

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE 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

Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles de
trois espèces d'agrumes

Présenté par : BOUMENIKHRA Karima

Devant le jury:

Mr. EL-HADI D.	M C A	U.S.D.BLIDA	Président
Mr. BENDALI A.	M A A	U.S.D.BLIDA	Promoteur
Mme. GHANAI R.	M A A	U S D BLIDA	Examinatrice
<i>Mme. AMEDJKOUH H.</i>	M A A	U S D BLIDA	Examinatrice

Année universitaire: 2014/2015

Résumé :

Le présent travail a porté sur l'extraction et aux analyses physico-chimiques et chromatographiques des huiles essentielles de trois espèces d'agrumes (*Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475).

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir de l'écorce des fruits de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475, ont données des rendements respectifs de 1,104%, 1,073%, 0,913%. L'analyse de ces huiles par la CPG et la GC-MS montre le limonène comme composé majoritaire avec des taux de 72,027%, 83,82% et 68,077% respectivement chez le *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475, ainsi que des composés minoritaires comme le β -pinene, le camphène et le caryophyllène.

Mots clés : *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475, huiles essentielles

Summary:

This work focused on the extraction and physicochemical and chromatographic analyzes of essential oils of three species of citrus fruit (*Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* and Citrumelo 4475).

The essential oils extracted by steam distillation from the bark of fruit *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* and Citrumelo4475, data have respective returns of 1.104 %, 1.073 %, 0.913 %. Analysis of these oils by GC and GC-MS shows limonene as major compound with rates of 72.027 %, 68.077 % and 83.82 % respectively for the *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* and Citrumelo 4475, as well as compounds minority as the β - pinene, camphene and caryophyllene.

Keywords: *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* and Citrumelo 4475, essential oil.

ملخص:

يهدف هذا البحث إلى استخراج الزيوت الأساسية لثلاثة أنواع من الحمضيات (*Citrus*، *Citrus volkameriana*، *aurantium*، Citrumelo 4475) وكذا دراسة خصائصها الفيزيوكيميائية والكروماتوغرافية.

الزيوت المستخرجة من قشرة الفاكهة للأنواع الثلاثة من الحمضيات *Citrus*، *Citrus volkameriana*، *aurantium*، Citrumelo 4475 عن طريق عملية التقطير البخاري، مكننا من تسجيل مردود يقدر ب: 1.104 %، 10.73 % و 0.913 % علي التوالي عند *Citrus volkameriana*، *Citrus aurantium* و Citrumelo 4475. تحليل هذه الزيوت باستعمال تقنية CPG و GC-MS، أظهرت limonène كعنصر اساسي في التركيبة الكيميائية للزيوت الاساسية المدروسة بنسب قدرت ب: 72.027% عند *Citrus volkameriana*، 83.82 % عند *Citrus aurantium* و 68.77 % عند Citrumelo 4475، تم تسجيل مركبات كيميائية أخرى لكن بنسب قليلة مثل β -pinene، camphène و caryophyllène.

الكلمات المفتاح : *Citrus volkameriana*، *Citrus aurantium*، Citrumelo 4475، الزيوت الاساسية

Liste des abréviations

TH :	Taux d'humidité
TMS :	Taux de matière sèche
HE :	Huile essentielle
d_{20}^{20} :	Densité à 20 °C
n_D^t :	Indice de réfraction
Ia :	Indice d'acide
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
IK:	Indice de Kovàts
Tr :	Temps de rétention
CPG-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
FTIR :	Spectrométrie infrarouge à transformée et fourrier
KBr :	Bromure de potassium
IR :	Indice de rétention
IR_C :	Indice de rétention calculé

Liste des figures

Figure	page
Fig.1 : Coupe transversal d'une orange	4
Fig. 2 : Illustration de la genèse des poches sécrétrices des agrumes	9
Fig. 3 : Montage d'hydro-distillation	10
Fig. 4 : Schéma du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau	11
Fig. 5 : Schéma du procédé d'hydro-diffusion	11
Fig. 6 : Schéma représentatif de l'extraction par pression	12
Fig. 7 : Montage d'une distillation assisté par micro-ondes	14
Fig. 8 : Diagramme de phase de CO ₂	14
Fig.9 : schéma de principe d'extraction par CO ₂ supercritique	15
Fig. 10 : Taux d'humidité et taux de matière sèche de l'écorce du fruit de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> , Citrumelo 4475.	27
Fig.11 : Histogramme du rendement moyen de l'écorce du fruit de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> , Citrumelo 4475.	28
Fig. 12 : spectre IR d'huile essentielle de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> et Citrumelo 4475.	38

Liste des tableaux

N° du tableau	Page
Tab.1 : Taux d'humidité de l'écorce du fruit de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> , Citrumelo 4475.	27
Tab.2 : Rendement moyen de l'écorce du fruit de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> , Citrumelo 4475.	28
Tab. 3 : Caractéristiques organoleptiques de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> et Citrumelo 4475	29
Tab. 4 : Grandeurs physiques des huiles essentielles de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> et Citrumelo 4475.	30
Tab. 5 : Résultats de quelques recherches précédentes sur les huiles essentielles des Citrus ainsi que ceux données par la pharmacopée européenne.	30
Tab.6 : Indice d'acide des huiles essentielles de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> et Citrumelo 4475.	31
Tab.7 : Les composés chimiques des huiles essentielles de <i>Citrus volkameriana</i> , <i>Citrus aurantium</i> et Citrumelo 4475 identifiés par la CPG et la GC-MS	33
Tab.8 : table spectroscopique IR par nombre d'onde (Capon, 1993)	39

Sommaire

Introduction	1
Première partie : synthèse bibliographique	
I. Les agrumes.....	2
1.1. Classification des agrumes.....	2
1.2. Morphologie des agrumes.....	2
1.3. Les espèces étudiées.....	4
1.3.1. Le bigaradier (<i>Citrus aurantium</i>).....	4
1.3.1.1. Description.....	4
1.3.1.2. Utilisation.....	4
1.3.2. Le volkamer (<i>Citrus volkameriana</i>).....	5
1.3.2.1. Description.....	5
1.3.2.2. Utilisation.....	5
1.3.3. Le citrumelo 4475.....	5
1.3.3.1. Description.....	5
1.3.3.2. Utilisation.....	6
II. Les huiles essentielles.....	7
2.1. Définition.....	7
2.2. Localisation des huiles essentielles.....	8
2.3. Le rôle physiologique des huiles essentielles.....	9
2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	9
2.4.1. L'hydro-distillation.....	9
2.4.2. L'entraînement à la vapeur d'eau.....	10
2.4.3. L'hydrodiffusion.....	11
2.4.4. L'extraction par expression.....	12
2.4.5. L'extraction par solvant.....	12
2.4.5. L'extraction assistée par micro-ondes.....	13
2.4.6. L'extraction par CO ₂ super critique.....	14
2.5. Les propriétés physiques des huiles essentielles.....	15
2.6. La composition chimique des huiles essentielles.....	16
2.7. Les facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles.....	17
2.8. Utilisation des huiles essentielles.....	18
2.8.1. En phytothérapie.....	18
2.8.2. En agro-alimentaire.....	18
2.8.3. En parfumerie et cosmétologie.....	18
2.8.3. En agriculture.....	19
Deuxième partie : Partie expérimentale	
I. Matériels et méthodes.....	20
1.1. Objectif de l'essai.....	20
1.2. Matériel végétal.....	20
1.3. Extraction des huiles essentielles.....	20

1.4. Les paramètres étudiés.....	21
1.4.1. La teneur en eau.....	21
1.4.2. Rendement en huile essentielle.....	21
1.4.3. Caractéristiques organoleptiques.....	21
1.4.4. Grandeurs physico-chimiques.....	22
1.4.4.1. Les grandeurs physiques.....	22
1.4.4.1.1. Densité.....	22
1.4.4.1.2. L'indice de réfraction.....	22
1.4.4.2. Les grandeurs chimiques.....	23
1.4.4.2.1. L'indice d'acide.....	23
1.4.5. Détermination de la composition chimique.....	24
1.4.5.1. Par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	24
1.4.5.2. Par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS).....	25
1.4.5.3. Par spectrométrie infrarouge à transformée et fourrier (FTIR).....	26
II. Résultats et discussions.....	27
2.1. Détermination du taux d'humidité.....	27
2.2. Le rendement en huile essentielle.....	27
2.3. Caractéristiques organoleptiques.....	29
2.4. Grandeurs physico-chimiques.....	29
2.4.1. Les grandeurs physiques.....	29
2.4.2. Les grandeurs chimiques.....	30
2.5. Détermination de la composition chimique.....	31
2.5.1. Par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et GC-MS.....	31
2.5.2. Par spectroscopie infrarouge à transformée et fourrier (FTIR).....	37
Conclusion générale.....	40
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction.

Introduction

L'usage des plantes est une composante naturelle de la culture humaine. En effet, l'homme a toujours tiré profit de son environnement végétal dont il a connu des propriétés bénéfiques dans le but de satisfaire ses besoins quotidiens de santé, bien-être, ou tout simplement son plaisir.

Les huiles essentielles utilisées depuis l'antiquité d'une manière empirique comme agents thérapeutiques des plus pratiques contre différents maux suscitent (SEDDIK, 2010). Elles sont considérées actuellement comme source potentielle de molécules naturelles bio-actives.

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels sans additifs chimiques de synthèses, a conduit à envisager l'incorporation de substances considérées comme non chimique ou naturel

Cependant, la science confirme de plus en plus les différentes vertus des plantes aromatiques, de leurs huiles essentielles et de leurs extraits bruts (DJARRI, 2011), qui font l'objet d'études actives dans le monde pour leurs emplois possibles pour la préservation de la santé humaine (BOUKHEBTI *et al.*, 2011,), dans l'industrie : alimentaire (KEHAL, 2013 et HIMED, 2011) cosmétique et parfumerie, ainsi qu'en lutte biologique (BENAYAD, 2008).

Les huiles essentielles de la famille des rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction. Ces huiles ont fait l'objet de plusieurs essais pour tester leur efficacité comme agent antimicrobien, bio-pesticide (JAZET-DONGMO, 2002), anti inflammatoire.

L'utilisation des huiles essentielles dans les domaines cités auparavant nécessite des études préalables sur ces caractéristiques physico-chimiques et sa composition chimique. Dans cette optique et suite aux travaux antérieurs sur l'étude des huiles essentielles des agrumes à l'échelle mondiale, nous nous sommes proposés l'extraction des huiles essentielles, à partir des fruits, de trois espèces utilisées comme porte-greffe d'agrumes

L'objectif de notre travail s'inscrit dans :

- ✓ La valorisation des fruits de porte-greffes d'agrumes par extraction des huiles essentielles à partir des fruits de trois espèces : *Citrus aurantium*, *Citrus volkameriana* et Citumelo 4475 ;
- ✓ La caractérisation physico-chimique des huiles essentielles extraites ;
- ✓ La caractérisation quantitative et qualitative des composants chimiques.

Première partie :

Synthèse

bibliographique.

I. Les agrumes

Le mot agrumes est appliqué aux fruits employés dans l'économie humaine, généralement comme comestible, appartenant à trois genres : *Poncirus*, *Fortunella* et *Cirtus* (Praleron, 1971). Il est utilisé aussi bien aux : fruits, arbres et culture (Praleron, 1971).

Originaire du Sud-Est asiatique, les agrumes sont aujourd'hui cultivés sur tous les continents entre les 40^{es} parallèles nord et sud (Loussert, 1989, Jacquemond et heuzet, 2012), à travers plus de 80 pays (Labaniya, 2008).

1.1. Classification des agrumes

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées. Selon Jacquemond et heuzet, 2012, il est admis communément que les agrumes se répartissent en trois genres botaniquement compatibles entre eux : *Poncirus*, *Fortunella* et *Cirtus*. Ces trois genres appartiennent à la tribu des *Citreae*, et la sous-tribu des *Citriniaae*:

- ✓ Les *Poncirus* ne produisent pas de fruits comestibles, mais sont utilisés comme porte-greffes car ils confèrent certaines résistances ou tolérances intéressantes ;
- ✓ Les *Fortunella* produisent des petits fruits qui se dégustent avec la peau ;
- ✓ Les *Citrus* regroupent la plupart des espèces d'agrumes cultivées et renferme, suivant les taxonomies, entre seize (swingle et Reece, 1967, In Jacquemond et heuzet, 2012) et cent cinquante-six espèces (Tanaka, 1961, In Jacquemond et heuzet, 2012).

Une nouvelle proposition de taxonomie des agrumes a été suggérée par Mabberley en 1997, dans la quelles la notion de fertilité des croisements est mieux respectée que celle des deux précédentes (swingle et Reece, 1967). Elle regroupe ainsi les six genres d'agrumes vrais, *Poncirus*, *Fortunella*, *Cirtus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* et *Clymenia* (Jacquemond et heuzet, 2012).

1.2. Morphologie des agrumes

Les agrumes sont des arbres, ou arbustes, atteignant de 5 à 15 m de hauteur, assez souvent épineux et à feuillages dense persistant, excepte le *Poncirus trifoliata* à feuilles caduques et ces hybrides à feuilles semi-persistantes (Loussert, 1989).

Les feuilles sont cireuses, coriaces et alternés. Ils présentent une grande variabilité de taille et de forme, non seulement entre les espèces et les variétés mais également suivant l'âge, en générale les jeunes arbres ont des feuilles plus grandes et souvent plus larges que les feuilles type de l'espèce, tandis que les arbres adultes et surtout leur rameaux fructifères portent des feuilles nettement plus petites et souvent plus allongée (Praleron, 1971).

Le système racinaire des agrumes est fortement pivotant. Ce pivot, simple, double ou triple, s'enfonce à plus de 1,50 m et émis un réseau de racines secondaire qui sont

sensiblement horizontale et elles peuvent atteindre 6 à 7 m de long chez les arbres adultes (Jacquemond et heuzet, 2012).

La floraison printanière des agrumes est caractérisée par une forte abondance, estimée à 60 mille fleurs, mais un très faible pourcentage de ces fleurs donnera des fruits, environ 1%. Les chutes ont une origine physiologique d'autorégulation plutôt que climatique (Loussert, 1989).

Le fruit des agrumes est un baie modifié appelé hespéridium, de taille très variable s'étend de 2,25 cm pour les kumquats à plus de 20 cm chez le pamplemousse (Labaniya, 2008).

Le fruit est composé de deux parties bien distinctes : le péricarpe, qui correspond à la peau du fruit, et l'endocarpe, qui correspond à la pulpe. La peau adhère plus ou moins à l'endocarpe, selon les espèces, les variétés et le stade de maturité (Loussert, 1989, Jacquemond et heuzet, 2012)

La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (Figure 1):

- ✓ **l'épicarpe ou flavédo** de couleur vive (du jaune à l'orange), qui recouvre le fruit et le protège des dommages. Cette partie de la peau colorée contient des glandes oléifères renfermant des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.
- ✓ **le mésocarpe** ou albedo blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.
- ✓ **la partie interne**, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelles) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Hendrix et Redd, 1995; Guimaraes et *al.*, 2010 *In* Bousbia, 2013).

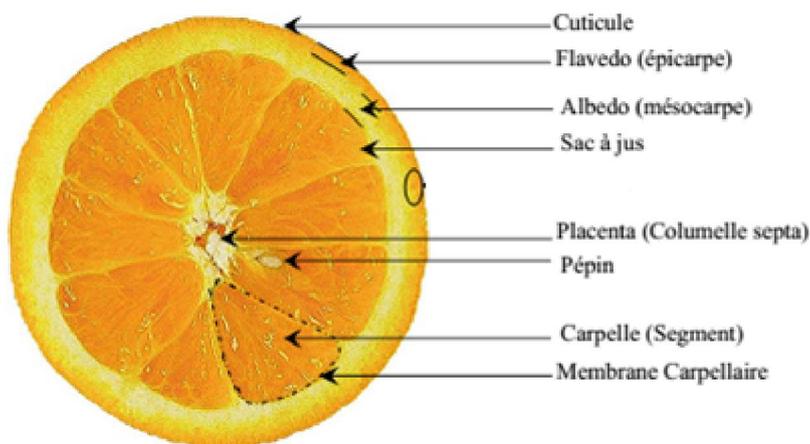


Fig.1 : Coupe transversal d'une orange (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et *al.*, 2010 In Bousbia, 2013)

1.3. Les espèces étudiées

1.3.1. Le bigaradier (*Citrus aurantium*)

1.3.1.1. Description

Le bigaradier peut atteindre près de 7m de haut. Son fruit ressemble à une orange, avec une épaisse écorce rugueuse, teintée de jaune et de vert et à pulpe acide et amère. Ses feuilles sont persistantes, composées d'un limbe ovale et d'un pétiole légèrement ailé.

1.3.1.2. Utilisation

La bigarade fut appréciée dès le Moyen âge pour son écorce à odeur fortement poivrée, son parfum d'une exquise suavité et sa fleur blanche odorante. L'huile essentielle est obtenue par distillation des fleurs de bigaradier. Elle s'appellera plus tard Néroli en hommage à la princesse de Nérole (XVIII^{ème} siècle) (Bousbia, 2013).

L'importance du bigaradier réside dans l'huile essentielle qu'on peut extraire à partir des fleurs, des feuilles, des graines et de l'écorce. Ces huiles donnent l'arôme typique d'orange utilisé dans les épices, les bonbons, les liqueurs ...etc. Certaines variétés donnent des huiles essentielles rentrant dans la fabrication des parfums, de savons renommés et de lotions après rasage. Elles trouvent également un usage en aromathérapie, et comme principal constituant des boissons gazeuses (Bousbia, 2013).

Le bigaradier était très utilisé comme porte-greffe des agrumes en raison de sa parfaite compatibilité avec la plupart des variétés. Il forme des associations sensibles à la Tristéza, ce qui conduit à délaissé son emploi (Anonyme, 2002)

1.3.2. Le citron volkamer (*Citrus volkameriana*)

1.3.2.1. Description

Originaire de l'Italie, le *Citrus volkameriana* est le résultat d'un croisement entre le citronnier (*Citrus limon*) et le bigaradier (*Citrus aurantium*), il est reconnu sous le nom de citron volkamer¹.

L'arbre de *Citrus volkameriana* est vigoureux et épineux, avec un feuillage vert foncé. Le fruit de couleur orangé à maturité, et de forme ovoïde à sphérique a une acidité similaire à celle de citron².

1.3.2.2. Utilisation

Le *Citrus volkameriana* est utilisé comme porte-greffe des agrumes vue sa résistance à plusieurs maladies, et donne de bon association avec la plupart des variétés commerciales. L'arbre fruitier est exceptionnellement ornementale et le fruit peut être utilisé comme un substitut pour le citron.

1.3.3. Le citrumelo 4475

1.3.3.1. Description

Le citrumelo 4475 est obtenu en 1907 par le célèbre botaniste Walter T. Swingle par un croisement entre le *Poncirus trifoliata* et le *Citrus paradisi* (pomelo) (Jacquemon et al. 2009).

Cet hybride est à l'origine appelé CPB 4475, les fleurs du pomelo ont été fécondées par le pollen du *Poncirus trifoliata* dont le but de transférer la résistance au froid du *Poncirus trifoliata* au pomelo, cependant le fruit n'a pas eu de qualité comestible. Dans les

^{1,2}http://www.agrumesbaches.com/baches/1292/boutique/50307/citrus_limonia_volkameriana.htm#.VRkZOPysTY

années 40, il a été examiné comme porte-greffe des agrumes dans des essais de résistance maladie virale de Tristeza et c'est montré intéressant.³

Le CPB 4475 est homologué par le département d'agriculture en USA en 1974 et il a été donné le nom de Swingle comme hommage à son créateur (Anonyme, 2004).

L'introduction de cet hybride en Algérie a été faite par l'ITAFV en 1979 sous forme de graines, alors que la plantation des arbres greffés a eu lieu en 1983 à Halwiya dans la région de Soma (Bekkis, 2008).

Les plants de citrumelo 4475 sont vigoureux avec des feuilles trifoliées de couleur foncées et semi-persistentes. Le fruit a une forme sphérique avec un gros calibre, une peau rugueuse et une écorce très épaisse avec une couleur jaune citronné (Aubert et Vellin, 1994).

1.3.3.2. Utilisation

Le citrumelo 4475 est utilisé seulement comme porte-greffe d'agrumes, et aucune étude n'est portée sur son utilisation dans le domaine d'extraction des huiles essentielles.

³ <http://www.citrolima.com.br/Rootstocks/swinglee.htm>

II. les huiles essentielles

Ce qui fait qu'un végétal est dit « à huile essentielle », c'est sa capacité à développer des structures anatomiques de stockage de composés organiques volatils (poches d'huile essentielle au sommet de trichomes de la menthe, canaux résinifères des aiguilles de pin, poche d'huile essentielle dans le flavido des agrumes) (Fernandez et Chemat, 2012).

2.1. Définition

On trouve dans la littérature plusieurs définitions des huiles essentielles. Afin d'être le plus exact possible, voici quelques unes de ces définitions.

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatiles et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices, elles sont volatiles et sensibles à l'effet de la chaleur (Kesbi, 2011).

Selon les normes AFNOR (norme NF T 75-006), l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerie des Citrus, soit par distillation « sèche ». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (Fernandez et Chemat, 2012).

Une autre définition des huiles essentielles est donnée par l'ANSM (Agence nationale de 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, soit 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 » (Desmares, 2008).

Pharmacopée européenne définie une huile essentielle comme étant un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Anonyme, 2008)

-7-

Il est important de distinguer essences et huiles essentielles (Besombes, 2008, Pierron, 2014):

- Essence : sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée.
- Huile essentielle : extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est -à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée.

La nature et la composition de ces deux substances diffèrent en raison des phénomènes d'oxydo-réduction qui ont généralement lieu lors de la distillation et qui modifient la composition biochimique de l'essence.

2.2. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se trouvent en général dans les fleurs, les feuilles, les fruits, le bois, les racines ou les rhizomes et les graines. Cette large distribution des huiles essentielles dans le règne végétal est associée à des structures cellulaires épidermiques spécialisées dans la production de ces substances et/ou leur accumulation : Les poils sécréteurs ou trichomes, Les poches sécrétrices, les cellules sécrétrices et les canaux sécréteurs (Besombes, 2008).

Chez les agrumes, l'huiles essentielles se trouvent dans les feuilles, appelées essence de petit grain, les différents pièces florales (pétales, stylé et étamines) et prennent le nom d'essence de Néroli et dans l'écorce des fruits (Praleron, 1971).

Cette huile essentielle est renfermée dans de petit poche sécrétrice appelées glandes à essence inclus dans les tissus sub-épidermiques : tissus palissadiques des feuilles, épicarpe des fruits tissus adjacents à l'épiderme des pétales et du calice. Elles sont visibles à l'œil nu sur l'écorce des fruits, signalées par de petites dépressions de l'épiderme qui peut en compter jusqu'à 50 par cm², et sur la face ventrale des feuilles sous forme de petites ponctuations claires (Medjber et Djoudi, 1995, Praleron, 1971).

La genèse des poches sécrétrices débute par la division d'une cellule parenchymateuse en quatre cellules, qui forment en leur centre une poche. les cellules, entourant la poche, vont se diviser et s'organiser pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne, ce qui forme alors une poche schizolysigène (**Fig. 2**) (Teuscher et *al.*, 2005 et Besombes . 2008.) -8-

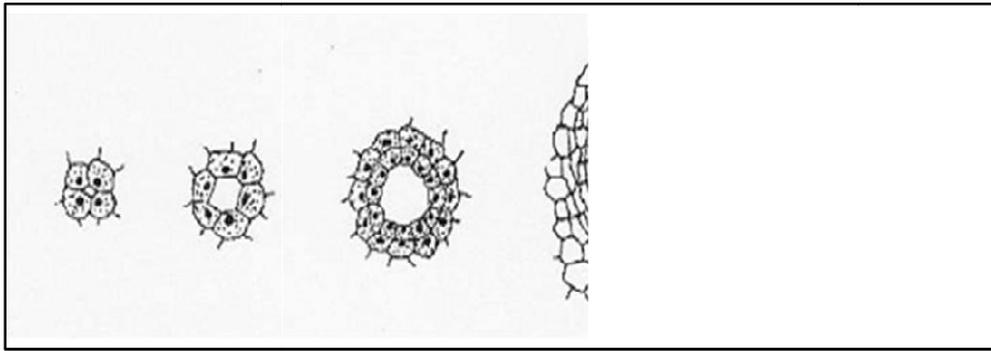


Fig. 2 : Illustration de la genèse des poches sécrétrices des agrumes (Besombes . 2008)

2.3. Le rôle physiologique des huiles essentielles

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu (Hellel, 2011)

Les spécialistes considèrent les huiles essentielles comme des sources de signaux chimiques de communication et de défense, ils permettent de tolérer les stress biotiques et abiotiques, et de communiquer des informations vitales à des insectes bénéfiques (des insectes pollinisateurs) (Porter, 2001 *In* Mohammedi, 2006, Fernandez et Chemat 2012, Nouioua, 2012). Selon Bakkali, 2008 *In* hellal, 2011, les huiles essentielles sont considérées comme source d'énergie, facilitant certaines réaction chimiques, et réduisent la compétition des autres espèces de plantes par inhibition de la germination des graines.

2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles:

2.4.1. L'hydro-distillation

La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. La vapeur est condensée dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (Benayad, 2008) (**Fig. 3**).

A l'échelle de laboratoire ; le système basé sur ce principe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la pharmacopée européenne est l'appareil de Clavenger (Marouf et Tremblin, 2009).

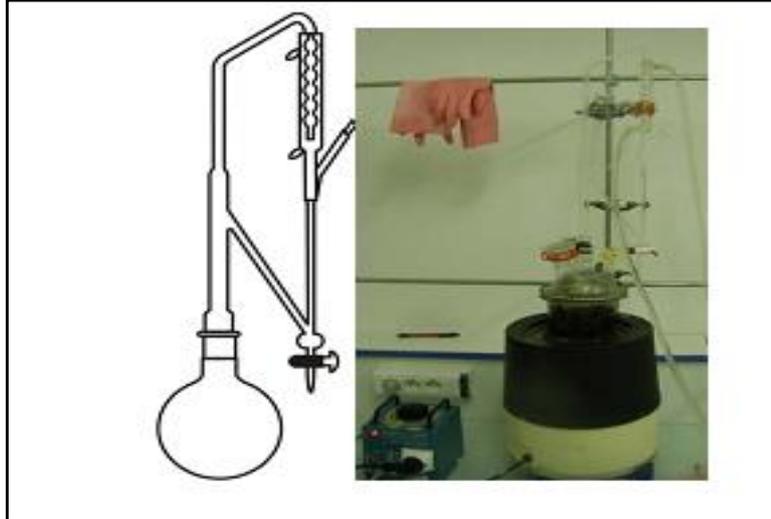


Fig. 3 : Montage d'hydro-distillation (Sutour, 2010)

2. 4.2. L'entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal, dans ce système d'extraction, est placé dans un alambic, qui possède à la base une grille perforé au-dessous de laquelle on introduit de la vapeur d'eau fournie par une chaudière ou par de l'eau portée à ébullition en dessous de la matière première. La vapeur d'eau traverse le matériel végétal, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles. En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composé volatils se condense et huile est récupérée par une simple différence de densité ou par décantation (Benayad, 2008, Marouf et Tremblin, 2009) (**Fig.4**).

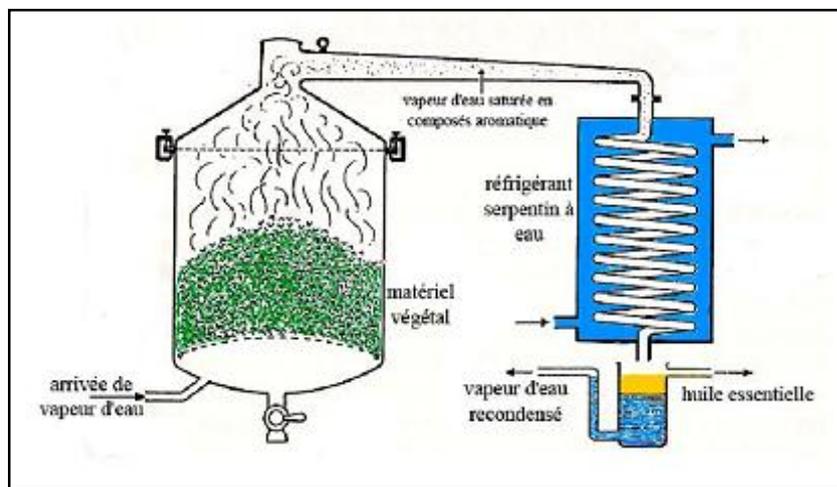


Fig.4 : Schéma du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau (Kesbi, 2011)

2.4.3. L'hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant (**Fig. 5**). L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie (Kesbi, 2011).

Cette technique est la plus utilisée actuellement, elle évite le contact prolongé du végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artefacts (Peyron, 1992 ; Garnero, 1996). Les produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes (Benayad, 2008).

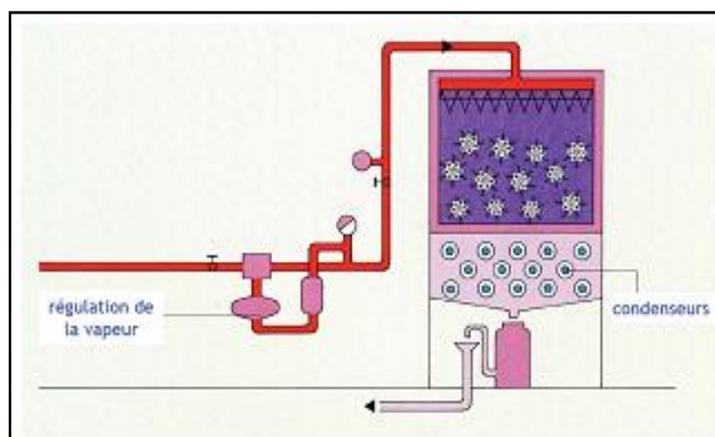


Fig. 5 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Bousbia, 2013)

2.4.4. L'extraction par expression

Cette opération est réservée au péricarpe frais des agrumes. Elle consiste à éclater par différents procédés mécaniques (abrasion, compression, incision, perforation) les poches qui

sont situées à la surface de l'écorce de ces fruits et qui renferment l'huile essentielle, l'essence libères est ensuite recueillie par un courant d'eau (**Fig.6**) (Marouf et Tremblin, 2009).

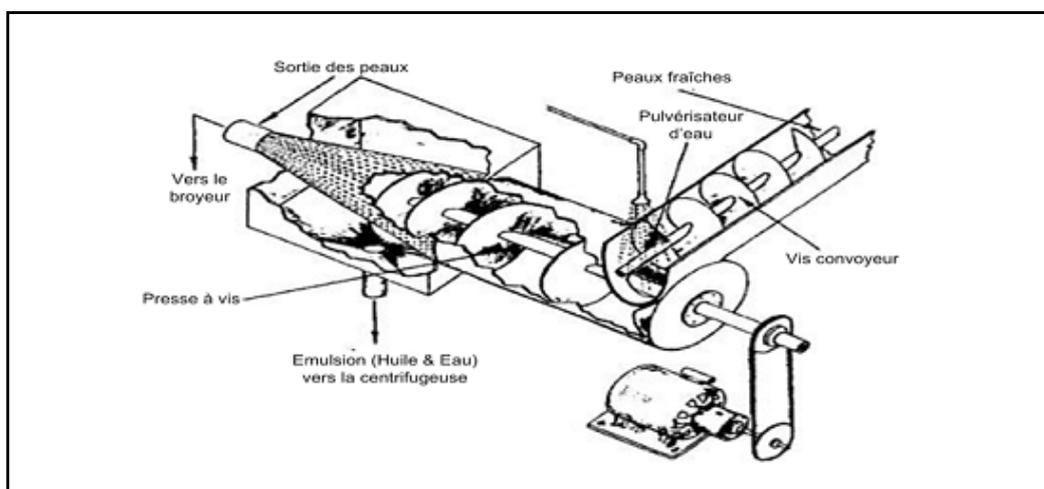


Fig. 6 : schéma représentatif de l'extraction par pression (Source Bousbia, 2013)

2.4.5. L'extraction par solvant

Cette technique, largement utilisée actuellement, consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut pas extraire par un autre procédé, soit en vue un rendement plus élevé, en fin d'opération, le solvant est éliminé par distillation sous pression réduite. On obtient alors une substance appelée concrète (mélange de cire et de constituant odorant), des lavages répétés avec l'alcool permet d'éliminé les cires, l'élimination de l'alcool par distillation conduit aux essences absolues, ce sont ces dernier qui sont utilisées en parfumerie, cependant les concrète et les absolues ne sont pas utilisés pour les huiles essentielles à destination thérapeutiques (Marouf et Tremblin, 2009).

Bien que, par rapport à la distillation, les rendements soient généralement plus importants, les solvants organiques utilisés posent des problèmes de sécurité et de toxicité.

2.4.5. L'extraction assistée par micro-ondes

En 1986, Ganzler et *al.* furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique (Sutour, 2010) -12- Cette technique permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie par rapport à une méthode conventionnelle (Benayad, 2008, Sutour, 2010).

Le premier brevet européen a été déposé en 1990 par Paré et *al.* sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal (**Fig. 7**).

L'extraction assistée par micro-ondes peut être réalisée par trois procédés :

- ✓ **hydrodistillation par microondes** est basée entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique :
- ✓ **extraction par solvant assistée par micro-ondes**
- ✓ **extraction sans solvant assistée par micro-ondes** : cette méthode décrit une distillation sèche qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique

Au cours des dernières années, L'extraction assistée par micro-ondes s'est développée. Toutefois, aucun développement industriel n'a encore vu le jour bien que ces techniques aient fait l'objet de plusieurs dépôts de brevets.

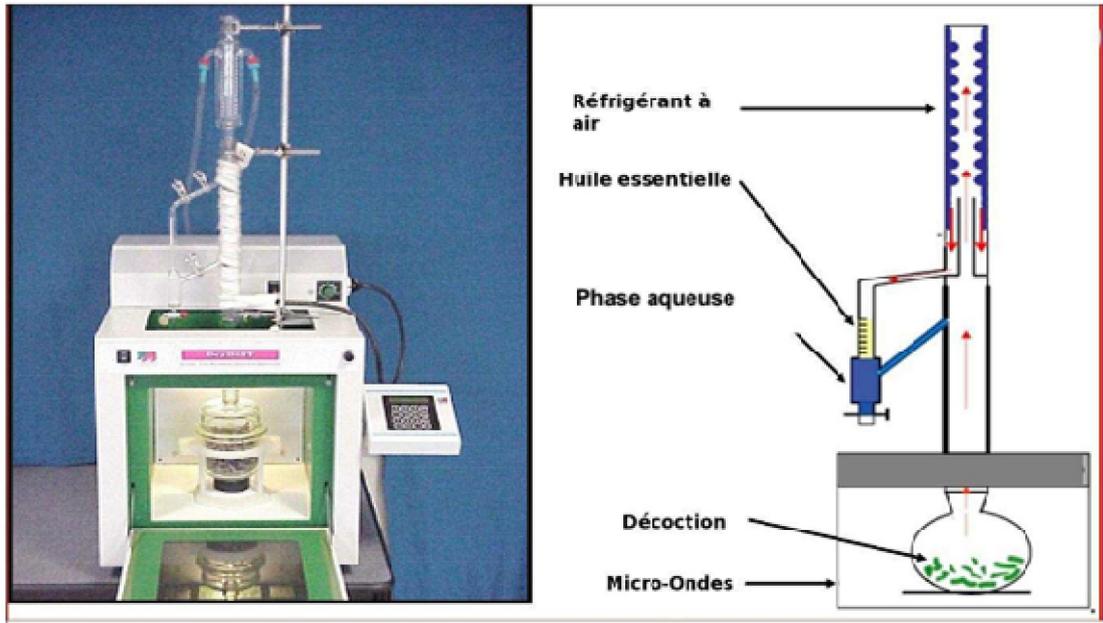


Fig. 7 : Montage d'une distillation assisté par micro-ondes (Chemat, et *al.*, 2004 In Duval, 2012)

2.4.6. L'extraction par CO₂ super critique :

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales. Le CO₂ sous pression $P_c = 74$ bar et à température de 31°C se trouve dans un état supercritique (se trouver à la fois à l'état liquide et gazeux) (**Fig.8**) (Penchev, 2010).

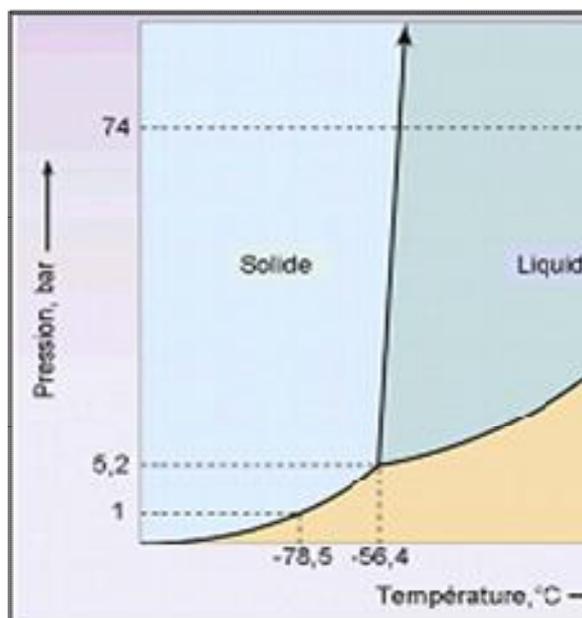


Fig.8 : Diagramme de phase de CO₂ (Penchev, 2010)

Le fluide obtenu est inerte, non inflammable et non-toxique, et chimiquement stable, il est caractérisé par une grande diffusivité, ce qui lui confère une bonne aptitude à la dissolution, et une densité élevée qui le dote d'une capacité de transport et d'extraction importante (Marouf et Tremblin, 2009, Penchev, 2010).

La matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ liquéfié est injecté. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion, la pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et il est complètement éliminé (**Fig. 9**). L'extract, ainsi obtenu est proche du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant (Mohammedi, 2006, Marouf et Tremblin, 2009).

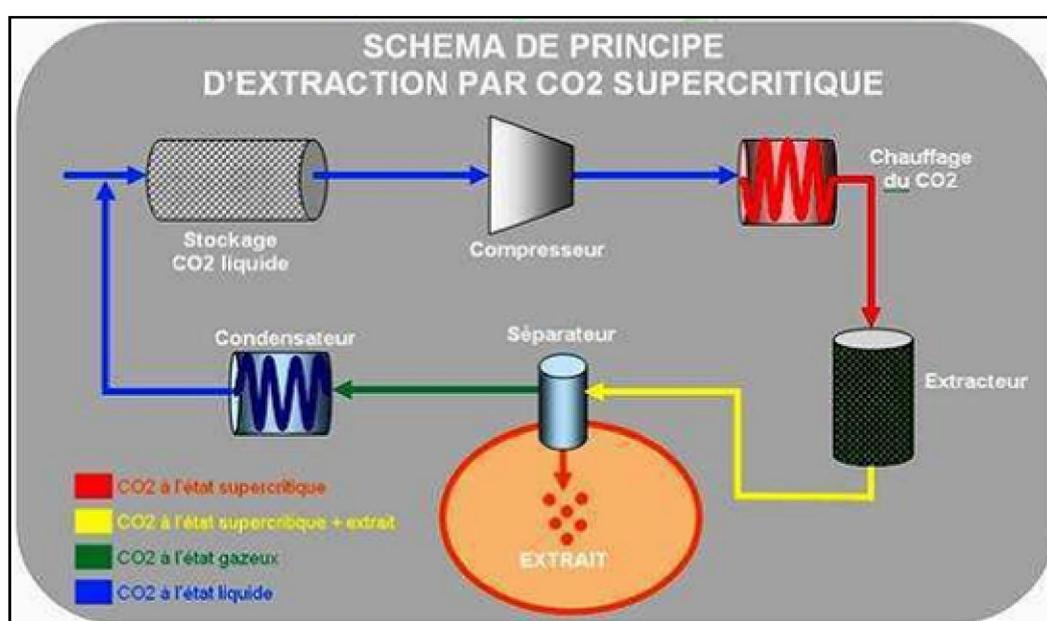


Fig.9 : schéma de principe d'extraction par CO₂ supercritique (Duval, 2012)

2.5. Les propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont une saveur acre et une odeur pénétrante, généralement incolores ou jaune pâle à l'état liquide et à température ordinaire (Rhayour, 2002). Elles sont inflammables, volatiles à une légère chaleur, et les taches qu'elles forment sur le papier se dissipent par l'évaporation.

La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieure à celle de l'eau et sont entraînable à la vapeur d'eau ; il existe, cependant, des exceptions telles que les huiles essentielles de Safran, de Girofle et de Cannelle dont la densité est supérieure à celle de l'eau. Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé (Duraffourd et *al.*, 1990 ; Salle et Pelletier, 1991).

La densité nous renseigne, selon Garnero (1996), sur la composition chimique : ainsi une densité inférieure à 0.9 indique la présence, dans cette huile, de composés terpéniques et aliphatiques à des taux élevés, alors qu'une densité supérieure à 1 indique une composition très variée en composés terpéniques polycycliques.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools, l'éther et les huiles fixes (Boronzio, 2008). Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (Jacques et Paltz, 1997 *In* Rhayour, 2002).

Les huiles essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeurs se modifient, leurs points d'ébullition augmentent et leurs solubilités diminuent. Elles absorbent le chlore, le brome et l'iode en dégageant de la chaleur (Duraffourd et *al.*, 1990).

2.6. La composition chimique des huiles essentielles

Les avancées spectaculaires réalisées ces dernières décennies dans le domaine de la chimie analytique ont permis de montrer que chaque huile essentielle était constituée de dizaines, voire de centaines de composés aux structures chimiques très diversifiées (Fernandez et Chemat, 2012).

Les huiles volatiles d'agrumes comprennent plus de 150 composés (Bousbia, 20013). Cependant ces huiles sont associées aux saveurs et arômes caractéristiques des agrumes. Chimiquement parlant, il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils (Labaniya, 2008).

Les composants principaux chez les agrumes sont presque toujours le limonène et le citral déterminant l'odeur des citrus, ils sont souvent accompagnés de β -pinène, de γ -tèrpinène, d' α -tèrpinéol et de tèrpinéol-4 (Teuscher et *al.*, 2005)

En fonction de leur teneur en limonène, les agrumes ont pu être scindés en deux groupes (Bart, 2001) :

- Le premier groupe avec les huiles d'orange (douce et amère), de pomelo et de tangerine présente des teneurs en limonène supérieures à 90% ;
- Le deuxième groupe comprenant les huiles de citron ou de bergamote présente des teneurs en limonène inférieures à 70%.

2.7. Les facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- **facteurs intrinsèques**, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, au degré de maturité et l'âge du végétal concerné. Chez les agrumes, les essences de très jeunes fruits sont riches en linalol, celles des fruits murs contiennent davantage de limonène (Praleron, 1971).
- **facteurs extrinsèques** pouvant influencés la composition chimiques et le rendement des huiles essentielles sont : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, ainsi que la méthode d'extraction.

En 1987, Huang et *al.* In Besombes, 2008, ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles obtenues dans le cas de 4 méthodes appliquées à la bergamote de Chine ; la composition est relativement variable, malgré une présence majoritaire de limonène.

L'hydro-distillation est responsable de nombreuses transformations et de la naissance de nouveaux composés qui n'existaient pas dans l'essence d'origine. En milieu aqueux, à l'ébullition l'acétate de linalyle est hydrolysé en linalol. Ce sont les essences extraites aux solvants ou par grattage froid des écorces, sans addition d'eau, qui subissent le moins de modification (Praleron, 1971).

Selon Bruneton, 1999 In Hellal, 2010, les citrus ont une teneur importante en huile essentielle lorsque la température est élevée.

2.8. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles d'agrumes occupent une place très importante comme source de matière première aromatique dans plusieurs secteurs : la parfumerie, l'industrie alimentaire, les traitements médicaux ainsi qu'en lutte biologique en agriculture :

2.8.1. En phytothérapie

Les huiles essentielles sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux) (Buronzo, 2008, Marouf et Tremblin, 2009). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Sourai, 1989 *In* Rhayour 2002).

Des études très récentes ont montré que le géraniole a une action sur les cellules cancéreuses du colon (Marouf et Tremblin, 2009), en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence (Siani et *al.*, 1999 *In* Rhayour 2002).

2.8.2. En agro-alimentaire

Les traitements technologiques, surtout thermiques provoquent dans la plus part des cas des pertes d'arômes, entraînant une modification organoleptique du produit. Pour pallier à cette déficience, des ajouts d'huile essentielle sont souhaités. Dans le cas des boissons non alcoolisées, les huiles essentielles incorporées jouent le rôle d'agents d'aromatisation, d'autre part les huiles essentielles servent d'aromatisant en pâtisserie et confiserie (Medjber et Djoudi, 1995).

2.8.3. En parfumerie et cosmétologie

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles confèrent à ces dernières une consommation importante. Actuellement, près de 300 huiles essentielles ont une importance commerciale et sont utilisées en parfumerie ou dans les produits cosmétiques (Marouf et Tremblin, 2009)

Les huiles essentielles sont utilisées dans les parfums, les shampoings, les dentifrices, les savons, les produits détergent ainsi que dans les crèmes et les gèles (Medjber et Djoudi, 1995, Rhayour, 2002, Marouf et Tremblin, 2009,).

2.8.3. En agriculture

Face à l'inquiétude de plus en plus croissante des consommateurs vis-à-vis des pesticides synthétiques, l'alternative est de se tourner vers des pesticides naturels basés sur des huiles essentielles ou sur certains de leurs constituants.

Regnault-Roger et Hamraoui (1995) *In* Chiasson et Beloin, 2007, ont observé l'effet du linalool, du thymol et du carvacrol sur la fécondité et le nombre d'œufs pondus du bruche du haricot. Il y a eu également inhibition complète de la pénétration des larves dans les grains traités de linalool et de thymol. De plus, ce dernier produit s'est avéré inhibiteur de l'émergence des adultes.

Deuxième partie :
Partie expérimentale.

Matériels et méthodes.

Matériels et méthodes

1.4. Objectif de l'essai

L'objectif de ce travail est la valorisation des fruits de porte-greffes d'agrumes par extraction des huiles essentielles à partir des écorces de trois espèces d'agrumes (*Citrus aurantium*, *Citrus volkameriana* et citrumelo 4475) et la caractérisation quantitative et qualitative des huiles essentielles extraites.

1.5. Matériel végétal

Les fruits d'agrumes, *Citrus aurantium* (bigaradier), *Citrus volkameriana* (citron volkamer) et Citrumelo 4457, proviennent de la station expérimentale de l'Institut des Techniques d'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (I.T.A.F.V.) située dans la région de Beni-Tamou dans le Nord de la wilaya de Blida. La récolte a été réalisée en pleine maturité des fruits et d'une façon aléatoire le 20 janvier 2015.

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, puis séchées dans un endroit aéré, à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 jours.

1.3. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles des trois espèces étudiées ont été obtenues au laboratoire de Biotechnologies des Plantes Médicinales et Aromatiques et des Produits Naturels par hydro-distillation avec un appareil de type Clévenger à partir d'une masse végétale de 80g d'écorce séchée à raison de trois répétitions par espèce.

Un échantillon de 80 g d'écorce sèche avec 350 ml d'eau distillée est introduit dans un ballon de 500 ml, le tout est porté à ébullition pendant trois heures. L'huile essentielle entraînée à la vapeur d'eau est condensée au niveau de réfrigérant et elle se sépare de l'hydrolat par différence de densité. Les huiles récupérées sont stockées dans des **eppendorfs** transparentes couverts en papier aluminium et hermétiquement fermés pour éviter le contact avec l'air et la lumière, qui sont des facteurs de dégradation, en suite les conservées au réfrigérateur à 4°C.

1.4. Les paramètres étudiés

1.4.1. La teneur en eau

La teneur en eau est déterminée à partir d'un poids de 36g d'écorce fraîche pour les trois espèces à l'étuve à 50°C pendant 7 jours jusqu'à la fixation du poids.

Le taux d'humidité est exprimé par la formule suivante :

$$TH\% = 100 - 100 P_s * P_f$$

Où :

- TH% : taux d'humidité
- P_s : poids sec
- P_f : poids frais

1.4.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la matière végétale sèche traité. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R_{HE}\% = 100 P_{HE} / P_{MVS}$$

Où :

- R_{HE}: Rendement en huile essentielle (%);
- P_{HE}: Masse de l'huile essentielle (g);
- P_{MVS} : Masse de la matière végétale sèche (g).

1.4.3. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques : aspect, odeur, couleur, des huiles essentielles obtenues sont notées.

1.4.4. Grandeurs physico-chimiques

1.4.4.1. Les grandeurs physiques

1.4.4.1.1. Densité

La densité relative à une température de 20°C d'une huile ou d'une graisse est le quotient de la masse dans l'atmosphère d'un certain volume de cette huile ou à une température donnée t par la masse du volume égal d'eau à la même température

La densité ou densité relative d'une substance ou huile essentielle est le rapport entre la masse d'un volume donné de cette substance et la masse d'un volume égal d'eau distillée à une température de 20°C (Pharmacopée européenne (01/2008 :20205), 2008 ; Fernandez et Chemat, 2012).

Où

$$d_{20}^{20} = M_{HE} / M_E$$

- d_{20}^{20} : densité à 20°C
- MHE : la masse d'un volume donné d'huile essentielle
- ME : la masse de même volume d'eau

On a effectué des pesés d'un volume de 50µl d'huile essentielle pour chaque espèce et le même volume d'eau distillée, avec deux répétitions.

1.4.4.1.2. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré à une température de référence (Pharmacopée européenne (01/2008 :20206), 2008). La température de référence est de 20°C, sauf pour les huiles essentielles qui ne se trouvent pas à l'état liquide à cette température.

La mesure des indices de réfraction de nos échantillons a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre. La prisme du réfractomètre est nettoyé après chaque mesure à l'éthanol et étalonné à l'eau distillée.

L'indice de réfraction n_D^t , à la température de référence $t = 20^\circ\text{C}$, est donné par l'équation suivante :

$$n_D^t = n_D^{t'} + 0,0004 (t' - 20)$$

Où : $n_D^{t'}$ est la valeur de lecture obtenue à la température t' , à laquelle a été effectuée la détermination

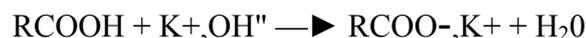
1.4.4.2. Les grandeurs chimiques

1.4.4.2.1. L'indice d'acide

La mesure de l'indice d'acide (Ia) est une mesure importante dans le contrôle des huiles essentielles. Il est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de corps gras.

A. Principe

La détermination de l'indice d'acide est basée sur le titrage des acides gras libres présents dans une prise d'essai à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium en milieu non aqueux, selon l'équation suivante :



B. Protocole

Dissoudre une prise d'essai de 0,2 g d'huile essentielle dans 10 ml du mélange oxyde diéthylique / éthanol, ajouter 2 gouttes de phénolphtaléine.

Titrer, en agitant, avec la solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose persistante de la phénolphtaléine).

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

$$I_a = V \times C \times \frac{56,11}{m}$$

Où :

- **56,11** : est la masse molaire, exprimée en grammes par mole, de l'hydroxyde de potassium ;
- **V** : est le volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisé ;
- **C** : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée ;
- **m**: est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

1.4.5. Détermination de la composition chimique

1.4.5.1. Par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie sous toutes ses formes représente un moyen d'identification et de séparation très efficace fréquemment utilisée pour l'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles.

Les analyses chromatographiques ont été effectuées au laboratoire de Technologie Alimentaire de l'ENSA- ex INA, à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 µm d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et d'un injecteur split splitless réglé à 250°C. Le gaz vecteur est l'azote à 1 ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite de 1/50, débit de 66 ml/min). La température de la colonne est programmée de 50°C(3mn) à 250°C à raison de 2°C/min, puis est maintenue à 250°C pendant 10 min. La quantité d'huile essentielle injectée est de 1 µl pour chaque espèce.

La détermination des composés chimiques détectés a été réalisée par comparaison des temps de rétention des pics enregistrés à ceux des étalons disponible. D'autres pics sont identifiés en se basant sur leurs indices de Kovàts (IK).

L'indice du Kovàts est nommé d'après le chimiste suisse Ervin Kovàts, qui a présenté ce concept dans les années 1950 tout en effectuant des recherches sur la composition des huiles essentielles. Il est utilisé pour convertir les temps de rétention en constantes indépendantes du système.

Les IK (ou indice de rétention) sont déterminés en injectant un mélange des alcanes de C9 à C24 dans les mêmes conditions opératoires (Jalali, 2007, *In* Bencheqroun et *al*, 2012), En général, la technique des indices de Kovats est largement employée pour identifier les composés habituels des huiles essentielles. Des tables d'indice de Kovats spécifiques à chaque produit sont proposées dans la littérature. Elles ont été élaborées en utilisant des analyses sur différents types de colonnes (Bencheqroun et *al*, 2012)

Les indices Kovats sont des valeurs accordées en fonction du type de composé et du type de colonne utilisée. Chaque composé a donc son propre indice Kovats, ce qui peut permettre son identification. L'indice de Kovats est défini par la relation suivante (Figueredo, 2007, Kim-An, 2011):

$$IK = 100 n + 100 \times \frac{Tr[A] - Tr [Cn]}{Tr[C(n+1)] - Tr [Cn]}$$

Où :

- **IK** est l'indice de Kovats ;
- **n** est le nombre de carbones de la paraffine précédant immédiatement le composé étudié ;
- **Tr [A]** est le temps de rétention du composé étudié ;
- **Tr [Cn]** est le temps de rétention de la paraffine précédant immédiatement le composé étudié;
- **Tr [C(n+1)]** est le temps de rétention de la paraffine à n+1 atomes de carbone suivant immédiatement le composé.

1.4.5.2. Par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS)

La composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des l'huiles essentielles étudiées a été déterminée au niveau du laboratoire centrale de SEAAL de Kouba, à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CPG/SM) de type Shimadzu QP2010, les analyses ont été réalisées en mode ionisation par impact électronique (EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV en utilisant l'acquisition en mode SCAN. La colonne utilisée est une OV 17 de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Les injections ont été faites en mode splitless. L'hélium -25-

a été employé comme gaz vecteur à un débit de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ la température de la colonne est de 60 à 220°C à raison de $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en mode splitless.

Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert sont de 250 et 220°C. La température du four a été programmée comme suit : la température initiale de la colonne est de 60°C maintenue en isotherme pendant 4 min puis augmentée à raison de $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ pour atteindre 220°C. Le volume injecté de l'huile essentielle est de 1 μL diluée dans 10 ml d'éthanol de masse volumique égale à 0,75g/l.

Il est à noter que seule les huiles essentielles de *Citrus volkameriana* et Citrumelo 4475 qui sont analysées par GC-MS.

Les composés des huiles essentielles étudiées sont identifiés par comparaison de leurs indice de rétention (Tr) avec ceux des composés chimiques répertoriés dans la bibliographie (Goodner, 2007, Babushok et *al.*, 2011).

1.4.5.3. Par spectrométrie infrarouge à transformée et fourrier (FTIR)

L'analyse par infrarouge est une méthode d'analyse structurale qui révèle la nature des liaisons entre atomes dans une molécule.

Les analyses de FTIR ont été réalisées au niveau du laboratoire de Biotechnologies des Plantes Médicinales et Aromatiques et des Ressources Naturels.

Les échantillons à analyser ont été réalisé sur des pastilles de bromure de potassium (KBr).

Résultats et discussion.

II. Résultats et discussions

2.1. Détermination de la teneur en eau

Les végétaux sont connus par leur richesse en eau elle présente une partie majoritaire de leur composition.

Tab.1 : Teneur en eau de l'écorce du fruit de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475.

Espèce	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Citrumelo 4475
Taux d'humidité %	79,254	65,682	68,729

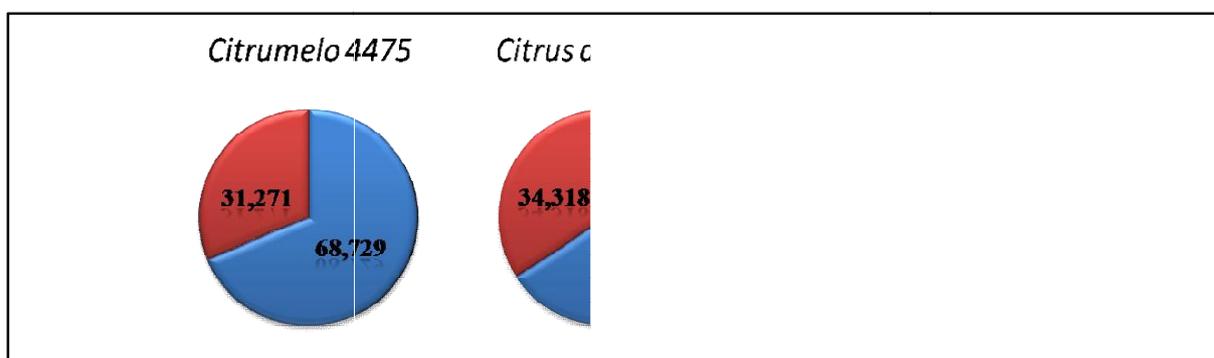


Fig. 10: Teneur en eau et en matière sèche de l'écorce du fruit de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium*, Citrumelo 4475.

Les analyses des écorces du fruit des 3 espèces étudiées relèvent un taux d'humidité supérieur à 50% (**Fig. 10**). Il est de 79.254 %, 65.682 % et 68.729% respectivement chez le *Citrus volkameriana*, le *Citrus aurantium* et le Citrumelo 4475 (**Fig.10 et Tab.1**). Le *Citrus volkameriana* présente le taux d'humidité le plus élevé.

2.2. Le rendement en huile essentielle

Les huiles essentielles des 3 espèces d'agrumes étudiées, *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium*, Citrumelo 4475, sont obtenues par hydrodistillation, cette méthode est la plus utilisée, environ 80% des cas, car elle est la plus économique (Kaloustian, et Hadji-Minaglou, 2012). Le tableau 2 résume les rendements moyens en huiles essentielles extraites.

Tab.2 : Rendement moyen de l'écorce du fruit de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium*, Citrumelo 4475.

Espèce	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Citrumelo 4475
Rendement moyen %	1,104 ± 0.043	1,073 ± 0,120	0,913 ± 0.072

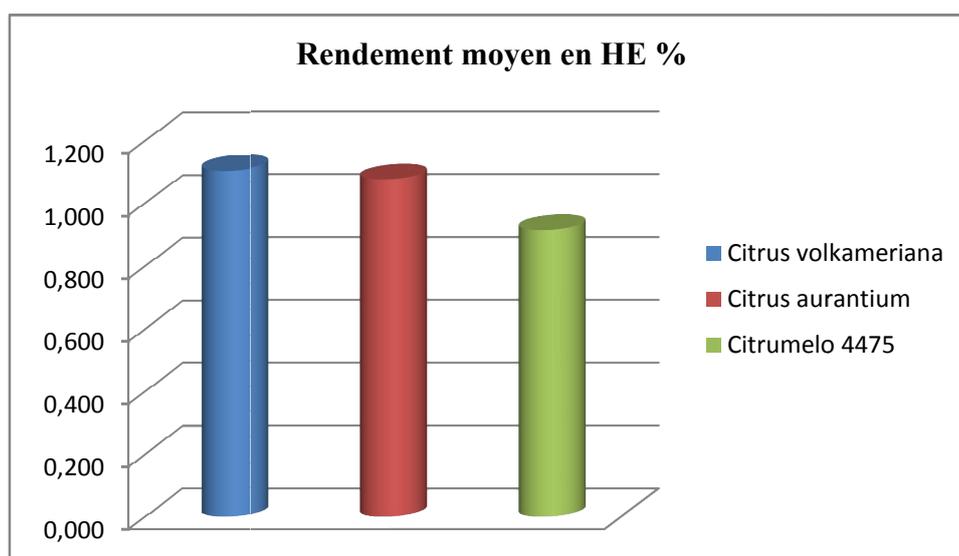


Fig.11 : Histogramme du rendement moyen en huile essentielle de l'écorce du fruit de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium*, Citrumelo 4475.

Le rendement moyen en huile essentielle de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium*, et Citrumelo 4475, obtenu sont de l'ordre de 1,104 %, 1,073 % et 0,913 % respectivement (Fig.11). Cependant, Himed, 2011 a obtenu chez le citronnier une quantité d'huile essentielle de 2,18%, alors que Sayah et al. 2014 et El-Khal et al., 2014 ont mentionné les deux un rendement moyen de 1,2 chez le *Citrus aurantium*.

Selon Rega et al., 2003 In Hellal, 2011, le rendement chez les Citrus différent selon les espèces, et ils ont signalé des rendements de 1 à 3 %. Par contre, et selon Hellal, 2011 et Drareni, 2013 ont observé des rendements moyen allant de 0,4 à 0,6 chez le *Citrus aurantium*.

Cette différence pourrait être expliquée par plusieurs facteurs. Le choix de la période de récolte, les conditions pédo-climatiques, l'organe utilisé, la durée de séchage, les stress biotiques, ainsi que la méthode d'extraction affectent d'une façon notable la qualité et la quantité des huiles essentielles.

Selon Himed 2011, l'extraction des huiles essentielles à partir du zeste de citron par deux procédés : pression à froid et hydrodistillation, révèle une différence significative, cependant, la pression à froid a donnée un rendement moyen de 1,02% tandis que l'hydrodistillation a donnée le double avec 2,18% donc il est intéressant de procéder à l'extraction des huiles essentielles de citron par hydrodistillation. Kuate et *al.*, 2003 ont observé une diminution du rendement en huile essentielle de l'oranger au fur et à mesure que le degré d'attaque de la cercosporiose, sur le fruit, augmente

L'extraction par le gaz carbonique supercritique engendre des rendements supérieurs sur des huiles essentielles caractérisées par un profil organoleptique naturel, néanmoins l'utilisation de cette méthode reste limitée dans la pratique industrielle pour des raisons économiques (Djenane et *al.* 2011)

2.3. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 sont regroupées dans le tableau 3.

Tab. 3 : Caractéristiques organoleptiques de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475

Spécification	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Citrumelo 4475
Aspect	Liquide, mobile, limpide		
Couleur	Jaune citronné	Jaune citronné claire	
Odeur	Agréable, fraîche et fruité		

2.4. Grandeurs physico-chimiques

L'évaluation de la qualité des huiles essentielles est réalisée par la mesure d'un certain nombre d'indice et des analyses chromatographiques.

2.4.1. Les grandeurs physiques

Les résultats de la détermination des grandeurs physiques des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475, obtenues par hydrodistillation à partir des écores séchées, sont regroupés dans le tableau 4.

Tab. 4 : Grandeurs physiques des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475.

Spécification	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Citrumelo 4475
Densité relative d_{20}^{20}	0,853	0,878	0,861
Indice de réfraction n_D^{20}	1,472	1,471	1,473

Au vu des résultats obtenus, on observe que les paramètres physiques déterminés se rapprochent de ceux de la littérature, sauf pour la densité relative de *Citrus aurantium* qui est légèrement élevée 0,878 (**Tab.5**)

Tab. 5 : Résultats de quelques recherches précédentes sur les huiles essentielles des Citrus ainsi que ceux données par la pharmacopée européenne.

		Densité relative d_{20}^{20}	Indice de réfraction n_D^{20}
Le Pomelo : <i>Citrus paradisi</i>	A	0,8519	1,478
	B	0,852 à 0,860	1,4740 à 1,4790
le Citronnier : <i>Citrus limon</i>	B	0,85 à 0,858	1,473 à 1,4760
	D	0, 855	1,472
	C	0,850 à 0,858	1,473 à 1,476
Le mandarinier : <i>Citrus reticulata</i>	C	0,848 à 0, 855	1,474 à 1,478
Le bigaradier : <i>Citrus aurantium (fleur)</i>	C	0,863 à 0,880	1,464 à 1,474
Le bigaradier : <i>Citrus aurantium (fruit)</i>	D	0,857	1,476
L'oranger doux : <i>Citrus sinensis</i>	C	0,842 à 0,850	1,464 0 1,474
	D	0,852	1,473
	A	0,84	1,4720

A : Marouf, 1990 ; B : Medjber et Djoudi, 1995 ; C : Pharmacopée européenne, 2008 ; D : Hellal, 2011.

Un indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivées oxygénés, une forte teneur en monoterpènes donnera un indice de réfraction élevée (Boukhatem et al., 2010). Un faible indice de réfraction d'une huiles essentielle indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (Kanko et al., 2004 In. Boukhatem et al., 2010).

2.4.2. Les grandeurs chimiques

La connaissance des indices chimiques donne des indications assez précises sur l'huile étudiées ainsi l'indice d'acide indique la quantité des acides libres présents dans une huile. Le

tableau 6, présente l'indice d'acide des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475.

Tab.6 : Indice d'acide des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475.

Spécification	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Citrumelo 4475
Indice d'acide (Ia)	3,927	1,122	2,244

L'huile essentielle de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 présente un indice d'acide de 3,927, 1,122 et 2,244 respectivement. Ces valeurs restent proche des normes des *Citrus*, Selon les normes de la Pharmacopée européenne, 2008 l'indice d'acide de l'huile essentielle de néroli (extraite à partir des fleurs) de doit pas dépassé la valeur de 2.

Pour le *Citrus volkameriana* et le Citrumelo 4475, l'indice d'acide demeure légèrement élevé, cela peut trouver une explication dans la dégradation de l'huile essentielle (hydrolyse des ester) durant la conservation. Cependant, ils peuvent être conformes puisque aucun travail n'a été réalisé sur ces deux espèces.

2.5. Détermination de la composition chimique

2.5.1. Par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et GC-MS :

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles étudiées par la CPG a révélée la présence de 25, 26 et 32 composés chimiques respectivement chez le *Citrus volkameriana*, le *Citrus aurantium* et le citrumelo 4475 (Tab. 7).

L'identification des composés a été faite par le calcul des indices de Kovats pour chaque composé de chaque espèce, alors que la confirmation des composés identifiés est réalisée par l'analyse des huiles essentielles par la GC-MS.

Les résultats des analyses chimiques (CPG et GC-MS), après identification, des trois huiles essentielles étudiées ont montrés que chez le *Citrus volkameriana*, le *Citrus aurantium* et le citrumelo 4475 des valeurs de 96,454%, 96,051% et 96,019% respectivement (Tab.7). Ils font ressortir, d'une part que le limonène est le composé majoritaire des huiles essentielles de *Citrus volkameriana* (72,027%), *Citrus aurantium* (83,82%) et le Citrumelo 4475 (68,077%)

(Tab.7), et d'autre part les hydrocarbures monoterpéniques une grande partie des composés identifiés.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Drareni, 2013, El-Khal et *al.*, 2014 qui ont obtenus des valeur respectives de limonène de : 70,33% et 90,0% chez le *Citrus aurantium*. Hellal, 2011, mentionne un taux de limonène très faible chez le *Citrus aurantium* de l'ordre de 2,2%, alors qu'il cite deux composés majoritaires le linalol et l'acétate de linalyl, les deux représente 60,7%.

Marouf (1990) rapporté pour le *Citrus limon* (citronnier géniteur de *citrus volkameriana*) et le *Citrus paradisi* (pomelo géniteur de Citrumelo 4475) des teneurs en limonène de 73,036% et 69,966% respectivement. Ces résultats sont proche de ceux obtenus dans notre étude concernant le *Citrus volkameriana* et le Citrumelo 4475.

Tab.7 : Les composés chimiques des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 identifiés par la CPG et la GC-MS

Composé	IR	<i>Citrus volkameriana</i>			<i>Citrus aurantium</i>			Citrumelo 4475		
		Tr(CPG)	T%	IR _C	Tr (CPG)	T%	IR _C	Tr(CPG)	T%	IR _C
α -Thujène	931 ^a	13,53	0,23	931,29	-	-	-	-	-	-
Camphène	939 ^a	13,92	0,757	937,81	13,86	0,35	937	13,91	0,65	938
Sabinène	974 ^a	-	-	-	16,29	0,13	977	16,27	0,30	977
β -Pinène	977 ^a	16,349	1,395	978,411	16,48	0,42	981	16,54	1,64	982
Myrcène	992 ^a	17,51	1,337	997,88	17,47	1,38	997			
α -Phellandrene	1004 ^a	-	-	-	-	-	-	17,65	9,64	1000
Carène	1007 ^a	18,21	0,218	1008,28	-	-	-	-	-	-
Hexyl acétate	1011 ^a	-	-	-	18,16	0,31	1008	18,38	0,79	1011
α -Terpinène	1017 ^a	19,20	0,345	1022,59	-	-	-	19,02	0,73	1020
1,8-Cineol	1030 ^a	19,77	1,276	1030,75	-	-	-	-	-	-
Limonène	1033 ^a	20,38	72,027	1039,67	20,51	83,82	1041	20,64	68,08	1043
α -Ocimène	1043 ^a	20,72	0,097	1044,62	-	-	-	-	-	-
γ -Terpinène	1050.3-1059.7 ^b	21,43	0,314	1054,82	21,42	0,22	1055	21,61	1,35	1057
cis-Sabinène hydrate	1066 ^a	22,20	6,249	1066,02	22,12	0,09	1065	22,18	0,48	1066
α -Terpinolène	1079,3 - 1086,9 ^b	-	-	-	23,11	0,20	1079	23,14	0,06	1080

δ -Terpinène	1090 ^a	24,22	0,677	1095,15	-	-	-	-	-	-
Linalool	1086,3 - 1099 ^b	-	-	-	24,22	0,09	1095	24,24	0,16	1095
Nonanal	1083,8 - 1103,3 ^b	25,08	1,045	1107,46	25,16	2,49	1109	25,15	1,12	1108
Sabinène hydraté	1110 ^a	25,31	0,386	1110,69	-	-	-	-	-	
(R)- Citronellal	1133,6 - 1153,7 ^b	28,84	1,272	1159,97	-	-	-	27,88	0,05	1147
Limonen-4-ol	1158,2 - 1177,3 ^b	-	-	-	-	-	-	28,84	0,13	1160
α-Tèrpéneol	1189 ^a	30,62	1,948	1184,92	30,63	0,17	1185	-	-	-
β-Fenchol	1192 ^a	31,58	1,082	1198,35	31,64	0,61	1199	-	-	-
Décanal	1205,4 ^b	32,14	0,767	1206,28	32,19	0,09	1207	32,12	0,13	1206
Linalooloxide	1212 ^a	32,58	0,141	1212,64	-	-	-	-	-	-
Nérol	1229 ^a	33,49	0,509	1225,59	33,60	0,17	1227	33,63	0,14	1228
Citronellol	1235 ^a	34,33	1,076	1237,74	34,38	0,20	1238	34,40	1,01	1239
Acétate de linalyl	1244 ^a	34,69	2,54	1242,84				34,70	0,13	1243
Cétral	1246 ^a	-	-	-	35,34	0,38	1252	35,13	0,07	1249
Géranol	1266 ^a	-	-	-	36,31	0,86	1266	36,19	0,15	1264
α-Cubebene	1345 ^a	-	-	-	41,64	2,14	1344			
Nerylacetate	1343,8 - 1362,9 ^b	-	-	-	42,98	0,46	1364	41,95	0,13	1348
Acétate de géranyl	1377 ^a	43,61	0,101	1372,96	43,77	0,18	1375			
α-Copaene	1424-1435 ^b	-	-	-	47,58	0,12	1433	47,60	3,99	1433
Geranylacetone	1448 ^a	-	-	-	48,46	0,14	1447			
α-Humulene	1449,3 - 1453,1 ^b	-	-	-	-	-	-	48,34	0,11	1445

β - Caryophyllène	1467 ^a	48,45	0,151	1473,87	-	-	-	49,82	0,89	1468
D-Germacrene	1475,9 - 1480,6 ^b	-	-	-	-	-	-	51,46	0,70	1493
β -Farnesene	1500 ^a	-	-	-	-	-	-	52,22	0,26	1505
β -Bisabolene	1499-1508,4 ^b	-	-	-	-	-	-	52,44	0,52	1509
Nerolidol	1539 ^a	-	-	-	-	-	-	54,09	0,17	1536
Oxyde de caryophyllène	1573 ^a	56,70	0,514	1578,74	56,63	0,31	1577	56,26	1,45	1571
α -Humuleneoxide	1598 ^a	-	-	-	-	-	-	57,80	0,26	1597
(-)-Cubenol	1645 ^a	-	-	-	-	-	-	60,51	0,23	1645
β -Bisabolol	1666 ^a	-	-	-	-	-	-	61,62	0,10	1665
α -Cadinol	1676 ^a	-	-	-	-	-	-	62,29	0,39	1677
Syringol	1948 ^a				76,698	0,1267	1948			
Totale %			96,454			96,051			96,019	
a : Goodner, 2007, b : Babushok et al, 2011										

En plus du limonène, d'autres composés figurent dans la composition des trois huiles essentielles : camphène, β -pinène, γ -terpinène, cis-sabinène hydraté, nonanal, décanal, nérol, et oxyde de caryophyllène. Ces composés sont présents à des pourcentages variables :

- le *Citrus volkameriana* présente les taux les plus élevés concernant : le cis sabinène hydraté (6,24%), et le décanal (0,767%) ;
- le camphène, le citronellol et β -pinène représentent des valeurs proches chez le *Citrus volkameriana* et le Citrumelo 4475 avec des valeurs respectives de 0,757 et 0,65 % pour le camphène et 1,395 et 1,64 pour le β -pinène.
- le *Citrus aurantium* présente les taux les plus élevés concernant le nonanal (2,46%) tandis que les autres composées ne représente que de faible quantité voir des traces ;
- le Citrumelo 4475 présente les taux les plus élevés concernant : γ -terpinène (1,35%) et l'oxyde de caryophyllène (1,45%).

La comparaison du profil chromatographique (annexe II) et la composition chimique des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 (Tab.7) révèle la présence de composés qui existent chez une espèce alors qu'ils sont absents chez les autres :

- D'après les le Tab.7 et les figure I et II (annexe 1), l'huile essentielle de *Citrus volkameriana* est caractérisée par la présence exclusive de : l' α -Thujène (0,23%), le carène (0,218%), le 1.8- cineol (1,276%), trace de l' α -ocimène (0,097%), l' δ -Terpinène(0,677%), et le sabinène hydraté (0,386%) ;
- L'huile essentielle de *Citrus aurantium* est caractérisée par la présence de l' α -cubebène (2,14%) et le syringol (0,1267%) (Tab.7 et Fig.III, annexe I) ;
- L'huile essentielle de Citrumelo 4475 est caractérisée par la présence de α -phellandrène (9,64%), limonène-4-ol (0,05%), α -humulène (0,11%), D-germacrène (0,70%), α -farnesène (0,26%), β -bisabolène (0,52%), α -humulène oxyde (0,26%), (-)-cubenol (0,23%), β -bisabol (0,10%), et α -cardinol (0,39%) (Tab.7 et Fig.IV et V, annexe I).

Ainsi on a constaté la présence de composés en commun entre deux espèces tandis qu'ils sont inexistantes chez la troisième espèce :

- Entre le *Citrus volkameriana* et le *Citrus aurantium*, on trouve le myrcène, l' α -terpénol, β -fenchol, linalool oxyde et l'acétate de geranyl ;
- Entre le *Citrus volkameriana* et le Citrumelo 4475, on trouve l' α -terpénène, le (R)-citrinellal, l'acétate de linalyl, le β -caryophyllène ;
- Entre le *Citrus aurantium* et le Citrumelo 4475, on trouve le sabinène, l'hexyl acétate, le α -terpinolène, le linalool, le nonanal, le géranol, le neryl acétate et l' α -copaène.

L'huile essentielle de Citrumelo 4475 est riche en composés chimiques identifiés, mono et sésquiterpènes, aldéhyde, ester et alcool, comparativement au *Citrus volkameriana* et *Citrus aurantium*, ainsi qu'une grande ressemblance avec l'huile essentielle de *Citrus aurantium* par rapport au *Citrus volkameriana* qui est le résultat de croisement entre le *Citrus aurantium* et le *Citrus limon*.

La différence entre les trois huiles essentielles peut être tributaire d'une part de patrimoine génétique de chaque espèce, des conditions pédo-climatiques et le système cultural, l'âge de la plante et le degré de maturité des fruits et d'autre part au procédé d'extraction et des conditions de stockage. Cependant, on peut dire que parmi ces facteurs, il y a le facteur génétique qui vient en première position puisque les fruits ont été récoltés dans les mêmes conditions (climat, sol et période), et les huiles sont extraites par le même procédé (hydrauldistillation), et conservés dans les mêmes conditions.

2.5.2. Par spectroscopie infrarouge à transformée et fourrier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (Mose-Boroumand, 1999).

Le spectre IR des huiles essentielles montre 15 pics chez le *Citrus volkameriana*, 17 pics chez le *Citrus aurantium* et le Citrumelo 4475, ces pics sont plus intenses chez le *Citrus aurantium* comparativement aux deux autres espèces (**Fig.VI, VII, et VIII**, annexe I).

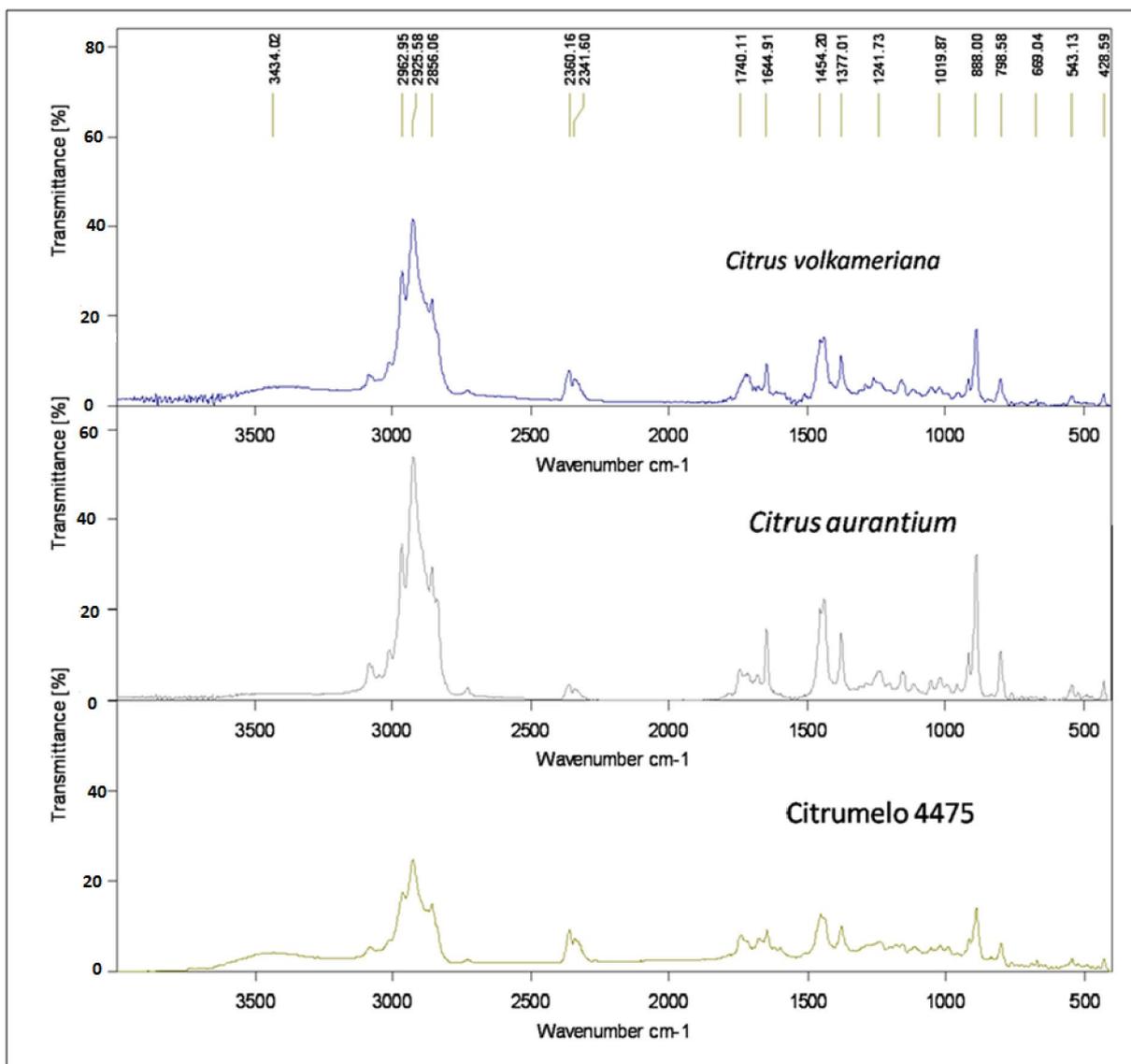


Fig. 12 : spectre IR d'huile essentielle de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475.

Chez le Citumelo 4475 on remarque la présence des deux bandes (669,04 et 2341,60 cm⁻¹) qui n'existent pas chez le *Citrus volkameriana* et *Citrus aurantium*. Le spectre IR de ces deux espèces révèle deux pics vers 913 et 1155 cm⁻¹ qu'on les observe pas chez le Citrumelo 4475 (Fig.12 et Tab.8).

Tab.8 : table spectroscopique IR par nombre d'onde (Capon, 1993).

Type de liaison	Nombre d'onde en cm^{-1}
C-H	2800-3000
C=C	1640-1660
=C-H et =CH ₂	1290-1420
C≡C et C≡N	2200-2300

Les plus intenses pics sont enregistrés comme suit (**Tab.8**):

- vers $2924,35 \text{ cm}^{-1}$, $2923,19 \text{ cm}^{-1}$ et $2925,58 \text{ cm}^{-1}$ respectivement chez *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 correspondant à une vibration d'élongation de type C-H alcane ;
- vers $1644,54 \text{ cm}^{-1}$, $1644,75 \text{ cm}^{-1}$ et $1644,91 \text{ cm}^{-1}$ respectivement chez *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 sont attribués à une vibration d'élongation C=C ;
- vers $887,45 \text{ cm}^{-1}$, $887,53 \text{ cm}^{-1}$ et 888 cm^{-1} respectivement chez *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475 correspondant à une vibration d'élongation de type =C-H.

Conclusion générale.

Conclusion générale

Ce travail s'inscrit dans la valorisation des sous produits des fruits d'agrumes, spécialement les huiles essentielles, et la détermination de ses principes actifs dans le but de trouver des alternatives aux produits chimiques de synthèses utilisés dans différents domaines et surtout la santé humaine et la lutte biologique.

D'après les résultats obtenus, nous mentionnons que le rendement obtenu pour les trois espèces est très intéressant qui sont de 1,104%, 1,073% et 0,913% respectivement chez le *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475.

Concernant les caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques, les huiles essentielles étudiées demeurent conformes aux normes internationales, sauf de légère élévation de la densité pour le *Citrus aurantium* et l'indice d'acide pour *Citrus volkameriana* et le Citrumelo 4475.

Pour la composition chimique des huiles essentielles de *Citrus volkameriana*, *Citrus aurantium* et Citrumelo 4475, notre étude montre la présence de limonène comme composé majoritaire chez les trois espèces mais qui reste plus élevé chez le *Citrus aurantium*, ainsi les trois huiles sont caractérisées par :

- En plus de limonène, composé majoritaire, d'autres composés figurent chez les trois espèces qui sont : camphène, β -pinène, γ -terpinène, cis sabinène hydraté, decanal, néral, cétionellol et oxyde de caryophyllène ;
- La présence de composés chez une espèce alors qu'ils n'existent pas chez les autres espèces, comme les α -thujène et α -ocimène chez le *Citrus volkameriana*, α -cubébène et syringol chez le *Citrus aurantium* et α -phellendrène, α -humulène et β -bisabolène chez le Citrumelo 4475 ;
- La présence de composés en commun en deux espèces tandis qu'ils sont inexistantes chez la troisième espèce.

Par ailleurs, il sera judicieux de confirmer les résultats obtenus avec des études ultérieures plus poussées, en utilisant d'autres méthodes d'identification comme la spectrométrie de masse (MS), Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse en tandem (CPG/SM/SM), et en testant les huiles

essentielles étudiées dans les différents domaines : pharmaceutique, lutte biologique et agroalimentaire.

Il sera intéressant d'étudier en premier lieu d'autres espèces de porte-greffes d'agrumes en utilisant les différentes parties de la plante, feuilles bois, fleurs et fruit, et en deuxième lieu faire des prélèvements à différentes périodes afin de déterminer l'époque de l'année qui sera jugée intéressante pour l'extraction des huiles essentielles selon les fins d'utilisation.

*Références
bibliographiques.*

Références bibliographiques

ANONYME, 2002, Mémonto de l'agronome, Ed. Cirad-Gret , Paris, France p.931.

ANONYME, 2008, Pharmacopée européenne, Tome 1, Méthodes physiques et physico-chimiques, 6^{ème} édition, Nordlingen, Allemagne, pp. 26-27.

ANONYME, 2008, Pharmacopée européenne, Tome 2, Monographie C, 6^{ème} édition, Nordlingen, Allemagne, pp. 1347 ; 1511 ; 1584 ; 1679.

AUBERT B. et VELLIN G., 1994. Pépinière et plantation d'agrumes. Ed . CIRAD, Paris, 184p.

BABUSHOK V. I., LINSTROM P. J., et ZENKEVICH I. G., 2011, Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils, Nat. Inst. of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland 20899, USA, J. Phys. Chem. Ref. Data, Vol. 40, No. 4, 47p.

BEKKIS S., 2008. Etude du développement de quatre espèces d'agrumes sur trois porte-greffes (Citrumelo 4475, Citrumelo 1452 et Mandarinier Cléopâtre). Th. ing. Inst. Nati. Agro., El-Harrach, 125p.

BENAYAD N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Th. Doct. Faculté des Sciences de Rabat, p. 68.

BESOMBES C. 2008, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques, Th. Doct. Univ. de la Rochelle, France, p289.

BOUKHATEM, M.N. MOHAND, S.H. FAIROUZ, S. YAHIA, H. 2010. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Unité de recherche en Biotechnologies Végétales, Univ. Saad Dahleb de Blida, Algérie, p37.

BOUKHEBTI H., CHAKER A. N., BELHADJ H., SAHLI F., RAMDHANI M., LAOUER H. et HARZALLAH D., 2011, Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium L.* and *Mentha spicata L.* essential oils, Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre, 2011: 3 (4) 267-275, p. 10.

BOUSBIA N., 2013, Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires, Th. Doct. Eco. Nat. Sup. Agro. (Ex – INA) El Harrach, p. 127.

BRAT P., 2001, Application du procédé de flash-détente (P) sous vide aux fruits tropicaux et méditerranéens pour la préparation de purées et huiles essentielles, Th. Doct. Univ. Réunion, France, p. 281.

BURONZO A. M., 2008, Grand guide des huiles essentielles : santé, beauté, bien être, Edit. Hachette pratique, paye, p. 244.

CAPON M., COURELLEAU-HAVERLANT V. et VALETTE C., 1993, Chimie des couleurs et odeurs, Edit. Cultures et techniques, p.255.

CHIASSEON H. et BELOIN N., 2007, Les huiles essentielles, des bio-pesticides « nouveau genre », Bulletin de la Société d'entomologie du Québec, vol. 14, n° 1, p. 6.

DESMARES C., 2008, Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles: Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles, France, p.18.

DJARRI L., 2011, Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes algériennes de la famille des *Apiaceae* : *Daucus reboudii* Coss. ex Batt. & Trab., *Kundmannia sicula* (L.) DC. et *Elaeoselinum thapsioides* Maire, Th. Doct. Univ. MENTOURI. Constantine, Algérie, 260 p.

DJENANE D., YANGÜELA J., AMROUCHE T., BOUBRIT S.,BOUSAAD N., RONCALESP., 2011, Chemical composition and antimicrobial effects of essential Oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef, Food Science and Technology International, Vol. 21. N° 102, p. 5.

DRARENI S., 2013, Caractérisation des huiles essentielles de fruit du *Citrus aurantium* et son action sur la bruche de la fève *Bruchus rufimanus* (Coléoptère-Bruchidés), Th. Mast. Univ. Saad DAHLEB-Blida, 52p.

DURAFFOURD C., D'HERVICOURT L. et LAPRAZ J. C., 1990. Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2^{ème} éd. Masson, Paris. p.79.

DURAFFOURD C., D'HERVICOURT L. et LAPRAZ J. C., 1990, Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris. P.....

DUVAL L., 2012, les huiles essentielles à l'officine, Th. Doct. Univ. Médecine et de pharmacie de Rouen, p. 137.

EL-AKHAL F., GUEMMOUH R., GRECHE H. ET EL OUALI LALAMI A., 2014, Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc , J. Mater. Environ. Sci. 5 (S1), pp. 2319-2324.

FARNAZ M-B., 1991, spectroscopie FTIR quantitative de reflectance et transmittance diffuse, th. doct, Ecol. Polytechnique fédérale de Lausanne, Suisse, p. 198.

FERNANDEZ X. et CHEMAT F., 2012, La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation, Edit. Vuibert, Paris, France, p.288.

FIGUEREDO G., 2007. Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Th. Doct. Univ. Blaise Pascal, p 417.

GARNERO J., 1996. Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico -chimiques. vol. papier n°: K2, pp 1-45.

GOODNER K.L., 2007, Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds, Edit. Elsevier. Society of Food Science and Technology. 8p.

HASSANIA K. BENCHEQROUN, GHANMI M., SATRANI B., AAFI A. et CHAOUCH A., 2012, Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 81, pp. 4 – 21.

HELLAL Z., 2011, Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pulchardus*), Mém. Mag., univ. Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, p. 120.

HIMED L., 2011. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine, Th. Mag. Univ. Mentouri, Constantine, Algérie, p.65.

JACQUEMOND C., AGOSTINI D. et CURK F., 2009, Des agrumes pour l'Algérie, Edit. Bureau d'ingénierie en horticulture et agro-industrie (BIHA), p. 104.

JACQUEMOND C. et HEUZET M., 2012, Les clémentiniers et autres petits agrumes, Edit. Quae, France, p. 368.

JAZET-DONGMO P. M., KUATE J., BOYOM F. F., DUCELIER D., DAMESSE F., AMVAM ZOLLO P. H., MENUT C. et BESSIERE J. M., 2002, Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*, *Fruits*, vol. 57, p. 95–104.

KALOUSTIAN J. ET HADJ-MINAGLOU F., 2012. La connaissance des huiles essentielles qualotologie et aromathérapie en science et tradition pour une application pratique médicale raisonnée, collection : phtytotéarapie, édition : Spinger, Paris, pp. 20-30.

KATO T., LIJIMA H., ISHIHARA K., KANEK T., HIRAI K., NAITO Y & OKUDA K., 1990 . Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* Vol. 31 N° 4, pp. 301-307.

KEHAL Farida, 2013, Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche, Mém. Mag. Univ. Constantine, Algérie, p. 77.

KESBI A, 2011, Etude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'*eucalyptus globulus* dans la région de Ouargla, du diplôme de Mast., Univ. Kasdi Marbah, Ouargla, p. 44.

KIM-ANL.-M., 2011. Elaboration de standards objectifs dans l'évaluation des arômes du café en complément aux méthodes subjectives de dégustation, Faculté des études supérieures de, Mém. Mag. Univ. Laval, Québec, p.87.

KUATE J., JAZET-DONGMO P. M., DUCELIER D., DAMESSE F., MENUT C. ET BESSIERE J. M., 2003, Effet de la cercosporiose à *Phaeoramularia angolensis* sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de peau d'orange, *Fruits*, vol. 58, N°. 3, p. 143–149

LABANIYA M. S., 2008. Citrus fruit. Ed. Elsevier Inc., USA, 558 p.

LOUSSERT R., 1989. Les agrumes, tome 1. Arboriculture. Ed. Lavoisier, Beyrouth. 113p.

MAROUF A. et TREMBLIN G., 2009, abrégé de chimie appliquée, edit., EDP sciences, coll. Grenobles sciences, Pp. 133-146.

MAROUF N., 1990, Identification des huiles essentielles de pomelo, d'orange et de citron par chromatographie en phase gazeuse, Th. Ing., ENSA (ex. INA), El-harrache, p.63.

MEDJBER N. et DJOUDI M., 1995, Etude des huiles essentielles d'orange, essai de valorisation, Th. Ing., ENSA (ex. INA), El-harrache, p.61.

NOUIOUA W., 2012, Biodiversité et ressources phylogénétiques d'un écosystème forestier « paeonia mascula(l.) mill.», mém. Mag., Univ. Ferhat Abbas, Sétif, p. 80.

PENCHEV P. I., 2010. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, Th. Doct. Int. Nat. Polytechnique de Toulouse, France, p. 239.

PEYRON L., 1992, Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, pp 217 – 238.

PIERRON C., 1989, Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gérontologie et soins palliatifs, Th. Doct., Univ. Lorraine, France, p.253.

PRALORAN J. C., 1971. Les agrumes. Ed. Maison neuve et Larousse, Paris. 565 p.

RHAYOUR K. 2002, Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Th. Doct. Univ. Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, p161.

SALLE J.L. et PELLETIER J., 1991, Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.

SAYAH M. Y., EL-OUALI LALAMI A., GREECH H., ERRACHIDI F., RODI EL-KANDRI Y. et OUAZZANI CHAHDI F., 2014, Activité Larvicide des Extraits de Plantes Aromatiques sur les Larves de Moustiques Vecteurs de Maladies Parasitaires, International Journal of Innovation and Applied Studies , Vol. 7 N°. 3, pp. 832-842

SMADJA J., 2009, Les huiles essentielles : laboratoire de chimie des substances naturelles et des sciences des aliments, université de réunion, p 52.

SUTOUR S, 2010, Etude de composition chimique d'huiles essentielles et des extraits de menthes de corse et de kumquants, Th. Doct. Univ. de corse, France, p. 222.

TEUSCHER E., ANTON R. et LOBSTEIN A., 2005, Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et leurs huiles essentielles, Ed. Lavoisier, paris, pp 77-88.

Annexe I.

Profil chromatographique des huiles essentielles analysées par CPG et CG-MS.

Citrus volkameriana

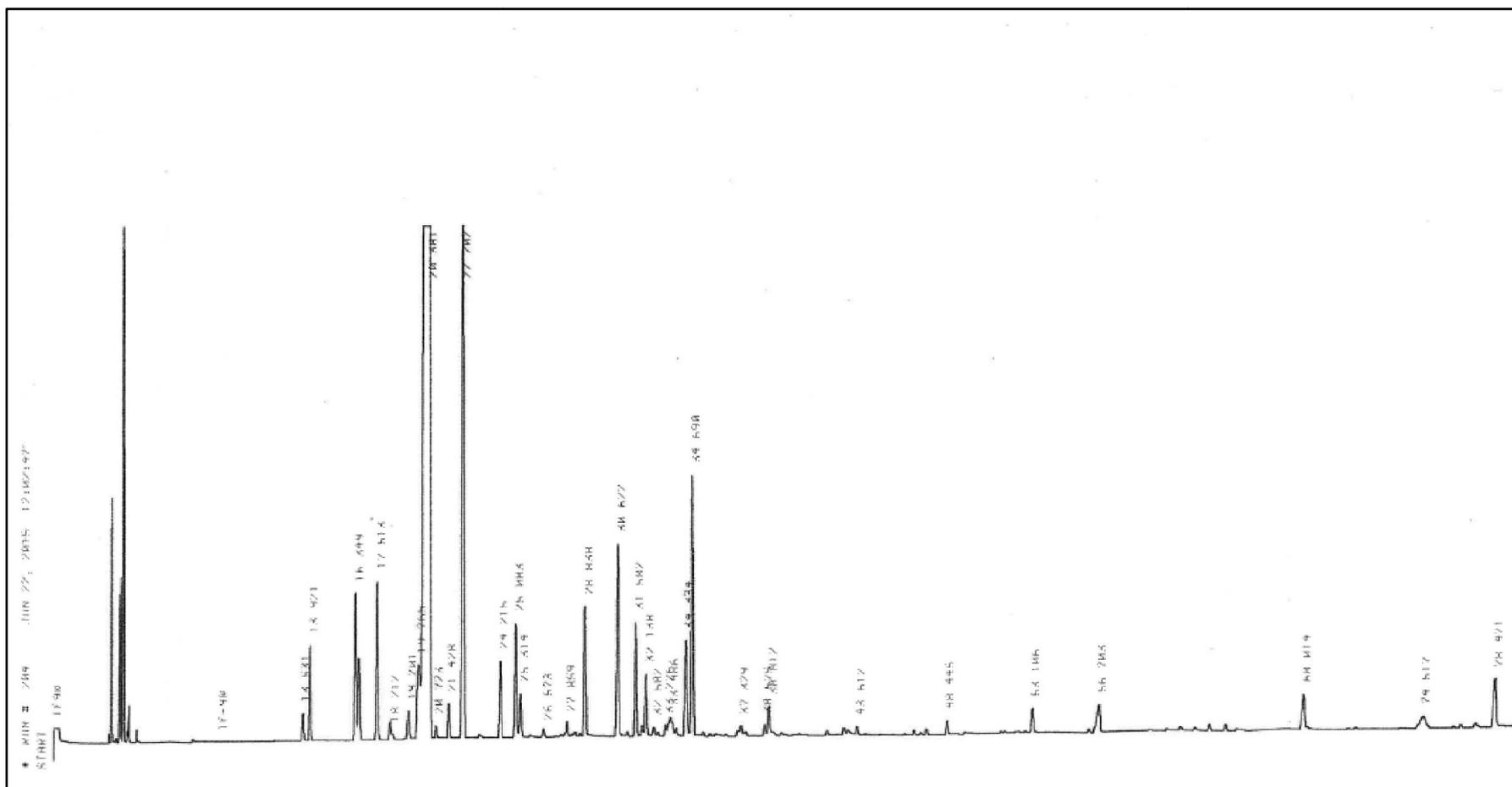


Fig.I: Profil chromatographique d'huile essentielle *Citrus volkameriana* de analysée par la CPG.

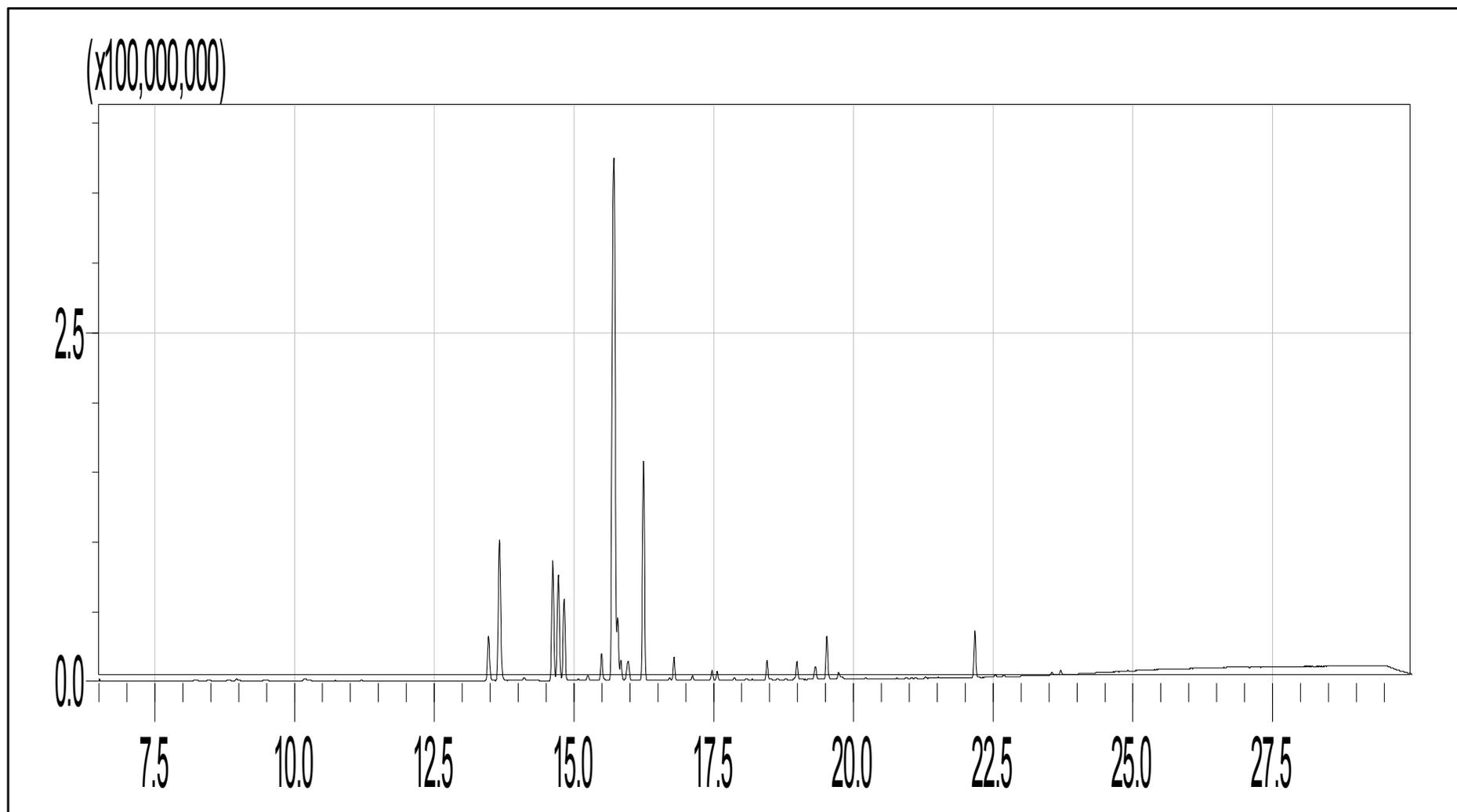


Fig.II : Profil chromatographique d'huile essentielle *Citrus volkamerina* de analysée par la CG-MS.

Citrus aurantium

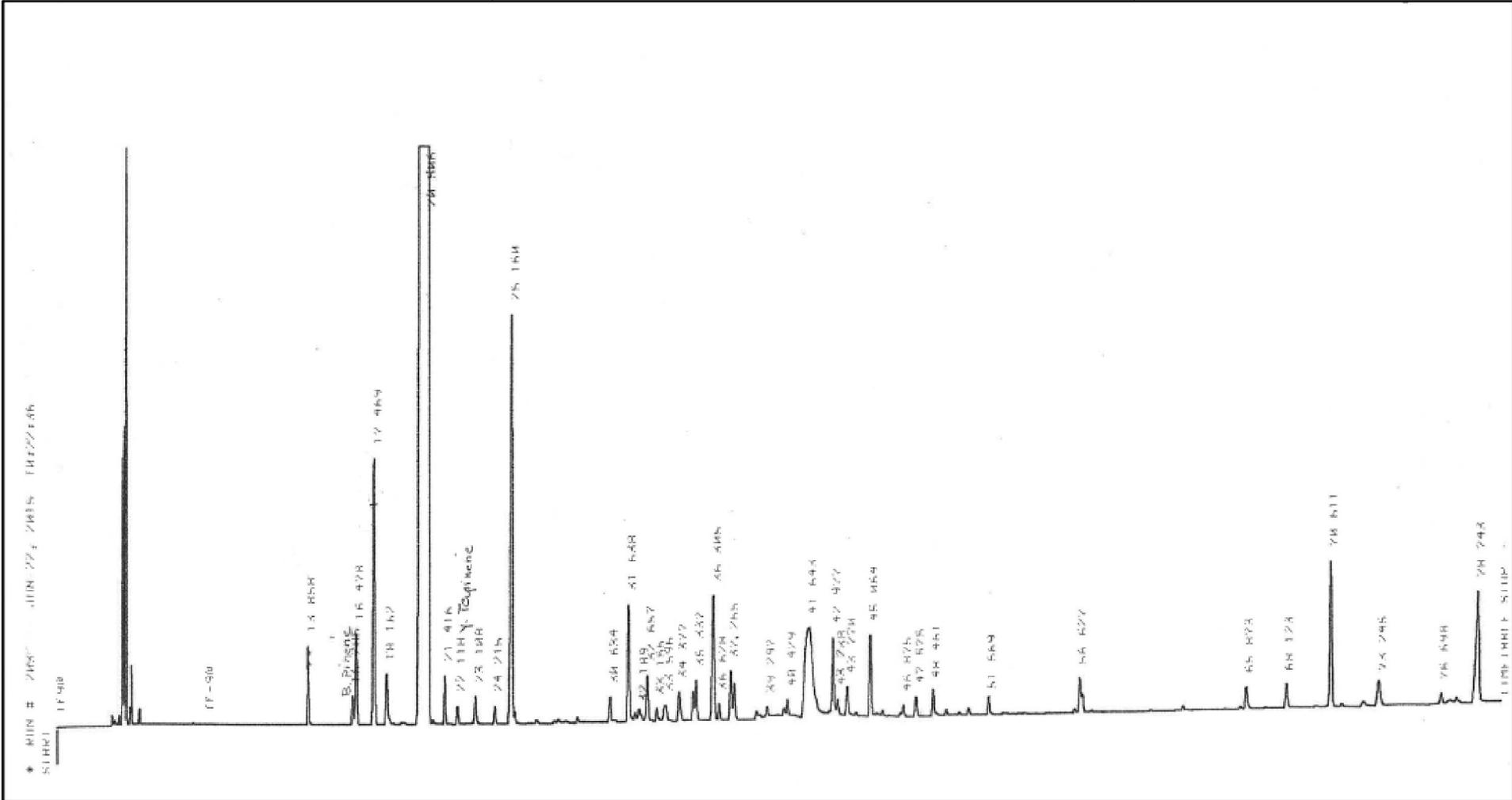


Fig.III : Profil chromatographique d’huile essentielle *Citrus aurantium* de analysée par la CPG.

Citrumelo 4475

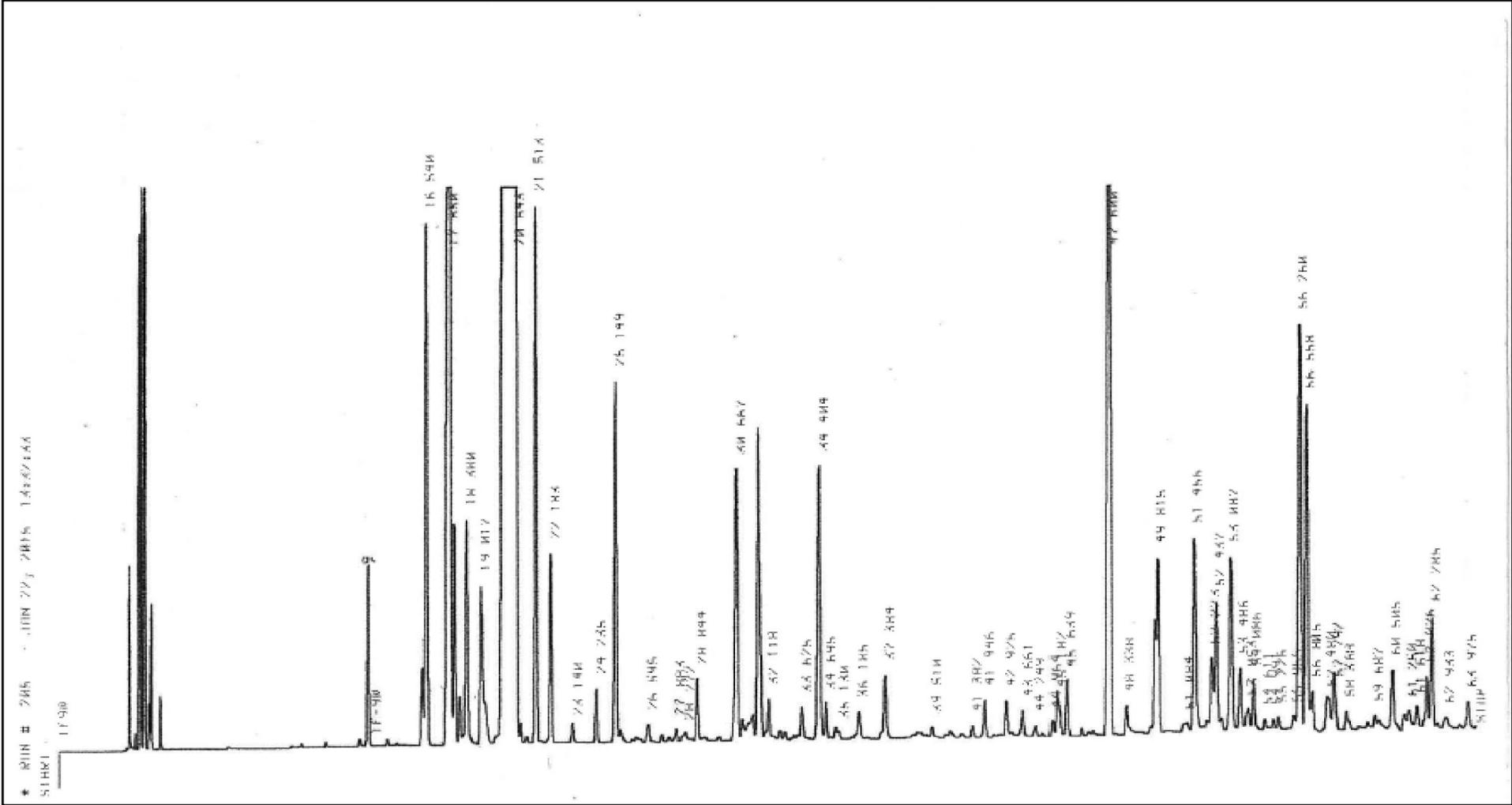


Fig.IV : Profil chromatographique d’huile essentielle de Citrumelo 4475 analysée par la CPG.

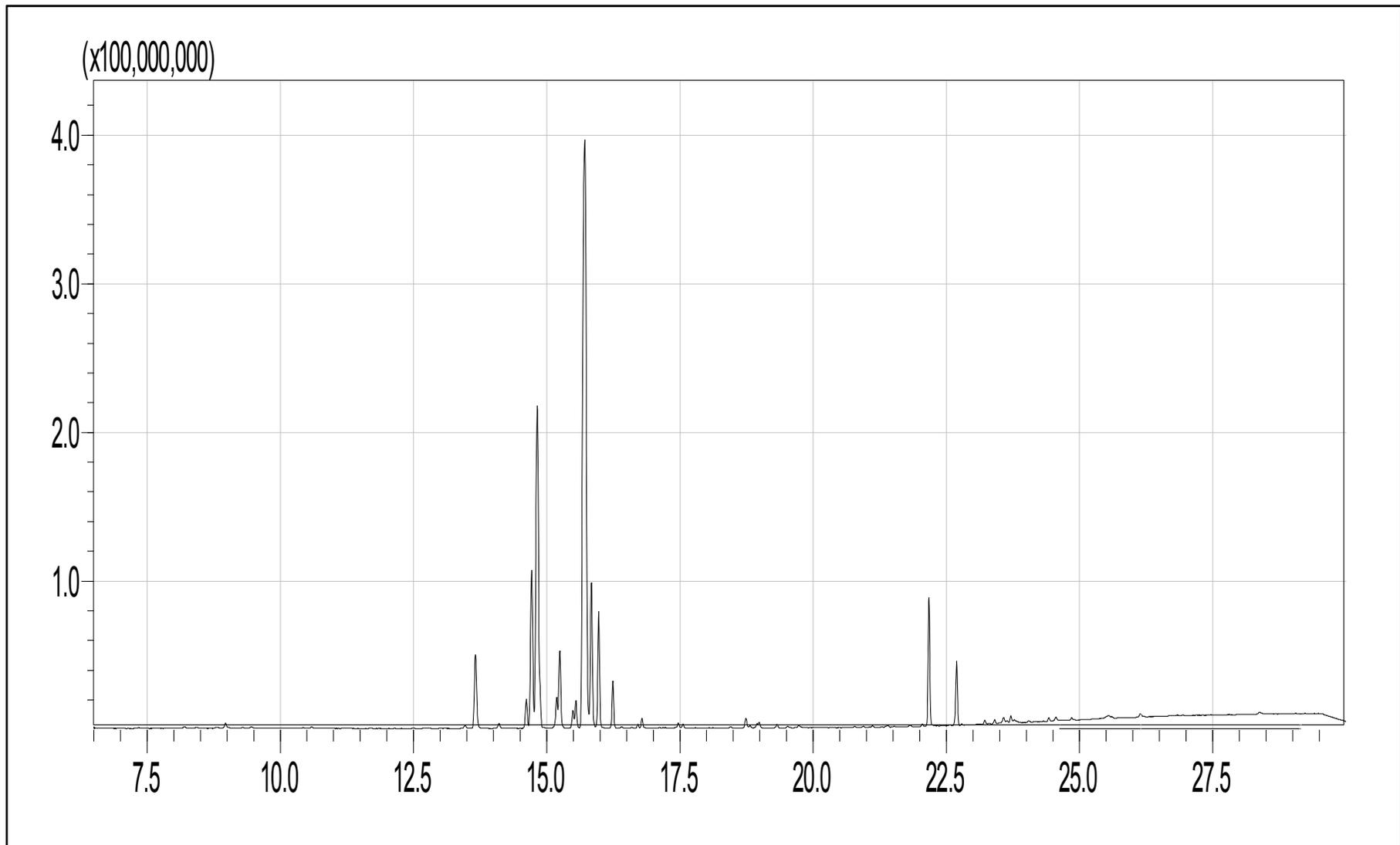


Fig.V : Profil chromatographique d'huile essentielle de Citrumelo 4475 analysée par la CG-MS.

Spectres FTIR

- *Citrus volkameriana*

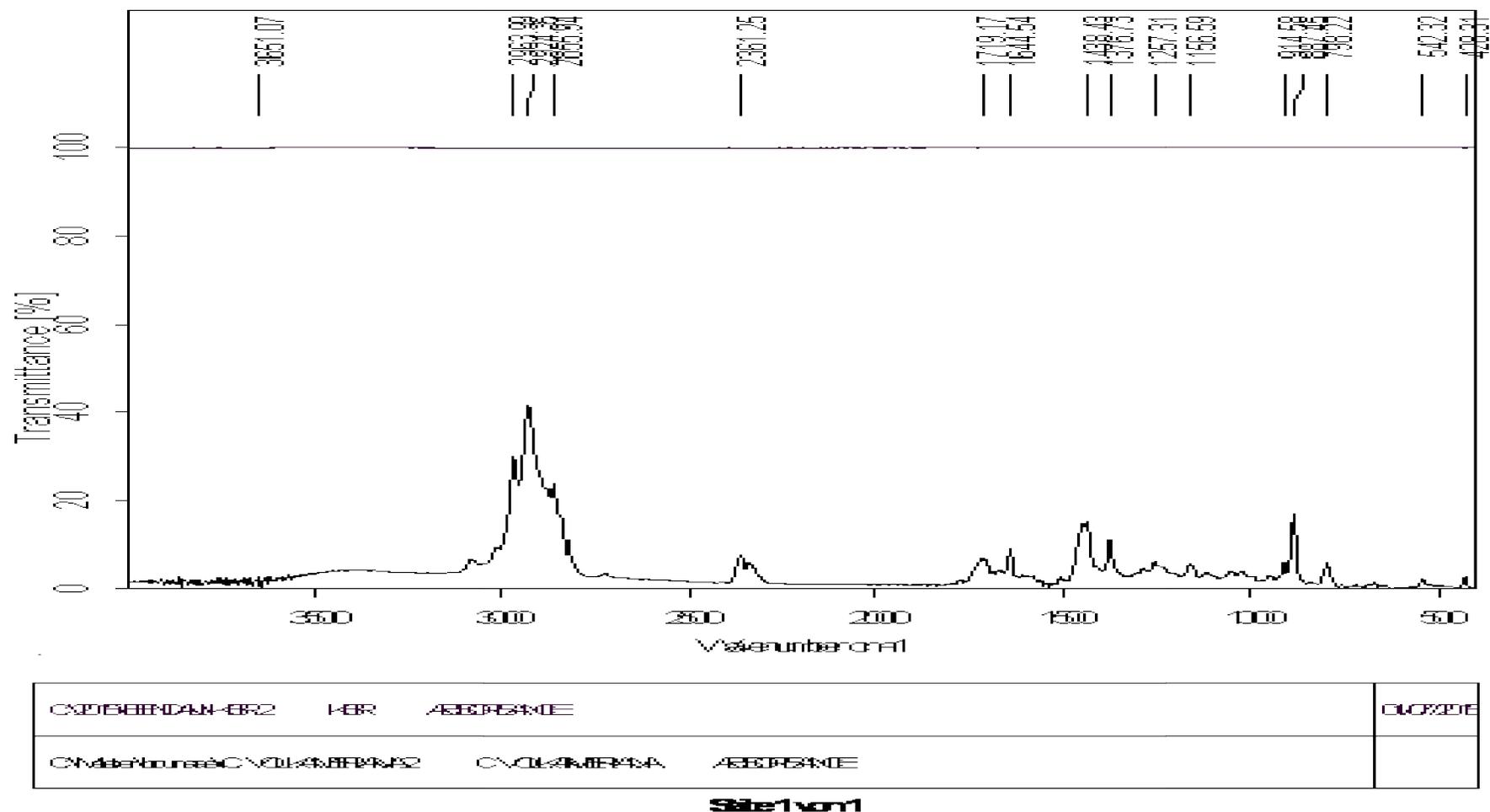
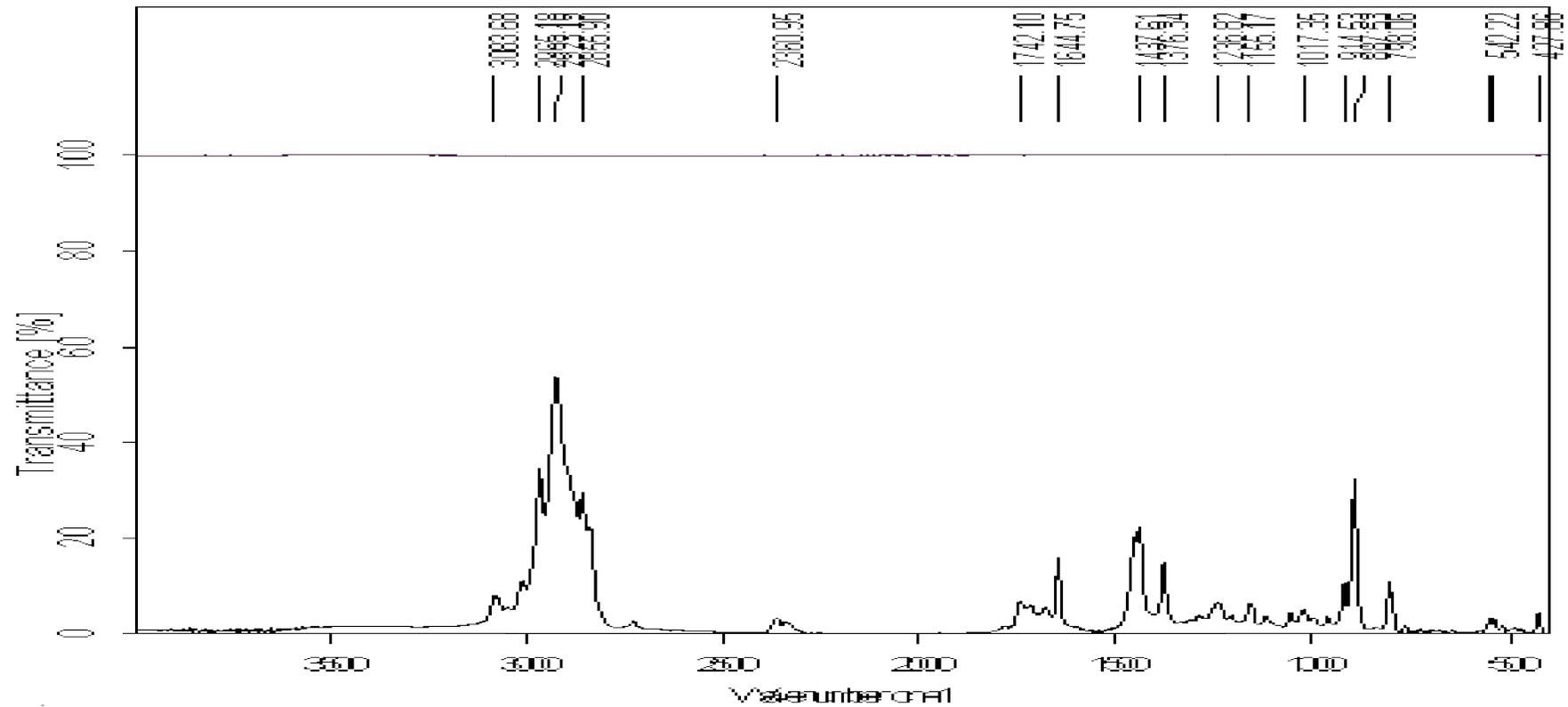


Fig.VI : Spectre FTIR d'huile essentielle de *Citrus volkameriana*.

- *Citrus autantium*

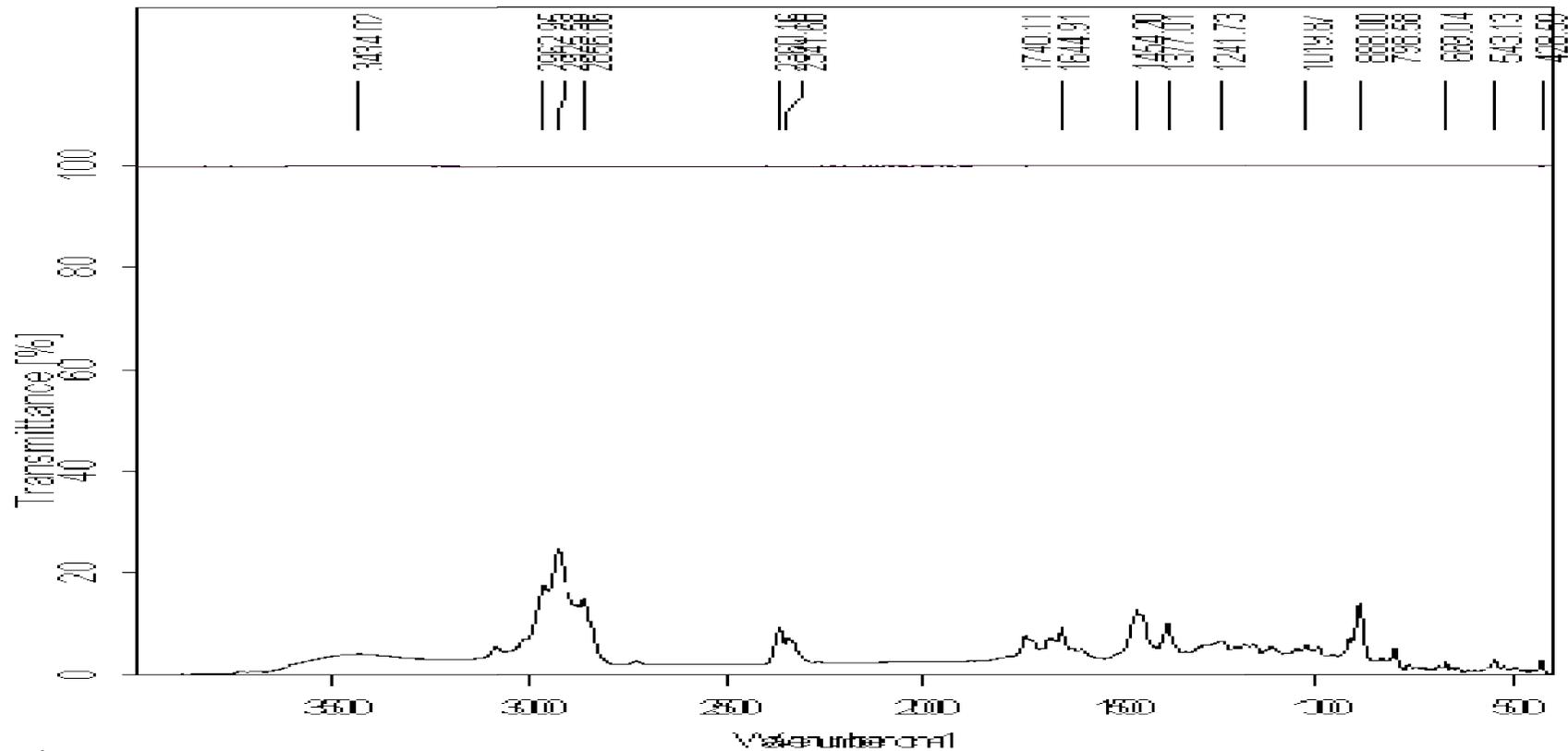


C:\BIBENDAN\BIB2	HER	ABSORBANCE	DUOXPTE
C:\Mela\Boune\BIB2\BIB2	BIB2\BIB2	ABSORBANCE	

Site1\var1

Fig.VII: Spectre FTIR d'huile essentielle de *Citrus autantium*

- Citrumelo 4475



OXI'EBENDAMERE	HER	ABSORBANCE	QUANTITE
OXI'EBENDAMCTPUNILOMEDI	IRUMILONGS	ABSORBANCE	

Site1 von1

Fig.VIII : Spectre FTIR d'huile essentielle de Citrumelo 4475