

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de biotechnologie

Filière des sciences agronomiques

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Science de la Nature et de
la Vie

Spécialité : Biotechnologie des Plantes Aromatiques et Médicinales et
Produits Naturels

Thème

Etude des propriétés physico-chimiques des huiles Essentielles de deux variétés
d'orange amer *Citrus aurantium* de la région de la Mitidja et évaluation de
quelques activités biologiques

Présenté par : MOKRETARI Ouafae

MANSOUR Imene

Devant le jury :

Mme. OUTALEB T.	M C B	U.BLIDA 1	Présidente
Mr. BENDALI A.	M A A	U. BLIDA 1	Promoteur
Mme. GHANAI R.	M A A	U. BLIDA 1	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

Remerciement

Quelques mots en préambule de cette étude, qui met un point d'orgue à une année riche et intense.

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

*En second lieu, nous tenons à remercier notre promoteur **Mr. BENDALI A**, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, la présidente **Mme. OUTALEB L.** Et l'examinatrice **Mme. GHANAI R.** Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.*

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui travaillent à SAIDAL :

Unité SAIDAL de Dar el Beïda

*Mme Mechouk Dalila, Mme Benameur F, Mme Samia
Mme Rekiq, Mr Mohammed*

Unité SAIDAL de Médéa

*Mme Bakheti, Mr Tayeb, Mr Zouambia Fouad, Mr
Benyahia, Mme iman, Mr Bachir.*

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail comme preuve d'amour :

À mes très chers du monde mes parents Hamida, Houcine, qui ont toujours rêvé de me voir arriver à ce stade. Pour leur amour, leur confiance, leur compréhension, leur soutien, leur conseil, leur tendresse, leur orientation et leur sacrifice.

Je leur souhaite le bonheur et la bonne santé.

Qu'ALLAH me les gardes.

À la mémoire de mes grands pères.

À mes grandes mères qui ne m'ont jamais oublié dans ses prières.

À Mes très chère frère Abdenour Aboubaker qui ont beaucoup fait pour moi. Dieu me les gardé heureux et à mes coté.

À mes très chères sœurs Zineb et Mazori qui j'adore de tout mon cœur.

À leurs enfants : Wassim ,Khawla ,Taha ,Abdo Imededdine , Dhayaeeddine et Achwak .

À mes chères tantes Hafida, Rachida, Fatma Zohra, Malika et Nouna .

À ma binome OUAFAE .

À toute ma famille Mansour ,Bedjaoui.

À mon Fiancé Abdelkader .

À ma belle-mère Zahia.

À mes futures enfants.

Imene☺

Dédicaces

« Louange à Allah qui nous a guidés à ceci. Nous n'aurions pas été guidés, si Allah ne nous avait pas guidés »

[Sourate 7. Al Araf verset 43]

*A la mémoire de mes grands parents **Ali** et **Mohamed sghir**
Vous avez toutes mes pensées. Que vos âmes reposent en paix.*

*A mes chers parents **Naser-Eddine** et **Meriem** auxquels je
souhaite que dieu leur prête le plus longtemps possible.*

***Au meilleur des pères**, A l'homme de ma vie, mon exemple
éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui
qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, je t'aime mon
père.*

***A ma très chère maman** la lumière de mes jours, la source de
mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur qui
m'a accompagné durant tout ce parcours laborieux, je t'aime ma
mère.*

*A ma très chère sœur **Selma** qui je souhaite un avenir radieux
plein de réussite Je te remercie pour ton soutien continu. Je suis
chanceuse de t'avoir à mes côtés, tu es mon plus beau cadeau.*

*A mes très chers frères : **Salah-Eddine**, **Adel**, **Islem** qui ont
beaucoup fait pour moi. Dieu me les gardé heureux et à mes
coté.*

*A mes grandes mères **Mama aïcha** et **Mama Zohra***

*A mon cher oncle **Mohamed** que j'aime beaucoup et aussi **Omar***

*A mon cher oncle **Mohamed** chakal*

*A mon cher mari **Badr-Eddine** qui m'a tellement soutenu ainsi que sa famille surtout mes beaux parents **zin-Eddine** et **Houria** que j'aime.*

*A mes beaux frères et mes belles sœurs et le petit **Anes**.*

*A toute la famille, qui porte le nom **Mokretari**, **Chakal** et **Ghalem**.*

A tout ceux qui ont participé à l'élaboration de ce modeste travail et tous ceux qui ils sont chers.

*A ma chère binôme **imane** qu'avec elle j'ai partagé des moments inoubliables pendant et en dehors de travail.*

A tous les membres de ma promotion. A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

*« **OuaFae** »*

Résumé

Ce travail se base principalement sur une étude de caractérisation physico-chimique des huiles essentielles et quelques activités biologiques de deux variétés de bigaradier (le bigaradier ornemental et le bigaradier Japon) cultivés dans la région de la Mitidja wilaya de Blida.

L'extraction des huiles essentielles réalisée par l'hydro distillation à partir de l'écorce de fruit, a donné un rendement pour la variété du bigaradier ornemental 0.64 % et pour le bigaradier Japon 0.40 %.

Les résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle sont conformes avec les normes AFNOR et aussi selon la pharmacopée européenne.

L'analyse de ces huiles essentielles par la CPG a montré un composé majoritaire le limonène avec des taux très élevés dans la variété Bigaradier ornemental 72.55% et 54.29% chez la deuxième variété Bigaradier japon ainsi que des composés minoritaires.

L'étude de pouvoir d'antioxydant par la méthode de réduction du radical libre DPPH a montré que l'huile essentielle de bigaradier est semblable à celle de l'acide ascorbique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles par la méthode d'aromatogramme sur 5 souche bactérienne (4 bactérie et 1 levure). Les résultats obtenus mis en évidence que l'huile essentielle de bigaradier possède une activité antifongique plus remarquable que antibactérienne avec des diamètres d'inhibitions qui varient entre 11 et 29 mm

Sur le plan thérapeutique, la pommade dermique préparée à base d'huile essentielle présente une meilleure activité cicatrisante

Pour l'activité hypoglycémiant de notre infusé préparé par la plante d'écorce étudiée est très efficace pour l'état hyperglycémie, ce qui permis d'utiliser cette plante médicinale comme vertus pour la santé.

Mots clés : *Citrus aurantium, huiles essentielles, Activité anti-cicatrisante, Activité antioxydant, Activité hypoglycémie, activité antimicrobienne.*

الملخص

يستند هذا العمل أساسا على دراسة الخصائص الفيزيائية للزيوت العطرية وبعض الانشطة البيولوجية لصنفين من البرتقال المر (الحامض الزينة البرتقال والبرتقال الحامض اليابان) التي تزرع في منطقة متيجة البلدية. استخراج الزيوت العطرية التي تنتجها المائية التقطير من لحاء من الفاكهة، وهو عائد لمجموعة متنوعة من الحامض البرتقال الزينة B.O 0.64 % واليابان B.J بنسبة 0.40% البرتقال الحامض.

نتائج التحليل الفيزيائية من الضروري النفط هي في الامتثال للمعايير AFNOR وأيضا وفقا لدستور الأدوية الأوروبي.

وأظهر تحليل هذه الزيوت الأساسية التي GC والليمونين مجمع كبير مع مستويات عالية جدا في متنوعة B.O 72.55% و 54.29% في B.J متنوعة والاقلية الثانية المركبات.

وأظهرت قوة مضادة للأكسدة الدراسة باستخدام طريقة الحد من DPPH الجذور الحرة التي من الضروري النفط من البرتقال المر مماثلة لتلك التي من حامض الاسكوربيك.

النشاط المضادة للميكروبات من الزيوت الأساسية التي aromato gramme طريقة من 5 السلالة البكتيرية (4) البكتيريا والخميرة واحد) وأظهرت النتائج المتحصل عليها. وأن من الضروري النفط من البرتقال المر لديه نشاط مضاد للبكتيريا اكثر من رائع كما بأقطار د الموانع التي تختلف ما بين 11 و 29 ملم علاجيا، أعد مرهم جلدي من الضروري النفط والنشاط تحسين الشفاء.

لنقص السكر في الدم النشاط غرست دراستنا من قبل المصنع فعالة جدا لارتفاع السكر في الدم الدولية الذي يجيز استخدام هذه العشبة عن الفوائد الصحية التي أعدت.

كلمات البحث: النارج والزيوت الأساسية والنشاط المضاد للشفاء، والنشاط المضادة للأكسدة، والنشاط سكر الدم، والنشاط المضادة للميكروبات.

Summary

This work is mainly based on a study of physicochemical characterization of essential oils and some biological activities of two varieties of bigaradier (ornamental orange tree and Japanese bigaradier) grown in the region of the Mitidja wilaya of Blida. Extraction of the essential oils carried out by the hydro distillation from the fruit bark gave a yield for the variegated orangutan orange varieties 0.64% and for the bigaradier Japan 0.40%.

The results of the physicochemical analyzes of the essential oil comply with the AFNOR standards and also according to the European pharmacopoeia. Analysis of these essential oils by GPC showed a major compound limonene with very high levels in the B.O. variety 72.55% and 54.29% in the second variety B.J as well as minority compounds.

The study of antioxidant power by the free radical reduction method DPPH showed that the essential oil of sour orange is similar to that of ascorbic acid.

The antimicrobial activity of essential oils by the bacterial strain aromatogram method (4 bacteria and 1 yeast). The results obtained demonstrated that the essential oil of sour orange has an antifungal activity more remarkable than antibacterial with diameters of Inhibitions varying between 11 and 29 mm

From a therapeutic point of view, the dermal ointment prepared from essential oil has a better wound healing activity.

For the activity hypoglycemia our infused prepared by the plant study very effective for the state hyperglycemia which allowed to use this medicinal plant as virtues for health.

Key words: *Citrus aurantium*, essential oils, Anti-healing activity, Antioxidant activity, Hypoglycemia activity, antimicrobial activity.

Liste des figures :

Fig.	Page
Fig. n°1 : coupe transversale d'orange amère	4
Fig. n°2 : Poches sécrétrices des huiles essentielles des <i>Citrus</i> dans feuilles.	13
Fig. n°3 : schéma du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau	15
Fig. n°4 : schéma d'un montage d'hydro-distillation	16
Fig. n°5 : montage d'une distillation assisté par micro-ondes	17
Fig. n°6 : Montage d'une hydro-distillation	25
Fig. n°7 : L'appareille de chromatographie en phase gazeux	30
Fig. n°8 : lapine testé	35
Fig. n°9 : Les scarifications réalisées	36
Fig. n°10 : l'infusé	37
Fig. n°11 : la poudre	37
Fig. n°12 : D+ glucose monohydrate pure (C6 H12 O6 H2O) à 50%	38
Fig. n°13 : La répartition des lapins	38
Fig. n°14 : gavage de l'infusé à l'aide d'une seringue en plastique équipée d'une (sonde gastrique)	39
Fig. n°15 : détermination de glycémie à l'aide d'un glucomètre (appareil de mesure de glycémie)	40
Fig. n°16 : Photos montrant l'effet antibactérienne d'HE de <i>C.aurantuim</i> (B.O) par la méthode aromatoigramme	46
Fig. n°17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'huile essentielle	

<i>de citrus aurantium</i>	48
Fig. n°18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique.	49
Fig. n°19 : Résultats observés après l'application de l'eau physiologique.	50
Fig. n°20 : Résultats observés après l'application de Madécassol	51
Fig. n°21 : Résultats observés après l'application huile essentielle d'orange amer.	51
Fig. n°22 : Courbe lingère présente la mesure de la glycémie (g/l) par le temps (min).	53

Liste des tableaux

N du tableau	page
Tab.01 : Superficie occupé par les agrumes dans la principale wilaya	7
Tab.02 : principaux constituants des essences et huiles essentielles de citrus	20
Tab.03 : Liste des caractéristiques des microorganismes testés	24
Tab.04 : La distribution d'application des produits testés sur le lapin.	35
Tab.05 : Rendement moyen de l'écorce du fruit de deux variété de bigaradier (<i>Citrus aurantium</i>).	41
Tab.06 : Taux de matière sèche des différentes variétés étudiées	42
Tab 07 : caractéristiques organoleptique des deux variétés (<i>Citrus aurantium</i>).	42
Tab 08 : les résultats des analyses physico-chimiques des HE des deux variétés de <i>Citrus aurantium</i> partie fruit (l'écorce) sont résumés dans le tableau.	43
Tab 09 : diamètre des zones d'inhibitions montrant l'activité antimicrobienne d'HE de <i>Citrus aurantium</i>	45
Tab 10 : Les résultats de la détermination de la glycémie pour les cinq lapins.	53

Liste des abréviations

°C :	Degré Celsius
µg :	microgramme
AFNOR :	Association française de normalisation
B.J :	Bigaradier Japon
B.O :	Bigaradier ornemental
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
<i>d</i>₂₀ :	Densité à 20 °c
HE :	Huile essentielle
IA :	Indice d'acide
IE :	Indice d'ester
IS :	Indice de saponification
Kg :	Kilo gramme
L :	Litre
mg :	milligramme
ml :	millilitre
PH :	Potentiel d'hydrogène
RHE :	Rendement d'huile essentielle

Introduction

Une plante est dite aromatique quand elle contient des substances odorantes volatiles appelées « Huile essentielle » que l'on peut obtenir suivant des techniques d'extractions connues. **(Lyslye b, 2005)**

Les plantes aromatiques sont utilisées dans la cuisine, l'industrie alimentaire, la cosmétique et la parfumerie ou leur saveur et leur odeur sont appliquées.

Ces plantes, sont appelées aromatiques médicinales si leur usage est dans le but de se soigner grâce aux propriétés de ses huiles essentielles comme principe actif médicamenteux, c'est-à-dire elles possèdent une action thérapeutique. **(Rachel f, 2015)**

L'objectif principal visé par ce travail est la mise en valeur d'une plante aromatique et médicinale très connue et largement utilisé ; c'est le bigaradier, et en particulier, le bigaradier de la région de la Mitidja, wilaya de Blida, en caractérisant les deux huiles de la plante, partie écorce pour les deux variétés le bigaradier Japon et le bigaradier ornemental. Afin de déterminer leur composition et d'évaluer leur pouvoir biologique pour bénéficier de cette plante médicinale dans la pharmacie, la cosmétique, l'industrie alimentaire et dans la lutte biologique.

Ce présent document est présenté en deux parties, une théorique et l'autre expérimentale.

Dans la partie théorique on fait une étude bibliographique qui comporte une systématique botanique sur les agrumes et particulièrement sur la plante à étudier, puis sur les huiles essentielles ainsi que les différentes méthodes et techniques d'extraction.

Dans la partie expérimentale on s'étalera sur le matériel et les méthodes utilisées dans notre expérimentation précisément l'extraction des huiles essentielles du bigaradier ainsi que les analyses physico-chimiques établies ; puis l'évaluation de leur activité biologique.

Enfin, présentation de nos résultats et discussions. On terminera notre travail avec une conclusion générale et quelques recommandations.

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I : les Agrumes

1. Historique de la culture des agrumes	2
2. Généralité sur les agrumes.....	2
2.1. Description	3
2.2. Description botanique.....	3
2.3. Classification des agrumes.....	5
3. L'état phytosanitaire des agrumes	5
4. La Situation mondiale des agrumes	5
5. Les Agrumes en Algérie.....	6
5.1. L'agrumiculture.....	6
5.2. Situation actuelle du verger agrumicole	6
6. Importance alimentaire des agrumes.....	8
7. Importance économique des agrumes.....	8
8. L'espèce étudié : le bigaradier.....	8
8.1. Description.....	8
8.2. Etymologie.....	9
8.3. Description botanique.....	9
8.4. Classification botanique.....	9
8.5. Composition biochimique	10

Chapitre II : Les huiles essentielles

1. Historique.....	11
2. Définition	11
3. Localisation des huiles essentielles	12
4. Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	13
4.1. L'expression à froid	13
4.2. La distillation.....	14
4.2.1. L'entraînement à la vapeur.....	14
4.2.1.1. Hydro-diffusion.....	15

4.2.2. Hydro-distillation	15
4.3. Extraction par solvant.....	16
4.4. Extraction assistées par micro-ondes.....	17
5. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	18
5.1. Propriétés physiques	18
5.2. Composition chimique des essences et des huiles essentielles.....	18
5.2.1. L'huile essentielle de bigaradier	19
6. Conservation des huiles essentielles	20
7. Les domaines d'utilisation	21
7.1. Usage des huiles essentielles en cosmétique.....	21
7.2. Usage des huiles essentielles en parfumerie	21
7.3. Usage des huiles essentielles dans industries agroalimentaires.....	21
8. Contrôle Des huiles essentielles	22

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1.1. But de l'essai.....	23
1.2. Matériel végétal	23
1.3. Matériel animal	23
1.4. Extraction des huiles essentielles.....	24
1.5. Les paramètres étudiés	25
1.5.1. Rendement en huiles essentielle.....	25
1.5.2. Détermination de taux d'humidité	26
1.5.3. Caractéristiques organoleptiques	26
1.6. Les analyses physico-chimiques.....	26
1.6.1. L'indice d'acide	26
1.6.2. L'indice de saponification.....	27
1.6.3. l'indice d'ester.....	28
1.6.4. la densité relative à 20°C (<i>d</i> ₂₀).....	28
1.6.5. L'indice de réfraction.....	29
1.6.6. PH	30

1.6.7.	pouvoir rotatoire.....	30
1.7.	Détermination de la composition chimique.....	31
1.7.1.	Par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	31
1.8.	Les activités biologiques	32
1.8.1.	L'activité antimicrobienne.....	33
1.8.2.	L'activité anti-oxydante.....	34
1.8.3.	L'activité anti-cicatrisante.....	35
1.8.4.	L'activité hypo-glycémiant.....	38

Chapitre II : Résultats et discussions

1.	Le rendement en huile essentielle.....	42
2.	Détermination de taux d'humidité.....	43
3.	Caractéristiques organoleptiques.....	43
4.	Les résultats des analyses physico-chimiques.....	44
5.	Détermination de la composition chimique.....	45
5.1.	Par la chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	45
6.	Les résultats des activités biologiques.....	46
6.1.	L'activité antimicrobienne.....	46
6.2.	L'activité anti-oxydante.....	49
6.3.	L'activité anti-cicatrisante.....	51
6.4.	L'activité hypo-glycémiant.....	54
	Conclusion générale.....	57

Références bibliographiques

Annexe

Chapitre I

Les agrumes

1. Historique de la culture des agrumes :

Les agrumes sont originaire des pays du Sud-est asiatique ou leur culture se confond avec l'histoire des civilisations ancienne de la Chine, qui les cultivèrent d'abord pour leurs parfums, puis pour leurs, C'est avec le rayonnement des civilisations chinoise et hindoues que leur culture commença à propager, au cours du premier millénaire avant notre ère, à l'ensemble des pays du Sud-est asiatique : sud Japon et archipel de Malaisie (LOUSSERT ,1989).

D'après PARALORAN, (1971) Les auteurs : s'accordent pour admettre que la culture des agrumes a pris naissance, aussi bien en Inde qu'en Chine, pendant le premier millénaire avant J-C.

Selon LOUSSERT, (1989) C'est à partir du Bassin Méditerranéen et grâce aux grandes découvertes que les agrumes furent diffusés dans le monde.

2. Généralité sur les agrumes :

Le mot agrumes est un nom collectif, masculin pluriel, désignant les seules espèces utilitaires du genre *citrus* et de deux genres voisins (*Fortunella* et *Poncirus*) .Il s'applique aussi bien aux arbres qu'à leurs fruits.(PARALORAN 1971).

Selon LESLYE (2005), les genres (*Citrus*) comprennent environ 16 espèces d'arbres et arbustes semper virens aux fleurs parfumées aux fruits segmentés, aromatiques et riche en vitamine C.

Les agrumes tirent leur nom du latin *acrumen* (signifiant aigre, acide), correspondant aux saveurs acides de la plupart de ces fruits : citron, oranges, pomelo, pamplemousse, clémentine, mandarine,

Tangerine, cumbaya, kumquat...appartiennent à la grande famille des Rutacées, famille comprenant de nombreuses espèces réparties en 150 genres. (**RACHEL FRELY, 2015**).

2.1. Description

D'après **PRALORAN (1971)** les agrumes sont des petits arbres, ou des arbustes, atteignant de 5 à 15 m de hauteur, assez souvent épineux. Et à feuillage dense, persistant à l'exception de quelques variétés hybrides dont les feuilles sont caduques ou semi-persistantes. D'un vert généralement très foncé.

Les agrumes, cultivés en orangerie, sont généralement composés par deux parties :

Une partie aérienne, essentiellement constituée par la variété (ou cultivar) de l'espèce cultivée (oranger, mandarinier, clémentinier, citronnier, pomelo, etc.). C'est la productive de l'arbre, celle qui portera les fruits.

Une partie souterraine, formée par le porte-greffe (ou sujet). C'est la partie qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol, et son alimentation en eau et en sels minéraux. (**LOUSSERT, 1989**).

2.2. Description botanique :

Des fleurs composées de 3 à 5 sépales verts, soudées en forme de coupe protectrice constituant le calice, de 4 à 8 pétales généralement blancs ou légèrement colorés en pourpres chez certaines espèces ; ils forment la corolle de 20 à 30 étamines soudés à leurs bases par groupes de 3 à 4 (**LOUSSERT, 1989**).

Les fruits charnus classés parmi les baies, le plus souvent comestibles (**BOCCAS et al, 1976**), ils sont revêtus d'une peau généralement lisse et divisés intérieurement en loges, dites quartiers qui contiennent les vésicules de jus et des pépins.

Elle est formée de l'épicarpe ou épiderme qui se colore à maturité d'orange jaune ;et du mésocarpe externe et interne .épiderme et le mésocarpe externe constituent le flavedo qui contient les glandes oléifères riches en huiles essentielles ,alors que le mésocarpe interne constitue l'albédo de couleur blanchâtre et de texture spongieuse .Cette peau est appelée aussi écorce ou < Zeste > qui constitue la partie non comestible du fruit. Parfois elle constitue la majeure partie de fruit (pamplemousse, cédrats...) et d'autre part reste peu développée (orange, mandarines,...). Tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique ,mais l'élément composant de cette structure varie avec l'espèce et la variété **LOUSSERT 1989**).

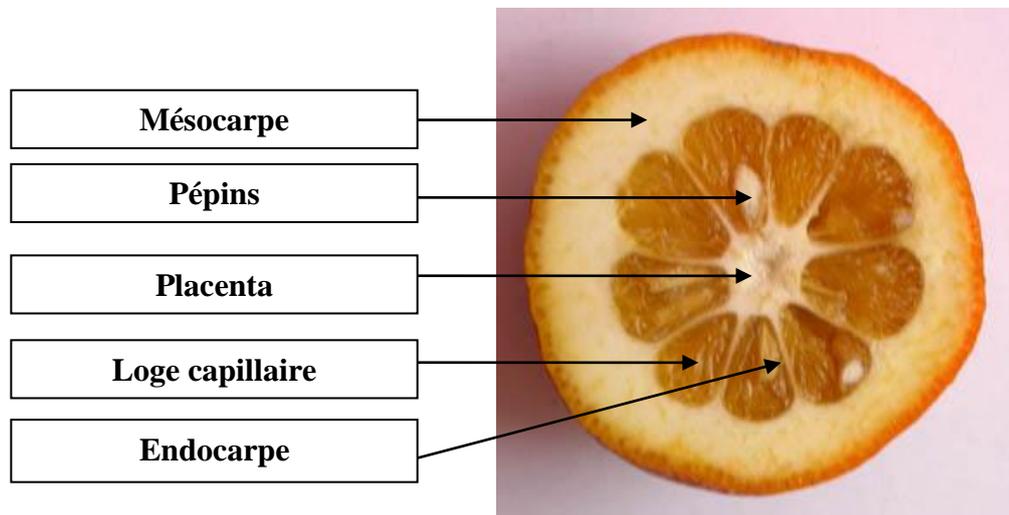


Fig.n°1 : coupe transversale d'orange amère (**Paraloran j c , 1971**).

2.3. Classification

La taxonomie des agrumes est établie en ordre chronologique comme suit :

- **Embranchement** : des Spermaphytes ;
- **Sous embranchement** : des Angiospermes ;
- **Classe** : des Dicotylédones ;
- **Sous classe** : des Disciflores ;
- **Ordre** : Géraniales ;
- **Famille** : Rutacées ;
- **Sous famille** : Aurantoideae
- **Genre** : Citrus / Poncirus / Fortunella (**Parlaron, 1971**).

3. L'état phytosanitaire des agrumes

Les agrumes souffrent de différentes maladies et ravageurs qui peuvent affecter considérablement la récolte en détruisant les fruits et/ou les arbres. Les principales maladies sont le Chancre des agrumes, la Chlorose variégée des agrumes et la Tristeza des agrumes. Les planteurs doivent apporter un soin particulier au cours de la croissance et de la récolte des fruits. Les arbres et les fruits sont également sensibles à différents types d'insectes. (**Anonyme, 2004**)

4. La Situation mondiale des agrumes

D'après **LOUSSERT, 1989** les agrumes sont les fruit les plus produits dans le Monde.

Les agrumes représentent le groupe de fruits le plus important du commerce international. La production annuelle totale d'agrumes s'est élevée à 123 millions de tonnes sur la période 2009- 2010. Les oranges constituent la majeure partie de la production d'agrumes avec environ 55% de celle-ci (**UNCTAD, 2013**).

Les agrumes occupent la première place des productions fruitières dans le monde avec 96 millions de tonnes produites en 2000 (**FAO, 2001**).

Parmi les pays producteurs du bassin méditerranéen, nous citerons les plus importants : Espagne et l'Italie qui représentent à eux deux plus de 50% de la production de la région (**MOHAMED AMINE FERHAT et al, 2010**).

5. Les agrumes en Algérie

5.1. L'agrumiculture :

Une relance de l'agrumiculture en Algérie est enregistrée ces dernières années à travers aussi bien le rajeunissement des vergers existants que la création de nouveaux vergers dans les zones de prédilection. Pour les nouveaux vergers agrumicoles, il est noté également la mise en place de système d'irrigation en goutte à goutte avec une conduite en intensif avec la réintroduction de variétés comme la clémentine et l'utilisation de nouveaux porte greffes adaptés aux différentes conditions pédoclimatiques et l'introduction de nouvelles variétés (**Anonyme, 2015**).

5.2. Situation actuelle du verger agrumicole :

Le verger agrumicole national occupe fin 2006 une surface de 62902 hectares ,soit 7,8% de la surface totale agricole. Le verger agrumicole est localisé dans trois zones :

- à l'est : Wilayas d'El-taraf et Skikda.
- au centre : Wilayas de Blida, de Chlef et de Tipaza.
- à l'ouest Wilayas de Mascara, de Mostaganem et de Relizane

Tab n°1 : Superficie occupé par les agrumes dans la principale wilaya

WILAYA	AGRUMES(ha)
Chlef	5808
Bejaia	1999
Blida	16304
Telemcen	2478
Skikda	2257
Mostaganem	4166
Mascara	4200
Boumerdes	2197
El-tarf	2165
Tipaza	3579
Ain-defla	2400
Relizane	4535
Alger	4948
Setif	4936

(Ministère de l'Agriculture, 2006) *In* CHEMAT et al, 2010.

6. Importance alimentaire des agrumes

Les fruits sont d'une grande importance dans l'alimentation humaine. Ils sont riches en sucre nécessaire pour la plupart ; à la production de l'énergie dont le corps humain à besoin.

Ils contiennent des sels minéraux et des vitamines indispensables aumaintien de la bonne santé. Les fruits contiennent beaucoup d'eaux (80 à 85%) qui est donc le constituant essentiel du corps humain (**Ministère de l'Agriculture, 1995**).

- Les agrumes ont apport énergétique modéré (environ de 25 à 45 calories pour 100 g).
- Il sont riches en fibres (notamment en pectine, une fibres solubles)qui facilitent le transit intestinal .
- C'est aussi une bonne source de minéraux (calcium, potassium, magnésium...), leur contenu exceptionnel en antioxydant dans puissants est intéressant en prévention des maladies cardiovasculaire et des pathologies dégénératives liées à l'âge.
- Ce sont les fruits vedettes de la saison hivernale en raison de leur teneur en vitamines C(environ 30 à 55 mg pour 100g).(**RACHEL FRELY ,2015**)

7. Importance économique des agrumes

Les fruits revêtent une grande importance économique. En effet, ils constituent une source des revenus tant pour les producteurs individuels que pour les pays producteurs. L'arboriculture fruitière soutien les gens qui la pratiquent par la vente de ses produits, pouvant facilement améliorer leurs conditions de vie tout en augmentant les niveaux de revenu qui sont les leurs (**Bonkena, 2001**).

8. L'espèce étudiée

8.1. Description

Le Bigaradier arbre a fruit sauvage cultivé pour servir de porte greffe et pour la culture de la fleur d'oranger,particulièrement fréquent dans la Mitidja.

Le bigaradier n'est pas très différent, par ses feuilles persistantes et ses fleurs au parfum suave, de l'oranger doux .son fruit n'est pas comestible car il est amère pourtant certaines ménagères savent en faire de délicieuses confitures (**LUCIENNE., 2010**).

Ses fleurs, très mellifères, sont les plus parfumées de la famille des citrus.(O .C.I. ALGERIE ,2015)

8.2. Etymologie

- ✓ **Nom scientifique** : *Citrus aurantium*.
- ✓ **Nom arabe** : la randj ; الرنج
- ✓ **Noms communs** : bigaradier ; orange amère LUCIENNE (2010).

8.3. Description botanique

D'après MOYSE (1981), le bigaradier est un petit arbre de 4 à 5 m, à tronc très ramifié en branches épineuses, à feuilles ovales, entières, un peu coriaces, luisantes ; le limbe, de 4 à 6 cm de long sur 3 à 4 de large, est articulé sur pétiole de 1 cm de long ,dilaté en une aile de 6 à 7 mm de large.les fleurs d'un blanc pur, très odorantes , sont groupées à l'aisselle des feuilles. Le fruit est plus petit que celui de l'oranger doux, à surface rugueuse, rouge à orangé à maturité.son suc, et très amer, le rend impropre à la consommation.

8.4. Classification botanique

Embranchement :	Spermaphytes.
Sous embranchement :	Angiospermes.
Classe :	Dicotylédones.
Sous classe :	Dicotylédone.
Ordre :	Rutales.
Famille :	Rutacées.
Genre :	Citrus.
Espèce :	<i>Citrus aurantium</i> . LOUSSERT (1989).

8.5. Composition biochimique

Les constituants intéressants sont les suivants :

a) Feuilles

0,02 à 0,40 % (plante fraîche) d'essence dite « de petit grain » composée de carbures terpénique (limonène) et surtout d'alcools (linéale, néroli) et d'un peu d'anthranilate de méthyle ; de bétaine : des hétérosides flavoniques, notamment l'hespéridoside ; des limonoïdes ou amaroides : limonène et substances voisines.

b) Fleurs

0,05 à 0,10% (plante fraîche) d'essence dite de néroli bigarade : limonène, linéale, néroli et leur esters, anthranilate de méthyle (surtout responsable de l'odeur).

c) Ecorce du fruit

Huile essentielles (limonènes...), tri terpènes, coumarines, flavonoïdes, pectine, carmantine, vitamine C. **4-5 %** de matières minérales, pectine, acides organique

(Citrique et malique), **5 à 8 %** d'hétérosides flavoniques : hespéridoside, naringoside ; un peu de limonène ; **1-2 %** d'essence d'orange amère ou de Curaçao (90% de limonène, un peu d'alcools terpéniques). **MOYSE(1981).**

1- Les huiles essentielles

1.1- Historique :

Les bienfaits des huiles essentielles sont connus depuis la nuit des temps. Les plus anciennes civilisations ont montré un intérêt important pour les plantes aromatiques dans un but thérapeutique.

Dans l’Egypte antique qui était la civilisation la plus avancée de son époque, on utilisait les huiles essentielles antibactériennes pour momifier les corps ainsi que les Egyptiennes les utilisaient sous forme de bain aromatique (**Sallé, 1991**).

Plus tard, les grecs utilisèrent les huiles essentielles dans la confection de parfums et s’en servirent dans l’art de guérir.

Les Romains et les Grecs en faisaient largement usage. De nombreux écrits attestent de l’utilisation fréquente de ces substances au titre d’agents thérapeutiques (**Sallé, 1991**).

Le terme essentiel découle de la théorie de Paracelse, personnage extraordinaire, thérapeute, selon laquelle l’homme est le miroir et l’image fidèle de l’univers. Paracelse prévoyait la possibilité d’extraire de la plante uniquement ce qui en constituait la partie active : les huiles essentielles qui représentent précisément la composante la plus subtile et purifiée de la plante (**Lucheroni, 1996**).

1.2- Définition :

Une huile essentielle est un liquide odoriférant d’aspect fluide à épais et de couleur variable selon les plantes dont elle est extraite.

Le terme « huile essentielle » est défini à la fois par l’Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) pour les usages pharmaceutiques et cosmétiques et par l’AFNOR/ISO pour les usages aromatiques et alimentaires.

Selon la Norme ISO 9235 Matières premières aromatiques d'origine naturelle – vocabulaire, une huile essentielle est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche. » (**Besombes, 2008**).

Une autre définition des huiles est donnée par l'ANSM (agence nationale sécurité du médicament et des produits de santé) : « 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, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. ».

Pour être vraiment précis, nous ferons appel à l'association française de Normalisation AFNOR qui désigne par huiles essentielles : « les produits généralement odorants obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau des végétaux ou des parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais des fruits d'hespéridés ». (**Fernandez et chemat, 2012**)

1.3- Localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus...) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (cannelier), des bois (bois de rose...), des racines (vétiver), des rhizomes (gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (muscade).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon la localisation. Ainsi dans le cas de l'oranger amer (*C.aurantium L. subsp.aurantium*, Rutacées), « le zeste », c'est-à-dire le péricarpe frais du fruit, fournit l'huile essentielles d'orange amère ou

« Essence de Curaçao », la fleur fournit « l'essence de Néroli » et l'hydro distillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à « l'essence de petit grain bigaradier ». La composition de ces trois huiles essentielles est différente (**Bruneton, 1999**).

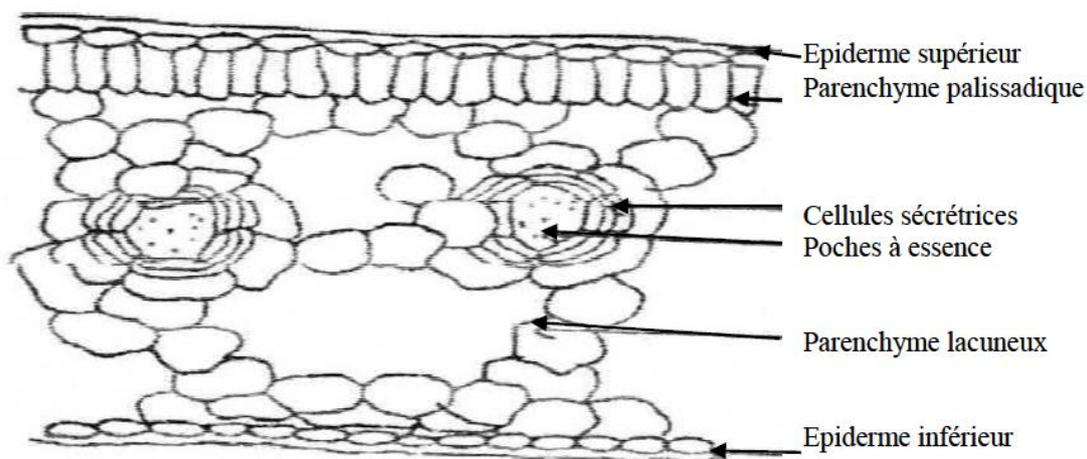


Fig. n°2 : Poches sécrétrices des huiles essentielles des *Citrus* dans feuilles. (Ferhat et al., 2010).

2- Les procédés d'extraction des huiles essentielles :

Parmi les différents procédés d'extraction nous citerons principalement :

- L'expression à froid
- La distillation
- L'Extraction par solvant
- Extraction assisté par micro-ondes

2.1- L'expression à froid :

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui basé sur la rupture des parois des sacs oléifères ; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation

Divers techniques manuelles ou mécaniques, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées.(Chemmat et al , 2010)

Il existe deux procédés manuels pour la récupération des huiles essentielles de citrus :

- 1) Le procédé à l'éponge
- 2) Le procédé à l'écuelle

De leur côté, les procédés mécaniques peuvent être classés en 3 catégories suivant qu'ils opèrent par déformation de l'écorce (sfumatrice), par abrasion (machine calabraise) ou par pression (FMC in line).

La FMC « in line » c'est la plus moderne des machines et la plus répandue dans les usines de jus d'agrumes, mais également la plus onéreuse en termes d'investissement et d'entretien.

Cette machine est équipée de quatre têtes d'extraction, chacune constituée d'un bol inférieur et d'un bol supérieur mobile qui comprime le fruit. Des couteaux supérieurs et inférieurs tranchent le fruit pendant le mouvement de descente du bol supérieur. Le jus est ainsi pressé dans un tuyau tamiseur qui se comprime pendant le mouvement ascendant synchronisé du tuyau d'écoulement. Parallèlement, l'essence, obtenue lorsque les cellules du zeste éclatent lors de la descente du bol supérieur, est écoulé latéralement avec un filet d'eau. Le rendement peut atteindre 2 tonnes de fruits pressés par heure. **(Fernandez x et Chemat ,2012).**

2.2- La distillation :

2.2.1- L'entraînement à la vapeur :

La distillation par l'entraînement à la vapeur est une technique utilisable pour certains agrumes et est réalisée dans certains pays uniquement. Pour la commercialisation des huiles essentielles d'agrumes distillées, le procédé d'extraction doit donc figurer sur le flacon, étant donné que la composition chimique est différente de celle exprimée à froid. **(Anonyme, 2015).**

Les parties de plantes utilisées (écorce, fruit, entier) sont déposées sur des grilles dans un récipient appelé alambic, sans que le matériel végétal ne soit en contact avec l'eau. La vapeur d'eau produite par une chaudière traverse les fruits. Ainsi les huiles parfumées contenues dans ces fruits se mélangent à la vapeur d'eau. Celle-ci s'élève alors et entraîne avec elle les parfums. Elle quitte la chaudière en passant dans un col de cygne puis dans un serpentín glacé. Au contact du froid, la Vapeur parfumée se condense et devient liquide. Ce liquide, qui est donc formé d'un mélange d'eau et d'huile parfumée, tombe dans un vase florentin. L'huile essentielle est ensuite isolée et récupérée par décantation.

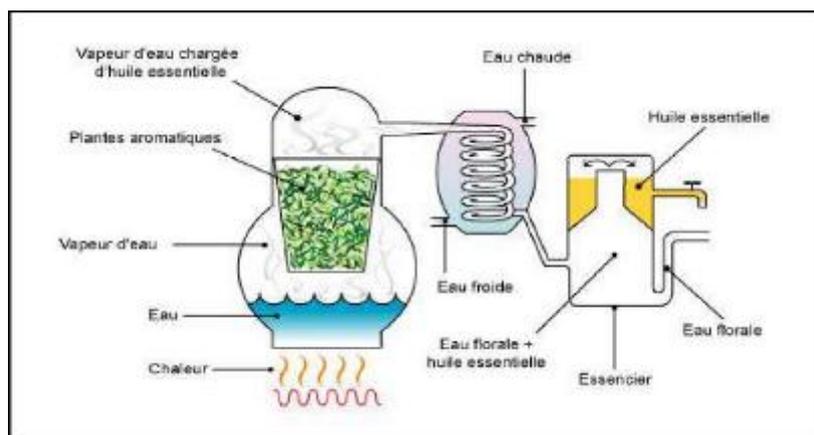


Fig n° 03 : schéma du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau (**Boutamani, 2013**)

2.2.2- Hydro-diffusion :

L'hydro-diffusion est une des variantes du procédé d'extraction à la vapeur d'eau, mais elle n'est que rarement utilisée par certains producteurs pour obtenir une qualité spécifique des huiles essentielles selon la demande des parfumeurs.

Le principe de l'extraction est basé sur l'action descendante d'un flux de vapeur sur le végétal, par l'utilisation de la pesanteur, pour extraire et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétale, ce qui permet un gain de temps d'extraction et une économie d'énergie.

2.2.3-Hydro-distillation :

L'hydro-distillation demeure la technique la plus utilisée pour la production d'huile essentielle et elle reste sans doute la plus rentable. Le procédé correspond à une distillation hétérogène, et consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique. (**Fernandez et Chemat, 2012**).

2.4- Extraction assistée par micro-ondes :

Ganzler et coll. en 1986 en Hongrie, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes la matière végétale, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. (**Belaiche, 1979**).

L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels :

- ✓ L'extraction par solvant assistée par chauffage micro-ondes.
- ✓ Hydro-distillation assistée par chauffage micro-ondes sous vide.
- ✓ Extraction sans solvant assistée par chauffage micro-ondes (extraction des plantes fraîches)

Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux, L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et incrémente le rendement d'extrait. Cependant irradiation d'un volume important pose des problèmes techniques. (**Chemat et al, 2010**).

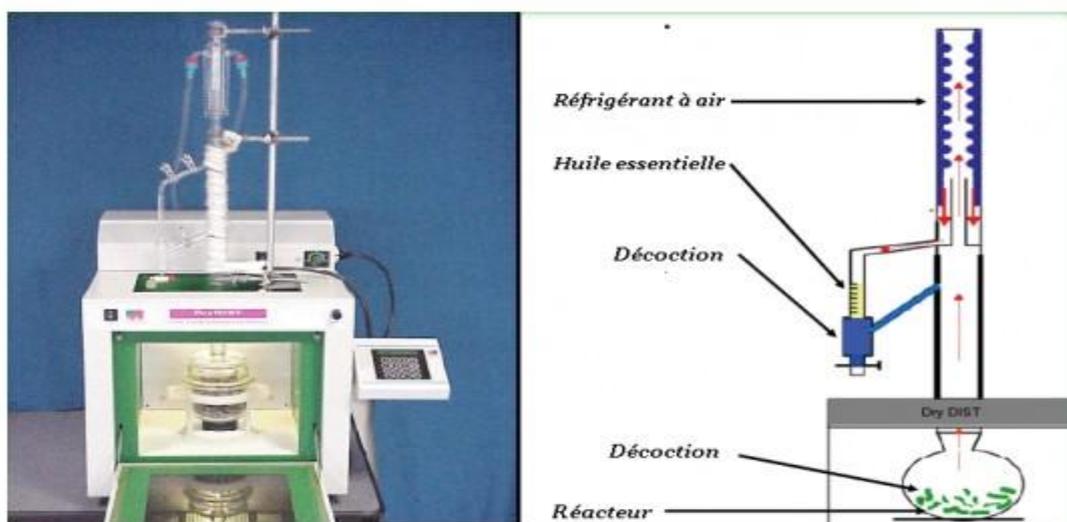


Fig n° 05 : montage d'une distillation assistée par micro-ondes (**Chemat et al. 2014**).

3- Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles :

3.1- Propriétés physiques :

Selon **Bruneton, 1999** les huiles essentielles possèdent en commun certain nombre de propriétés physique :

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.
- Leur point d'ébullition vraie de 160° à 240° C.
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99 (les huiles essentielles de saffron, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).

- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, très odorantes et volatiles.
- A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pâles, il existe, cependant, quelques exceptions.
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelquefois purs ; généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté.

4- Composition chimique des essences et des huiles essentielles :

La détermination de la composition chimique a intéressée de nombreux chercheurs et les méthodes d'analyse chimique de plus en plus sophistiquées ont permis d'identifier un très grand nombre de constituants des huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont des mélanges plus ou moins complexes dont les constituants jouent du point de vue parfum des rôles d'inégale importance : les uns contribuent puissamment à l'arôme de l'essence, certains participent simplement à l'harmonie du mélange. D'autres sont complètement inodore ou peu odorantes, ceux-ci ont un rôle tout à fait effacé. (Millet, 2013).

Les essences de citrus possèdent de nombreux dérivés dont la nature et la présence dans l'essence varient d'une espèce de citrus à une autre. Ces dérivés appartiennent à cinq grands groupes de substances :

- 1) Dérivés terpéniques : mono terpènes et sesquiterpènes.
- 2) Dérivés hydroxylés : alcools aliphatiques, alcools terpéniques
- 3) Constituants carbonylés : aldéhydes, cétones
- 4) Acides et esters : acides aliphatiques, acides terpéniques, esters
- 5) Dérivés de la benzopyrone : coumarines, furo-coumarines, flavones.

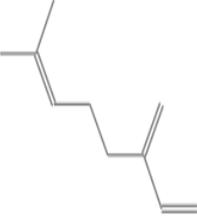
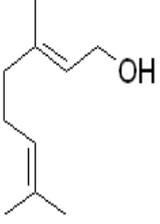
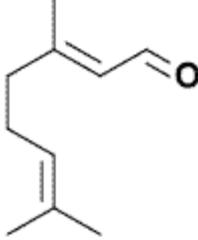
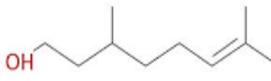
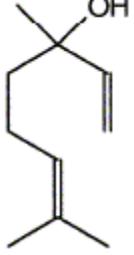
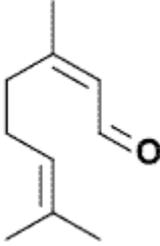
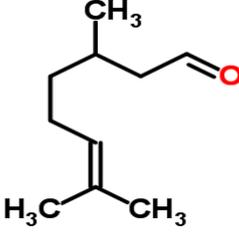
4.1- L'huile essentielle de bigaradier :

Dans l'essence d'orange amère, le d-limonène est le plus abondant. Comme toutes les essences, ce sont les composants oxygénés qui sont responsable de leur parfum caractéristique.

La composition chimique de l'huile essentielle du bigaradier montre la présence de :

- | | |
|--|-------|
| • Terpènes (d-Limonène) | 92% |
| • Alcools libres (Linalol, Terpinéol) | 0.37% |
| • Aldéhydes (nonylique, décylrique, do décylrique) | 0.78% |
| • Esters (acétate de linalyle) | 2.10% |
| • Phénols | 0.09% |
| • Sesquiterpènes (non identifiés) | 0.03% |
| • Acides libres (formique, acétique, cinnamique) | 0.05% |

Tab n°2 : principaux constituants des essences et huiles essentielles de citrus

Monoterpènes		
 <p>Myrcène</p>	 <p>Géraniol</p>	 <p>Géraniol</p>
		 <p>Citronellol</p>
 <p>Linalol</p>	 <p>Néral</p>	 <p>Citronellal</p>

5- Conservation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances très délicates, et s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile. Les risques de dégradation sont multiples : photo isomérisation, photo cyclisation, coupure oxydation de propénylphénols, peroxydation des carbures et décomposition en cétones et alcools (limonène)

Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur.

Les huiles essentielles se conservent entre 2 et 5 ans.

Les essences entre 1 et 2 ans à l'abri de la lumière et de la chaleur. Elles s'oxydent plus rapidement.

Les hydrolats sont plus fragiles que les huiles essentielles. Ils se conservent entre 6 mois et 1 an après ouverture du flacon. (Festy, 2008)

6- Les domaines d'utilisation :

6.1- Usage des huiles essentielles en cosmétique :

Les huiles essentielles bénéficient de la demande croissante de naturalité dans les produits cosmétiques.

Les marques de cosmétique naturel (bio) les utilisent largement, et dans un même temps, les produits de cosmétique conventionnelle les intègrent de plus en plus.

L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier, pour les formulations de grande diffusion, les produits synthétiques.

A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence des HE dans les préparations pour bains (calmants ou relaxants). (Jean-Pierre, 2002)

6.2- Usage des huiles essentielles en parfumerie :

Les huiles essentielles, ou essences, comme les nomment souvent les parfumeurs, font partie intégrante des ingrédients de la parfumerie. Leur emploi historique le plus notable a été dans l'eau de Cologne, créée par Jean-Marie Farina vers 1714 .sa composition s'appuyait sur plus de 70 % d'essences d'agrumes et d'aromates complétée par quelques extraits de fleurs (Chemat, 2012).

6.3- Usage des huiles essentielles dans industries agroalimentaires :

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps. C'est pour cela, que l'on pense de plus en plus à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires. (Bekhchi, 2014)

Les huiles essentielles sont très utilisées dans les arômes alimentaires, que ce soit dans le secteur des arômes sucrés ou salés .dans le domaine des arômes salés, une place de choix revient évidemment aux huiles essentielles d'épices et d'aromates. Celles-ci sont également utilisées dans une moins de mesure dans le domaine des arômes sucrés, dans lequel les huiles essentielles d'agrumes sont largement représentées. (Chemat, 2012).

7- Contrôle des huiles essentielles :

Les huiles essentielles, objet de transactions commerciales souvent importantes en valeur monétaire, doivent répondre à des normes déterminant des critères chimiques, physiques et des variations tolérées.

La pharmacopée française énonce, pour les huiles essentielles qui y figurent, un certain nombre de contrôle à effectuer les examens pratiqués portent sur :

- Les caractères organoleptiques : aspect, odeur, couleur et gout
- Les caractères physiques : densité, indice de réfraction, déviation polarimétrique, solubilité dans l'éthanol, point de congélation.
- Certaines caractéristiques chimiques : indice d'acide, indice d'ester, indice de carbonyle

La connaissance de la composition d'un seul lot d'huile essentielle ne saurait définir celle-ci. En effet, la qualité des huiles essentielles varie selon le moment de la cueillette, le type de terrain, le procédé d'extraction et la conservation. (**Pharmacopée européenne, 2004**).

1- Matériel et méthode

1.1- But de l'essai

L'objectif de ce travail est d'étudier les caractérisation physicochimique d'huile essentielle de fruits de porte-greffes d'agrumes par extraction des huiles essentielles à partir des écorces fraîches de deux variétés de bigaradier (*Citrus aurantium*) d'une part et d'autre part étude de quelques activités biologiques.

Notre stage a été fait chez SAIDAL de Médéa pendant 20 jours et SAIDAL de Dar el Beida pendant 3 mois.

1.2- Matériel végétal

Les deux variétés de bigaradier étudiées sont : le bigaradier japonais et le bigaradier ornemental.

Le bigaradier japonais provient de la station expérimentale de l'Institut Technique d'Arboriculture Fruitier et de la Vigne (I.T.A.F.V) situé dans la région de Boufarik.

Le bigaradier ornemental provient des arbres du centre de la ville de Blida.

La récolte a été réalisée en pleine maturité des fruits et d'une façon au hasard le 23 février 2017.

Les fruits fraîchement récoltés sont nettoyés lavés et séchés avec une serviette propre l'écorce est récupérée à l'aide d'un éplucheur, pour éviter la peau blanche.

1.3- Matériel animal

Les animaux de l'expérimentation sont des lapins (5 lapins) de race Néozélandaise, sexes (femelles) de poids moyen d'environ $(3,420 \pm 0,11)$ Kg, provenant de l'animalerie du complexe antibiotique SAIDAL de MEDEA.

1.4- Matériel microbiologique

Tab n°3 : Liste des caractéristiques des microorganismes testés

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Famille	Principales infections causé
<i>Escherichia coli</i>	8739	-	Enterobacteriaceae	Responsable d'infections urinaires (cystite, pyélonéphrites), septicémies, de méningites, de pneumopathies d'infection des plaies chirurgicales,
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	Cause des crampes abdominales, troubles digestifs.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Staphylococcaceae	Responsable chez l'homme d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses, d'intoxications alimentaires
<i>Streptococcus</i>	ATB81			
<i>Candida albicans</i>			Cryptococcaceae	

1.5- Extraction des huiles essentielles

1.5.1- Principe

La procédure d'extraction se résume à porter à ébullition une quantité de matière végétale sèche pendant un temps déterminé avec un volume d'eau distillée précis dans un ballon.

1.5.2- Mode opératoire

Dans un ballon de (1L) mettre (100g) d'écorce frais (bigaradier) et(300 ml) d'eau distillée.

Cette préparation est portée à ébullition pendant 03 heures.

Les vapeurs chargées d'huiles traversent un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter.

À la fin on obtient deux phases (l'eau et huile) qui se sépare par une différence de densité. (Pharmacopée Européenne,2002).

L'huile essentielle obtenue est stockée dans des eppendorfs transparent couvert en papier aluminium est conservée au réfrigérateur à 4°C.

L'hydro distillation des écorces de *Citrus aurantium* est réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clivenger. Le montage utilisé est présenté dans la (figure 06)



Fig n° 06 : Montage d'une hydro-distillation

1.6- Les Paramètres étudiés

1.6.1- Rendement en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée et la masse de la matière végétale. Le rendement en huile essentielle, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante :

$$\mathbf{R_{HE} = (P_{HE}/P_{MS}) \times 100\%}$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle en %.

P_{HE} : la masse de l'huile essentielle récupérée en gramme.

P_{MS} : la masse de la matière végétale fraîche en gramme.

1.6.2- Détermination de taux d'humidité

Pour déterminer la teneur en eau, on fait une dessiccation de la matière fraîche

La valeur de la matière sèche est déterminée par un passage d'une quantité de matière végétale (écorce) à l'étuve à **105°C** pendant **24h**. Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\mathbf{MS (\%) = (PS / PF) \times 100}$$

MS (%) : pourcentage de matière sèche.

PS : poids sec (g).

PF : poids frais (g).

1.6.3-Propriétés organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'huile essentielle ont été notées.

1.7- Analyses physico-chimiques

1.7.1- Indice d'acide

L'indice d'acide d'une matière grasse est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1g de matière grasse. Il mesure la quantité d'acide gras libre présent dans un corps gras. (**Pharmacopée européenne, 2014**).

Le principe s'agit d'une dissolution de la matière grasse dans l'éthanol neutralisé puis titrage des acides gras libres présents au moyen d'une solution titrée de KOH en présence de la phénolphthaléine comme indicateur .

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$I_a = \frac{5.61 \cdot n}{m}$$

5.61 : est la masse molaire, exprimée en grammes par mole de l'hydroxyde de potassium.

n : est le volume, en ml, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisé.

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

1.7.2- L'indice de saponification

L'indice de saponification I_s est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g d'HE. (**Pharmacopée européenne 2014**)

1.7.2.1-Mode opératoire

Dans un fiole conique de 250 ml et muni d'un réfrigérant introduire la prise d'essai. Ajoutez 25,0 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M et quelques billes de verre. Adapter le réfrigérant et chauffer a reflux pendant 30 min.

Ajoutez a la solution chaude, 0.5 ml à 1 ml de la solution phénolphaléine et titrez immédiatement avec l'acide chlorhydrique (HCl) 0.5M jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur, le volume de HCl ajouté est noté (n1)

Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions (n2 ml d'acide chlorhydrique 0,5M) (**pharmacopée européenne, 2001**)

$$I_s = 28,05 (n_2 - n_1) / m$$

I_s : Indice de saponification

n₁ : Volume en ml d'acide chlorhydrique 0.5M utilisé pour l'essai à blanc.

n₂ : Volume en ml d'acide chlorhydrique 0.5M utilisé pour la détermination de l'indice.

m: la masse en g de la prise d'essai.

1.7.3- l'indice d'ester

L'indice d'ester est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1 g d'HE. Il est calculé à partir de l'indice de saponification et de l'indice d'acide.

$$I_E = I_s - I_A$$

1.7.4- Détermination de la densité relative à 20°C (d_{20})

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

1.7.4.1- Mode opératoire et calcul

Un volume de 1ml de chaque huile essentielle a été prélevé à l'aide d'une micropipette et pesé avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de température (NF ISO 279. 1999).

$$d_{20} = \left[\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right] + (0.00073 \times (T^{\circ} Ech - 20))$$

m_0 : La masse en gramme de la fiole vide.

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

m_2 : La masse en gramme de la fiole remplie d'huile essentielle.

$T^{\circ} Ech$: température en ° C.

1.7.5- L'indice de réfraction

1.7.5.1- Définition

On entend par indice de réfraction d'une substance le rapport de la vitesse d'une lumière de longueur d'onde définie dans le vide et sa vitesse dans la substance. (**NF ISO 6320,2000**).

L'appareil qui sert à mesurer l'indice de réfraction des liquides, c'est le réfractomètre **ABBE** qui a un usage assez recommandé.

Cet indice est déterminé comme suit :

- Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction 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'huile essentielle sur la partie centrale du prisme principal.
- Enfin, nous fermons délicatement le prisme secondaire.
- La lecture de la mesure s'effectue à une température stable.
- L'indice de réfraction n_D , à la température de référence t , est donné par l'équation suivante :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004(t' - t)$$

- n_D^t : l'indice de réfraction d'huiles essentielles.
- $n_D^{t'}$: est la valeur de la lecture, obtenue à la température t' laquelle a été effectuée la détermination.
- t : température de laboratoire.
- **0,0004** : l'indice de réfraction quand la température de 1°C.
- D : la raie de sodium.

1.7.6- PH

Le pH des huiles essentielles des agrumes se situe entre 4 et 6. C'est effectivement légèrement acide (**Festy, 2008**).

Il est constitué de deux éléments : un boîtier électronique qui affiche la valeur du pH est une électrode qui mesure cette valeur

Leur fonctionnement de cet appareil est basé sur le rapport entre la concentration en ions H_3O^+ et la différence de potentiel électrochimique qui s'établit dans l'électrode de verre.

On utilise deux solutions tampons pour étalonner le PH mètre une à $\text{pH} = 7$ et une à $\text{pH} = 4$ pour garder approximativement le même PH malgré l'addition d'acide, de base ou d'une dilution. (Fernandez et al, 2012).

1.7.7- Mesure du Pouvoir rotatoire :

Elle est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type JASCO 1010 (réglé de façon à donner 0° et 180° avec l'eau), Source lumineuse (lampe à vapeur de sodium) permettant d'obtenir une lumière de longueur d'onde $589.3 \pm 0.3 \text{ nm}$

tube d'observation de $100 \pm 0.5 \text{ mm}$ de longueur.

Mode opératoire :

- Dilution de l'essence d'écorce d'agrumes $0.25 \text{ g}/100 \text{ ml}$ d'éthanol.
- Remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.
- Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil.

1.8- Détermination de la composition chimique

Principe

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation des composés gazeux susceptible d'être vaporisé par chauffage sans décomposition, (chemat et al, 2012). ELLE est assez récente et permet de séparer des mélanges de gaz vaporisable à haute température. Le mélange à analyser est injecté dans une colonne métallique de quelques millimètres de diamètre enroulée sur elle-même et contenant la phase stationnaire. Les composés sont véhiculés sous pression par un gaz inerte il s'agit du gaz vecteur (l'azote), le temps que met un constituant gazeux pour parcourir la colonne est le temps de rétention, les constituants sont aussi séparés par la différence entre le temps de rétention respectif.



Fig. n°07 : L'appareille de chromatographie en phase gazeux

1.9- les activités biologiques

1.9.1- Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

La recherche de l'activité antimicrobienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'HE d'orange amer . Dans ce test, On a utilisé la méthode de l'aromatogramme (Technique en milieu solide)

a- Technique en milieu solide : Méthode de l'Aromatogramme

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle. La méthode de diffusion des disques appliquée est celle décrite par **Mayachiew et Devahastin (2008); Hussain et al. (2010)**.

b- Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boîtes, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (Na Cl) (Mohammedi, 2006).

L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

c-Ensemencement

- ❖ Les milieux des cultures utilisées sont : Muller-Hinton (MH) et Soja agar (SA) pour les bactéries, et Saburraux (SAB) pour les levures et champignons.
- ❖ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ❖ L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ❖ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ❖ Répéter l'opération quatre fois, en tournant la boîte de Pétri de 45° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ❖ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

d- Dépôt des disques

- A l'aide d'une pince stérile, nous avons prélevé à chaque fois un disque stérile. Ce dernier est imbibé avec l'HE en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'HE. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Nous avons déposé les disques sur la surface du milieu de culture.
- Les boîtes sont laissées diffuser pendant 1h30.

- Les boîtes sont ensuite mises à incuber à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les champignons.

Expression des résultats

Après 24h pour les bactéries et 48h pour les levures, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 9 mm). Dans la littérature relative aux huiles essentielles,

les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm (**Baser et Buchbauer, 2010**).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al, (2009)**. Cet auteur a classé les diamètres des zones d'inhibition (\emptyset) de la croissance microbienne en 5 classes :

- ✓ Très fortement inhibitrices : $\emptyset \geq 30$ mm. (+++)
- ✓ Fortement inhibitrices : $21 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 29$ mm. (++)
- ✓ Modérément inhibitrices : $16 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 20$ mm. (+)
- ✓ Légèrement inhibitrice : $11 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 16$ mm. (\pm)
- ✓ Non inhibitrices : $\emptyset < 10$ mm. (-)

1.9.2- L'activité anti-oxydante :

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire d'huiles essentielles extraite a été effectuée selon la méthode de piégeage des radicaux libres de DPPH.

1.9.2.1- Piégeage du radical libre DPPH

a- Principe

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et

change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (**Gachkar et al., 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH, pour une concentration en extrait donné et un temps donné. Le test de réduction du DPPH permet aussi de calculer la CE50 (**Dongmo et al. 2010**). La valeur CE50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH•.

b- Mode opératoire

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

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

Un volume de 1ml de différentes concentrations d'huile essentielle (de 10, 20, 40, 60, 80,100 µg/ml dans l'éthanol) ont été mélangés avec 3 ml de la solution éthanoïque de DPPH dans des tubes à essai secs. Après 30 min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm. Le contrôle négatif est composé de 1ml du l'éthanol et de 3 ml de la solution de DPPH (Solution de contrôle).

Une expérience de contrôle a été effectuée en utilisant l'acide ascorbique dont les concentrations varient entre 6 et 100 µg/ml.

1.9.3- L'activité anti-cicatrisante

a- But

Le but de notre travail est de tester l'effet cicatrisant de l'HE d'orange amer en les comparant avec un médicament « Madécassol® ».

b- Principe

Le principe consiste en l'application des traitements sur des plaies préalablement provoquées, les applications se feront de façon quotidienne jusqu'à la disparition complète de la plaie. Dans notre cas nous avons utilisé des pommades (HE d'orange amer + vaseline) et Madécassol®.

c- Mode opératoire

Nous avons utilisé une lapine, femelles, dont l'âge moyen est de 1 ans.

Tab n°4 : la distribution de lapin et les produits testés.

Les cotés d'animaux	La gauche de lapine	Au milieu de lapine	La droite de lapine
Le produit testé	Pommade à base de l'HE d'orange amer	Madécassol®	L'eau physiologique (témoin)
Préparation du produit	Mélange 1g de l'HE d'orange amer avec 40g de vaseline	Tube 10 g (utilisé 1g)	Flacons de 5 ml (utilisé 1 ml)

d- Préparation de l'animale

Pour provoquer des plaies superficielles sur la lapine, nous avons fait des scarifications

L'opération est réalisée selon les étapes suivantes :

- ❖ Epilation de lapine par une tondeuse électrique pour dégager une surface d'environ 5×5cm.
- ❖ Désinfecté les régions tondues avec l'alcool chirurgical.
- ❖ Après la préparation de lapine, on a effectué pour chaque coté de lapine (droite, au milieu et à gauche) à l'aide d'une lame de scalpel, une série de 3 plaies parallèles (des scarifications peu profondes) (Figure n°09).

e- Application des traitements

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

L'observation macroscopique est réalisée avant chaque nouvelle application. Elle prend en considération les paramètres suivants :

- ✓ Evolution de la cicatrisation de la plaie.
- ✓ Apparition ou non d'œdème.

1.9.4- L'activité hypo-glycémiant

a- Evaluation de l'activité hypoglycémiant des extraits

L'étude d'activité hypoglycémiant des extraits a été réalisée sur 4 lapins albinos .le protocole expérimentale est inspiré à partir des travaux de (Cabo *et al* ,1998)

Echantillon de la plante testé

Nous avons testé l'activité hypoglycémiant en utilisant les extraits aqueuse a partir d'une poudre d'écorce d'orange amer .

b- Préparation de la surcharge de glucose

L'épreuve hyperglycémiant est réalisée par l'utilisation d'une solution aqueuse de D-glucose monohydrate pure (C₆ H₁₂ O₆ H₂O) à 50% .la dose est à raison de 2ml de solution glucosé /Kg de poids de l'animal (**Cabo et al ,1998**).

c- Préparation des lots de lapins

Les lapins sont répartis de manière en quatre lots à raison de un lapin par lot tous les lapins ont été soumis à jeun 18h avant l'expérimentation

- **Lot 1 :** lapin en état d'hyperglycémie et non traités (témoin-)
- **Lot 2 :** lapin en état d'hyper-glycémie traités par un médicament hypoglycémiant (DCI : glibenclamide de la spécialité DIABENIL) à une dose de 5mg (témoin +)
- **Lot 3 :** lapin en état d'hyper glycémie et traités par l'extrait aqueux de la plante 10 ml d'infusé.
- **Lot 4 :** lapin en état d'hyper glycémie et traités par l'extrait aqueux de la plante 10 ml d'infusé.

d- Administration des traitements

Les extraits de plante, ont été administrés aux lapins par 15min avant l'épreuve hyperglycémiant. le produit de référence (Glibenclamide) à été administré aux lapins 60mn avant l'épreuve hyperglycémiant pour faire coïncider la concentration maximale c Max d'absorption du médicament avec la concentration maximale de glucide provoqué par la surcharge glycémique (**Cabo et al.1998**)

Le gavage des lapins, est réalisé à l'aide d'une seringue en plastique équipée d'une sonde gastrique.



Fig n°14 : gavage de l'infusé à l'aide d'une seringue en plastique équipée d'une (sonde gastrique) (Originale, 2017).

Détermination de la glycémie



Fig n° 15 : Détermination de glycémie à l'aide d'un glucomètre (appareil de mesure de glycémie).(Originale, 2017).

La détermination de la glycémie est faite à l'aide d'un glucomètre (appareil de mesure de glycémie). Une goutte de sang (2ul) est prélevée par ponction au niveau de la veine marginale de l'oreille avant le gavage pour déterminer la glycémie à jeun à T0 de chaque lapin puis 30,60, 90, 120 ,180 minutes après le gavage de la surcharge de glucose.

La goutte de sang ponctionnée est déposée sur la zone active de bandelette, la lecture de la glycémie se fait automatiquement 10 secondes après le résultat est exprimé en g /l.

1- Le rendement moyenne en huile essentielle :

Les résultats du rendement en huiles essentielles des deux variétés d'agrumes étudiées est résumé dans le tableau suivant :

Tab n°5 : Rendement moyen de l'écorce du fruit de deux variété de bigaradier (*Citrus aurantium*).

La variété	Bigaradier japon	Bigaradier ornemental	AFNOR – ISO 3140
Le rendement %	0.4%	0.64%	0.5 – 2

La différence en rendement peut être expliquée par la particularité de chaque variété. Les résultats représentés dans le tableau 4 montrent que le rendement moyen en HE de *Citrus aurantium* est que le bigaradier J obtenu (0.40%) est plus faible que chez le Bigaradier O (0.64%).

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'HEs. Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités par **Anton et Silano, (2001)** qui ont obtenus des rendements compris entre 0.2 et 0.6% pour *C. limonum* et se rapprochent des résultats de **Madjene et Madani, (2010)** qui notent un rendement de 0.4% par hydro distillation.

En effet **Jeannot et al. (2005)** et **Fuselli et al. (2008)** ont observé des rendements allant de 0.6 à 0.8 % pour l'HE de *C. sinensis* et 0.7 à 0.9% pour l'HE de *C. limonum*.

Regaetal, (2003) ont rapporté que les rendements en HEs chez les Citrus diffèrent selon l'espèce et ont signalé des rendements de 1 à 3 %.

2- La teneur en eau:

Tab.n°6 : Taux de matières sèches des différentes variétés étudiées :

La variété Etudié	Poids frais	Pois sec après deux semaines (g) à l'air libre
B .O	100	31 .57
B.J	100	30.21

On remarque que le taux en matières sèches diffère d'une variété à une autre à cause de la proportion d'eau contenue dans des écorces des deux variétés.

3- Caractéristiques organoleptiques :

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

Les résultats des caractéristiques organoleptiques obtenus de nos HEs sont conformes aux normes d'AFNOR (2000). (**Tab n°06**).

Tab n°7 : caractéristiques organoleptique des deux variétés (*Citrus aurantium*).

Variété	Odeur	Couleur	Aspect	Etat
B. O	Fraiche et épicée	Jaune très pale à transparent	Liquide et limpide	Très volatile mobile
B.J	Fraiche et épicée	Jaune très pale à transparent	Liquide et limpide	Très volatile Mobile
AFNOR 3140	Fraiche et épicée	Jaune très pale à transparent	Liquide limpide fluide et mobile	Très volatile

4- Les résultats des analyses physico-chimiques :

Le tableau n°7 regroupe les résultats des mesures réalisés.

Tab n° 8 : Les résultats des analyses physico-chimiques des HE des deux variétés de *Citrus aurantium* partie fruit (l'écorce) sont résumés dans le tableau.

	B. O	B.J	AFNOR –ISO 3140
la densité	0.867	0.860	0.905 – 0.921
pouvoir rotatoire	100.48	101	
L'indice de réfraction	1.476	1.472	1.460 – 1.4760
PH	5.83	6.18	Acide faible
L'indice d'acide	2.535	2.646	0.5 – 3.0
L'indice de saponification	7.91	5.35	
L'indice d'ester	5.37	2.706	

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

Une huile fraîche ne contient que très peu d'acide libre. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters (**Kaloustian et al, 2013**).

L'indice d'acide permet de donner une appréciation sur le taux d'acides libres (**Salle, 1991**). Nous avons obtenus dans notre étude un indice d'acide supérieur à deux pour les deux huiles essentielles étudiées

Dans l'intervalle 1.472 à 1.476 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 *C. aurantiaum*(B.O)par rapport à celle de *C.aurantium* (B.J) dans notre étude. Plusieurs investigations **Moufida et Merzouk (2003)** ; **Belleti 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 (**Kaloustianetal. 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 0.876 (**AFNOR NF T.75202**), ce qui le cas pour les huile essentielles de *C. aurantium* B.O et le B.J (0.867, 0.860 respectivement).

D'autre part et pour mieux caractériser la qualité des huiles essentielles nous avons mesuré l'indice d'ester qui est égale à 5.37 pour la variété de B.O et 2.706 pour celle de B.J. Les huiles essentielles de très bonnes qualités renferment une très grande quantité d'esters (**Othmer, 2012**).

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

5- Détermination de la composition chimique par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La chromatographie phase gazeuse (C.P.G) nous apermis de déduire la présence de quelque substance chimique connues et inconnues dans les huile essentielles de bigaradier, le pourcentage du limonène vraie entre les deux essences.

On compare les deux chromatogrammes, nous remarquons le pourcentage de limonène d'huile de B.O 72.55% est plus élevé que celui de B.J 54.29%.

Selon (**LUC SALE, 2003**) plusieurs composés d'huile essentielle de *Citrus aurantium*ont été identifiés, et le composé majeur c'est limonène.

6- Les résultats des activités biologiques :

6.1-L'activité antimicrobienne :

Les observations effectuées sur l'effet d'HE de *Citrus aurantium* sur la croissance des souches bactériennes testés sont représentées dans le tableau suivant :

Tab n°9 : diamètre des zones d'inhibitions montrant l'activité antimicrobienne d'HE de *Citrus aurantium*.

Les souches testées	Diamètre d'inhibition	Résultats
Escherichia coli	11mm	±
Pseudomonas aeruginosa	12mm	±
Staphylococcus aureus	29mm	++
Streptococcus	11mm	±
Candida albicans	19mm	+

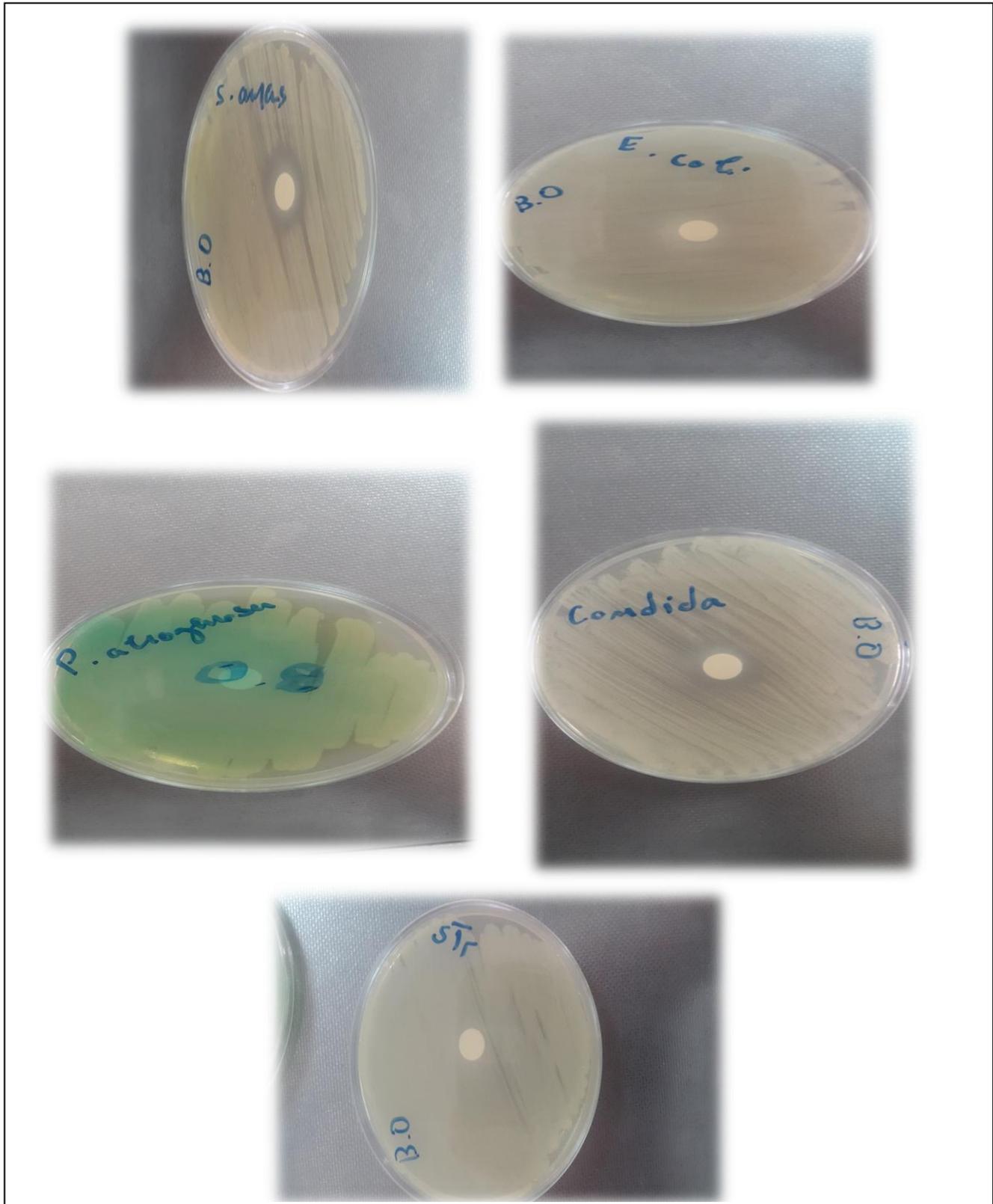


Fig. n°16 : Photos montrant l'effet d'HE de *C.aurantium* sur *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* et *Staphylococcus aureus* par la Méthode d'aromatogramme (Originale, 2017).

Il est noté que l'HE de *C. aurantium* est légèrement inhibitrice à l'encontre du *Escherichia coli*, *Pseudomonas* et *Streptococcus* par contre l'HE elle est fortement inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* (29mm) et modérément active contre *Candida albicans* (19mm). (Figure n°16).

Un fait saillant pourrait être dégagé de ces résultats et qui concernent *S. aureus*. En effet, cette bactérie a manifesté une certaine sensibilité variable à cette HE.

Billerbeck, 2007)

Concernant l'activité inhibitrice des HEs sur les souches fongique utilisées (levures), il apparaît clairement que l'HE de *C. aurantium* présente un pouvoir anti-fongique modérément inhibiteur contre *Candida albicans* avec de diamètre d'inhibition (19mm). Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules bactériennes et fongiques (**Cristiani et al. 2007**).

En comparant les données obtenues des différentes études, la plupart des publications font état d'une généralisation de l'activité antibactérienne d'une HE, ou d'un extrait de plantes contre les bactéries à Gram (+) et à Gram (-).

Zaika, (1988) et **Hussein, (1990)**, ont indiqué que les bactéries Gram+ sont plus résistantes aux HEs que les bactéries Gram-, ce qui est le contraire des résultats trouvés par **Jay (1996)**, **Marino et al, (1999)**, qui ont montré que les bactéries Gram+ sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram-.

Chaque HE est unique dans sa composition et chaque bactérie diffère considérablement en structure et en fonctionnalité. (**Elgayyaret al, 2001**).

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. aurantium* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalool (**Alma et al. 2004**). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (**Deba et al. 2008**).

6.2-L'activité anti-oxydante :

Après avoir calculé les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huiles essentielles et des absorbants des échantillons préparés, on a présenté les résultats sous forme de deux courbes une présente le pouvoir inhibiteur d'huile essentielles de *Citrus aurantium* (fig.17) et autre présente l'acide ascorbique (fig.18)

Ces deux dernières courbes nous permettent de déterminer la concentration inhibitrice des 50% des radicaux pour chaque huile.

La figure suivante l'activité antioxydant des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et l'acide ascorbique. Elle représente le pourcentage d'inhibition des radicaux libres en fonction de concentration des deux l'HE et l'acide ascorbique.

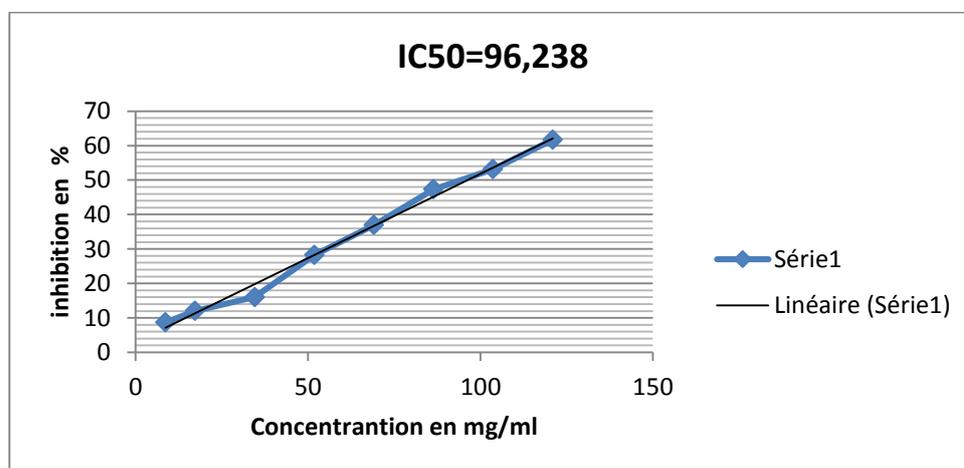


Fig. n°17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'huile essentielle de *citrus aurantium*

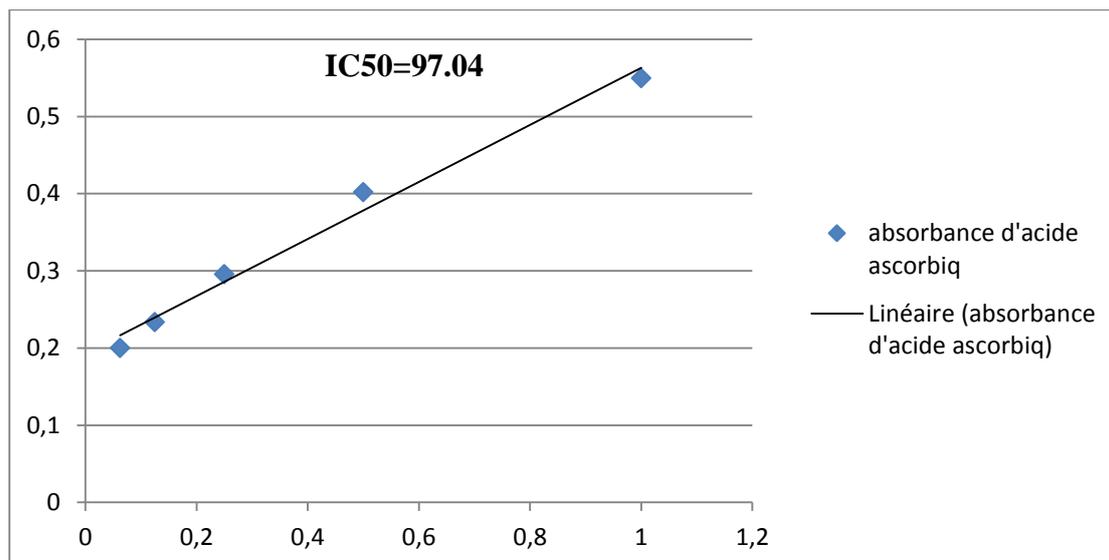


Fig. n°18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique.

D'après les deux figures précédentes, on peut dire que l'huile essentielle extraite de *Citrus aurantium* ont un pouvoir antioxydant très important, ont inhibée 50% des radicaux de DPPH en une faible concentration.

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure n°17) révèlent que l'huiles essentielle testée ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence, sont des anti-radicalaires.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le standard ou pour HE *C.Aurantium*.
 . Nous remarquons aussi que le pourcentage d'inhibition du radical libre, de l'huile essentielle de *C. aurantium*, est preceque la même à celui de l'acide ascorbique.

6.3-Détermination des IC50 :

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

L'huile essentielle de *C. aurantium* pouvaient transformer le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (coloré en violet) au diphenylpicrylhydrazine (coloré en jaune) avec des IC50 de (96,238 µg/ml) montrant ainsi une activité anti-oxydante largement ressemble à celle de l'acide ascorbique avec un IC50 de 97.04µg/ml (Fig. n°18).

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que les huiles essentielles des *Citrus*. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes dont le *d*-limonène est le constituant majeur, jouant un rôle principal dans l'activité anti-oxydante (**Girenavaretal, 2007 ; Aoetal., 2008 ; Buchbauer, 2010**).

6.4- L'activité cicatrisante :

Les résultats obtenus après application journalière des pommades préparées (pommade à base d'huile essentielle de *Citrus aurantium*) et les deux témoins (Madécassol et l'eau physiologie) sont reportés dans les figures n° (19, 20,21).

L'essai préliminaire de cicatrisation nous a permis de relever certaines observations :

D'une façon générale, l'observation montre l'absence d'œdème pour la zone traitée par la pommade préparée et par la pommade de référence Madécassol ce qui signifie que ce traitement ne favorisent pas le processus inflammatoire, par contre pour le lot témoin un œdème léger apparait dès le premier jour et s'estompe pour disparaître le 6^{eme} jour. Aucun signe de toxicité locale ou systémique n'a été noté chez les lapins traités par les deux pommades préparées.

L'examen macroscopique journalier des plaies permet de constater une action très nette de Madécassol et la pommade à base d'HE de *C. aurantium* sur la vitesse et la qualité de cicatrisation superficielle, Les figures qui récapitulent les résultats de l'activité cicatrisante, montre que la cicatrisation des lots traités par Madécassol, et

par la pommade préparé à base de l'HE de *C. aurantiu* augmente progressivement avec le temps de traitement.

Les deux traitements ont donné une bonne cicatrisation avec des délais de guérisons un peu différentes et qui est de 8 jours pour la pommade à base d'HE de *C. aurantium*, de 8 jours pour Madécassol et 15 jours pour l'eau physiologique.



1^{er} jours
(Originale 2017)

6^{eme} jours

12^{eme} jours (Originale

Fig n°19 :Resultas observé après l'application de l'eau physiologique.



1^{er} jours
(Originale 2017)

6^{ème} jours

12^{eme} jours

Fig n°20 : Résultats observés après l'application de Madécassol.



1^{er} jours (HE) 6^{ème} jours (HE)

12^{ème} jours

(Originale, 2017)

Fig. n°21 : Résultats observés après l'application huile essentielle d'orange amer.

L'HE de *C.aurantium* peut être envisagé comme traitement pour la guérison des plaies.

6.6- L'activité hypo-glycémiant:

Tab n °10 : les résultats de la détermination de la glycémie pour les quatre lapins.

	Avant t0	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Lapin 1 (témoin -)	1.18 g/l	1.21 g/l	2.00 g/l	1.21 g/l	0.95 g/l	0.94 g/l
Lapin 2 (témoin +)	0.99 g/l	1.41 g/	1.33 g/l	0.98 g/l	0.78 g/l	0.70 g/l
Lapin 3 (extrait)	0.73 g/l	1.00 g/l	1.22 g/l	0.76 g/l	0.66 g/l	0.63 g/l
Lapin 4 (extrait)	0.84 g/l	1.20 g/l	1.49 g/l	0.98 g/l	0.85 g/l	0.78 g/l

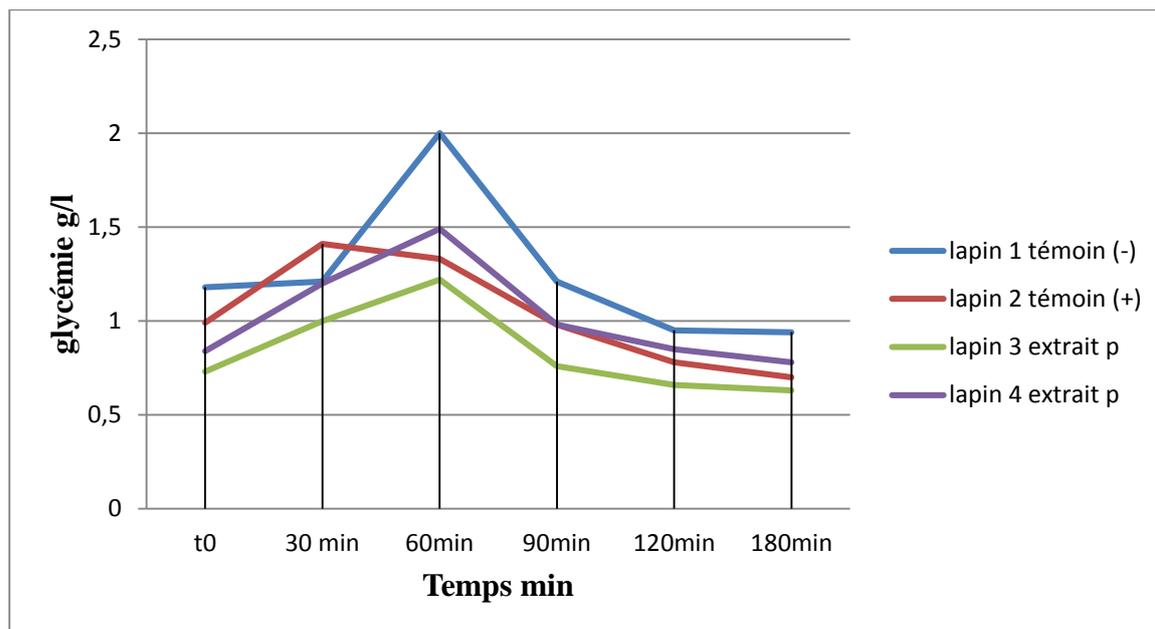


Fig.n°22 : Courbe lingère présente la mesure de la glycémie (g/l) par le temps (min).

Lapin1

L'administration de 2g de glucose entraîne en 60min une augmentation significative de la glycémie allant jusqu'à 2g /l, à 90min la glycémie amorce une baisse (1,21 g/l), Elle continue de baisser au cours de 120min et 180 min 0,95g/l et 0,94g/l respectivement c'est l'état d'hypoglycémie.

Lapin2

5 mg de Glibenclamide **provoque** des 90min une baisse considérable de

la glycémie **20%** par rapporta lapin 1 témoin(-), à 120min la baisse est de 15% par rapport a lapin1 témoin à 180 min lapin2 est en état d'hypoglycémie avec une baisse de 27% par rapport au lapin 1 .

Lapin3

10ml de l'extrait aqueux de la plante abaisse la glycémie 10% par rapport au

Lapin 1 soumis à la surcharge de glucose à la 90min, l'action est la même qu'avec le

Lapin2 traité par Glibenclamide.

à 120 et 180 min le lapin est en état d'hypoglycémie noter de 0,66g /l et 0 ,63g/l respectivement, Nous observons une abaissement de la glycémie par rapport au témoin(-) lapin 1.

Lapin4

10ml de l'extrait aqueux de la planteabaissentla glycémie de 25%par rapport au lapin 2 (0 ,98g /l) à 120min la baisse est peut significative de 10%(0,85g /l) par comparaison au lapin1 témoin(-), et significative de 3% par rapport au lapin2 témoin (+) à 180min la glycémie reste en état d'hypoglycémie (0,78 g/l).

Ces différents résultats nous portent a croire la fraction de l'extrait aqueux de l'écorce de *Citrus .aurantium* a une activité dépendent .La dose utilisé pour le Glibenclamide est celle donné en thérapeutique. Le Glibenclamide, Sulfamide hypoglycémiant des 3génération nous a paru être un bon médicament de référence

Notant que contrairement à notre produit qui est un extrait, le glibenclamide est une molécule pure nous pouvons donc dire que l'extrait aqueux de 10ml a une action préventive :

- ❖ Une baisse important de la glycémie.

Conclusion générale

L'objectif visé par ce mémoire de fin d'étude est de valoriser le bigaradier (*Citrus.aurantium*) de la région de Blida-Mitidja, pour bénéficier de cette plante aromatique et médicinale dans la pharmacie (pommade guérison), la cosmétique (l'odeur), l'industrie alimentaire (confiture), la lutte biologique (antifongique) et dans la médecine (hypoglycémiant).

L'extraction des huiles essentielles des fruits de *Citrus.aurantium* a été réalisée par l'hydrodistillation, nous mentionnons que le rendement pour les deux variétés est de 0,4% et 0,6% respectivement chez le bigaradier japon et le bigaradier ornemental.

La détermination des caractéristiques organoleptiques (Odeur, couleur, aspect, état) et les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles (densité, PH, pouvoir rotatoire, indice de réfraction, l'indice d'acide, indice de saponification et indice d'ester) sont comparables pour les deux variétés (BO, BJ) et mettent en évidence la qualité de ces huiles. La majorité de ces résultats sont conformes aux normes AFNOR.

Pour la composition chimique de ces huiles essentielles montre un composé majoritaire limonène avec un taux élevé chez le bigaradier ornemental 72,55% et 54,29% dans le bigaradier japon.

Concernant l'activité anti-oxydante étudiée par la méthode de réduction du radical libre DPPH et après comparaison des IC₅₀, nous avons remarqué que l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle des fruits de *C. aurantium* (IC₅₀ = 96,238 µg/ml). D'autre part, ces valeurs sont largement semblables à celle de l'acide ascorbique avec un IC₅₀ de 97,04 µg/ml. L'étude de pouvoir antioxydant a confirmé la propriété anti-oxydante que possède les huiles essentielles de Citrus avec une faible concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres.

En outre, L'HE de *C. aurantium* a montré un pouvoir antifongique très important avec une inhibition peut aller jusqu'à 29 mm de diamètre. Par contre de certaines souches microbiennes testées, manifesté une résistance totale.

Il a été constaté que ces activités varient en fonction de la souche microbienne testée

A la lumière de ces résultats, il en résulte que les huiles essentielles de Citrus ont une activité antimicrobienne et anti-oxydante complètement en accord avec l'efficacité qui lui est reconnue dans la littérature.

Pour l'activité cicatrisante l'huile essentielle de *C. aurantium* peut être envisagé comme traitement pour la guérison des plaies.

Et ce qui concerne l'activité hypoglycémique d'infusé de cette plante a donner des très bonnes résultats dans la prévention dans les cas d'hyperglycémie .

Nos résultats restent toujours préliminaires pour mieux connaître les vertus médicinales de cette plante, il sera intéressant de compléter ce travail par :

- ✓ L'extraction de l'huile essentielle par d'autre méthodes et tester leur influence sur la composition chimique de l'HE et sur ses effets biologiques.
- ✓ La séparation des différents composants de l'HE par des techniques plus performantes identifier les composés actifs de la plante étudiée.
- ✓ La mise en évidence du degré de toxicité de l'HE.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographique

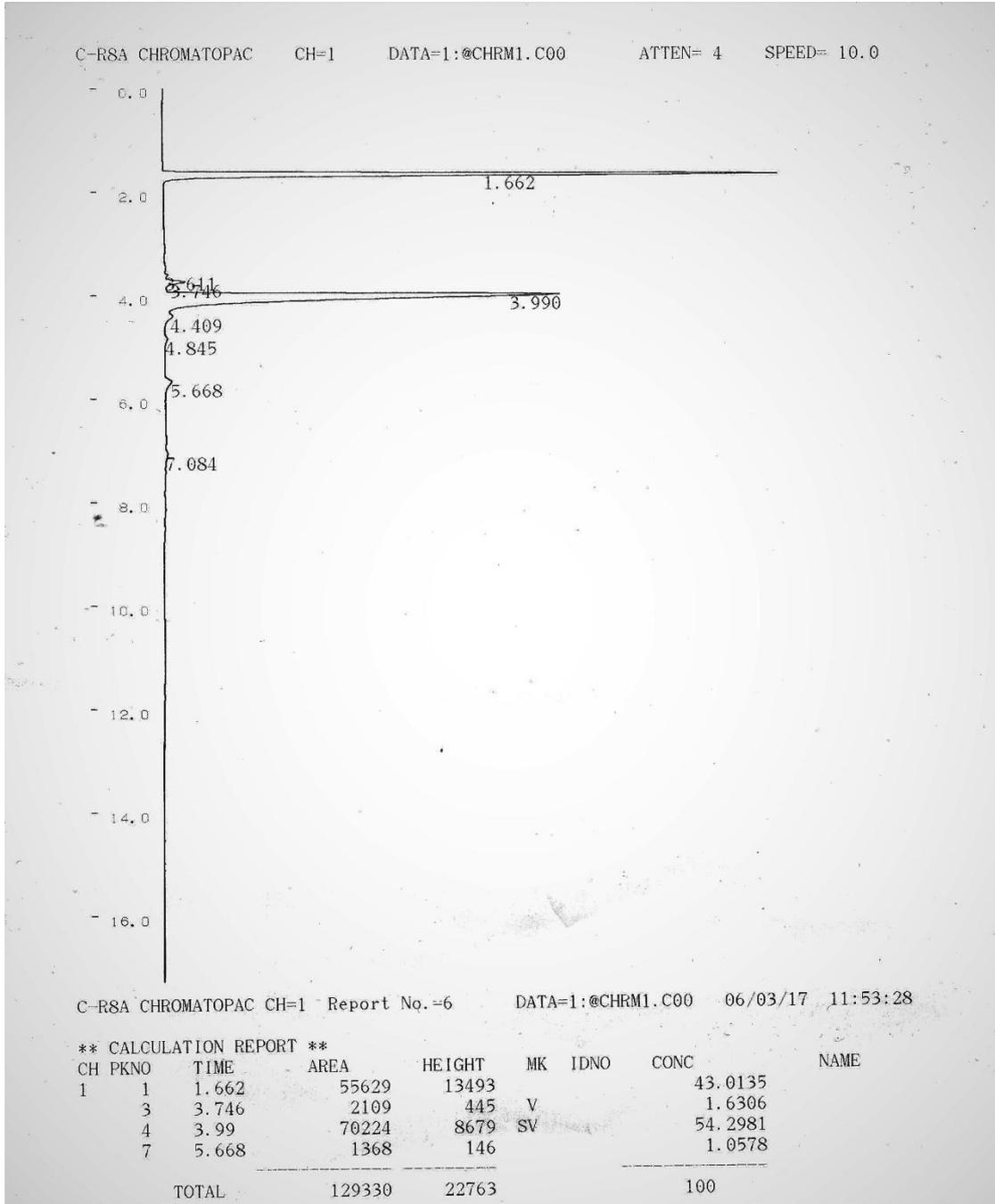
- « **Pharmacopée européenne** ». **2014**. 6^{ème} Edition, Strasbourg, conseil de l'Europe.
- **Afnor, 2002**. Recueil des normes : les huiles essentielles monographiques relatives aux huiles essentielles. Tome 2. Paris. 661-663p.
- **Alma M. H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F. T., Yilmaz N. 2004**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3911–3914
- **Anonyme, 2015**. Les Maladies et les Ravageur des agrumes. « Algérie Agroconsulting International ACI. ».
- **Anonyme., 2007**. Fiche technique complet bigaradier. *Citrus aurantium*. Paris.
- **Anonyme., 2011**. Nature des huiles essentielles. article.
- **Anton R et Silano V., (2001)**. Plants in cosmetics, Volume II, edition Conseil de l'Europe, Allemagne, pp 41-43.
- **Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010**. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994P.
- **Bekhchi., 2014**. Les huiles essentielles. Ed. 40p.
- **Belaiche P, 1979**. Traité de phytothérapie et l'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme Ed. Maloine S.A. Paris. 204p.
- **Belletti 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.
- **Besombes c., 2008**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique. D'herbes aromatiques. Application généralisés. Thèse doctorat université de Rachele. 282p.
- **Boccaschia ville e .foressrdf.1976** les maladie phytophtora des agrumes, edit IRFA Grand bretages 162p

- **Bruenton j., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales techniques et documentation. Ed. Médicales international. Paris.
- **Buchbauer G., 2010.** Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, pp.235 – 280.
- **Cabo, j ; Yaruelo, A, :** Etudes sur l'action hypoglycémiant des graines de lupin. Action antihyperglycémiant de la fraction active, Plantes Médicinales et Phytothérapie 84 Tome XVIII p. 237-247.
- **Catier Oet Roux D, 2007.** Botanique, pharmacognosie et phytothérapie, 3ème édition, Walter's Kluwer, Paris, pp 112
- **De Billerbeck V.G. 2007.** Huiles essentielles et bactérie résistantes aux antibiotiques phytothérapies, 5, 249-253.
- **Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. Food Control. 19, pp. 346–352.
- **Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. And Mazza G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology, 74 :101-109.
- **Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A. & Menut C., 2010.** Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. Agric. Biol. J. N. Am., 1 (4): pp. 606-611.
- **Elgayyar M., Draughon F.A. Golden D.A et Mount J.R., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selectes pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food protects, 64 : pp 1019-1024.
- **Fernandez x. Et chemat F., 2012.** La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation, Edit. Vuibert, Paris, France, p.228.
- **Festy D., 2008.** Ma bible des huile essentielle. Ed. Leduc. 20p.

- **Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J.& Rosalia F., 2008.**
Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essence on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent American Foulbrood. World journal of microbiology and biotechnology, pp; 2067-2072.
- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007.** Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chem.,102, pp 904.
- **Georges M., 1969.** L'Algérie et ses agrumes. Vol 44, pp. 5-36.
- **Girenavar B., Jayaprakasha G.K., Jadegoud Y., Nagana Gowda G.A., Patil B.S. 2007.** Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. Bioorg Med Chem. 15(11) pp. 3684–91.
- **Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S., Nigam P.S. 2010.** Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 41, pp.1070-10780
- **Jacqueline smadja ,2009** ;les huiles essentielles ,Université de la Reunion
- **Jay J.M., 1996.** Microorganisms in fresh ground meat : the relative safety of product with low versus high numbers. Meat sci, 43: S59-S66.
- **Jean-marie P., 2005.** La culture des agrumes. Ed. Artemis. 93p.
- **Jeannot V., Chahboune J., Russell D. et Baret P. 2005.** Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium L. ssp. aurantium*). International journal of aromatherapy, 15 (2), pp 94-97.
- **Jean-pierre w., 2002.** Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Ed du Dauphin. Paris.
- **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.
- **Koba K., Sanda K., Raynaud C Mandin D., Millet J., Chaumont J.P., 2003.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus L. naradus L et C. schoenanthus*. Journal de Mycologie médicale, Vol 13, N°4, (décembre 2003), pp 175-180.

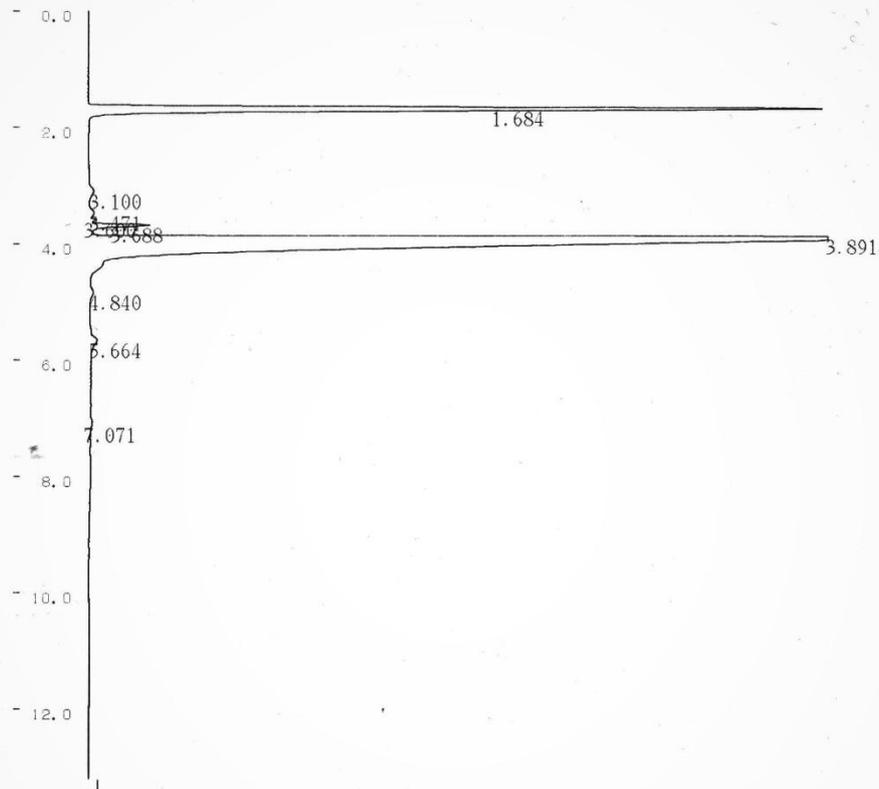
- **Lamamra mebarka ,2013** contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tingura sicula* parl et de *filipendule hexapetala gibb* Université Ferhat abbas –sétif
- **Leslye b ., 2005** .Plantes aromatiques et médicinales .1.Production. Paris. Vol 306 P 46.
- **Loussert r., 1989**, les agrumes, Tome 1. Arboriculture. Ed. Lavoisier, Beyrouth. 113p.
- **Lucienne., 2010**. Les Plantes Médicinales d'Algérie 2^{eme} édition vol 239, P56.
- **Madjene A et Madani F., 2010**. Contribution à la mise en évidence de l'effet anti- inflammatoire et analgésique de l'huile essentielle des feuilles et du péricarpe de Citronnier. 35p.
- **Mariem Boutamani ;2013**.Etude de la variation du rendement et la composition chimique du *Curcuma longa* et *Myristica fragrans* en fonction du temps et de la technique utilisé .
- **Mayachiew P. & Devahastin S., 2008**. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. Food Science and Technology 41; pp. 1153-1159.
- **Millet f., 2013**. Le grand guide des huiles essentielles. Les presses de unigraf, Espagne.
- **Mohammedi Z., 2006**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse magistère*, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- **Parloran j.c., 1971**. Les agrumes. Ed. Maison neuve et Larose, paris. 565p.
- **Rchel f, 2015**. Les agrumes saveurs et vertus. Ed. Grancher. 127p
- **Salle J.L. et Pelletier J., 1991**, Les huiles essentielle, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, 167p.
- **Simon l., 2011**. Les huiles essentielle et aux florales des Madagascar « Guide pratique d'une aromathérapeutique. Innovante »
- **Sutour s, 2010**, Etude de coposition chimique des huiles essentielles et des extraits de menthes de corse et de Kumquant ;Th .Dot .Univ ,de corse ;France p .222

Annexe



Annexe 01 : Chromatogramme de l'huile essentielle du B.O. analysé par CPG.

C-R8A CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATTEN= 4 SPEED= 10.0



C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=7 DATA=1:@CHRM1.C00 06/03/17 12:26:12

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	1.684	74648	15872			25.3735	
	5	3.688	4787	1316	V		1.627	
	6	3.891	213444	20166	SV		72.5519	
	8	5.664	1317	130			0.4475	
TOTAL			294195	37483			100	

Annexe 02 : Chromatogramme de l'huile essentielle du B.J. analysé par CPG.



Fig 9 : les sacrifices réalisé



Fig 8 : lapine testé



Fig 10 : l'infusé



Fig 11 : la poudre

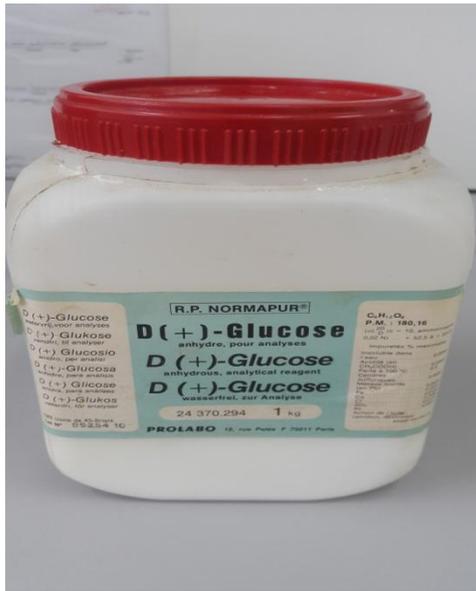


Fig 12 : D glucose



Fig 13 : les répartitions des lapins