pastinacea. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Lardry J.M. et Haberkorn V., 2007, Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation, *Kinesitherapy Reviews* 61, p: 18-23.
- Lim. T.K. (2012). Citrus reticulata Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. *Springer sciences et Business Media B.V*; 4: 695-715.
- Lion Ph., 1955. Travaux pratiques de chimie organique. Ed. Dunod, Paris.
- Loeillet(2010)-la production mondiale des agrumes ''les marchés mondiaux''
- LOUSSERT R., 1989b. Les agrumes, arboriculture. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113p.
- Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique (3é èd). Technique et documentation. Lavoisier . Paris. 211p.

- MADR (La Ministre de l'Agriculture et du développement du Rural).2009. La direction des statistiques Agricoles et des systèmes d'information. MADR. Algérie.
- Marie-Noëlle Maillard : AgroParisTech, campus Massy (Massy, France), Université ParisSaclay ; <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/savoir-plus/3> .
- Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges. 1-187.
- MAKHLOUF H. 2002 - Les huiles essentielles de romarin et de clou de girofle : approche analytique et activité antioxydante sur une huile alimentaire. Mémoire ingénieur, I.N.A., Alger, 82p.
- Malacrida, C. R., Kimura, M., & Jorge, N. (2012). Phytochemicals and antioxidant activity of citrus seed oils. *Food Science and Technology Research*, 18(3), 399-404.
- MANSOURI A, ATOUI AK, BOSKOU G, KEFALAS P., 2011 : Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* Pp 27–36
- Mannisto S, Smith-Warner SA, et al. Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004 January;13(1):40-8.
- MAPM (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime).2013. Note de veille secteur agrumicole ; Note stratégique n°97.
- Mazouz B, Hahdaoui A, "Caractérisation et l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle des graines de *Petroselinum Sativum*", Thèse d'ingénieur d'état en biologie, Faculté des sciences agronomiques et des sciences biologiques, Université Hassiba Ben Bouali-chlef, 2010.
- Mensor L.I., Menezes F.S., Leitaog G., Reis A.S., Dos Santos T., Coube C.S., Leittao S.G., 2001. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use ofDPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 15: 127-130.

- Meynadier J.M. et Raison-Peyron N., 1997 – Allergie aux parfums. *Re. Fr. Allergol.*, 37(5): 641-650.
- Meziti A. (2009). *Activité antioxydante des extraits des graines de Nigella sativa L Étude in vitro et in vivo*, mémoire de magister en biochimie appliquée, Option: Molécules Bioactives, Université El-Hajlakhdar Batna, pp 71.
- Middleton Jr E, Kandaswami T C C. (2000) Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673-839.
- MIKA A., MINIBAYEVA F., BECKETT R., LÜTHJE S., 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews.* (3):173-193.
- Mirmostafa SA, Rasooli I.2002; Antibacterial properties of thymus pubescens and Thymus serpyllum essential oils. *Fitoterapia.*73, 244-250.
- Moulehi, S. Bourgou, I. Ourghemmi, T. M. Saidani, Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, *Ind. Crops Prod.*, 39 (2012) 74- 80.
- Moreno S, Scheyer T, Romano C.S, and Vojnov A.A. 2006: Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *FreeRadic Res*, 40: 223– 231
- Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J Agr Food Chem*, 57, 1655 – 1666
- Muther L. *Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant [thèse].*Faculté de pharmacie de Clermont Ferrand, 2015
- Mukhtar. R; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A. (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulata (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.

- Mukht AR. R; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A. (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulata (Blanco), *International Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.

## N

- 34: National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH
- Nait Achour Kh, "Etude de la composition chimique des essences de quatre especes d'eucalyptus poussant dans la région de Tizi Ouzou", Thèse de Magister, Faculté des Sciences, Université de Mouloud Mammeri-Tizi Ouzou, 2012.
- Nakayama, N., Yamaura, K., Shimada, M., & Ueno, K. (2011). Extract from peel of *Citrus natsudaoides* alleviates experimental chronic allergic dermatitis in mice. *Pharmacognosy research*, 3(3), 155
- NDO E.G.D., 2011. Evaluation des facteurs de risque epidemiologie de phaeoramulariose des agrumes dans les zones humides du cameroun. These de doctorat en biologie integrative des plantes, montpellier sup agro, france, 202p.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2012). Naturel products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 of 2010. *J.Nat. Prod*, 75, 311-335
- Njoroge, S. M., H. N. Mungai, et al. (2006). "Volatile Constituents of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Peel Oil from Burundi." *Journal of Essential Oil Research* 18(6): 659- 662.

## O

- Oussala M, Caillet S, Saucier L. (2006) .Lacroix m-antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *pseudomonas putida* strain isolated from meat-meat science.73: 236-244. Cité par Bessedik et khenfer, 2014.

P

- Patterson T.F. (2005). Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 366:1013-25. Cité par Youcef-Ali, 2014.
- Paul Goetz Kamel Ghedira, Herbal Phytothérapie anti-infectieuse, Paris, 2012. p 73-77.
  - Peña L., Cervera M., Fagoaga C., romeroj. , Juárez J., Pina J.A. et Navarro L. (2007). Citrus. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 60: 35-49.
  - Pesson P., et Louveau J., 1984 – pollinisation et production végétale. Ed. INRA. Paris. 637p.
  - Pellegrini N.,Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F.,2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J .Nutr*, 133: 2812-2819.
  - Pinchuk I., Shoval H., Dotan Y.et Lichtenberg D., 2012 - Evaluation of antioxidants: Scope,limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, (165): 638– 647
  - Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. & Roura S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LebensmittelWissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.
  - Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 4290-302.
  - P. Franchomme et D. Péroël. L'aromathérapie exactement. Editions Roger Jollois ; Limoges ; 2001
  - P. de Bonneval et F. Dubus. Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien. Editions Désiris ; Paris ; 2014

- **PIBIRI M.C., 2005:** Assainissement microbiologie de l'aire et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorale. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse).Pp 161.
- **Pitman V., 2004, Aromatherapy: A Pratical Approach; Ed: Nelson Thornes, 137 pages.**
- P. J. Marriott, R. Shellie, et C. Cornwell, « Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils », J. Chromatogr. A, vol. 936, no 1-2, p. 1–22, 2001.
- PRALORAN J. C., 1971. Les agrumes, techniques agricoles et productions tropicale. Ed. G.P.Maisonneuve et Larose, Paris, 565 p.
- PRALORAN, 1971: Les agrumes, techniques agricoles et production tropicales. Ed. Maisonneuve et Larox, Paris, T.XXI et XXII, 665p.
- Price, L; Price, S. 2004. Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy. Churchill Livingstone. 294 p

## R

- Rafiq S, Kaul R, Sofi S.A., Bashir N, Nazir F, Ahmad Nayik G. 2018. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 17, 351-358
- Raven, H., Evert, R.F., et Eichhorn S.E. (2000). Biologie végétale (6<sup>é</sup> éd). (B. jules., et M. Charles, Trad.). Paris.
- RAYNAUD J., 2006: Prescription et conseil en aromathérapie. Paris: Tec & Doc, Pp247.
- Ramful D., Tarnus E. , Aruoma O. I., Bourdon E., Bahorun T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps; Food Research International; 44: 2088-2099.
- Rahal S. (2004) - Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.162

- Rezaie A., Parker R.D., Abdollahi M. (2007). Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?; *Dig Dis Sci*; 52: 2015–2021.
  - Richard F., 1992, *Manuel des corps gras*, Paris, Ed: Lavoisier, Tec& Doc., p. 1228-1242.
  - Richard H. et Peyron F., 1992, *Epices et aromates*, Ed. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, p. 339.
  - Roulier G (1999) *Les huiles essentielles pour votre santé*. Editions Dangles.
  - Roux D., 2011, *Conseil en aromathérapie*. 2e éd. Pays-Bas : Pro-Officina, 187 pages
- S
- Saïdani, M., Dhifi, W. and Marzouk, B. (2004). Lipid evaluation of some Tunisian citrus seeds. *J. Food Lipids*, 11, 242-250.
  - SANSHEZ-MORENO C., 2002: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. **8**: 121137.
  - Schauenberg P. et Paris F., 2010, *Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes*, Ed. Delachaux et Niestlé, p.396.
  - Schauenberg, P et Paris, F., 1997. *Guide des plantes médicinales* : Ed. Delachaux et Niestlé, Paris (396 P)
  - Scherer, R., Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem*, 112: 654–658.
  - Scheinvar, L. 1995. Taxonomy of utilized opuntia. In: Barbera, G., Inglese, P and E, Pimienta-Barrios (eds.). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO. Rome (Italy): 20-27.
  - SEGHIRI Ramdane ;2013 : *Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre Centaurea : C. africana, C. nicaensis* ; THESE Présentée pour obtenir

le diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique - Option Phytochimie , Université Mentouri – Constantine Pp : 14.

- Sidana J, Saini V, Dahiya S, Nain P, Bala S (2013). A review on citrus 'the boon of nature. Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 18: 20–27.
- Scimeca D. Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, 2007, p.12-17. Cité par Fekih, 2015.
- Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim Biophys Acta 2005 May 30;1740(2):101-7.
- Sun, C., Chen, K., Chen, Y. & Chen, Q. 2005. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. Food Chemistry, 93, 599-605.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S.. & Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 20163012462

## T

- Taofiq O, Martins A, Barreiro M.F, and Ferreira I.C. 2016: Antiinflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. Trend. Food Sci. Technol, 50: 193 -210.
- TANGUY M., 2009. Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. Médecine. Vol 5 (6):256-260.
- Tapiero H, Tew K D, Nguyen Ba G, Mathé G. (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomed. Pharmacother. 56: 200-7.
- TEISSEIRE P.J. (1991), Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 480p
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O. E. K., & Moulti-Mati, F. (2010).

Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des Sciences et technologie*, 2(2), 107-114.

•THOMAS ; O.P., 2009. Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.

• Thormar H. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Wiley (2011). 315p

•T. Folliard. *Le petit Larousse des huiles essentielles*. Editions Larousse ; Paris ; 2014

• Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D. Et Giammanco M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, 104: 466–479.

•Tsao R., Yang R., Young J.C. (2003). Antioxidant Isoflavones in Osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid, *Journal Agric Food Chem*, 51 (22) : 6445-6451.

### U

•Uchiyama S, Sumida T, Yamaguchi M. Oral administration of beta-cryptoxanthin induces anabolic effects on bone components in the femoral tissues of rats in vivo. *Biol Pharm Bull* 2004 February;27(2):232-5.

• United States Department of Agriculture, (2017) : Un regard sur le marché Mondial et tunisien des agrumes calculs de l'ONAGRI d'après L'USDA, 13 p

### V

• Valnet J. (1984) - *Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes*. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544

• Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Ed, Springer: U.S.A.

- Vinson JA, Liang X, et al. Polyphenol antioxidants in citrus juices: in vitro and in vivo studies relevant to heart disease. *Adv Exp Med Biol* 2002; 505:113-22.
- Virbel-Alonso, C., 2011. Citron et autres agrumes. Ed. Groupe Eyrolles. 15p

### W

- Whitman SC, Kurowska EM, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. *Atherosclerosis* 2005 January;178(1):25-32
- Wichtel M. et Anton R. (1999) - Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
- Williams LR, and Lusunzi I.1994: Essential oil from *Melaleuca dissitiflora*: a potential source of high quality tea tree oil. *Industrial Crops and Products*, 2: 211–217.
- Wilkinson J.M., 2006- Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII,pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405 p.

### Y

- Yu et; Li X; Liu .S; Xu .G; Liang .Y. (2009). Comparative analysis of volatil constituent in citrus *Reticulata Blanco* using Gc-Ms and alternative moving window factor analysis; [J.Sep.Sc](#); 32: 3457-3465.

### Z

- Zhang Y M, Sun Y, Xi W P, Shen Y, Qiao L P, Zhong L Z, Ye XQ, Zhou Z Q. 2014.Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata Blanco*) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674–680.

- Zayyad, N., A. Farah, and J. Bahhou, Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de Thymus: Thymus zygis, T. Algeriensiset T. bleicherianus. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 2014. 83(118): p. 132.
- Zhiri A., 2006, Aromathérapie ; Nutranews ; Ed: Fondation Libre Choix ; p: 2-16.
- Zhiri, A. and D. Baudoux, Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Ghislenghien: Pranarôm International, 2007.
- Zou Z, Xi W P, Hu Y, Nie C, Zhou Z Q. 2016. Antioxidant activity of *Citrus* fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896.



# **Annexes**

## Annexes

### Annexe I: Composition de milieu de culture Muller-Hinton :

- Infusion de viande de bœuf déshydraté.....300g
- Hydrolysate de caséine.....17.5g
- Amidon de maïs .....5g
- Agar-agar.....13g
- Eau distillée.....1

### Annexe II: Composition de milieu de culture Sabouraud :

- Peptone..... 10 g
- Glucose massé..... 20 g
- Agar-agar..... 15 g
- Eau distillée (qsp)..... 1 000 ml
- vitamines et facteurs de croissance
- pH .....6

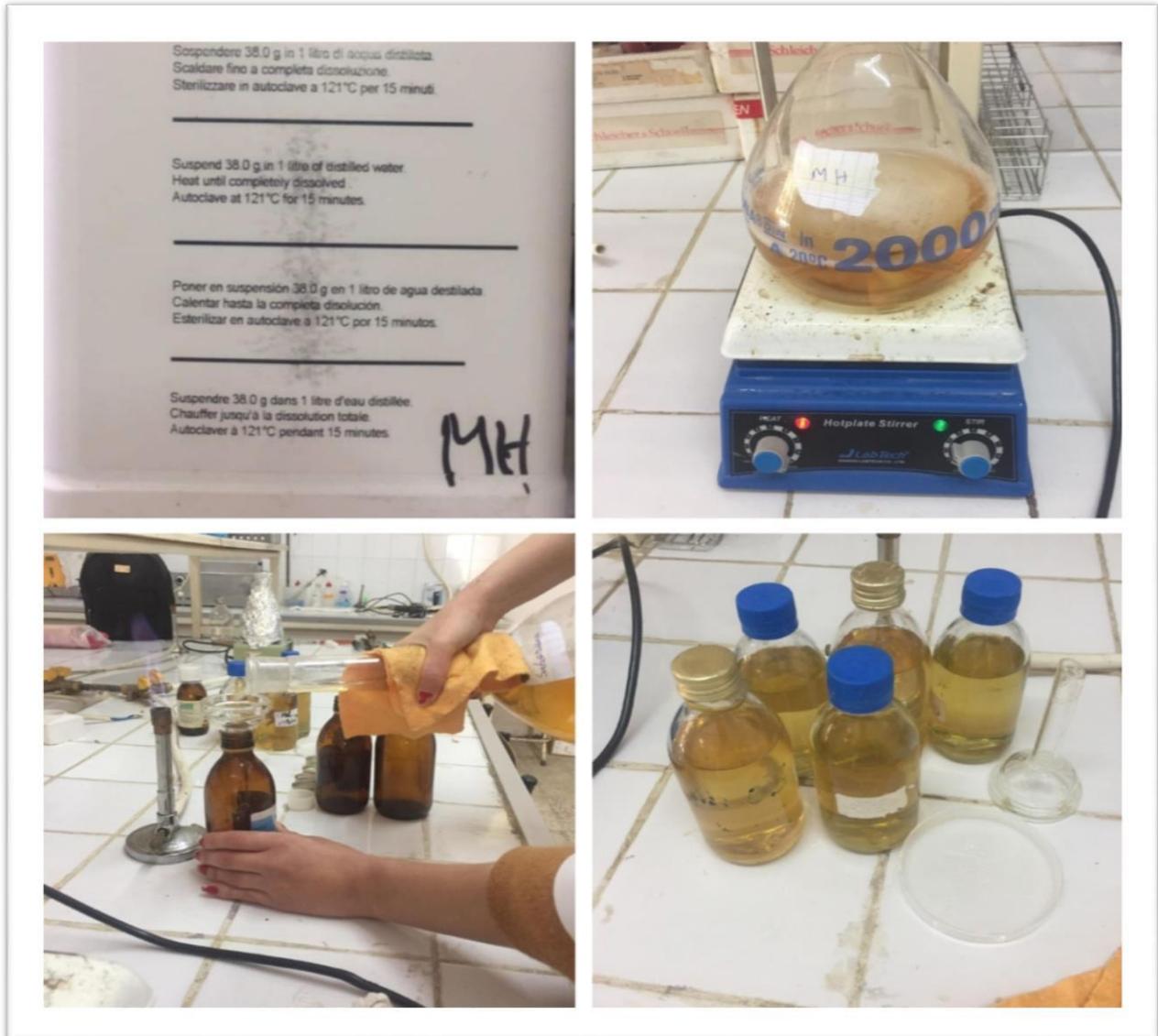
### • **Annexe III: Préparations des milieux (Muller Hinton- Sabouraud)**

- Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.
- Mettre 38 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau fraîchement distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser à l'autoclave à  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes.
- Répartir dans des tubes ou dans des flacons stériles.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu au bain-marie bouillant et répartir en boîtes de Pétri rondes l'intégralité du flacon ou des tubes. L'épaisseur de la couche de gélose doit être de 4 mm. Sécher les boîtes 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le volume de Mueller Hinton permettant

### Annexe III

d'obtenir exactement une épaisseur de 4 mm est de 25 ml pour une boîte de 90 mm, de 60 ml pour une boîte carrée de 120 mm, de 70 ml pour une boîte ronde de 150 mm.



**Figure 19.** Les étapes de préparation de milieu de culture

## **Annexe IV**

### **: Matériels et produits utilisés en laboratoire :**

#### **Appariellage**

- Agitateur
- Appareillage d'extraction (clevenger)
- Autoclave
- Bec bunsen
- Balance de précision
- Etuve
- Réfractomètre
- Spectrophotomètre UV

#### **Verrerie et consommable**

- Anse de platine
- l'ampoule à décanter
- Bêchers
- Boîte de pétri stériles de 90mm de diamètre
- Ecouvillons stériles
- Erlenmeyer
- une coupelle tarée
- un dessiccateur
- Fioles
- Flacon avec bouchon
- disque stérile de cellulose de 9 mm de diamètre (Whatman N°1)

#### **Solution de réactifs**

- 2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH)
- Acide ascorbique
- Méthanol
- Hydroxyde de potassium(KOH)
- l'eau distillée
- Phénophtaléine

**Annexe V**

**: la classification des bactéries et champignons utilisées :**

<b>GRAM</b>	<b>bactérie</b>	<b>Systématique bactérienne</b>
<b>Gram négative</b>	Escherichia coli	-Domaine : Eubacteria -Phylum : proteobacteria -Classe :Gammaproteobacteria -Ordre : Entrobactriales -Famille : Enterobacteriaceae -Genre : Escherichia -Espèce : Escherichia coli
<b>Gram positive</b>	Staphylococcus aureus	-Domaine : Bacteria -Embranchement: Firmicutes -Classe : Bacilli -Ordre : Bacillales -Famille : Staphylococcaceae -Genre : Staphylococcus -Espèce : Staphylococcus aureus
<b>Gram positive</b>	Bacillus cereus	-Domaine : Bacteria - Embranchement: Firmicutes -Classe : Bacilli -Ordre : Bacillales -Famille : Bacillaceae - genre : Bacillus - Espèce : Bacillus cereus

**Champignons**

**Systématique**

<b>champignon</b>	Aspergillus brasiliensis	Règne :Fungi Division :Ascomycota Classe :Eurotiomycetes Sous-classe :Eurotiomycetidae Ordre : Eurotiales Famille :Trichocomaceae
		Règne : Fungi Division : Ascomycota
<b>Levure</b>	Candida albicans	Classe :Saccharomycetes Ordre : Saccharomycetales Famille : Saccharomycetaceae Genre : Candida Espèce : Candida albicans

#### **Annexe VI: Détermination du rendement en huile essentielle**

*Citrus reticulata blanco*

## Annexe VII

	Ech1	Ech2
Poids de la matière fraîche en g	500	500
Masse en HE en g	1,1	1,59
Rendement %	0,22	0,318
Rendement moyen %	0,27	

## Annexe VII: Détermination du taux d'humidité

Matiere fraiche	Matiere apres séchage	Humidité
20g	4,157g	79,21%,

## Résumé

Notre étude a porté sur l'évaluation de quelques activités biologiques de l'huile essentielle (HE) de l'écorce de la mandarine (*Citrus reticulata blanco*). L'hydrodistillation de l'écorce fraîche a donné un HE : Liquide visqueux avec une odeur forte frais, caractéristique celle du zeste de mandarine et une couleur transparente. Un rendement en HE de 0,27% avec un Taux d'humidité égale à 79,21%. L'estimation du pouvoir anti-radicalaire évalué par la méthode DPPH (2,2-diphényl-1picrylhydrazyl) révèle que l'HE du *Citrus reticulata blanco* a une activité antioxydante (virage du violet au jaune). L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de l'aromatogramme montre que l'HE de *C. reticulata* a soit un effet inhibiteur sur la croissance des souches microbiennes, soit il ne montre aucun effet.

**Mots clés :** Huile essentielle, Mandarine, *Citrus reticulata blanco*, Rendement, humidité, Antioxydant, Antimicrobien, CPG.

## Abstract

Our study focused on the evaluation of some biological activities of the essential oil (EO) of the mandarin peel (*Citrus Reticulata Blanco*). The hydrodistillation of the fresh peel gave an essential oil: Viscous liquid with a strong, characteristic fresh odor, that of tangerine zest and a transparent color a yield in EO of 0.27% with a humidity rate equal to 79.21%. The estimate of the anti-radical power evaluated by the DPPH method (2, 2-diphenyl-1picrylhydrazyl) reveals that the EO of *Citrus reticulata blanco* has an antioxidant activity (change DPPH color from purple to yellow). Evaluation of antimicrobial activity by the aromatogram method shows that the EO of *C. reticulata* has either: an inhibitory effect on the growth of microbial strains, or it shows no effect.

**Key words:** Essential oil, Mandarin, *Citrus reticulata blanco*, Peel, humidity, Antioxidant, Antimicrobial, CPG.

## المخلص

ركزت دراستنا على تقييم بعض الأنشطة البيولوجية للزيت العطري (EO) لحاء اليوسفي (*Citrus Reticulata Blanco*)

أعطى التقطير المائي للقشرة الطازجة سائل لزج برائحة منعشة قوية ، من سمات قشر اليوسفي ولون شفاف عائد 0.27% مع معدل رطوبة يساوي 79.21%. يُظهر تقدير القوة المضادة للجذور الحرة التي تم تقييمها بواسطة طريقة (2-diphenyl-1picrylhydrazyl) DPPH أن EO من الحمضيات الشبكية blanco لها نشاط مضاد للأكسدة (التغيير من اللون الأرجواني إلى الأصفر). يوضح تقييم النشاط المضاد للميكروبات بواسطة طريقة التصوير العطري أن EO لـ *C. reticulata* إما له تأثير مثبط على نمو السلالات الميكروبية ، أو أنه لا يظهر أي تأثير.

الكلمات المفتاحية: زيت عطري ، مندرين ، حمضيات شبكية بلانكو ، المحصول ، الرطوبة ، مضادات الأكسدة ، مضادات الميكروبات ، CPG.

