

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB de BLIDA

Faculté de Science de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Thème

**Caractérisation physico-chimique des huiles
essentielles de l'écorce de citron (*Citrus limon*) et
évaluation des activités antioxydante et anti
inflammatoire**

Présenté par:

KERFI GUETEB IHCENE & BENYAHIA RADJAA

Devant le jury composé de :

Mr Bendali A	USDB	MAA	Promoteur
Mme Belguendouz R	USDB	MCA	Présidente
Mme Ghanai R	USDB	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2019/ 2020

Dédicaces

*A ma très chère mère a mon père que dieu les protégé. En témoignage
de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail
est en partie le fruit de leur soutien; je leur suis très
reconnaisant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la
meilleure des récompenses*

A ma sœur, mon frère, et toute ma famille

A mon binôme Radjaa

*A mes amis qui m'ont permis d'oublier les moments de stress et de
découragement.*

A tous mes miens.

Ihcene

Dédicaces

*En premier lieu je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté,
la Santé et le courage pour réaliser ce travail.*

Je dédie ce mémoire à

*la source de tendresse, de patience et de générosité, ma mère «**Khadija**». Qui a
œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien, tous les sacrifices
consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans
ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes
sentiments et de mon éternelle gratitude. Puisse dieu, le tout puissant, te
préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon père «**Mustapha** », qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues
années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.*

*A ma grande mère et mon grand-père ma chère sœur, mes frères, et toutes ma
famille*

*Une spéciale dédicace à ma magnifique copine et merveilleuse binôme qui
comptent énormément pour moi «**ihcene** »*

A mes chères et adorables amies de toujours

Tous les proches de mon cœur

*Je ne saurais terminer sans exprimer mes dédicaces les plus sincères à tous mes
professeurs.*

Radjaa

Remerciement

Nous commençons par remercier le dieu de nous avoir donné la force et la patience pour pouvoir mener ce travail.

Nous remercions en premier lieu monsieur Bendali. A pour avoir accepté d'être notre encadreur de mémoire de fin de cycle, de nous avoir guidé et soutenu durant ce travail.

Nous tenons à remercier Mme Belguendouze. R de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et Mme Ghanai. R d'avoir accepté à examiner ce mémoire.

Nous voulons de félicitations les héros de cette pandémie à savoir les aide-soignant les infirmiers les médecins les chercheurs et tous les professionnel qui été on première ligne durant des mois contre le corona virus.

En fin, un grand remerciement à tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce travail

SOMMAIRE

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Synthèse bibliographique

I. Monographie de la plante étudiée.....	3
---	----------

1 Historique sur les agrumes.....	3
-----------------------------------	---

1.1 Caractères généraux de citrus :.....	3
--	---

1.1.1 Structure.....	3
----------------------	---

2 Espèces <i>citrus limon</i> :.....	4
--------------------------------------	---

2.1 Classification.....	5
-------------------------	---

2.2 Composition chimique de citron :.....	6
---	---

2.3 Usage de citron :.....	7
----------------------------	---

II. Huiles essentielles.....	8
-------------------------------------	----------

1. Définitions :.....	8
-----------------------	---

2 Méthodes utilisées pour l'obtention d'huiles essentielles.....	8
--	---

2.1 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau ou hydro-distillation.....	9
--	---

2.2 Distillation sèche.....	10
-----------------------------	----

2.3 Expression à froid.....	10
-----------------------------	----

3 Caractérisation des huiles essentielles :.....	11
--	----

3.1 Caractéristiques organoleptiques.....	11
---	----

3.2 Propriétés physico-chimiques.....	12
---------------------------------------	----

4 composition chimique des huiles essentielles :.....	13
---	----

4.1- Huiles essentielles des agrumes.....	13
4.2 Huiles essentielle de citron	14
5 Toxicité des huiles essentielles.....	15
III. Stress oxydatif et antioxydant.....	16
1 stress oxydatif	16
1.1 Origine du stress oxydant.....	16
1.2 Les radicaux libres.....	16
1.3 Les maladies liées au stress oxydant.....	16
2 Antioxydant	17
2.1 Activité antioxydant des huiles essentielles	17
IV. Inflammations et activité antiinflammatoire.....	18
1 Généralité sur l'inflammation :.....	18
1.1 L'inflammation aiguë.....	18
1.2 L'inflammation chronique :.....	19
2 Anti-inflammatoires naturels.....	19
3 Mode d'action des huiles essentielles anti-inflammatoire	19
Matériel et méthode	
I. Matériels et produits utilisés.....	21
1 matériel non biologiques	21
2 Matériel biologique	21
2.1 Matériel végétale	21
II. Extraction des huiles essentielles de Citron.....	22
1 Hydrodistillation	22
1.1. Le principe.....	22

1.2 Méthodologie.....	22
2 Calcul du rendement en huile essentielle.....	23
III. Analyses physico-chimiques des huiles essentielles de Citron.....	23
1 Etude analytique de l'huile essentielle.....	23
2 Les propriétés physico-chimiques.....	24
2.1 Mesure de pH.....	24
2.2 Mesure de la densité.....	24
2.3 Indice de réfraction (IR)	24
2.4 Détermination de l'indice d'acide (IA).....	25
IV. Activité antioxydant des huiles essentielles de Citron.....	26
1 La méthode de DPPH.....	26
1.1 Principe.....	26
1.2 Mode opératoire	27
1.3 Expression des résultats:.....	27
V. Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de Citron.....	28
1 Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)	28
1.1 Le principe	28
1.2 Le protocole expérimental.....	28
1.3 Expression des résultats.....	29
1.4 Analyse.....	29
Résultats et discussion	
I Extraction des huiles essentielles de l'écorce de <i>Citrus limon</i>	31
1 Détermination du rendement d'extraction	32
2 Caractères organoleptiques	32

II. Les indices physico-chimiques	32
III. Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de <i>C.limon</i>	34
III.1 Activité anti radicalaire par DPPH	34
IV. Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	36
1 Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire).....	36
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des tableaux:

Tableau 01 : Constituants chimiques principaux de citron.....	06
Tableau 02: Rendement en huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	31
Tableau 03 : les indices physico chimique de deux HEs.....	32
Tableau 04: Evaluation de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de Citrus limon de Bejaia et l'acide ascorbique et les valeurs d'IC50	34
Tableau 05: Evaluation de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de Citrus limon de Tlemcen et l'acide ascorbique et les valeurs d'IC50.....	35
Tableau 06: L'activité anti hémolytique d'huile essentielle de l'écorce de <i>C.limon</i> et de Diclofénac de sodium.....	36

La liste des figures :

Figure 01: Caractéristiques morphologiques d'un citrus (Duan et al, 2014).....	4
Figure 02 : Feuilles, et fruits de citrus limon.....	5
Figure 03 : Distillation par entrainement à la vapeur d'eau.....	9
Figure 04: Appareil de type Clevenger, répondant aux exigences et aux normes de la pharmacopée européenne. (DUMAS, 2015).....	10
Figure 05 : Site de collecte de citron, région d'Ouled-Yaich, Blida.....	21
Figure 06: Montage d'hydrodistillation.....	23
Figure 07 : Mécanisme réactionnel du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydante (RH) (GOUDJIL., 2016).....	26
Figure 08 : huile essentielle de citron.....	32

Les abréviations :

AFNOR: Association Française de normalisation

ISO : l'Organisation internationale de normalisation

C. limon : *Citrus limon*

CE : Concentration efficace

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

A. Ascorbique: Acide Ascorbique.

A.A : acide ascorbique.

Abs C: absorbance de contrôle.

Abs T: absorbance de test.

DIC: Diclofénac de sodium.

RBC: les globules rouges, en anglais (red blood cells).

Ech : Echantillon

HE : huile essentielle.

HEs : huiles essentielles

IA: indice d'acide.

IC : Concentration inhibitrice.

IR: indice de réfraction.

M: molaire.

HD: hydrodistillation.

HRBC: globules rouges humains (en anglais, human red blood cells).

IC50: concentration de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50%.

PI : Pourcentage d'inhibition

NB : notez bien.

R% : pourcentage de rendement

Introduction :

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours pour but de résoudre leurs problèmes de santé. Elles forment la base de la médecine traditionnelle grâce à leur richesse en métabolites secondaires utilisées comme composés actifs. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**Ventrella et Marinho, 2008; Ladoh et al., 2014**).

Le recours à la médecine traditionnelle est due à diverses raisons comme par exemple : le coût des plantes médicinales qui est faible par rapport aux médicaments conventionnels, la disponibilité de ces plantes surtout dans les régions les plus éloignées et au sein des populations les moins favorisées, les effets secondaires indésirables des médicaments, l'envie de consommer « bio » et ces effets bénéfiques sur la santé, l'existence des maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace (Zenasni, 2014).

Parmi ces plantes, on a le genre Citrus appartenant à la famille des Rutaceae, est l'une des cultures les plus largement cultivées dans le monde surtout dans les climats tropicaux et les régions tempérées. Elles sont très riches en composés actifs (polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, les huiles essentielles...etc) (**Chutia et al., 2009; Kamal et al., 2011**).

Actuellement, les huiles essentielles des plantes aromatiques possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés médicinales: antibactériennes, anti inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, anti-tumoral, insecticides, insectifuges...etc, ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique tels que la cosmétique, la

parfumerie, l'aromathérapie et l'agroalimentaire (**Choi et al., 2000; Zenasni, 2014**). L'écorce des Citrus est l'une des parties de la plante riche en métabolites secondaires, tels que les huiles essentielles qui sont étudiées pour ces composés actifs (coumarines, terpènes et linalool...etc) (**Dhanavade et al., 2011; Kamal et al., 2011**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude des huiles essentielles extraites de l'écorce de l'espèce Citrus limon (citron jaune), dans le but de déterminer leur intérêt biologique. Ce travail porte sur :

- Extraction des huiles essentielles à partir de l'écorce fraîche de fruit de citron.
- Evaluation in vitro de l'activité antioxydante .
- Evaluation in vitro de l'activité anti inflammatoire.

*Synthèse
bibliographique*

I. Monographie de la plante étudiée

1 Historique sur les agrumes :

Les agrumes sont originaires du Sud-Est Asiatique (**Ollitrault et al., 2000**). Ce sont des arbres de la famille des Rutacées composés de 156 ou de 16 espèces, selon que les auteurs ont ou n'ont pas pris en compte les hybrides (**Swingle et Reece, 1967**). La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement. Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduits dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. L'introduction des agrumes en Afrique de l'Est a été faite par les commerçants arabes et hindous vers le XIVE siècle (**Loussert, 1989 ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996**).

L'expansion dans le sud de l'Europe au XVe siècle est le fait des portugais, qui les ont exportées d'Asie. Au moment de la conquête, l'orange traverse l'atlantique avec le Bigarade, la lime et le cédrat. Ces derniers ont été cultivés dans les Antilles, au Mexique et en Amérique du sud (**Loussert, 1989**).

1.1 Caractères généraux de *citrus* :

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées et correspondent aux espèces exploitées chez les genres Citrus (**Dongmo et al., 2002**).

Le genre Citrus appartient à la sous famille des Aurantiodeae, et compris plusieurs espèces: cédratier, limonier, citronnier, pamplemoussier, oranger doux, oranger amer, bergamotier, mandarinier, clémentinier...etc (**Faucon, 2015**).

1.1.1 Structure :

Tous les citrus sont identiques dans la structure sauf quand il s'agit des dimensions et de la forme et de la couleur: Selon les espèces, les fruits mûrissent de novembre à mars. Le fruit est constitué d'une peau qui entoure une pulpe riche en eau (Figure 01). La peau est constituée de l'extérieur vers l'intérieur de (**kimball, 1999; Polese,2008; Bachès et Bachès , 2011 ; Haineault , 2011**) :

- **L'épiderme** : composé de cires épicuticulaires en forme de plaques. La quantité de cires dépend de la variété, des conditions climatiques et de la croissance.
- **Le Flavédo** : caractérisé par sa couleur jaune, verte ou orange. Il abrite les vésicules oléifères qui sont caractérisées par des parois très fines et fragiles qui renferment l'huile essentielle.

- **L'Albédo** : fait de cellules à structures tubulaires qui forment une véritable toile avec la plupart du volume tissulaire comprimé dans l'espace intercellulaire. L'épaisseur de l'albédo varie selon le type d'agrumes et le type de cultures. Il est très riche en flavonoïdes, responsable de l'amertume du jus.

La pulpe est formée de :

- **l'endocarpe** : des fruits avec les carpelles dans lesquelles se trouvent les vésicules contenant le jus, qui, d'un point de vue biosynthétique devrait être considéré comme le liquide relâché par le cytoplasme et par les vacuoles des cellules internes des vésicules (10 à 14 sections).

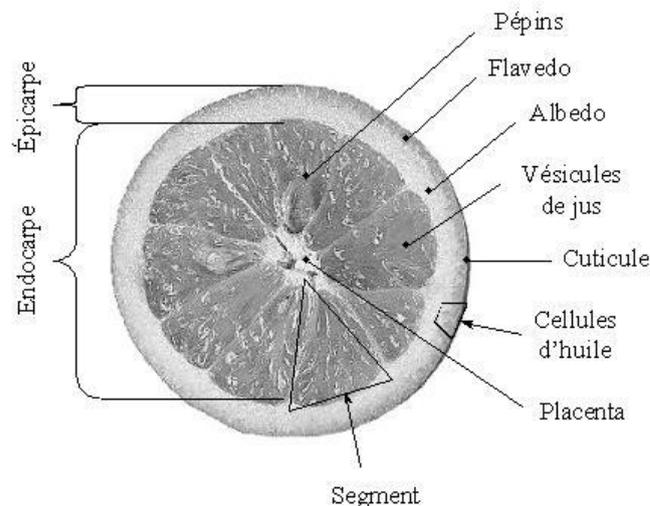


Figure 01: Caractéristiques morphologiques d'un citrus (Duan et al, 2014).

2 Espèce *citrus limon* :

Le citronnier, *Citrus limon* est un arbre qui appartient à la famille des Rutacées et atteint 2,5 à 3 m de haut. Son fruit est jaune et ovoïde. Ses feuilles sont oblongues lancéolées de couleur verte. Ses fleurs ont des pétales blancs, à teinte violacée, axillaires, réunis en petits groupes. Son fruit est oblong, ovoïde, pointu, de 8 à 12 cm de long. Sa couleur verte vire au jaune à la maturité. Sa pulpe est acide, son écorce (zeste) épaisse contenant une essence à odeur caractéristique. Les graines qu'il contient ont des cotylédons blancs. (P. Goetz 2014).

Le citronnier est un arbuste originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropical (**Dubois, 2006 ; Debuigine et Couplan, 2008**).

Cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment, et la fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre) (**Dubois, 2006**). Les principales variétés méditerranéennes cultivées de citronnier sont «Verna », «Eureka », «Lisbonne », «Monachello », «Interdonato » et «Lunaris » (**Blancke, 2001**).



Figure 02 : Feuilles, et fruits de *citrus limon*.

2.1 Classification :

Selon **Padrini et Lucheroni (1996)**, la classification de citron est la suivante :

Règne :	Plantae	Famille :	Rutaceae
Division :	Magnoliophyta	Genre :	Citrus
Classe :	Magnoliopsida	Espèce :	<u><i>Citrus limon</i></u>
Ordre :	Sapindales		

2.2 Composition chimique de citron :**Tableau 1 : Constituants chimiques principaux de citron (P. Goetz, 2014).**

Matière	Famille de constituants	Constituants chimiques
Jus	Flavanones Citroflavonoïdes	de naringine et d'hespéridine (faite d'une flavanone l'hespérétine et le disaccharide-rutinosose) ériodictyol 7-rutinoside, citroflavonoïdes, caroténoïdes, nobilétine
	Acides organiques	d'acide citrique d'acide malique
	Hydrates de carbone	de saccharose, de glucose, lévulose, etc
	Vitamines	de vitamine C (acide ascorbique) de vitamines A et bêta-carotène (provitamine A) Traces de vitamines B1, B2 et B3 ou P, P
	Minéraux et matières générales	Sodium, calcium ; phosphore; silicium, cuivre, phosphore : manganèse, zinc Protéines ; lipides ; glucides ; sucres simples
Peau de citron	Huile essentielle	90 % D-limonène (monoterpène cyclique) 0,4 %, bêtapinène (11,58 %), gammaterpinène (9,28 %), sabinène (1,83 %), alphapinène (1,75 % 3 à 5 %) citronellal, alphaterpinéol, linalyl-acétate, acétate de géranyl, coumarine et autres constituants mineurs

2.3 Usage de citron :

De nombreuses études ont montré que les espèces du genre Citrus sont riches en principes actifs tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, utilisés à des fins thérapeutiques ou dans les domaines cosmétiques ou alimentaires (**HAMA et ASLOUNE, 2017**).

- Usage culinaire: le citron pelé ou finement gratté donne sa propre saveur qui est très prisée en cuisine et en pâtisserie, le jus du citron permet de fabriquer des boissons rafraîchissantes.
- utilisée pour traiter les maladies de la peau : l'acné, soins de visage. (**Valnet, 2001**).
- Le citron a été utilisé contre l'insomnie, l'asthme et dissoudre des cristaux rénaux
- Stimulation de l'appétit (zestes) (**Karimi et al., 2012**).
- Activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse
- Abaissement de la pression artérielle, traiter l'obésité (**Ramful et al., 2011**).

II. Huiles essentielles :

1 Définitions :

On appelle huile essentielle, ou parfois essence végétale (du latin *essentia*, « nature d'une chose »), le liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Il est obtenu par extraction mécanique, entraînement à la vapeur d'eau ou distillation à sec. **(BENNAMA, 2016)**

La Pharmacopée européenne définit l'huile essentielle comme un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. **(Adeline Gadenne ,2017)**

Selon **Bernard et al. (1988)**, le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ces composés ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses. Par conséquent, ils ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

Selon l'**AFNOR**, L'huile essentielle est une substance volatile et odoriférante sécrétée par les plantes aromatiques. Les poches sécrétrices peuvent être situées tant au niveau des parties aériennes (fleurs, feuilles, tiges et rameaux) que des organes souterrains (racines, rhizome). L'huile essentielle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première (dont elle porte le nom) par simple distillation ou par expression mécanique **(AFNOR, 2000)**.

Le terme d'huile essentielle a été retenu par les spécialistes en pharmacognosie. La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible **(BRUNETON, 1999)**.

2 Méthodes utilisées pour l'obtention d'huiles essentielles

A l'heure actuelle, seules 3 méthodes d'obtention d'HE à usage thérapeutique sont autorisées par la pharmacopée européenne : l'entraînement à la vapeur d'eau. La distillation sèche et l'expression à froid pour les HE des péricarpes des plantes du genre *Citrus*.

2.1 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau ou hydro-distillation :

Cette technique (figure 03) utilise l'entraînement des substances aromatiques par la vapeur d'eau. Les plantes sont disposées entières ou broyées (lorsqu'il s'agit d'organes durs comme les racines ou les écorces) dans un appareil de type Clevenger (figure 04) ou dans un alambic (obtention à l'échelle industrielle). Pour l'obtention à l'échelle industrielle, un courant de vapeur d'eau traverse l'alambic et sous l'effet d'une source de chaleur, l'eau se transforme en vapeur qui traverse alors la cuve contenant les plantes aromatiques. La vapeur d'eau ayant volatilisé et entraîné l'HE se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant et retourne donc à l'état liquide pour se séparer dans l'essencier ou vase florentin. L'HE étant hydrophobe et souvent moins dense que l'eau, surnage dans la majorité des cas à sa surface et est recueillie après décantation. Il est impératif que la distillation soit complète pour que tous les constituants aromatiques de l'HE soient récupérés. Par conséquent, les durées de distillation sont généralement longues. Elles varient en fonction des organes distillés de 1 à 24 heures. (BAUDOUX D et al. 2012)

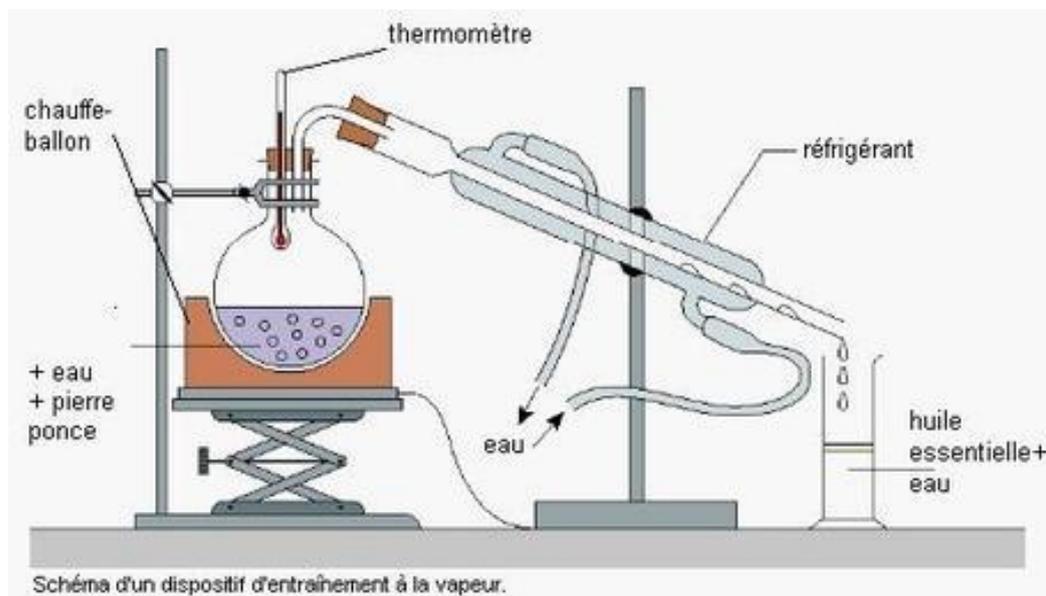


Figure 03 : Distillation par entraînement à la vapeur d'eau.



Figure 04: Appareil de type Clevenger, répondant aux exigences et aux normes de la pharmacopée européenne. (DUMAS, 2015)

2.2 Distillation sèche :

Lors d'une distillation sèche, la plante n'est pas en contact direct avec l'eau. La masse végétale est disposée sur une plaque perforée et de la vapeur d'eau y est injectée au travers. Il est possible de travailler en surpression modérée (de 1 à 3 bars) afin de gagner en temps et en énergie mais la qualité de l'HE peut en souffrir. Cette méthode est utilisée pour les écorces, bois et racines. (BARLIER L ,2013)

2.3 Expression à froid :

C'est le procédé le plus ancien et le plus simple pour obtenir une HE. Cependant, il reste limité car il ne s'applique qu'aux agrumes dont le péricarpe des fruits possède des poches sécrétrices d'essences. Cette technique, née en Sicile et en Calabre, 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 D, 2012 ; BAUDOUX D et al., 2012).

3 Caractérisations des huiles essentielles :

L'importance des huiles essentielles dans divers domaines (pharmacie, cosmétique, parfumerie...) nous amène à vérifier leur qualité. La caractérisation d'une huile consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur).
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, et indice d'acide).
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

3.1 Caractéristiques organoleptiques

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

a) L'odeur :

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parviennent à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'au dix millièmes de grammes par litre d'air.

b) La couleur :

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée.

c) L'aspect :

L'aspect d'un extrait dépend des produits qui la constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide- liquide.

3.2 Propriétés physico-chimiques :

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) étaient autre fois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

a) Densité :

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume, donc c'est le rapport du poids d'un certain volume d'un corps et le poids du même volume d'un corps de référence (eau).

b) Indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (Mohamdi Z, 2005).

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé. L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé. Il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.3356, et de l'huile d'olive à 20°C = 1.4684. Ceci montre leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée.

c) Indice d'acide :

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de leur état de détérioration. (Mohamdi Z, 2005).

4 Composition chimique des huiles essentielles :

4.1 Huiles essentielles des agrumes :

Les huiles essentielles constituées principalement des métabolites secondaires lipophiles volatils tels que les hydrocarbures (terpènes et sesquiterpènes) et les composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, phénols, éthers, esters, lactones et éthers phénoliques). Ils sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 80 % de l'huile, tandis que d'autres composants sont présentés seulement comme trace (**Bousbia, 2011; Sharopov et al., 2015**).

De nombreux facteurs influents sur la composition des huiles essentielles, les facteurs Environnementaux en particulier (propriétés du sol, approvisionnement en eau, lumière du soleil, température) ont un effet important sur la qualité et la quantité de la composition d'huile. Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus (**Bousbia, 2011; Sharopov et al., 2015**).

- **Les terpènes** : ce sont des molécules les plus répandues dans les huiles essentielles.
 1. **Les monoterpènes (C10)** : sont les composés majeurs des huiles essentielles avec des teneurs comprises entre 89,8 % et 99,08%. Le limonène est en général le composé le plus abondant, et d'autres composants monoterpéniques comme α -pinène, α -thujène, β -pinène, α -terpinène, β -terpinène, p-cymène...etc (**Dongmo et al., 2002; Faucon, 2015**).
 2. **Les sesquiterpènes (C15)**: ce sont des terpènes en C15 présents en faible quantité dans les plantes, sauf dans le bois des arbres.
 3. **Les diterpènes (C20)** : molécules assez rares dans les huiles essentielles, et présentes en faibles quantités (cypres, thuya, mélèze).
 4. **Les triterpènes (C30)**: leur présence est aléatoire dans les huiles essentielles. Car, plus la molécule contient un nombre important de carbones, plus elle est « lourde » et donc plus il est difficile de l'extraire par distillation à la vapeur d'eau. Les triterpènes font souvent partie des structures épicuticulaires des plantes aromatiques.

- **Phénols et terpénols (Monoterpénols(C10) Sesquiterpénols(C15) et Diterpénols):** molécules possédant une fonction alcool.
- **Aldéhydes :** il existe des aldéhydes terpéniques et des aldéhydes aromatiques.
- **Lactones :** esters intramoléculaire non aromatiques très actifs, non toxiques, a l'état de traces dans les huiles essentielles.
- **Coumarines :** ce sont des esters intramoléculaires aromatiques, très souvent présentés dans les essences, en particulier les essences de Citrus. Toujours en faible concentration dans les huiles essentielles.
- **Phtalides :** famille chimique apparentée aux coumarines, d'odeur puissante et caractéristique.
- **Composés azotés :** ce sont des composés peu courants au sein des huiles essentielles.
- **Les composés soufrés :** ces composés se rencontrent souvent à l'état de traces dans les huiles essentielles.
- Les acides, les esters, cétones, oxydes terpéniques, éthers (**Faucon, 2015**).

4.2 Huiles essentielle de citron :

La norme ISO : NF T 75-335 (1995) In Robert et Lobstein (2005) a donné la composition de l'huile essentielle extraite par expression de l'écorce du *Citrus limon* avec un rendement de 1,2 à 1,5%.

Les principaux constituants sont :

- le limonène (65 à 70%),
- le citral (1 à 5%),
- le β -pinène (4 à 9%),
- le γ -terpinène (9 à 12%),
- le linalol (1,5%),
- le cinéole, d'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l' α -terpinéol, le camphène et l' α bisabolène .

5 Toxicité des huiles essentielles :

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise (**Degryse et al., 2008**).

Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées (**Degryse et al., 2008**).

Selon **Englebin (2011)**, les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, c'est la puissance concentrée du plant aromatique, il ne faut donc jamais exagérer les doses, quel que soit la voie d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée. Paracelse a dit: "rien n'est poison, tout est poison, tout dépend de la dose "Il faut également savoir qu'une période trop prolongée provoque l'inversion des effets et fou l'apparition d'effets secondaires indésirables.

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines d'entre elles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autres ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone). La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi (**Guba, 2001**).

III Stress oxydatif et antioxydant :

1 Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la quantité excessive de radicaux libres et des antioxydants. Les radicaux libres sont des molécules contenant du dioxygène et sont l'origine du processus naturel de l'oxydation des cellules. En trop grande quantité dans le corps, elles peuvent être nocives pour l'organisme et s'attaquer aux tissus gras, aux protéines, à l'ADN et tous les composants de l'organisme. Lors d'un déséquilibre antioxydants/radicaux libres, le système immunitaire du corps est affaibli et donc les mécanismes de défense du corps sont lésés (Favier, 2003).

1.1 Origine du stress oxydant :

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par le système de défense, la balance antioxydant/pro-oxydante est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une production énorme de radicaux (Favier, 2003).

1.2 Les radicaux libres :

Par définition, un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, capables d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique). Cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Finaud et al., 2006 ; Mac Laren, 2007). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (exemple : $\cdot\text{OH}$) (Mac Laren, 2007 ; Sayre et al., 2008 ; Goto et al., 2008).

1.3 Les maladies liées au stress oxydant :

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies :

cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

2 Antioxydant :

Un antioxydant est une substance qui à faible concentration, prévient ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat (**Halliwell, 1990**). Un nouveau concept beaucoup plus général a défini un antioxydant comme "une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible" (**Gutteridge et Mitchell, 1999; Medina-Navarro et al., 2010**). Un antioxydant idéal devrait être aisément absorbé, susceptible d'éliminer les radicaux libres et chélater les métaux redox à des niveaux physiologiquement appropriés (**Rahman, 2007**).

Afin de maintenir l'homéostasie redox de la cellule, il existe de nombreux systèmes de défense antioxydante endogènes ou exogènes, enzymatiques ou non (**Rezaie et al., 2007**) .

Les antioxydants les plus connus sont le B-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique et le tocophérol (vitamine E) (**Favier, 2006**).

2.1Activité antioxydant des huiles essentielles :

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols qui sont responsables de cette activité (**Zhiri et Baudoux, 2005**).

Les propriétés antioxydants des huiles essentielles de citrus sont depuis peu massivement étudiées. En effet, elles se sont avérées être de très bon antioxydants, donc peuvent être utilisées dans le traitement de pathologies liées au stress oxydatif telles que l'Alzheimer, l'artériosclérose et le cancer ainsi que dans les pathologies dégénératives associé au vieillissement. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de remplacer dans l'alimentation les apports supplémentaire en antioxydants classiques (vitamine C, a-tocophérol, BHT, etc.) par les huiles essentielles (**Pincemail et al.,2002**).

IV Inflammations et activité antiinflammatoire :

1 Généralité sur l'inflammation :

L'inflammation est une réaction de défense naturelle déclenchée lorsque le corps est menacé par des agents pathogènes, des cellules endommagées ou des irritants. Cette réponse est essentielle pour l'être humain afin de combattre les différentes infections, pour favoriser la cicatrisation et le rétablissement de la fonction normale du tissu endommagé. Elle est caractérisée par 4 signes : une rougeur, un gonflement avec chaleur et douleur (**Russo-Marie et al., 1998**).

Quel que soit le facteur inducteur, la réponse inflammatoire sera la même mais avec des intensités et des durées variables. La réponse inflammatoire peut être éphémère ; se manifeste immédiatement après l'invasion de l'agent pathogène et dure jusqu'à 48 h environ. Dans ce cas elle est appelée inflammation aiguë. Toutefois, elle peut persister des années d'où on l'appelle l'inflammation chronique.

1.1 L'inflammation aiguë :

Elle est décrite selon quatre étapes : la reconnaissance des signaux de danger, le recrutement de cellules sur le site d'infection, l'élimination du pathogène et la résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Barton, 2008**).

L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ;

Une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale.

Une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés.

Une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (**Weill et al., 2003**).

1.2 L'inflammation chronique :

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé. Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années (**Rankin, 2004**), et être à l'origine de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, et la goutte (**Das, 2011**).

2 Anti-inflammatoires naturels :

Des études menées in vitro et in vivo ont démontré l'effet anti-inflammatoire et antioxydant d'un grand nombre de plantes utilisées en médecine traditionnelle ainsi que le mécanisme d'action de plusieurs substances naturelles extraites de ces plantes. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant par exemple l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (**Duwiejua et Zeitlin, 1993**).

Les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les cas d'inflammations semblent être une alternative fiable et logique à la recherche d'agents anti-inflammatoires sûr et efficace. Il est bien connu que la dénaturation des protéines tissulaires conduit à des maladies inflammatoires et des arthrites. Les produits naturels qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seront donc utiles pour le développement de la thérapie anti-inflammatoire (**Alhakmani et al., 2010**).

2.1 Mode d'action des huiles essentielles anti-inflammatoire :

Les HEs sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple, l'huile essentielle de géranium (**Maruyama et al., 2005**) ainsi que le linalol et son acétate ont montré une activité anti-inflammatoire sur des oedèmes de pattes de souris induit par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires (**Piochon, 2008**).

Matériel et méthodes

I Matériels et produits utilisé :

1 Matériel non biologiques :

Le matériel utilisé au laboratoire « l'appareillage, la verrerie, et les réactifs » est énuméré en Annexe 1.

2 Matériel biologique :

2.1 Matériel végétal :

Le présent travail est focalisé sur la partie écorce (zeste) du Citrus limon, connue par sa richesse en huiles essentielles par rapport aux autres parties du fruit (**Robert et Lobstein, 2005**).

Les fruits du citron ont été récoltés le mois de février 2020 Issu d'un verger situe près de l'université SAAD DAHLEB dans la ville D'Oulad Aiche de Blida (Figure 05).



Figure 05 : Site de collecte de citron, région d'Ouled-Yaïch, Blida.

Les fruits ont été soigneusement lavés pour les débarrasser de la poussière, puis épluchés à l'aide d'un couteau en évitant d'inclure l'albédo, la matière blanche (les écorces sont coupées en petits morceaux).

II. Extraction des huiles essentielles de Citron

1-Hydrodistillation :

1.1. Le principe :

L'hydrodistillation (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction des huiles essentielles. Dans son principe, elle consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, l'ensemble est ensuite porté à l'ébullition, à pression atmosphérique. Sous l'action de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées et entraînées par la vapeur d'eau qui est ensuite condensée. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Puis les deux phases, la phase aqueuse (hydrolat) et la phase organique surnageant (huile essentielle) sont séparées par leurs différences de densité (Venturini, 2012; Herzi, 2013).

1.2 Méthodologie:

On a utilisé la technique d'hydrodistillation pour extraire l'huile essentielle de Citron, le montage est réalisé au laboratoire des plantes aromatique (Figure 06), selon le mode d'extraction suivant:

- 200g de matière végétale (les zestes frais de citron) ont été introduits dans un ballon contenant de l'eau. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 heures.
- Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau d'huile essentielle qui la surnage (Figure 06).
- Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C .



Figure 06: Montage d'hydrodistillation.

2 Calcul du rendement en huile essentielle

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huiles essentielles (R%), est défini comme étant le rapport entre la masse des huiles essentielles obtenues après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$R\% = (M' / M) \times 100$$

Où **R%** est le rendement des huiles essentielles en pourcentage.

M' est la masse des huiles essentielles obtenues en g.

M est la masse de zeste de citron en g.

III. Analyses physico-chimiques des huiles essentielles de Citron

1 Etude analytique de l'huile essentielle :

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'HE ont été notées en concertation avec les ingénieurs de laboratoire.

2 Les propriétés physico-chimiques :

Les HEs obtenues par les techniques d'extraction mentionnées précédemment doivent être contrôlées et analysées par des méthodes physico-chimiques en mesurant quelques paramètres:

2.1 Mesure de pH :

Il permet de mesurer la concentration d'une solution aqueuse en protons (H+) et le degré d'acidité ou de basicité d'une solution.

- Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre.

2.2 Mesure de la densité :

La densité d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la Masse d'un égal volume d'eau distillée, la densité est donnée par la formule suivante :

$$D = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où ;

m₀ : La masse de flacon vide.

m₁ : la masse de flacon remplie d'eau distillée.

m₂ : La masse de flacon remplie d'HE. (BOUKHATEM, 2010 ; KHOLKHAL, 2014 ; OUIS, 2015)

2.3 Indice de réfraction (IR) :

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

➤ Mode opératoire et calcul :

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

- Régler le réfractomètre en mesurant l'IR de l'eau distillée qui doit être de 1.333 à une température de 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, nous déposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal. Enfin, nous fermons délicatement le prisme secondaire. (KAIBI et TIMIZAR, 2016)

2.4 Détermination de l'indice d'acide (IA) :

L'indice d'acide est défini comme étant le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'HE. Les acides libres sont neutralisés par une solution éthanoïque titrée de KOH. (AFNOR, 2000).

➤ Mode opératoire :

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

Il est calculé par la formule suivant :

$$\mathbf{IA} = \frac{V \times 5.61}{M}$$

IA : Indice d'acide.

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

M : La masse en gramme de la prise d'essai (KAIBI et TIMIZAR, 2016)

IV. Activité antioxydant des huiles essentielles de Citron

1 La méthode de DPPH :

1.1 Principe :

Le test DPPH est largement utilisé pour étudier l'activité de balayage des composés de produits naturels. Le DPPH a un électron impair qui forme la couleur violette, conduisant à une longueur d'onde d'absorbance à 517 nm (**Bui Thanh et al, 2016**).

Les huiles essentielles ont la capacité d'inhiber le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) par la donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons (**Choi et al, 2000**).

Lorsque le DPPH réagit avec un antioxydant, perd sa couleur violette et devient de couleur jaune (**Lakshmi et al, 2014**).

La réduction du radical par un donneur d'atome H (ROH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune (DPPH-H) et au radical (A•) (Figure 07).

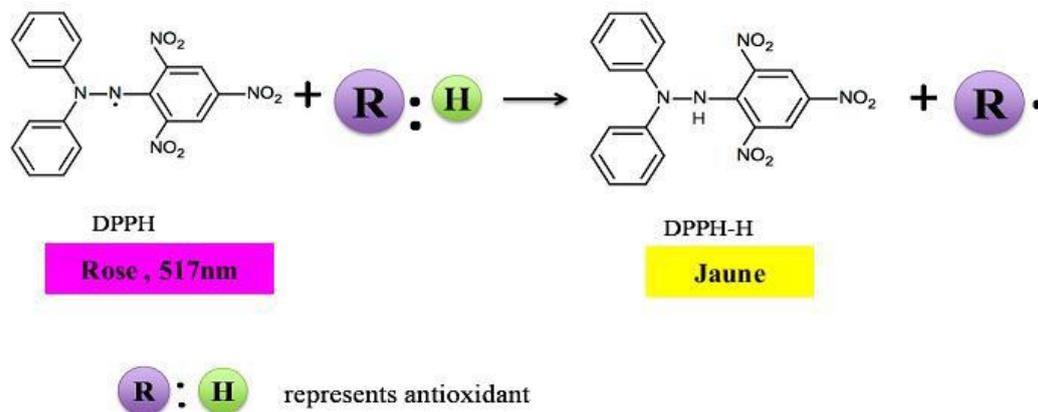


Figure 07 : Mécanisme réactionnel du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydante (RH) (**GOUDJIL., 2016**).

1.2 Mode opératoire :

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par **Lopes-Lutz et al. (2008)**,

- 100 µl de chacune des solutions méthanoïques des HE testées à différentes concentrations sont mélangées avec 1300 µl d'une solution méthanoïque de DPPH (0,004%).
- Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire,
- L'absorbance est lue à 517nm.
- L'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique a été également analysée pour comparaison.

1.3 Expression des résultats:

➤ Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Le pourcentage d'inhibition PI est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI (\%)} = 100 \times [(\text{Ac} - \text{AE}) / \text{Ac}]$$

Avec :

A C : absorbance du contrôle négatif.

A E : absorbance de l'extrait.

NB: le contrôle négatif contient le méthanol à la place d'huile essentielle.

A partir des résultats présentant l'activité scavenger en %, on peut déterminer l'IC50 (concentration d'huiles essentielles nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH).

V. Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de Citron :

1 Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire) :

1.1 Le principe :

L'action anti hémolytique *in vitro* d'huile essentielle a été évaluée par l'utilisation de modèle érythrocytaire, ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane à similitudes avec d'autres membranes cellulaire (**Shobana et Vidhya, 2016**).

Si les globules rouges (RBC) sont exposés à des substances nuisibles telles que le milieu hypotonique alors la rupture de sa membrane se produira, provoquant la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant. Étant donné que les membranes des globules rouges humains (HRBC) sont similaires aux composants de la membrane lysosomale. L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule (**Habibur Rahman et al., 2015; Labu et al., 2015**).

Il existe une relation entre l'hémolyse et l'inflammation, car pendant l'inflammation, il y a une lyse de la membrane lysosomale qui libère leurs composants enzymatique produisant une variété des troubles (**Labu et al., 2015**).

L'hémolyse est détectée visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma. Dans cette étude, la stabilisation de la membrane HRBC est effectuée par l'inhibition de l'hypotonicité (**Habibur Rahman et al., 2015; Shobana et Vidhya, 2016**). La lecture de la densité optique de surnageant récupéré est réalisée par un spectrophotomètre visible.

1.2 Le protocole expérimental

Le protocole suivi pour l'étude de l'activité protectrice de la membrane des érythrocytes par les huiles essentielles est celle de **Labu et al. (2015)**.

➤ Préparation de la suspension des érythrocytes

On a prélevé le sang d'un volontaire sain qui n'a pas pris de médicament anti inflammatoire pendant 15 jours avant le prélèvement.

L'obtention des érythrocytes est comme suit:

- Centrifugation de sang pendant 10 min à 3000 rpm.
- Lavage des érythrocytes trois fois avec une solution iso-saline [(154 mM NaCl) dans un tampon phosphate à 10 mM (pH= 7,4)].
- Reconstitution des globules rouges sous forme d'une suspension à 10% dans la solution iso-saline.

➤ **Protocole de stabilisation membranaire (Labu *et al.*, 2015)**

- Verser 0,5 ml globules rouges.
- Ajouter 5 ml de solution hypotonique.
- 0,5 ml d'huile essentielle ou standard.
- Centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min.
- Incubation à 37c° pendant 10 min.
- Lecture à 540 nm.

1.3 Expression des résultats

L'inhibition de l'hémolyse est obtenue en pourcentage par la formule suivante : (Labu *et al.*, 2015).

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{Abs C} - \text{Abs T}}{\text{Abs C}} \times 100$$

Abs T: absorbance de test (huile essentielle ou standard).

Abs C: absorbance de contrôle.

1.4 Analyse :

Chaque expérience est répétée trois fois, les valeurs sont représentées par la Moyenne ± écart type. Les valeurs d'IC50 sont mesurées par régression linéaire.

Résultats et discussion

I Extraction des huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon* :

1 Détermination du rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction en huile essentielle de la plante étudiée exprimés en pourcentage poids par rapport à l'écorce des fruits, est indiqué dans le tableau 02 :

Tableau 02: Rendement en huile essentielle de Citrus limon.

Méthode d'extraction	Hydrodistillation
Rendement %	0.41 ± 0.0275

Les résultats représentés dans le tableau 02 montrent que le rendement de HE de C.Limon (0.41%) (Le détail de calcul des rendements est mentionné dans l'annexe 2).

Ce résultat est comparé à d'autres études (**HAMDANI, 2018**) qui ont été prélevés les échantillons de C.limon dans 10 stations de la wilaya de Tlemcen. Les huiles essentielles ont été obtenues avec des rendements varient selon la provenance, allant entre 0,18 à 0,82 %

D'autre part, les résultats de ce travail se rapprochent des résultats de d'autres travaux comme ceux de **BOUBERKA et BOUCHETA, (2018)** de wilaya de Bejaïa qui notent un rendement de 0.40 % par hydrodistillation.

Cette différence de rendement est peut être due à un ensemble de paramètres comme l'origine géographique, la méthode d'extraction, la période d'extraction, la maturité de fruit mais également aux conditions d'expérimentation (**Djenane, 2015**).

2 Caractères organoleptiques :

Les HEs des espèces de *Citrus limon* présentent un aspect liquide, limpide et de couleur jaune, elles sont caractérisées par une odeur très forte (caractéristique du fruit d'agrumes).

Ces résultats sont comparés à une étude de (OUALI et SADOUNI, 2017) wilaya de Bejaia qui a trouvé les mêmes propriétés organoleptiques d'huile essentielle de *Citrus limon*.



Figure 08 : huile essentielle de citron.

II. Les indices physico-chimiques :

Le tableau 03 regroupe les résultats physico-chimiques d'huile essentielle de *C.limon* de deux wilayas en Algérie, wilaya de Blida selon les résultats de KAIBI F et TIMIZAR À, 2016 et wilaya d'Ouargla selon MEFLAH et LADJEL 2017.

Tableau 03 : les indices physico chimique de deux HEs.

	HE de Blida	HE d'Ouargla	AFNOR- NF T75006
pH	-	5.00	Acide faible
Densité	0.849	0.91000	≤ 0.921
Indice de réfraction	1.475	1.47803	1.470 -1.478
Indice d'acide	1.20	5.32	0.84-3.74

Les propriétés physico-chimiques tels que : la densité relative, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, constituent un moyen de vérification et de contrôle de l'huile essentielle (Afssaps, 2008).

A partir les résultat de tableau nous remarquait que l'indice d'acide de HE de Blida et inférieure (1.20) est une preuve de bonne conservation de l'huile par rapport l'indice d'acidité d'Ouargla (5.32) est supérieure à l'énorme de AFNOR qui prouve aussi une mauvaise conservation de l'huile, une huile fraîche ne contient que très peu d'acide libre, C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradation telle l'hydrolyse des esters (**Kaloustian et al., 2013**).

Dans l'intervalle 1.470 à 1.478 l'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et les dérivés oxygénés une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Koba et al., 2003, Kaloustian et al., 2013**). Ce qui le cas de HE de citrus limon de wilaya de Blida par rapport à celle de Ouargla (1.475,1.478, respectivement). Plusieurs investigations **Moufida et Merzouk (2003) ; Belletti et al., (2004) ; Rehman et al., (2004)** ont démontré que, généralement les HEs de Citrus sont constituées principalement de composés monoterpénique (97%). Alors que les autres composés comme les alcools, les aldéhydes et les esters ne sont représentés qu'avec des teneurs faibles allant de 1.8 à 2.2 %.

La détermination de la densité relative peut être considérée comme un critère de pureté qui indique la présence de corps étrangers (**Kaloustian et al., 2013**), la densité des huiles essentielles est inférieure à celle de l'eau et selon l'Association Française de Normalisation, les HEs appartenant aux espèces Citrus doivent avoir une densité maximale de 0.921 (**AFNOR- NF T75006**), ce qui le cas pour les huiles essentielles de Blida et Ouargla (0.849, 0.910 respectivement).

L'huile essentielle de Ouargla présente un acide faible avec un $pH = 5$.

La majorité des paramètres physico-chimiques d'huile essentielle de Blida et Ouargla sont en accord avec l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

III. Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de *C.limon* :

1 Activité anti radicalaire par DPPH :

L'évaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielle de *c.limon* de deux wilaya en l'Algérie, wilaya de Bejaïa et wilaya de Tlemcen été faite en comparaison avec celle de l'acide ascorbique. En utilisant la méthode de DPPH.

Selon les résultats de travail de **OUALI, SADOUNI 2017** sur *C.limon* de Bejaia et **HAMDANI, 2018** de Tlemcen ont permis de tracer deux tableaux 4,5 à partir de ces tableaux nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC50. Les résultats sont représentés selon des courbes (Annexe 3.4.5.6).

Tableau 04: Evaluation de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de *Citrus limon* de Bejaia et l'acide ascorbique et les valeurs d'IC50.

	concertation	% d'inhibition	Ic50 mg/ml
control	-	0	
A. ascorbique	12,5µg/ml	11,898 ± 0,002	0.06
	25µg/ml	28,860 ± 0,006	
	100µg/ml	78,354 ± 0,002	
HE <i>C.limon</i>	3,75mg/ml	14,81 ± 0,018	24.30
	7,5mg/ml	22,151 ± 0,013	
	15mg/ml	34,43 ± 0,010	
	30mg/ml	60,506 ± 0,008	

Tableau 05: Evaluation de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de *Citrus limon* de Tlemcen et l'acide ascorbique et les valeurs d'IC50.

	Concentration mg/ml	% Inhibition	Ic50 mg/ml
Acide ascorbique	0,005	4,88	0.13
	0,02	14,98	
	0,05	19,86	
	0,1	39,37	
	0,2	74,91	
HE <i>C.limon</i>	0	0	183.06
	50	24,14	
	100	32,18	
	150	40,46	
	200	53,79	

Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou pour les HE de *Citrus limon*.

L'évaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* de Bejaïa et Tlemcen ont montré que cette activité est moins importante avec une valeur d'IC50=24,30mg/ml,183.06ml/ml respectivement par rapport au standard A.ascorbique utilisé qui donne une valeur d'IC50 de 0,06 mg/ml,0.13ml/ml respectivement.

Selon **laïb(2011)**, la IC50 est inversement lié à la capacité antioxydant d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de IC50 est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est grande. Ceci nous permet de constater que pour les huiles essentielles de la plus faible valeur d'IC50 est celle de la région de Bejaïa avec une valeur de l'ordre 24.30 mg /ml, ce qui signifie que leur pouvoir antioxydant est plus grand que celui de la région Tlemcen, leur valeur enregistrée est 183.06 mg/ml. Toutefois, cette valeur reste élevée par rapport à celle de l'acide ascorbique qui est de (0.06ml/ml,0.13ml/ml respectivement). Il semble donc que ce dernier soit l'antioxydant le plus efficace.

IV. Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'huile essentielle de *Citrus limon* :

1 Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire) :

L'activité anti hémolytique d'huile essentielle de *C.limon* est évaluée en provoquant l'hémolyse par une solution hypotonique qui induit la désorganisation de la membrane et la libération de l'hémoglobine donnant au surnageant une légère coloration rouge en fonction de la proportion d'hémolyse.

Les résultats obtenus par **OUALI et SADOUNI ,2017** qui ont travaillé sur le *C.Limon* de wilaya de Bejaïa présentés dans le tableau 06 :

Les résultats sont représentés selon des courbes (Annexe 7,8).

Tableau 06: L'activité anti hémolytique d'huile essentielle de l'écorce de *C.limon* et de Diclofénac de sodium.

	[c]	%d'inhibition	IC50 mg/ml
Control	-	0	-
DIC	125µg/ml	44,37	0,168
	250µg/ml	54,37	
	500µg/ml	65,72	
	1000µg/ml	75,20	
HE <i>C.limon</i>	1,87mg/ml	12,50	14,24
	3,75mg/ml	37,39	
	7,5mg/ml	43,43	
	15mg/ml	50,52	

L'huile essentielle de *Citrus limon* a protégé les globules rouges contre l'hémolyse avec un pourcentage maximum de 50,52% à une concentration de 15mg/ml ; l'effet de standard anti inflammatoire contre l'hémolyse est très important avec un pourcentage de 75,20% à une concentration de 1mg/ml.

L'IC50 d'huile essentielle de l'écorce de *C.limon* est 14,24 mg/ml dont la puissance est moins importante de celle du standard ayant une IC50 de 0,168 mg/ml.

Cette étude a affirmé que les huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon* possèdent une activité anti hémolytique.

Conclusion :

Les agrumes occupent aujourd'hui une place importante dans les échanges mondiaux des produits végétaux, tel que le citron (*Citrus limon*) qui est riche en différents métabolites secondaires. Parmi eux, les huiles essentielles qui sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe et caractérisées par des propriétés biologiques importantes, ce qui leur confère d'être utilisées dans plusieurs domaines : industrie pharmaceutique, la cosmétique, l'industrie alimentaire...etc.

L'idée directrice de notre étude a consisté à extraire l'huile essentielle des écorces de *Citrus limon* (Citron jaune) provenant de la région de Blida, à déterminer ses propriétés physico-chimiques, à évaluer in vitro ses propriétés antioxydante et anti-inflammatoire.

L'extraction des huiles essentielles de Citron, a été réalisée par hydrodistillation au laboratoire de recherche de notre département, le rendement calculé est faible de 0.41%.

D'après les résultats des autres auteurs, la détermination des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles (densité, l'indice d'acidité, indice de réfraction et le Ph) nous a permis de mettre en évidence la qualité de ces huiles. La majorité de ces résultats sont conformes aux normes AFNOR.

Les résultats obtenus par certains auteurs montrent que l'huile essentielle de *Citrus limon* possède un pouvoir antioxydant, et après comparaison des IC₅₀, nous avons remarqué que l'activité antioxydante de l'huile essentielle (*C.limon*) de Bejaia (IC₅₀= 24.30 µg/ml) est supérieure à celle de l'huile essentielle de Tlemcene (IC₅₀= 183.60 µg/ml). D'autre part, ces valeurs sont largement inférieures à celle de l'acide ascorbique avec un IC₅₀ de 0.06µg/ml ; 0.13 µg/ml respectivement. L'étude de pouvoir antioxydant a confirmé la propriété antioxydante que possède les huiles essentielles de Citrus mais avec une efficacité antiradicalaire beaucoup moins importante que celle de l'acide ascorbique.

En outre, concernant l'activité anti-inflammatoire in vitro par l'auteur (ouali, sadouni, 2017) a été étudiée par la méthode de l'inhibition de la dénaturation de l'albumine et la stabilisation membranaire d'un modèle érythrocytaire, l'huile essentielle de *C.limon* a donné un pourcentage d'inhibition important confirmant sa propriété anti-inflammatoire.

Références

Bibliographiques

Les références bibliographiques :

A

Adeline Gadenne, Bien choisir ses huiles essentielles, plante & sante de France, janv2017, 1_4p

AFNOR, 2000. Association Française de Normalisation. Normes françaises : huiles essentielles. AFNOR, Paris.

AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition. AFNOR, Paris.

AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition. AFNOR, Paris.

Afssaps. 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.17

Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4: 208-228.

Alhakmani F., Kumar S. and Khan S.A. (2013). Estimation of total phenolic content, *in-vitro* antioxidant and anti-inflammatory of flowers of *Moringa oleifera*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(8): 623–627.

Anton R et Silano V., (2001). Plants in cosmetics, Volume II, édition Conseil de l'Europe, Allemagne,pp 41-43.

Anton R. et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p

B

Bachès B. et Bachès M (2011). Agrumes, nouvelle édition ULMER: 7-127

BARLIER L. *Etat des lieux de l'utilisation des huiles essentielles au CHU d'Angers (de 2000 à 2013)*, 2014. Thèse d'exercice. Université d'Angers. UFR des sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé. 87 p.

Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* 118, 413-420.

BAUDOUX D, BREDA M., ZHIRI A. *Aromathérapie scientifique : Huiles essentielles chémotypées*. 1e éd. Belgique : J.O.M, 2012. 88 p.

Belleti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R., Gardini F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52 (23), 6932-6938.

BENNAMA Wafa, Étude de La rémanence d'un savon additionné à l'huile essentielle de citron (Citrus limon, mémoire de master en Valorisation des Substances Naturelles Végétales, Mostaganem : Université Abdelhamid Ibn Badis, 2016,89p.

Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. (1988). Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. In *Information chimie*, 229 pp. 179-184.

Blancke R., 2001. Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.

BOUBERKA W et BOUCHETA K, Evaluation in vitro des activités antioxydante et antibactérienne et caractérisation de l'huile essentielle de l'écorce de citron (*Citrus lemon L.*), these de master en Sciences Alimentaires, bejaia : Université A. MIRA, 2018 ,23p

BOUKHATEM M N, HAMAIDI M S, SAIDI F, HAKIM Y.(2010)- Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie)., *Nature & Technologie.*,3.,37-45p.

Bousbia, N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 128p.

BRUNETON, J., 1999. *Pharmacognosie- photochimie- Plantes médicinales.* Ed : Tec &Doc. Lavoisier, Paris, 1220 p.

Bui Thanh, T., Vu Duc, L., Nguyen Thanh, H. et Nguyen Tien, V. (2016). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds of ethanol extract from *Sanchezia speciosa* Leonard's leaves. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*

C

Choi, H-S., Song, H.S., Ukeda, H. et Sawamura, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem*, 48: 4156-4161.

Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C. et Boruah, P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Sci. Technol*, 42: 777-780.

CONSEIL DE L'EUROPE. Pharmacopée européenne en ligne 8.3. [En ligne]. [Consulté en juillet 2015]. Disponible à l'adresse : <http://online6.edqm.eu/ep803/>

D

Das NU, (2011). Inflammation. Chapitre 3. In: *Molecular Basis of Health and Disease.* Springer. New Work. pp. 15-100.

Débuigine G. et Couplan F., 2008. Petit Larousse des plantes qui guérissent. Ed : Larousse, Paris. 895 p.

Degryse A., Delpla I., Voinier M. (2008) : Risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ingénieure du Genie Sanitaire, atelier santé environnement.

Dhanavade, M.J., Jalkute, C.B., Ghosh, J.S. et Sonawane, K.D. (2011). Study antimicrobial activity of lemon (*Citrus lemon L.*) peel extract. *Br. J. Pharmacol. Toxicol*, 2(3): 119-122.

Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of

Dongmo, P.M.J., Kuate, J., Boyom, F.F., Ducelier, D., Damesse, F., Zollo, P.H.A., Menut, M. et Bessiere, J.M. (2002). Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de citrus sur la croissance mycelienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, 57(2): 95-104.

Dongmo, P.M.J., Kuate, J., Boyom, F.F., Ducelier, D., Damesse, F., Zollo, P.H.A., Menut, M. et Bessiere, J.M. (2002). Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de citrus sur la croissance mycelienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, 57(2): 95-104.

Duan L., Guo L., Liu E . H. & Li P. (2014). Characterization and classification of seven citrus herbs by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *J .chromatogr A*. 1339:27-118.

Dubois C., 2006. Les arbres fruitiers. Ed : Rustica, Paris. 127 p.

DUMAS. Appareil de distillation : verrerie scientifique et technique, matériel de laboratoire, oenologie, laiterie [en ligne]. [Consulté en octobre 2015]. Disponible à l'adresse : <http://www.verrerie-dumas.fr/appareil-de-distillation-boutique-20-41-93.html>

Duwiejua M, Zeitlin I J, (1993). Plants as source of anti-inflammatory substances. In : *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni). p: 153.

E

Englebin M. (2011): Essences et huiles essentielles: precaution d'emplois et conseils d'utilisation Centre de formation en aromathérapie.

F

FAO. 2013. FAOSTAT statistical database (disponible à l'adresse: faostat.fao.org).

Faucon, M. (2015). Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.

Faucon, M. (2015). Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455

Favier A, oxidative stress in human diseases ,*Ann Pharm Fr*,2006 ;64 :390-396

Favier,A. (2003). le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.*l'actualité chimique*, p108-115.

Fernnell C.W., Lindsey K.L., McGaw L.J., et al., 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacology screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**. 94:205-217.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports med* 2006b, Vol. 36 (4); pp 327-58.

G

Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, Kanazawa K. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008, Vol.45; pp 1318–1325.

GOUDJIL M B. (2016)-Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. thèse doctorat ., Université kasdi marbah Ouargla.

Gramza A., Pawlak-Lemańska K., Korczak J., Sowiński E.W. and Rudzińska M., 2005. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*

Guba R., 2001. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *Int. J.Aromather.* **11**: 76-83

H

Habibur Rahman., Chinna Eswaraiah, M. et Dutta, A.M. (2015). *In-vitro* antiinflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* Var. *Joha Rice* (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 15 (1): 115-121.

Habibur Rahman., Chinna Eswaraiah, M., Vakati, K. et Madhavi, P. (2012). *In-vitro* studies suggest probable mechanism of *Eucalyptus* oil for anti-inflammatory and anti-arthritic activity. *Int J Phytopharm*, 2(3): 81-83.7

Haineault S (2011). Les Vertus Thérapeutiques des agrumes, 3^{ème} édition Quebecor : 152 pp

HAMDANI S, Etude chimique et activité antioxydante des huiles essentielles des agrumes cultivés dans la région de Tlemcen, these de doctorat en chimie, TLEMEN : UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID,2018,48p.

Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse en vue de l'obtention de doctorat de l'université de Toulouse. Université de Toulouse. 185p.

Jazet Dongmo, P.M., Kuate, J., Ngouana, V., Damesse, F., Sonwa, E.T., Amvan Zollo, P.H. et Menut, C. (2008). Comparaison des propriétés anti-radicalaires et anti inflammatoires des huiles essentielles de *Citrus reticulata* var. Madagascar et *Citrus sinensis* var. Casagrande du Cameroun. *Fruits*, 63: 201–208.

K

KAIBI F, TIMIZAR A, 2016, Etude de quelques activités biologiques Antimicrobienne, antioxydant et cicatrisante de deux agrumes « Citrus limon et Citrus sinensis », thèse de master en Génomique et biotechnologie végétale, Blida Université Saad Dahleb, ,55p

Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., Vanella. P ., 2013. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Ed Springer Verlag., France. 226p.

Kamal, G.M., Anwar, F., Hussain, A.I., Sarri, N. et Ashraf, M.Y. (2011). Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *Food Res Int*, 18(4): 1275-1282.

karimi E., Oskoueian E., Hawa Z.J.(2012). Phenolic compounds choraetrization and biological activities of citrus aurantium bloom molecules; **14**: 1203-1218.

Khodabakhsh, P., Shafaroodi, H. et Asgarpanah, J. (2015). Analgesic and antiinflammatory activities of *Citrus aurantium L.blossoms* essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. *J Nat Med*.

KHOLKHAL F.(2014)- Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ,*ssp coloratus* et *ssp euciliatus* ..thèse doctorat ., Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

Kimball D.A (1999). Description of citrus fruits. In:”citrus processing: A complete guide”.Ed. An Aspen publication. (2), p: 7-35.

Koba K., Sanda K., Raynaud C Mandin D., Millet J., Chaumont J.P., 2003. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cympogon citratus L. naradus L et C. schoenanthus*. Journal de Mycologie médicale, Vol 13, N°4, (décembre 2003), pp 175-180.

Labu, Z.K., Laboni, F.R., Tarafdar, M., Howlader, M.S.I. et Rashid, M.H. (2015). Membrane stabilisation as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities of ethanolic extract of arial parts of *Spondias pinanata* (family: Anacardiaceae). *PhOL*, 2: 44-51.

Laib I, (2011).Etude des activités antioxydante et antifongique de l’huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de magister, Université de Constantine, 122P

Lakshmi, G., Smitha, N., Ammu, S.V., Priya, C.L. et Bhaskara Rao, K.V. (2014). Phytochemical profil, *in vitro* antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea nouchali Linn*: an *in vitro* study. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6 (6): 548- 552.

Leelaprakash, G. et Mohan Dass, S. (2011). *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *Int.J. Drug Dev & Res*, 3 (3): 189-196.

Lopez-tutz, D.S., Alviano, D.S., Alviano, C.P., & Kolodziejczyk, P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of artemisia essential oils. *Phytochemistry* 69:1732-1738.

LOUSSERT R., (1989). Les agrumes arboriculture. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113 p.

M

Mac Laren D. Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier. 2007

Maruyama N., Sekimoto N. and Ishibashi H. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of inflammation*. 2:1-11.

MEFLAH, LADJEL, caractérisation des huiles essentielles de citron fruits et feuilles, thèse de master en Génie de l'Environnement, Ouargla : Université Kasdi Merbah, 2017.

Militello, V., Vetri, V. et Leone, M. (2003). Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophys. Chem*, 105: 133- 141.

Mohamdi. Z. Etude du pouvoir et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat, université Abou Baker belkaïd Tlemcen, 2005, 89-92.

Moufida S. et Merzouk B., 2003. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.

O

Ollitrault, P., Dambier, D., Froelicher, Y., Luro, F., Cottin, R., 2000. La diversité des agrumes : structuration et exploitation par hybridation somatique. *Compte rendu d'Académie d'Agriculture de France* 86 (8), 197-221.

Osman, N.I., Sidik, N.J., Awal, A., Adam, N.A.M. et Rezali, N.I. (2016). *In vitro* xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *J Intercult Ethnopharmacol*, 5 (4): 343 - 349.

OUALI T et SADOUNI Y, Evaluation in vitro des activités antioxydante et anti inflammatoire des huiles essentielles de l'écorce de Citrus limon, thèse de master en Pharmacologie Moléculaire, Bejaia : Université A. MIRA, 2017,41p.

OUIS N. (2015)-Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil, et de persil, thèse doctorat, Université Oran1.

P

P. Goetz, Citrus limon (L.) Burm. f. (Rutacées) Citronnier, Springer-Verlag France, 2014, vol 12:116-121p

Padrini P. et Lucheroni M.T., 1996. Le grand livre des huiles essentielles –guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences. Ed : De Vecchi, Paris. Pages 11, 15, 61 et 111

Pincemail J., Bonjean, K., Cayeux K. et Defraigne J.O (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16: 233-239.

Piochon M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire de maîtrise, option ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi 13-51.

Polese J. M (2008). la culture des agrumes .édition artémis. p 94

R

Race, S. (1997). Natural antioxidants, chemistry, health effects, and application
editeur fereindoon Shahidi, Memorial University of new found land St Dohn's, new found
Canada.

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.

Rankin JA, (2004). Biological mediators of acute inflammation. *Advanced Practice in Acute
and Critical Care*, 15(1): 3 -17.

**Rehman S. U., Hussein S., Nawaz H., Mushtaq A. M., Murtaza M. A. & Rizvi A. J.,
2007.** Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread.
Pakistanian Journal of Nutrition, pp 558-561.

ROUX D. Conseil en aromathérapie. 2e éd. Pays-Bas : Pro-Officina; 2011. 187 p.

Russo-Marie, F., Peltier, A., Polla, B.S. (1998). L'inflammation. John Libbey Eurotext.
565p.

S

Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. Metal ions and oxidative protein modification
in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità.* 2008, Vol. 41(2); pp 143-164.

**Sharopov, F., Santhosh Braun, M., Gulmurodov, I., Khalifaev, D., Isupov, S. et Wink,
M. (2015).** Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of
selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods*, 4(4): 645-653.

Shobana, S. et Vidhya, R. (2016). Evaluation of *in vitro* hemolytic activity of different parts
of abutilon indicum (Linn.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5):
1182–1196.

Spiegel- Roy P . et Goldschmidt E.E. 1996 . Horticultural classification of cultivated
citrus. In: *Biology of citrus .* Ed. Cambridge university press, 19-44.

Swingle, W. T., Reece, P. C., 1967. The botany of citrus and its wild relatives. In. Reuther,
W., Batchelor, L. D., Webber, H. J., (Eds.). *The Citrus Industry* (Vol. 1). University of
California Berkeley. Pp: 130-190.

V

Valnet J. (2001). La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. Pp : 207-281

Venturini, N. (2012). Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples des
spiritueux de myrte (*Myrtus communis L*) et de cédrat (*Citrus medica L*) de corse. Thèse
présentée pour l'obtention du grade de docteur en chimie. Université de Corse- Pascal Paoli.
Ecole doctorale environnement et société UMR CNRS 6134 (SPE). 242p.

W

Weill B, Batteux F, (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Supérieur, Paris. 12-23.

Y

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J. P., SRIVATVA, S., Prahba, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body, up council of agriculture research. Res. Environ. Life Sci. 9(11) 1328-1331.

Z

Zhiri A. & Baudoux D., 2005. Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies, Aromathérapie scientifique. Ed. Inspir Development, Luxembourg.

Annexe 1

Appareillage et équipements :

- Spectrophotomètre UV-Visible Biotech. Engineering Management - model spectrophoto scan 80 DV.
- Balance sensible KERN ALS 220-4N.
- Chauffe ballon 2000 ml.
- Agitateur magnétique VELP SCIENTIFICA.
- Réfractomètre.
- Densimètre DMA 35 N, ANTON Paar
- Microseringue 250 µl.
- Ballon Bicol de 2 L.
- 2 thermomètres rodés.
- bec bunsen.

Verreries:

- Réfrigérant.
- Ampoule à décanter 250 ml.
- Ballon 2000 ml.
- Colonne vigreux.
- Deux flacons en verre fumée.
- Burette 5 ml.
- Fiole 100 ml.
- Fiole 500 ml.
- Eprouvette 10 ml.
- Entonnoir.
- Pipette graduée 1 ml.
- Tubes à essai.
- Boîtes de pétri.

Réactifs et matières :

- KOH.
- Ethanol (99.8%).

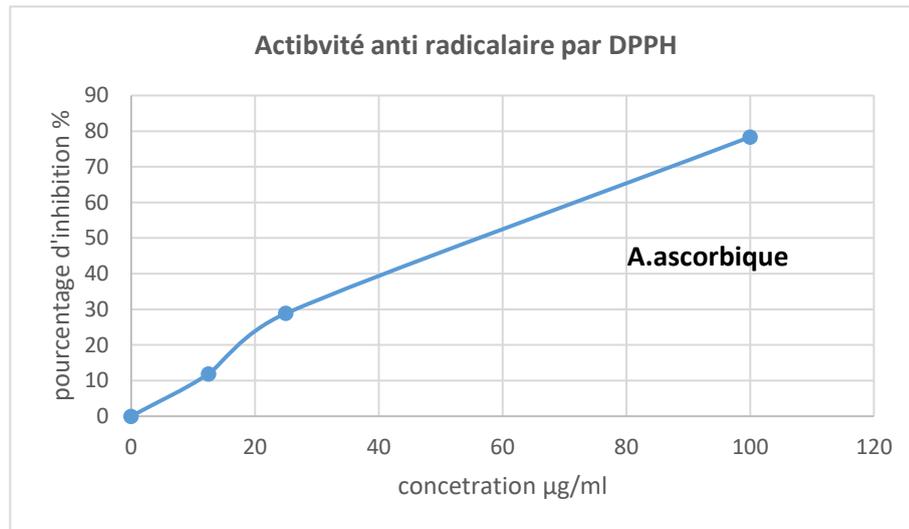
- Phénolphtaléine.
- DPPH- eau distillée.
- Globules rouges.
- Solution hypotonique.
- Eau physiologique.
- Milieu de culture (Gélose Mueller Hinton).
- poupétuve,

Annexe 2

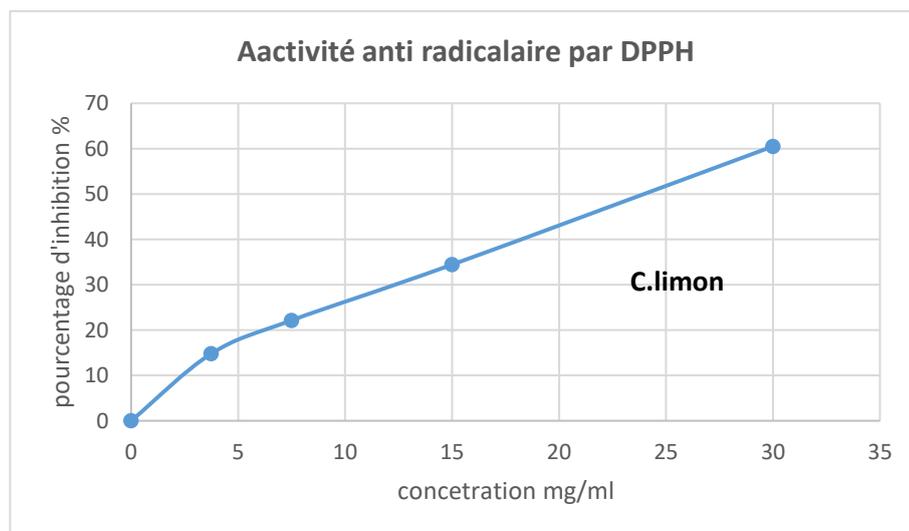
Détermination du rendement en huile essentielle.

La durée d'extraction de chaque échantions 2 heures.

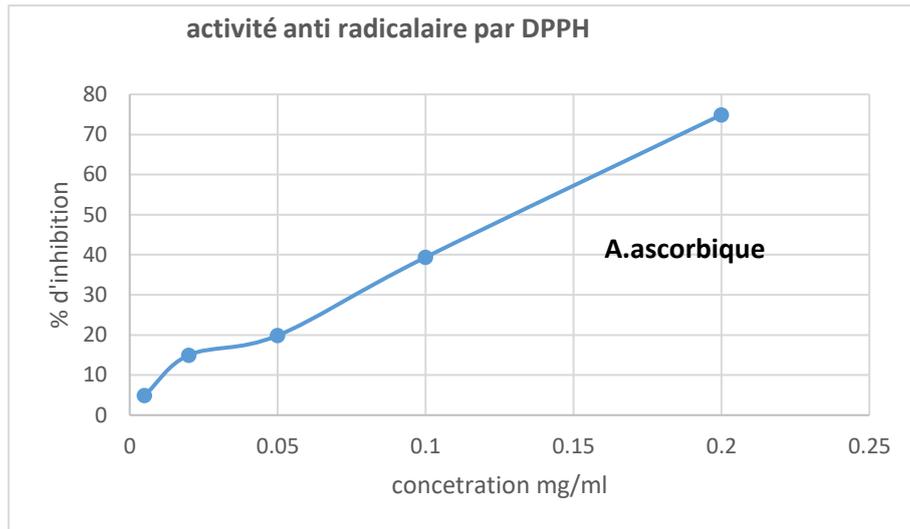
	Ech 1	Ech2
Poids de la matière fraîche en g	200	200
Masse de l'huile essentielle en g	0.77	0.88
Rendement %	0.385	0.44
Rendement moyen %	0.41 ± 0.0275	



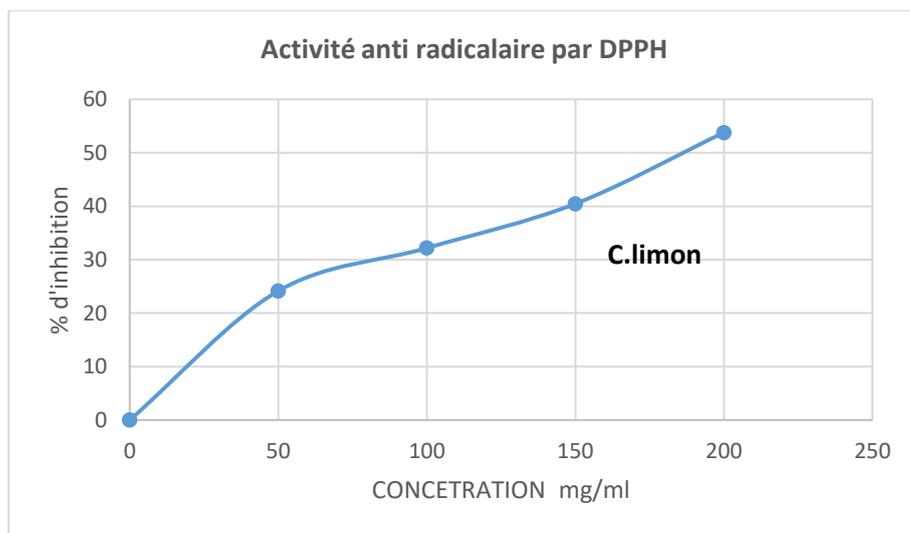
Annexe 03 : Présentation de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique selon les résultats de **OUALI, SADOUNI 2017**, Bejaia.



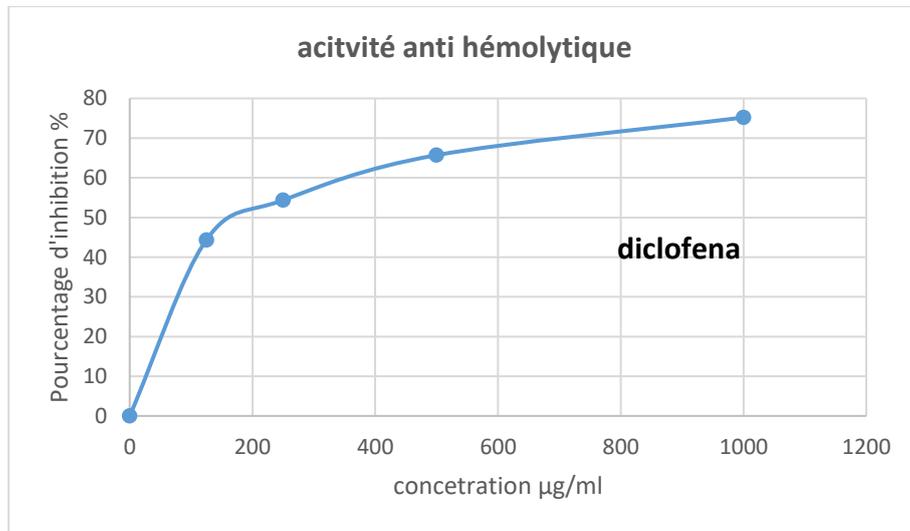
Annexe 04 Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de Citrus limon. selon les résultats de **OUALI, SADOUNI 2017**, Bejaia.



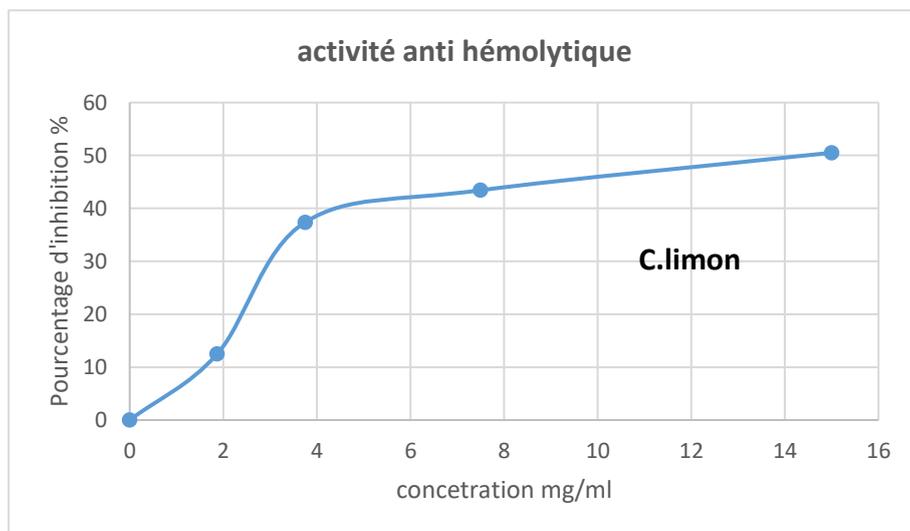
Annexe 05 : Présentation de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique selon les résultats de **HAMDANI, 2018** de Tlemcen.



Annexe 06: Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de Citrus limon. selon les résultats de **HAMDANI, 2018** de Tlemcen.



Annexe 07: Présentation de l'activité anti hémolytique de DIC selon les resultat de **OUALI, SADOUNI 2017**, Bejaia



Annexe 08: Evaluation de l'activité anti hémolytique d'huile essentielle de Citrus limon selon les resultat de **OUALI, SADOUNI 2017**, Bejaia

Résumé

Ce travail se base sur une étude de caractérisation des huiles essentielles de l'écorce de *Citron* cultivés de la région Ouled Yaich à la wilaya de Blida.

L'extraction des huiles essentielles de *Citrus limon* réalisée par hydro distillation a donné un faible rendement de 0.41%.

La majorité des résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle sont conformes avec les normes AFNOR.

Le but de ce travail est l'évaluation de l'activité antioxydant et anti inflammatoire *in vitro* de l'huile essentielle de l'écorce d'espèces d'agrumes *C. limon* (citron).

D'après les résultats obtenu par certain auteur, l'activité antioxydant a montré un pouvoir plus au moins importante des écorces de *Citron*.

l'activité anti inflammatoire *in vitro* est prévu étudiée par la méthode de l'inhibition de la dénaturation de l'albumine et la stabilisation membranaire d'un model érythrocytaire, l'huile essentielle de *C.limon* a donné un pourcentage d'inhibition important confirmant sa propriété anti inflammatoire.

Mots-clés : Citron, Huile essentielle, physico-chimique, Activité antiinflammatoire, activité antioxydant

الملخص

يعتمد هذا العمل على دراسة توصيف الزيوت الأساسية من قشر الليمون المزروع في منطقة أولاد يعيش بولاية البليدة.

أعطى استخلاص الزيوت العطرية من ليمون الحمضيات بواسطة التقطير المائي عائداً منخفضاً بلغ 0.41%.

تتوافق غالبية نتائج التحليلات الفيزيائية والكيميائية للزيت العطري مع معايير AFNOR.

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للالتهابات في المختبر للزيت الأساسي لقشرة أنواع الحمضيات (*C. limon* الليمون).

وفقاً للنتائج التي حصل عليها مؤلف معين ، أظهر النشاط المضاد للأكسدة قوة أكبر أو أقل لقشور الليمون.

من المتوقع دراسة النشاط المضاد للالتهابات في المختبر من خلال طريقة تثبيط تمسخ الألبومين وتثبيت الغشاء لنموذج كرات الدم الحمراء ، وأعطى الزيت العطري لسلك الليمون نسبة كبيرة من التثبيط. مؤكداً خصائصه المضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: ليمون ، زيت عطري ، فيزيائي-كيميائي ، نشاط مضاد للالتهابات ، نشاط مضاد للأكسدة

Summary :

This work is based on a characterization study of essential oils from lemon peel grown in the Ouled Yaich region in the wilaya of Blida.

The extraction of essential oils from Citrus limon carried out by hydro distillation gave a low yield of 0.41%.

The majority of the results of the physico-chemical analyzes of essential oil comply with AFNOR standards.

The aim of this work is to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity in vitro of the essential oil of the rind of citrus species C. limon (lemon).

According to the results obtained by a certain author, the antioxidant activity showed a more or less important power of lemon peels.

anti-inflammatory activity in vitro is expected to be studied by the method of inhibition of denaturation of albumin and membrane stabilization of an erythrocyte model, the essential oil of C. limon gave a significant percentage of inhibition confirming its anti-inflammatory property.

Keywords: Lemon, Essential oil, physico-chemical, Anti-inflammatory activity, antioxidant activity