

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

FACULTE DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER
Option : Phytopharmacie et Protection des Végétaux

Thème

Extraction de l'huile essentielle de citron (Citrus Limon) de la région de la Mitidja et évaluation des activités anti oxydante et anti bactérienne pour l'utilisation dans une crème hydratante

Présenté par:
TSAGADIRTS RAWNAK

Devant le jury composé de :

Mr Bendali A	USDB	MAA Promoteur
Mme Chaichi W	USDB	MCA Présidente
Mme khaddar	USDB	MCB Examinatrice

Année Universitaire : 2020/ 2021

Remerciement

Je remercie Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé la santé , la volonté, et le courage pour accomplir ce modeste travail .

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Mr Bendali .A**, pour avoir accepté d'être mon encadreur de mémoire, pour sa disponibilité, ses conseils tout au long de ce travail .

Mes remerciements les plus respectueux vont également aux membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait ,pour accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissante et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

Mes sincères remerciements à **Mme Chaichi .W**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de mon soutenance.

Je remercie également **Mme Khaddar**, pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant d'examiner ce travail.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude et mes remerciements à **Mr. Benmaalem .A**, pour son aide .

Je remercie **Mme Ghanai .R** pour son aide , sa très grande disponibilité, et sa gentillesse .

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire de recherche des plantes Aromatiques et Médicinales de l'université de Blida 1, et surtout **Amira .H** ,je la remercie pour sa disponibilité et son aide précieuse dans la pratique.

Je marque ma reconnaissance **Mr Moula Mustapha** , directeur de laboratoire vague de fraîcheur de m'avoir accueilli comme stagiaire au sein de son entreprise ,ainsi qu'à **Mme Kacem** pour l'aide, l'assistance et les conseils .

Enfin je remercie, toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, afin que ce travail puisse arriver à son terme.

Dédicaces

Je dédie ce travail

Avec grand amour, Sincérité et fierté ,aux êtres les plus chères aux monde « mes parents »
pour tous les efforts , lesconseils, qu'ils ont consentis afin de me voir réussir.

Je vous dédie ce travail, Puisse Dieu, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes chers frères **Moncef,Soheib** , et**M.Akram** qui est le plus chère, Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A ma chère sœur **Anfel** je te souhaite plein de bonheur, de santé et de réussite.

A mes chère tantes **Assia** et **Khadidja**,un grand merci pour vous je vous souhaite toute la jolie du monde.

A mes chères amies , **Khadidja** , **Hassiba**, **Amina** ,**Maya** ,**Salsabila** , **Keltoum**, et**Wafa**, je vous remercie pour vos motivations ,encouragements , je vous dédie ce travail , je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu ou encouragé au long de mes études.

Enfin, à tous ceux qui m'aiment et qui ont une place dans mon cœur.

Résumé

Le but de ce travail consiste à évaluer in vitro l'activité anti-oxydante et antibactérienne de l'huile essentielle extraite de l'écorce de l'espèce **Citrus limon** par la technique d'hydro-distillation avec un rendement de **2,2 %** afin de la valoriser dans le domaine cosmétique et de formuler **188g** de crème hydratante.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de citron a été déterminée par la méthode de piégeage du radical **DPPH°** (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) avec un **IC₅₀ de 10.81 µg/l**.

L'huile essentielle de citron exerce une activité antibactérienne contre deux souches bactériennes *Escherichia coli* et **Staphylococcus aureus** avec un diamètre de zone d'inhibition **9.26 mm** et de **9.89 mm** contre **E. Coli**.

Enfin nous avons formulé avec succès une crème hydratante de bonne qualité avec des tests sensoriels et des tests de stabilité satisfaisants.

Mots clés: huile essentielle, citron, citrus limon, activité anti-oxydante, activité antibactérienne.

Abstract

The aim of this work is to evaluate in vitro the antioxidant and antibacterial activity of the essential oil extracted from the bark of the species **Citrus limon** by the technique of hydro-distillation with a yield of **2,2%** in order to value it in the cosmetic field and to formulate **188g** of **moisturizing cream**.

The evaluation of the antioxidant power of lemon essential oil was determined by the **DPPH°** (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical trapping method with an **IC₅₀ of 10.81 µg/l**.

Lemon essential oil exerts antibacterial activity against two bacterial strains *Escherichia coli* and **Staphylococcus aureus** with an inhibition zone diameter of **9.26mm** and **9.89 mm** against **E. Coli**.

Finally we have successfully formulated a good quality moisturizer with satisfactory sensory and stability tests.

Key words: essential oil, lemon, citrus limon, antioxidant activity, antibacterial activity.

المخلص

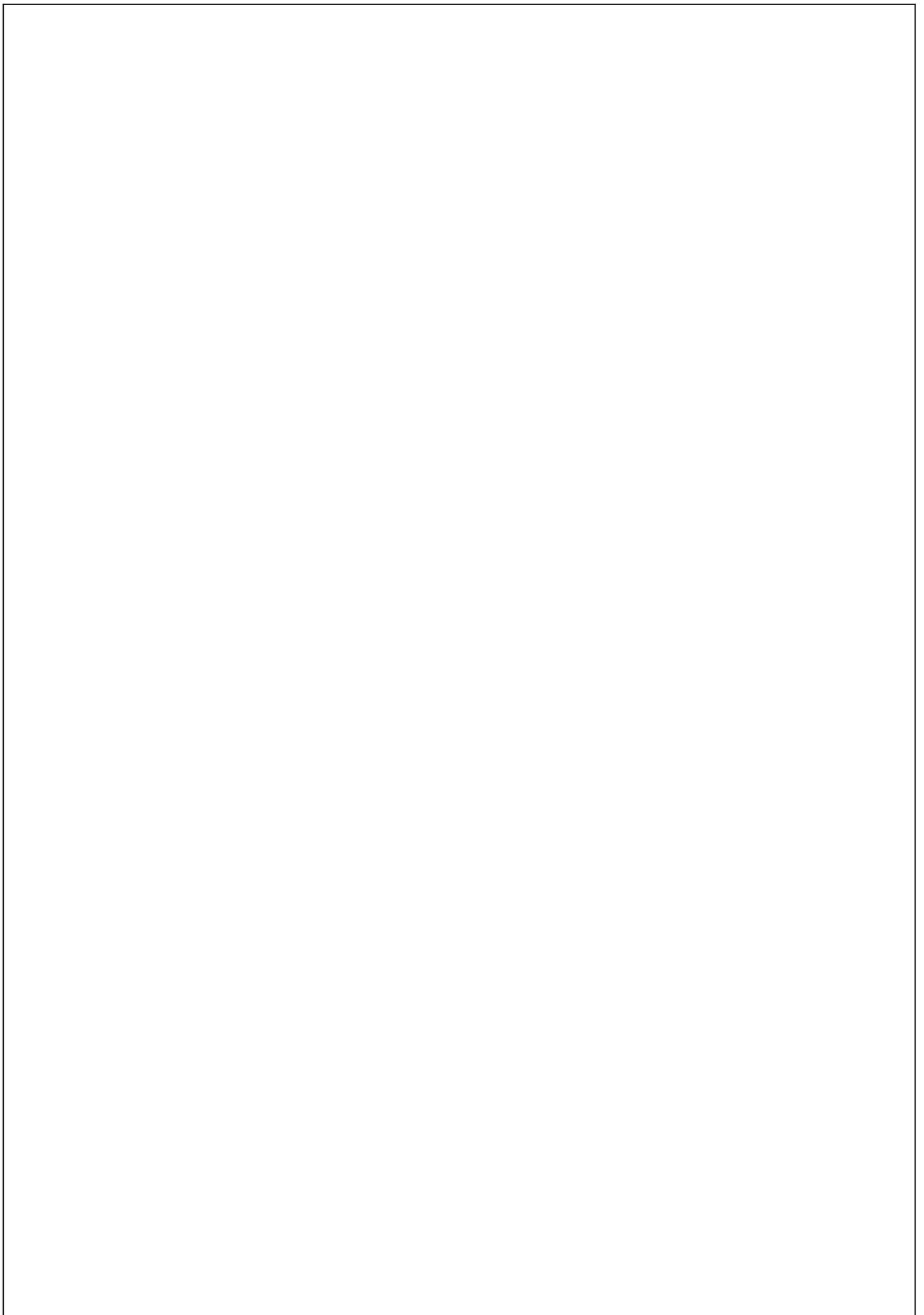
الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والبكتيريا في المختبر للزيت العطري المستخرج من لحاء فصيلة الليمون الحامض بتقنية التقطير المائي بنسبة 2.2 % من أجل تعزيزه في مستحضرات التجميل الحقل وصياغة 188 جرام من المرطب.

تم تحديد تقييم قوة مضادات الأكسدة للزيت العطري بالليمون من خلال طريقة محاصرة الجذور DPPH °، 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl مع تركيز IC₅₀ بنسبة 10.81 ميكروغرام / لتر.

يمارس زيت الليمون الأساسي نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد سلالتين من البكتيريا *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* يبلغ قطر منطقة التثبيط 9.26 مم و 9.89 مم ضد *E. Coli*.

أخيراً ، نجحنا في صياغة مرطب عالي الجودة مع اختبارات حسية واختبارات ثبات مرضية.

الكلمات المفتاحية: زيت عطري ، ليمون ، ليمون حمضيات ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم.



Liste des abréviations

%:pour cent

µg : micro gramme

µl : microlitre

mg : milligramme

mm : millimètre

µm : micromètre

EF : écorce fraîche

FL:flavonoïde

RL:radical libre

HE : Huile essentielle

DPPH:2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

CMI : concentration minimale inhibitrice

E. coli : Escherichia coli

S. aureus : Staphylococcus aureus

HD : Hydrodistillation

IC50% : concentrations inhibitrices de 50%

C :Degré Celsius

FAO :Food and Agriculture Organization

ONS :Office national des statistiques (National Office of Statistics)

OFSP:L'office fédéral de la santé publique

E.F.E.O : la Fédération européenne des huiles essentielles

AFNOR:Association Française de Normalisation

H/L : Huile/ eau

PI% : Pourcentage d'Inhibition

Liste des figures

Figure 1: Quelques photos de <i>Citrus limon</i>	5
Figure 2: Coupe équatoriale d'un Citron.....	5
Figure 3: Citronnier	5
Figure 4: Structure de base des flavonoïdes	8
Figure 5: Citrus limon variété <i>Eureka</i>	9
Figure 6: La <i>Tristeza</i> sur les feuilles du citronnier.....	10
Figure 7: La gommose	11
Figure 8: Maladie de la moniliose sur le fruit de citronner	11
Figure 9: Puceron des agrumes.....	12
Figure 10: Structure de la cochenille et leur apparence sur les feuilles.....	13
Figure 11: <i>Aleurodes</i>	13
Figure 12: Cartographie des principaux pays producteurs d'huiles essentielles	16
Figure 13: Quelques exemples d'appareil sécréteur.....	17
Figure 14: Coupe transversale de l'épicarpe de citron.....	18
Figure 15: Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.....	19
Figure 16: Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation.....	20
Figure 17: Analyse macroscopique des poches à huile essentielle du citron.....	25
Figure 18: Analyse microscopique des poches à huile essentielle du citron.....	25
Figure 19: Schéma des différents couches de la peau.....	27
Figure 20: Les différents types d'émulsions	30
Figure 21: Schéma d'un tensio-actif	30
Figure 22: Vue microscopique des émulsions multiples H/L/H ;L/H/L.....	31
Figure 23: Espèce de <i>Citrus Limon</i>	32
Figure 24 : Ecorce de citron pulvérisé.....	34
Figure 25: Ecorce du citron en petits morceaux.....	34
Figure 26: Montage d'hydro distillation manipulé (Clevenger).....	36
Figure 27: pHmètre	38
Figure 28: Réfractomètre type ABBE.....	39
Figure 29: Un flacon contient la solution méthanoïque.....	40
Figure 30: spectrophotomètre(THERMO SIENTIFIC).....	41
Figure 31: Illustration de la méthode de diffusion sur le milieu gélosé	44
Figure 32: Les différents étapes de l'activité antibactérienne.....	46
Figure 33: formulation d'une crème hydratante à base de l'huile essentielle de citron.....	47
Figure 34: Aspect et couleur de l'huile essentielle <i>Citrus limon</i>	49
Figure 35: Le résultat du pouvoir anti-radicalaire par le DPPH après	50
Figure 36: L'effet de l'antibiotique sur <i>E.Coli</i> et <i>S.aureus</i>	51
Figure 37: L'effet de l'H.E de <i>Citrus limon</i> sur : 1 : <i>E. Coli</i> , 2 : <i>S. Aureus</i>	52

Liste des tableaux

- **Tableau1** : Les caractéristiques morphologiques du citron.....4
- **Tableau2**:la composition biochimique moyenne du citron7
- **Tableau3**:les différents caractéristique de la variété *Eureka*.....8
- **Tableau 4**:Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition45
- **Tableaux 5,6,7** : les différents composants, quantités et fonctions dans la crème.....45
- **Tableau8** :aspect, couleur et odeur et type de l' huiles essentielles de *Citrus Limon*.....47
- **Tableau9**:les résultats Contrôle organoleptique sur la crème52

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Rappels bibliographiques

Chapitre I : *Citrus limon* plante médicinale caractéristiques et vertus

I.1 .Généralités sur les plantes médicinales.....	3
I .2.Généralités sur les plantes aromatiques.....	3
I.3 .Généralité sur les agrumes.....	3
I.4 . <i>Citrus limon</i>	4
I .4. 1 .Généralités	4
I.4.2. Classification botanique	5
I.4.3. Production	6
I.4.3.1. ProductionMondiale.	
I.4.3.2 .ProductionAlgérienne.	
I.4.4. Composition et valeurs nutritive.....	6
I.4.4.1Les flavonoïdes.....	7
I.4.5. La variété <i>Eureka</i>	8
I.4.6. Usages.....	9
I.4.7. Culture	9
I.4.8. Maladies et ravageurs.....	10
I.4.8.. Les Maladies	
I.4.8.2.Les ravageurs	

Chapitre II : Les huiles essentielles et leurs activité biologiques

II.1. Définition des Huiles essentielles.(2008).....	14
II.1.1.Selon la pharmacopéeEuropéenne.....	14
II.1.2.Selon AFNOR NF T 75-006 (1998).....	14
II.1.3.Selon OFSP (2009).....	14

II.1.4. Définition générale	14
II.2. La Production mondiale	15
II.3. Répartition et localisation	17
II.4. L'Obtention.....	19
II.4.1. Hydro-distillation.....	19
II.5. Les Propriétés Des huiles essentielles.....	20
II.5.1. Propriétés physiques	20
II.5.2. Propriétés chimiques.....	21
II.6. La synergie des huiles essentielles	21
II.7. Le Rôle physiologique des huiles essentielles chez la plante.....	22
II.8. Stockage et Conservation.....	22
II.9. Toxicité.....	22
II.10. L'Huile essentielle du citron et sa composition chimique	24
II.10.1. Description de l'appareil sécréteur	24
II.11. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	25
II.11.1. Activité anti-oxydante	25
II.11.2. Activité antibactérienne	26

Chapitre III : La physiologie de la peau

III.1. La peau	27
III.1.1. L'épiderme.....	27
III.1.2. Le derme.....	27
III.1.3. L'hypoderme	28
III.2. Le film hydrolipidique	28
III.3. Le pH cutané	28
III.4. L'hydratation cutanée.....	28

Chapitre IV : La crème hydratante et leur composants

IV .1.Définition d'un « produit cosmétique biologique »	29
IV .2.La crème hydratante.....	29
IV.3.La structure générale d'une crème cosmétique.....	29
IV .3.1.Les émulsions.....	29
IV .3.2.Les excipients.....	31
IV .3.3.L'adjuvant.....	31
IV .3.4.Les additives.....	32

Partie expérimentale

Matériel & Méthodes

I .1.L'Extraction de l'huile essentielle de citron.....	33
I .2.Matériel végétale	33
I .2.1.l'extraction par HD.....	34
I .2.2.Méthodologie.....	35
I .3.Les Caractéristiques organoleptiques.....	36
I .4.Les propriétés physico-chimiques.....	36
I .5.Evaluation Des activités biologique du <i>Citrus Limon</i>	40
I .5.1.L'activité antioxydante.....	40
I .5.1.1.Test au DPPH°	40
I .5.1.2.Méthodologie.....	41
I .5.2.L'activité Antibactérienne.....	42
I .5.2.1.les antibiotiques.....	42
I .5.2.2.La Détermination De La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	42
I .5.2.3.Mode opératoire d'antibiogramme.....	43
I .6.La formulation d'une crème hydratante.....	45
I .6.1.Composants et fonctionnement.....	45
I .6.2.Procédure de Fabrication.....	46

Résultats Et Discussion

I.1. Analyses des huiles essentielles de Citron.....	46
I.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	46
I.2.1. Caractéristiques organoleptiques	46
I.2.2. Détermination du rendement d'extraction	
I.2.3. La densité	
I.2.4. La Mesure de pH	
I.2.5. Indice de réfraction	
I.3. L'activité antioxydante de l'huile essentielle de citron.....	48
I.4. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de citron.....	49
I.4.1. Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques.....	50
I.4.2. Evaluation de la sensibilité à l'huile essentielle de <i>C. limon</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>	51
I.5. La crème hydratante.....	52
I.5.1. Contrôle organoleptique sur la crème.....	52
I.5.2. Analyses physicochimiques.....	53
Conclusion et perspective.....	54
Référence bibliographique	

INTRODUCTION

Introduction

Les problèmes de santé d'aujourd'hui et leurs préoccupations ont conduit l'homme revenir à l'utilisation massive des substances naturelles dans le domaine industriel.

En effet, le retour à l'utilisation des produits naturels issus des plantes est devenue une nécessité et ce pour faire face aux effets néfastes des composés synthétiques qui peuvent être nocifs à la santé humaine et à l'environnement.

Pour ce faire les plantes médicinales et aromatiques sont des sources végétales qui suscitent un très grand intérêt (propriétés thérapeutiques, métabolites secondaire), elles renferment des molécules naturelles qui lui confèrent un effet biologique très important.

La nature peut nous offrir une panoplie de plantes qui renferment en même temps des propriétés médicinales et aromatiques, c'est le cas de l'espèce de notre présente étude le *Citrus limon*.

Les huiles essentielles considérées comme des substances naturelles bioactives occupent un bon choix dans la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, et attirent l'intérêt de plusieurs recherches vu le nombre important de leurs propriétés biologiques.

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

La subtilisation d'un produit de synthèse par une huile essentielle permet d'accroître la valeur ajoutée (**kerdudo et al;2014**).

En outre la valorisation des composés naturels est très importantes vu la demande sans cesse ingrédients naturels, ce qui a poussé les industriels des secteurs agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques davantage à les intégrer dans leurs formulations.

Le cosmétique est également un secteur qui utilise de plus en plus les huiles essentielles, car on les retrouve dans de nombreux produits comme : savons, shampoings, gel douches, crèmes...., et encore dans les produits de beauté.

l'Algérie est parmi les plus grand pays méditerranéens producteurs d'agrumes ,de haute qualités .parmi ces agrumes le citron (*Citrus limon*) un fruit de citronnier une plante aromatique et médicinale connue par ses différentes vertus dans plusieurs domaines .

Le citronnier, un membre de la famille des *Rutacées*, Originaire du Moyen-Orient ,a été introduit en Afrique du Nord au moyen-âge .c'est un arbre qui peut atteindre 3 à 6m de haut, les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes, alternatives et Persistantes, très adurantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent ,et qui sont visibles à l'œil nu (**Gollouin et Tonelli, 2013**), c'est un fruit jaunes au goût acide ,riche en vitamines A,B,B2 et surtout C .

Dans le contexte de la valorisation des plantes et en vue de bénéficier leurs propriétés biologiques , nous avons procédé à l'étude de l'huile essentielle de citron (variété *Eurêka*) parvenant de la région de la Mitidja .

L'objectif de notre travail est d'estimer les paramètres physico-chimiques de l'huile essentielle extraite de l'écorce de *Citrus limon* par hydro-distillation, et l'évaluation des activités biologiques (antioxydant, antibactérienne) dans le but d'utilisation dans une crème hydratante .

Ce mémoire s'articule autour de deux parties:

La partie théorique consiste à une étude bibliographique dans laquelle nous avons présenté des généralités sur les agrumes , les huiles essentielles et leurs activités biologiques , monographie de la plante , et sur la formulation de la crème .

La deuxième partie est réservée a l'étude pratique de notre recherche .

Enfin une conclusion générale.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Citrus limon une plante médicinale ,
Caractéristiques et vertus

I.1 .Généralités sur les plantes médicinales

Une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et qu'elle présente des propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Moreau, 2003**). Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, leur action provient de leur composition chimique (métabolites primaires ou secondaires) ou des synergies entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**) .

I .2. Généralités sur les plantes aromatiques

Les plante aromatiques sont des plantes médicinales ou a parfum .Elles sont utilisés à des fins thérapeutiques, alimentaires, cosmétiques et en parfumerie.

A partir des plantes aromatiques, on obtient soit des extraits végétaux(phytothérapie) ,soit des huiles essentielles, des essences ou des hydrolats(aromathérapie plus ou moins riche en composants odorantes.

Les plantes aromatiques sont des plante qui contiennent des composés odorantes dans un ou plusieurs organes producteurs (graines, racines, écorces,branches,feuilles,fleurs,fruit,...).Ce sont des composés qui donnent à la plante ,entre autres, son odeur et des propriétés particulières.

I.3 . Généralité sur les agrumes

La culture des agrumes a été pratiquée il y a au moins 4000 ans dans les régions tropicales et subtropicales du continent asiatique et de l'archipel malaisien(**Dugo et Di Giacomo, 2002 ; Batchelor and Sinclair, 1961**).

Le terme agrumes, **agrios** ou **citricos** en espagnol, provient du latin *acrumen* (*aigre*), qui signifie dans l'antiquité la saveur âcre(acide)(**Ladaniya, 2008 ; Khanet al, 2010 ; Davies and Albrigo, 1994**).

Les agrumes sont des fruits dont la production est la deuxième plus importante au monde avec plus de 115 millions de tonnes par an, 517 milles tonnes ont été produits en Algérie qui occupe la 18ème place mondiale (**FAO, 2013**).

Ces fruits originaires du Sud-est Asiatique (**Ollitrault et al., 2000**)appartiennent à la famille des *Rutacées*, pouvant mesurer de 2 à 10 m. Leur tronc est assez court, leur feuillage est dense, et persistant sauf pour le genre *Ponceras* où il est caduque (**Barboni, 2006 ; Ramful et al ; 2011**).Avec des écorces qui sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes qui sont caractérisés par leurs activités anti-oxydantes, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (**Bocco Et Al., 1998 ; Ma Et Al., 2009 ; Huang Et Al., 2010**).

Il existe pas moins de 900 variétés d'agrumes à ce jour, dont l'orange et le citron sont connues par leur richesse en vitamine C et en quantités considérables de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les caroténoïdes (**Del Rio Et Al., 2004**).

I.4 .*Citrus limon*

I.4. 1 .Généralités

Le citronnier est une plante médicinale importante de la famille des rutacées, originaire du bassin méditerranéen et répandu particulièrement en Italie, en Espagne, et Chypre (Mohanapriya et al., 2013 ; Leroy, 2016). Cet arbuste de 2,5 à 6 m de haut est parmi les agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment , la fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre) (Dubois, 2006).

Le fruit de citronnier est une baie cortiquée, selon les espèces, la fleur se transforme en fruit mur, de forme ronde, allongée ou ovale (8 à 12 cm de long sur 5 à 6 cm de diamètre), présentant un téton à une extrémité et quelquefois à chaque extrémité (Espirad, 2002), Il reste longtemps sur l'arbre sans que le goût s'altère (Bachés, 2011).

Les principales variétés méditerranéennes de citronnier sont «Verna », «Eureka », «Lisbonne », «Monachello », «Interdonato » et «Lunaris» (Blancke, 2001)

Le citron a un large spectre d'activité biologique, entre autres (les activités antibactérienne, antifongique, anti-oxydante, antivirales (Burt, 2004).

Les caractéristiques du citron sont résumées dans le tableau ci-dessous :



Les Parties de Fruit		Caractéristique
L'écorce	épicarpe	Jaune très odorante, remplis de l'huile essentielle répartie de façon très irrégulière (Ladanya, 2018; Bachés, 2011).
	Mésocarpe	Couleur blanchâtre, épaisseur variable (Ladanya, 2008).
Pulpe		Juteuse et très acide représente 50% à 80% de fruit (Ladanya, 2008).
Pépins		Quelques pépins.

Tableau 1 : Les caractéristiques morphologiques du citron.



A) (B) (C)

Figure1 : Quelques photos de Citrus limon. (A) les fleurs et les feuilles, (B) la plante entière, (C) les lesfruits .

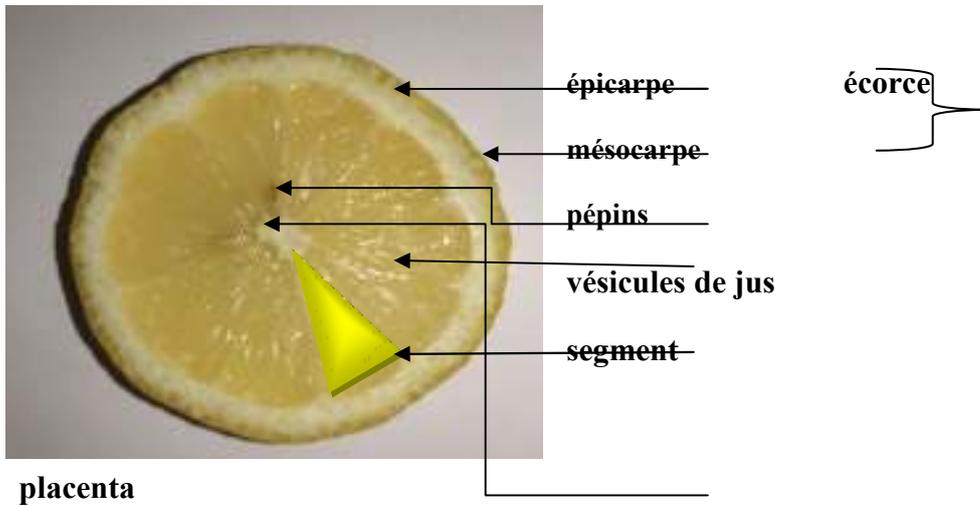


Figure 2: Coupe équatoriale d'un Citron (photo personnelle).

I.4.2. Classification botanique

La classification scientifique du citron, selon *Ecormier (2001)*, est comme suit :

Règne : *Plantae* Famille : *Rutacées*

Division : *Magnoliophyta* Genre : *Citrus*

Classe : *Magnoliopsida* Nom binomial : *Citrus Limon (L) Burm f*

Ordre : *Sapindales*



Figure3: Citronnier (originale 2021)

I.4.3. Production

I.4.3.1. Production mondiale

la production mondiale de citron est estimée à 8,5 millions de tonnes (**FAO, 2019**).

les principaux pays producteurs de citron sont l'argentine en premier (1800 millions tonnes), ensuite l'Espagne(1192 millions tonnes) en deuxième place ,et les Etats-Unis (998 millions tonnes)en troisième place

I.4.3.2 .Production algérienne

L'Algérie dispose d'une superficie de plus de 4 365 Ha pour la culture du citron, (**Ministre de l'agriculture et de développement rural, 2012**)

La production nationale avoisine de 790000 quintaux de citron (**ONS,2017**).

I.4.4. Composition et valeurs nutritive

Comme les autres agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). Il est riche en acide citrique, en calcium, en phosphore, en potassium et en vitamines e, K,etC(qui représente 53 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes. Cette richesse, fait de lui un fruit très recherché pour ses propriétés thérapeutiques, antiseptiques et anti oxydantes .

Les principaux flavonoïdes contenus dans le citron et la lime sont l'ériocitrine et l'hésperétine, on les retrouve dans la partie blanche de l'écorce du citron .

Des expériences menées sur des animaux ont démontré que ces derniers pouvaient diminuer ou prévenir l'augmentation des dommages reliés au stress oxydatif (**miyake et al., 1998**) .

La teneur de ce fruit en glucides est faible mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g.

Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron. Le potassium est le minéral le plus abondant (**valnet, 2001**).

selon**souci et al. (1996)** la composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais) est la suivante :

Composition	Teneur
Eau	90,20 g/100 g
Glucides	3,16/ 100g
Protéines	0,70 g/100g
Lipides	0,60 g/100g
Acides organiques	4,88 g/100g
Fibres alimentaires	0,50 g/100g
Les vitamines	51,26 mg/100g
Les minéraux	211,95 mg/100g
Apports énergétiques	36,48 k calories

Tableau2: la composition biochimique moyenne du citron .

I.4.4.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très importants pour leurs activités médicinales et biologiques. Ce sont des agents antioxydants et antimicrobiens (**Granados– Covarrubias et Maldonado, 2009**).

Les **FL** peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture

directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al, 2006**).

Ils représentent une famille large de polyphénols. Des colorations jaune, orange et rouge de différents organes. Leur caractérisée par un squelette carboné de type diphenyl 1,3 de carbone répartis en deux cy pyrène C contenant un oxygène(**Ghedira, 2005**).. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes. Leur structure moléculaire est caractérisée par un squelette carboné de type diphenyl 1,3-propane qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B reliés entre eux par un noyau .

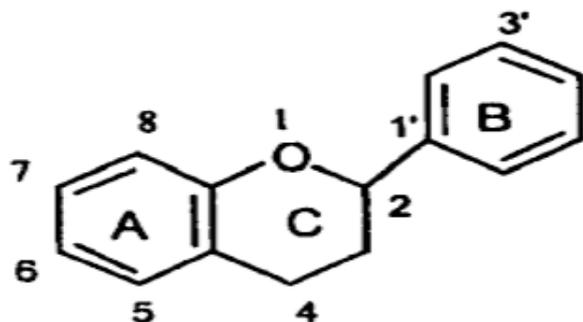


Figure4: Structure de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les fruits (notamment du genre Citrus où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais.

I.4.5. La variété *Eurêka*

Cette variété est introduite en Algérie dans les années quarante (Rebour, 1950).

La variété du citronnier, *Eureka* ou des 4 saisons, est la plus cultivée du fait de sa mise à fruit rapide et de ses floraisons très remontantes permettant la production de fruits au printemps et en été, cette variété est originaire de Californie (Loussert, 1989).

Dans le tableau suivant il est expliqué ses caractéristiques morphologiques

Espèce	Variété	Caractéristiques
<i>Citrus Limonum</i>	<i>Eureka</i>	<p>Fruits: écorce légèrement rugueuse devenant jauniveif.</p> <p>Fruits très remontant qui produit au printemps et en été.</p> <p>Calibre moyen, pourvus d'un mamelon apical peu Prononcé.</p> <p>Pulpe: donne un jus clair acide et bien parfumé.</p> <p>Floraison : Fleur très nombreuse, blanc rosé et très Parfumées.</p>

Tableau3: les différents caractéristique de la variété *Eureka* (Medjdoub, 2002).



Figure5:*Citrus limon* variété *Eureka* .

I.4.6. Usages

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

Le citron est l'un des fruits les plus puissants qui existe sur terre. Ce fruit est l'un des fruits les plus riches en vitamine C ,une vitamine que tout le monde connaît, pour ses vertus anti-cancers, antioxydants et revitalisantes.

Le citron possède de très nombreuses vertus qui sont utilisées depuis plus de 4000 ans .Il possède des propriétés médicinales incroyables pour purifier l'organisme en profondeur et revitaliser les convalescents et les fatigues chroniques liés au problèmes de foie et de sang .

Le citron aide efficacement à combattre la grippe ,les angines, les maux de tête ,etc.... Ce fruit est également d'une grande aide pour arrêter les hémorragies, réguler la tension artérielle, favoriser la digestion, nettoyer le sang .

Il est utilisé aussi pour traiter les maladies de la peau : l'acné, soins de visage. (**Valnet, 2001**), favorise le régime et à traite l'obésité (**Ramful et al., 2011**).

I.4.7. Culture

Le citronnier exige un sol bien drainé, léger et fertile pour un bon développement du système racinaire. Il préfère les sols à pH de 6-7 et ne peut vivre en milieu extrême ou salé. La température moyenne préférable est de 14 °C (22°C en été et 9°C en hiver). Cette culture craint le vent qui peut occasionner de gros dégâts en période de fructification: frottement du feuillage, chute des fruits et déchirement de branches.

I.4.8. Maladies et ravageurs

I.4.8.1. Les maladies

➤ La *Tristeza* :

La *Tristeza* est probablement originaire de Malaisie et d'autres pays d'Asie du Sud-Est, zone d'origine présumée des agrumes, où elle existait depuis longtemps sur des cultivars tolérants (**Roistacher, 2000 ; Atta et al., 2012**)

C'est une maladie grave causée par un virus et propagée par des pucerons, en particulier par le puceron brun des agrumes *Toxoptera citricida* Kirkaldy. Les symptômes de la maladie se manifestent par un dépérissement plus ou moins rapide de la plante car le virus en se multipliant obstrue les vaisseaux de celle-ci.

Autres symptômes spécifiques de la **TRISTEZA** sont : éclaircissement des nervures foliaires (vein clearing) et cannelures dans le bois des rameaux, des branches et des troncs (stem-pitting).



Figure6: La *Tristeza* sur

les feuilles du
citronnier(internet).

➤ La Gommose :

La Gommose est l'une des maladies les plus redoutées du monde agrumicole. Elle possède une vaste répartition géographique et des appellations différentes. Elle est connue sous plusieurs noms: Mildiou des Agrumes, Gommose parasitaire , Chancre du collet , Pourriture du collet

Cette grave maladie est due a cause d' un Champignon appartenant au groupe des *Péronosporales*, du genre *Phytophthora* .

Tous les organes de la plante sont attaqués par le Champignon : racines, collet, tronc, branches, rameaux, feuilles, fleurs et même fruits. Ce sont surtout les attaques au collet et, secondairement sur les fruits(on peut constater une boursouffure sous l'écorce, laissant apparaître des traces jaunâtres), qui sont

les plus graves. L'arbre infecté réagit par des sécrétions de gommose d'odeur acide qui obstruent les vaisseaux de la plante, déterminant un arrêt dans la circulation de la sève. Les parties de l'arbre qui ne sont plus desservies par la sève perdent leurs feuilles, se dessèchent et meurent.



Figure7: La gommose (internet) .

➤ **La Moniliose**

C'est une maladie fongique provoquée par un champignon qui s'attaque principalement aux fruits à pépins dont le citron. La présence de piqûres d'insectes, de coups de bec et d'impacts de grêlons est souvent à l'origine de cette maladie.



Figure8:la maladie de la moniliose sur le fruit de citronner (internet).

I.4.8.2.Les ravageurs

Certaines espèces d'insectes s'attaquent au citronnier tels que

➤ **Le Puceron**

Les pucerons est le nom commun donné aux insectes appartenant à la superfamille *Aphidoidea*, au sein de l'ordre *Hemiptera*(**Remaudière et Remaudère, 1997**), Près de 4700 espèces sont recensés dans le monde (**Carletto et al., 2009**) .

De nombreuses espèces de pucerons peuvent s'attaquer aux agrumes. Le plus dangereux, non encore présent aux Marquises, est le *Toxoptera citricida* Kirkaldy (puceron brun des Citrus) car il est le vecteur le plus efficace de la maladie de la *Tristeza*. Les autres pucerons les plus courants sont : *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (puceron noir des citrus) .

Les pucerons commettent d'importants dégâts sur les feuilles qui s'enroulent après extraction de la sève par les ravageurs. La présence de ces insectes rend les plantations vulnérables, ce qui peut provoquer le dépérissement des citronniers .



Figure9: Puceron des agrumes(internet).

➤ **La Cochenille**

Les cochenilles sont de petits organismes collés sur les feuilles ou les fruits et protégés par un bouclier qui rend les traitements difficiles.

Elles ponctionnent la sève des plantations, provoquant des fumagines (des moisissures noires dues à un champignon).



Figure10:structure de la cochenille et leur apparence sur les feuilles (internet).

➤ **La Mouche Blanche ou *Aleurode***

Les *Aleurodes* ou mouches blanches ressemblent à de petites mouches d'un blanc lumineux qui vivent sur les feuilles en colonies importantes formant des feutrages blancs très caractéristiques.

Elles s'attaquent au feuillage et causent d'importants dégâts sur les plantes, lorsqu'elle recouvre les feuilles, la mouche blanche ou aleurode transmet un virus phytopathogène.



Figure 11:*Aleurodes* (Mouches blanches)(internet).

Chapitre II

les huiles essentielles et leurs
activités biologiques

II .1. Définition des huiles essentielles

II .1.1.Selon la pharmacopée Européenne (2008)

- la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contuse ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont toujours traités à l'état frais.

- une huile essentielle est un produit odorant, de composition complexe, sécrétée par les plantes aromatiques et 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 ».

II .1.2.Selon AFNOR NF T 75-006 (1998)

« Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition... ».

II .1.3.Selon OFSP (2009)

L'office fédéral de la santé publique (OFSP, 2009) a défini l'huile essentielle comme l'extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques. Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes (fleur, feuille, tige, écorce, racine, fruit, graine).

II.1.4. Définition générale

Selon **Bernard et al. (1988)**, le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ce sont des métabolites secondaires produits par des plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (**FANNY,2008**).

C'est des substances très précieuses, extraites de plantes aromatiques et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois(**Parini et Lucheron, 1996**), ils sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Elles ne se compose que de substances aromatiques volatiles, elles sont soluble dans l'huile et dans l'alcool mais pas dans l'eau.

Les huiles essentielles contiennent le mot "huile", mais elles ne sont pas huileuses sachant qu' à l'état pur, elles ne laissent pas de traces huileuses sur un papier, mais peuvent laisser un résidu coloré si l'huile a une couleur distincte.

Les HE sont très sensibles à l'oxydation. La plupart sont incolores ou jaune pâle, mais certaines peuvent être brun foncé (Patchouli), bleues (Camomille Allemande), orange (Orange Douce) ou vertes (Géranium). À l'inverse, il ne faut pas partir du principe que la couleur distincte d'une plante produira une huile de cette couleur. Par exemple, l'huile de lavande n'est pas mauve ou violette, elle est plutôt claire à jaune pâle.

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible (**BRUNETON, 1999**).

II .2. La Production mondiale des Huiles essentielles

Depuis plusieurs années, le marché des huiles essentielles a connu de nombreuses avancées . Les huiles essentielles constituent un groupe majeur de produits agro-industriels, et ont des applications dans diverses industries, telles que les produits alimentaires, les boissons, les parfums, les produits pharmaceutiques et les cosmétiques .

Les trois huiles essentielles les plus vendues dans le monde représentent près de 90 % de ce volume total, avec deux grands groupes : les agrumes et les menthes.

Selon plusieurs analyses économiques, la croissance va se poursuivre , dans les années 2020, elle devrait atteindre 370 000 tonnes par an et être évaluée à plus de 10 milliards de dollars US (dollars courants).

Les données de la Fédération européenne des huiles essentielles (E.F.E.O.) indiquent que la production mondiale d'huiles essentielles couvre environ 600 000 ha sur les 1,6 milliard d'hectares de la production agricole, les trois principales cultures d'huiles essentielles (orange, menthe et citron), soit environ 100 000 tonnes, représentent plus des deux tiers de la production totale de cultures d'huiles essentielles.

TOP 05 des productions d'huiles essentielles au niveau mondiale (2019)

Huile Essentielle	Estimation de la Production 2019	Estimation de la valeur 2019
Orange	49 000 T	344 M \$
Menthe Arvensis	42 000 T	985 M \$
Ciron	9000 T	264 M \$
Eucalyptus	4000 T	103 M \$
Menthe Poivrée	3500 T	131 M \$

Sur le plan géographique, l'industrie mondiale des huiles essentielles est répartie entre l'Amérique du Nord, l'Asie-Pacifique, l'Europe et l'Afrique (l'Algérie et le Maroc).

Les principaux producteurs d'huiles essentielles au niveau mondiale

Part des différentes huiles essentielles exportées en volume pour certaines zones en 2019.

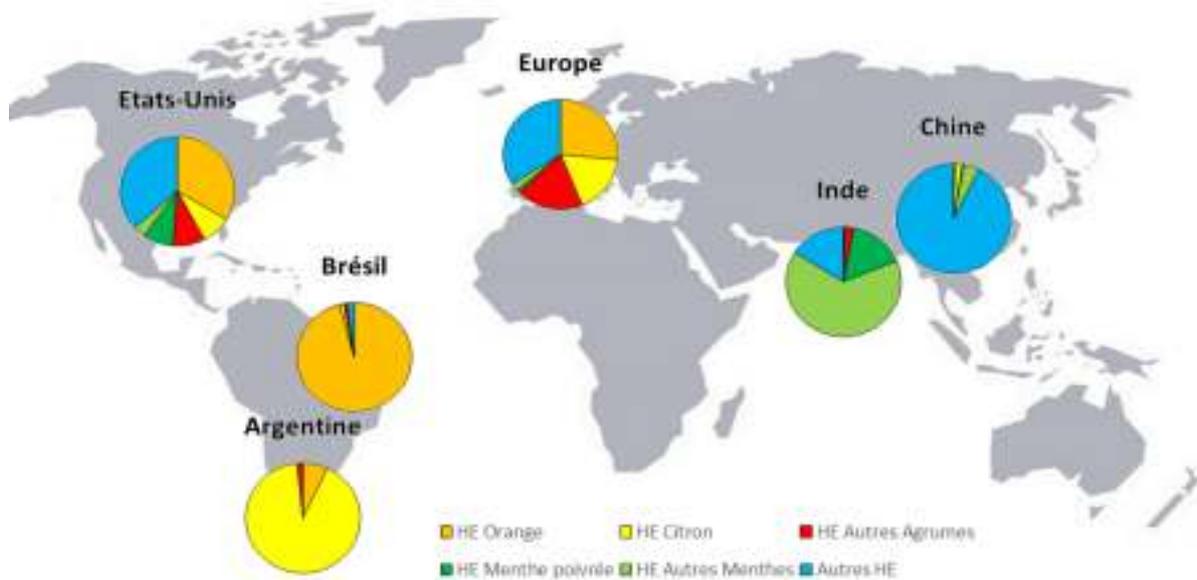


Figure 12: cartographie des principaux pays producteurs d'huiles essentielles.

II .3.Répartition et localisation

Parmi les espèces végétales 800.000 à 1.500.000 selon les botanistes, 10 % seulement sont dites aromatiques.

La composition qualitative et quantitative en HE est variable en fonction des organes de la plante utilisée, ce qui confère des propriétés pharmacologiques différentes. Il est donc indispensable de préciser la partie de la plante dont l'HE est issue

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées et peuvent être stockées dans tous les organes végétaux :

- Les Feuilles : Eucalyptus, Citronnelle, Laurier Noble...
- Les Fleurs : Camomille, Rose, Lavande
- Les Zestes : Citron, Orange, Bergamote...
- Le Bois : Bois De Rose, Santal...
- L'écorce : Cannelle...
- La Racine : Vétiver...
- Les Fruits : Anis, Badiane...
- Les Rhizomes : Curcuma, Gingembre...
- Les Graines : Muscade...

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiquement spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (**Bruneton, 1987**). On retrouve par

- Les Cellules A Huiles Essentielles : Chez Les *Lauracées* Et Les *Zingiberacées*.
- Les Poils Sécréteurs : Chez Les *Lamiacées*/
- Les Poches Sécrétrices : Chez Les *Myrtacées* Et Les *Rutacées*.
- Les Canaux Sécréteurs : Chez Les *Apiacées* Et Les *Astéracées*.

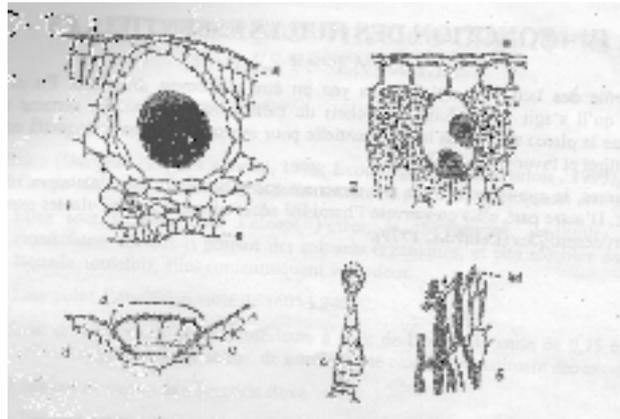


Figure13:quelques exemples d'appareil sécréteur.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes.

Les poches sécrétrices sont localisées dans tous les organes végétaux des *Citrus* : l'écorce, les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits (le Flavedo) et les graines. Les cellules, entourant la poche, se divisent et s'organisent pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne (Myriam., 2005).

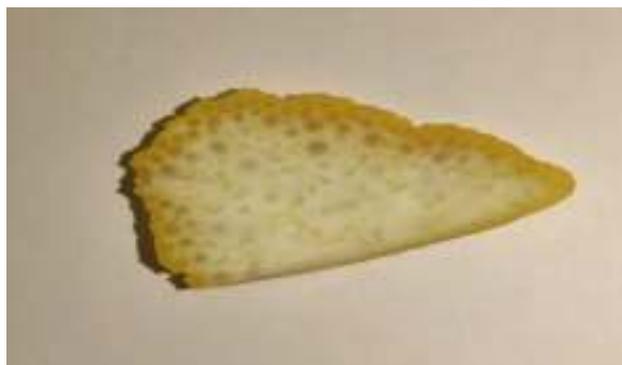


Figure14: Coupe transversale de l'épicarpe de citron (originale)

II .4. L'Obtention des huiles essentielles

Après l'identification de la matière première végétale, il convient d'utiliser une méthode d'extraction adaptée pour son obtention. De ce fait, à partir d'une même matière première végétale, une multitude d'extraits différents peuvent être réalisés, parmi lesquels on retrouve les huiles essentielles.

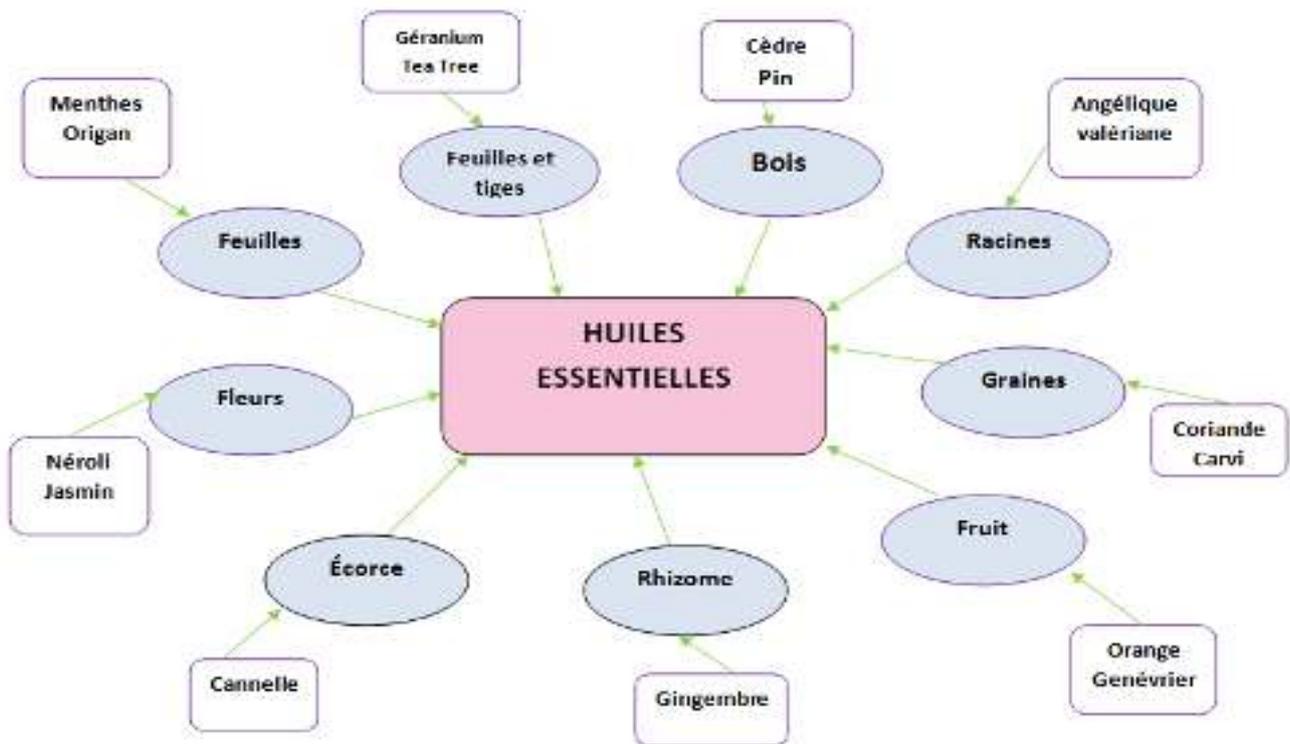


Figure 15: Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.

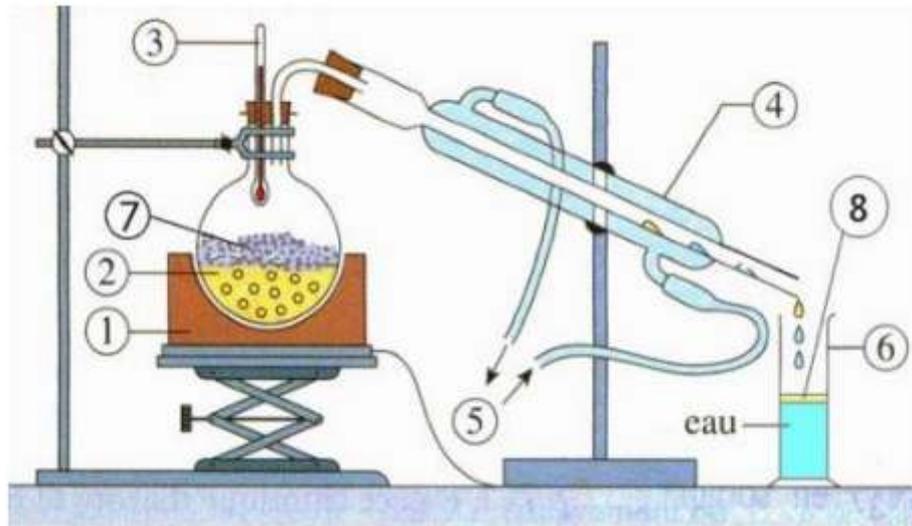
Il existe de nombreux procédés qui sont utilisés pour extraire les huiles essentielles des plantes aromatiques. Nous expliquerons ci-après la méthode principale :

II .4.1. Hydro-distillation

C'est un procédé d'extraction parmi les plus anciens et les plus simples, apporté par les arabes au IX^e siècle. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (**loi de Dalton et loi de Raoult**) (Pavida et al, 1976). Cette technique est très proche de la distillation à vapeur saturée, la seule grande différence est que la plante aromatique (entière ou broyée) est directement immergée dans un alambic rempli d'eau. Le tout est ensuite porté à ébullition, la chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues.

La distillation à l'eau s'effectue en dessous 100°C, ce qui aide à protéger tant la matière végétale que l'HE qu'elle contient. Cette technique permet d'extraire sans l'endommager les HE les plus délicates comme l'huile de néroli, qui est sensible à la chaleur .

Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le **Clevenger (el haib, 2011)**.



1- Chauffe ballon
2- Ballon
3- Thermomètre
4- Réfrigérant

5- Entrer et sortie d'eau de refroidissement
6- Eprouvette graduée
7- Matière à extraire l'essence
8- La couche d'HE

Figure16:Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation(internet).

II .5. Les Propriétés Des huiles essentielles

II .5.1. Propriétés physiques

Selon (Bardeau,1976;Legrand , 1978;Lenberg,1982;Bruneton,1999)les huiles essentielles et les essences possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

- Les huiles essentielles sont volatiles ,insolubles et plus légère que l'eau ,ce qui permet leur séparation dans le vas florentin
- Leurs volatilité permet la diffusion atmosphérique et les inhalations .
- Chaque HE a une odeur caractéristique selon sa richesse en composés oxygénés et aromatiques

- Les HE sont solubles dans les huiles végétales (meilleurs solvants et véhicules), dans les alcools, l'éther, et les solvants organiques.
- Elles présentent une densité ($D=m/v$) proche de l'eau (varie de 0,75 et 0,99 g/cm³) ce qui permet leur distillation.
- Leurs solubilités :
 - Dans le Corp. Gras permet l'utiliser pour préparer des huiles de massages, laits corporels, et des crèmes
 - Dans l'alcool permet de se mélanger avec un gel hydro-alcoolique
- Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation

- La couleur des huiles essentielles est très variable. Cela comprend l'ultra-violet (UV) du zeste de mandarine (*Citrus Reticulata* Blanco), le bleu (lié à la présence de *Chamazulène*) des sommités de tanaïse annuelle (*Tanacetum Annuum* L.), ou encore le vert pâle du zeste de bergamote (*Citrus bergamia* Risso & Poitet). On retrouve également le rouge de certaines sarriettes (*Satureja* sp.) Ou le jaune pâle de la sauge sclérée (*Salvia sclarea* L.). La plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Elles foncent au cours de leur vieillissement (oxydation).

II .5.2. Propriétés chimiques

Les HE s'oxydent à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène en même temps que leur odeur se modifie. Elles absorbent le Chlore, le Brome, l'iode, avec un dégagement de chaleur, et peuvent se combiner à l'eau pour former les hydrolats. Dans certains cas extrêmes, les huiles essentielles vieilles et oxydées présentent un risque toxique important

II.6. La synergie des huiles essentielles

En aromathérapie, une synergie désigne un mélange de plusieurs huiles essentielles et/ou végétales dont l'association va renforcer l'action recherchée.

Ces huiles peuvent avoir des propriétés différentes, permettant d'obtenir un mélange polyvalent agissant à différents niveaux, ou avoir les mêmes propriétés mais via des molécules différentes, permettant de potentialiser l'effet recherché. Une synergie aura donc plus de chances d'agir qu'une huile essentielle toute seule.

Les interactions entre les constituants des huiles essentielles peuvent également affecter leur activité. Par exemple, l'efficacité des huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas Aeruginosa* est due à la synergie entre les principaux constituants : le *Carvacrol* et le *Thymol* (Lambert et al., 2001).

II .7. Le Rôle physiologique des huiles essentielles chez la plante

Beaucoup de plantes produisent les HE en tant que métabolite secondaires. Ces derniers ne sont pas essentiels pour la croissance des plantes (Croteau et al;2000), leurs rôle exact dans le processus de vie de plante reste encore mal connu. Les HE peuvent avoir plusieurs effets Utiles pour la plante comme source énergétique ,facilitant Certaines réactions chimiques permettant de conserver l'humidité des plantes, pour leurs action répulsive sur les prédateurs .

Des études ont montrés que dans les plantes les HE ont pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs ou repousser les insectes hostiles. Un certain nombre d'entre elles ont également des propriétés antiseptiques ,insecticides, fongicides et bactéricides (Carson et Hammer,2011)

les huiles essentielles ont été testées sur déférentes cibles en protection des cultures :les insectes, les micro-organismes(champignons et bactéries),les adventices et aussi en protection des semences.

➤ Les insectes:

les activités des HE décrites sur les insectes sont variées :

La plupart des huiles essentielles agissent en perturbant la structure de la membrane cellulaire mais, pour certaines des effets neurotoxiques ont pu être mis en évidence ,dus à des interactions avec des neurotransmetteurs tels que le GABA et l'octopamine ou par inhibition de *L'acétylCholinesterase*.

Par leur volatilité et leur petite taille ,beaucoup des constituants des huile essentielles inter-agissent avec les récepteurs d'odeur des insectes, déclenchant des comportements varié : fuite, attraction ,etc.

➤ Les adventices :

Les études publiées sur l'activité des huiles essentielles comme herbicides sont nombreuses et recouvrent généralement des tests d'inhibition de germination de graines

Les herbicides agissent en dissolvant la cuticule recouvrant les feuilles ,ce qui entraine la mort des cellules .

II .8. Stockage et conservation

La stabilité d'une huile essentielle lors de son stockage est un facteur important pour la sécurité de son utilisation et pour sa valeur commerciale, il existe peu d'études sur la stabilité des huiles essentielles pendant la phase de stockage,elles portent principalement sur l'oxydation.

Pourtant, d'autres facteurs sont importants à considérer à savoir :

l'exposition à la chaleur, la lumière, l'oxygène et l'humidité, les matériaux dont sont faits les contenants ainsi que le temps où ils y sont entreposés .

En effet, les conséquences de la dégradation sont nombreuses ,pour éviter au possible l'altération des HE, il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des HE (**norme AFNOR NF T 75-001, 1996**) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (**norme NF 75-002, 1996**) il y a lieu de :

- d'utiliser des flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique(Vert,Brun,ou bleu), presque entièrement remplis et fermés de façon étanche.

- de pourvoir le flacon d'un bouchon vissé et bien scellé pour éviter l'évaporation, vue la volatilité des HE.

- l'emploi de petites billes en verre à la surface de l'HE réduit l'action oxydante de l'air.

- conserver le récipient au sec, au frais, à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 5°et 30°C (mettre au réfrigérateur si nécessaire). Ne pas exposer les bouteilles à la lumière ou à l'air pendant de longues périodes, pour éviter l'oxydation des composants, car cela peut rendre l'HE plus toxique, les zones de stockage doivent être hors de la portée des enfants.

- La durée de conservation d'une HE, varie entre 2 et 5 ans ,a condition de respecter les bonnes conditions de stockage.

- Les essences d'agrumes font exception, ils ne peuvent se conserver que pendant 6 mois .

II .9. Toxicité

En dépit de leurs effets bénéfiques ,les huiles essentielles sont loin d'être non toxique ,la majorité des HE a de très fortes doses causant ainsi des effets toxiques(**Hammer et Carson,2011**) .

Les plantes aromatiques ne sont pas toxiques , mais les huiles qu'on en extrait peuvent l'être ,ces dernières sont lipophiles, et de ce fait rapidement absorbées, que ce soit par voie respiratoire, cutanée, ou digestive. Cette propriété qui est à l'origine de leur grande efficacité est également la source de leur toxicité.

Par leur composition chimiques les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence ,du fait qu'elles peuvent présenter de très grave danger lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essence en absorption interne ou en application externe (**Bernadet,1983**).

Rappelons que les huiles essentielles sont susceptibles d'entraîner plusieurs types de toxicité

- Hépatotoxicité
- Dermotoxicité (irritations, brûlures, hypersensibilité, phototoxicité) et irritation des muqueuses exposées
- Neurotoxicité (dépression ou excitation du système nerveux central, effet stupéfiant, convulsions)
- Effets tératogènes et abortives
- Propriétés carcinogéniques
- Hypersensibilité

II.10. l'Huile essentielle du citron et sa composition chimique

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

Les principaux constituants de l'huile essentielle de citron sont mentionnés ci-dessous :

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

L'effet antioxydant de cette huile, est démontré par plusieurs articles scientifiques, ce qui a permis d'envisager un traitement dermatologique local contre le vieillissement de la peau, sachant que l'huile essentielle du citron a un effet photo-sensibilisant.

II .10.1. Description de l'appareil sécréteur

Ces essences aromatiques sont secrétées par des poches sphériques *Schizolysigènes* et libérées par un canalicule relié à l'épiderme. (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

Au niveau macroscopique, les poches apparaissent comme des petits points sombres.



Figure17:Analyse macroscopique des poches à huile essentielle du citron(SupAgro).

L'allure microscopique des cellules sécrétrices est présentée sur la figure18 :

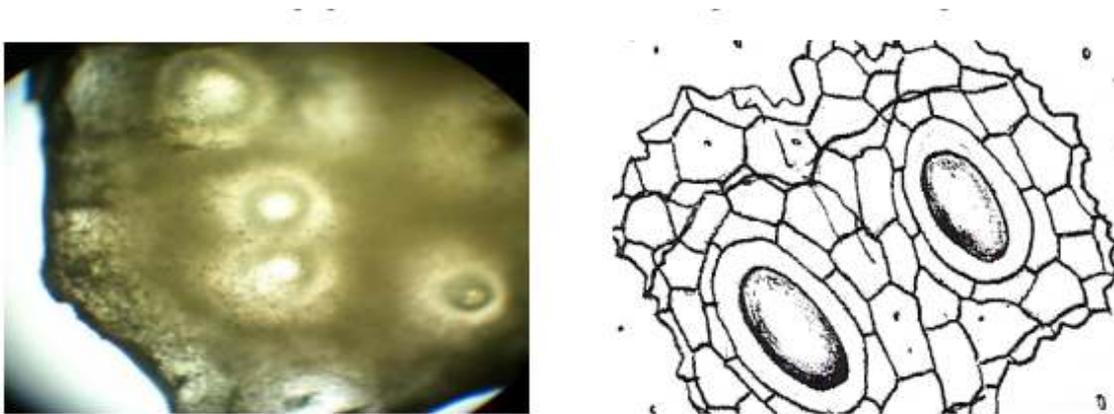


Figure18: Analyse microscopique des poches à huile essentielle du citron(SupAgro).

II.11.Les activités biologiques des Huiles Essentielles

II.11.1.ActivitéAnti-Oxydante

L'activitéantioxydante est parmi les des sujets les plus abordés dans la recherche sur leshuiles essentielles . L'oxydation est indispensable pour les organismes vivants pour effectuer la production d'énergie servant à alimenter les processus biologiques.

Les dommages engendrés par les réactions d'oxydation surl'ensemble des substances biologiques peut entraîner plusieursmaladiestellesque :lecancer,maladiedufoie,l'Alzheimer,lesarthrites,l'inflammation,lediabète,lamaladiedeParkinson,l'athérosclé roseetleSIDA(Shaaban *et al.*, 2012).

Les composés responsables de cette activité, ce sont souvent les terpènes et terpénoïdes. De ce fait les huiles essentielles qui contiennent des hydrocarbures monoterpéniques, des monoterpènes et/ou des sesquiterpènes oxygénés ont des propriétés antioxydantes plus importantes (**Deba et al., 2008**).

Selon (**Jazet Dongmo et al en 2013**) les huiles essentielles de l'écorce du fruit de Citrus possèdent d'autres activités dont l'activité antioxydante, anti radicalaire et anti inflammatoire.

Toutes ces études montrent que les huiles essentielles, sont une source importante d'antioxydants naturels, et peuvent être utilisées en étant une alternative aux antioxydants synthétiques, afin de prévenir plusieurs maladies dégénératives (**Yanishlieva-Maslarova, 2001**).

II .11.2..Activité antibactérienne

Les huiles essentielles sont connues pour avoir un effet antibactérien (**Deans et Ritchie, 1987; Carson et al., 1995; Mourey et Canillac, 2002**), et ceci sur les deux groupes de bactéries gram-positif et gram-négatif, qui ont démontrées une importante sensibilité *in vitro* (**Carson et Hammer, 2011**).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été la plus étudiée. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries (**Safaei-Ghomi J, 2010 ; Belletti N et al, 2008**).

Chapitre III

La physiologie de la peau

III .1. La Peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain, elle agit comme une barrière efficace entre le milieu intérieur et l'environnement extérieur, et défend les organes internes des agressions externes, ainsi qu'elle prévient la perte en eau et empêche la pénétration des substances toxiques et pathogènes.

Elle est composée de trois couches superposées: L'épiderme ,Le Derme, Et L'hypoderme.

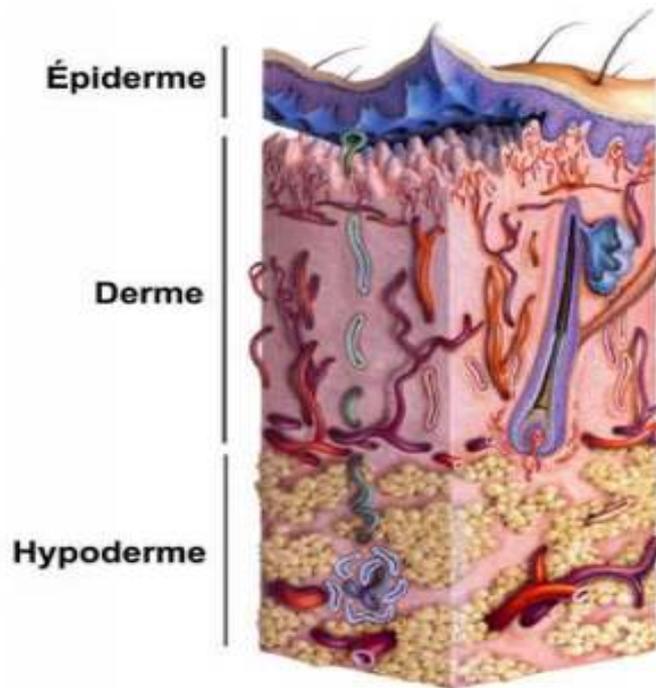


Figure19:schéma des différents couches de la peau.

III .1.1.L'épiderme

La couche superficielle de la peau, de nature épithéliale, son épaisseur varie de 0,05 mm à 1,5 mm, recouvrant le derme, il assure l'imperméabilité et la résistance de la peau .

C'est une couche corné qui contient des petite trou d'ou il sort la sueur ,il possède quatre couche cellulaire .

III .1.2.LeDerme

Il est aperçu ,lorsque l'on se blesse ou dans le des vergeture, c'est la couche la plus épaisse .c'est un tissu conjonctif ,qui soutient l'épiderme ,il protège le réseau vasculaire et les fibres nerveuses, et régule les variations de chaleur du Corp., car il active la transpiration par le biais des glandes sudoripares, il alimente aussi la peau en oxygène et en substances nutritives ,il contient des vaisseaux lymphatiques par les quelles le système immunitaire est informé de la présence d'agents pathogène .

Au niveau de derme se trouve le collagène et l'élastine qui assure son élasticité et sa résistance.

III .1.3.L'hypoderme

C'est la troisième et la dernière couche de la peau , c'est une couche grasseuse ,au niveau de cette dernière l'accumulation des graisses peut entraîner des modifications du tissu adipeux comme c'est le cas de la cellulite

Cette couche protège le corps des chocs physiques et des variations de température ,c'est un lien de passage pour les vaisseaux et les nerfs pour atteindre le derme .

III .2. Le film hydrolipidique

C'est une émulsion sébum – sueur, la phase lipidique étant composée de sébum excrété par les glandes sébacées et la phase aqueuse ayant pour origine la sueur et l'eau provenant de la perte insensible en eau ,il recouvre la peau .

Ce film cutané de surface participe au maintien du pH acide de la peau, et à son hydratation en empêchant l'évaporation de l'eau, il possède avant tout une fonction de barrière.

III .3. Le pH cutané

Le pH de la peau joue un rôle très important , le pH de la surface cutanée est acide, il se situe généralement entre 4 et 7. Cette acidité limite la multiplication des germes pathogènes tout en préservant le développement de la flore résidente .

III .4. L'hydratation cutanée

L'eau composante principale de la matière vivante, est une substance vitale, indispensable aux échanges cellulaires et tissulaires, dont l'organisme a un besoin permanent.

Les teneurs moyennes en eau sont les suivantes

- Corps humain : 70% (homme femme, nouveau-né vieillard)
- Peau : 70% (soit environ 8 litres chez l'adulte)
- Hypoderme : 20%
- Derme : 80% ,c'est le réservoir en eau de l'organisme
- Epiderme : 60 à 65%
- Couche cornée : 10 à 15%

Une peau bien hydratée est résistante, souple, d'aspect agréable, lumineuse, douce et lisse au toucher.

L'hydratation de la peau est le reflet de l'équilibre entre les apports et les pertes en eau .

ChapitreIV

La crème hydratante et leur
composants

IV .1.Définition d'un « produit cosmétique biologique »

C'est tout un produit contenant un maximum d'ingrédients naturels, issus du règne végétal, comme les huiles végétales ou les extraits de fruits, les huiles essentielles et les eaux florales. ,lescires,lesbeurres...

Ces produits utilisent des matières premières quasiment brutes. Ils subissent essentiellement des transformations mécaniques et chimiques primaires, telles que distillation, extraction, cuisson ou filtration, fermentation et oxydation, percolation, dessiccation, laissant peu de résidus, qui sont aisément recyclables et biodégradables .

IV .2.La crème hydratante

L'eau est un élément vital pour tout organisme vivant et également pour la peau.

Le niveau d'hydratation de la couche cornée varie selon la profondeur considérée : il existe un gradient d'hydratation, la base étant la mieux hydratée et la surface, au contact de l'air, ayant une teneur en eau plus faible .

L'hydratation de la peau vise donc à renforcer cette couche cornée ainsi que l'ensemble de la peau.

Une crème hydratante est un produit cosmétique qui apporte une réponse pratique aux problèmes de la perte d'eau de la peau, c'est une émulsion constituée d'une phase aqueuse (à base d'eau) et d'une phase grasse, ce mélange homogène d'huile et d'eau va jouer un double rôle dans l'hydratation :

* d'abord amener de l'eau : hydrater (c'est d'abord éviter la déshydratation).

*éviter qu'elle ne reparte trop rapidement : c'est le rôle de la phase huileuse.

La crème hydratante a le pouvoir de rétablir le FHL (Film Hydrolipidique).

IV .3.La structure générale d'une crème cosmétique

IV .3.1.Les émulsions

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables de deux liquides non miscibles qui se séparent après mélange. . La phase discontinue (aussi appelée phase dispersée ou interne) est dispersée dans la phase continue (ou dispersante ou externe) sous forme de petites gouttelettes. La phase dispersée et la phase dispersante peuvent être soit aqueuse, soit huileuse (hydrophile, lipophile).

L'émulsion peut être de types:

Les émulsions simples

Sont obtenues par la dispersion de deux phases, en général liquides: une phase lipophile (L, "qui aime le gras") est une phase hydrophile (H, "qui aime l'eau").

Il existe deux types d'émulsions simples

-les **émulsions lipophile-hydrophile** ou L/H, plus connues sous l'appellation "huile dans eau", dont la phase externe est la phase hydrophile .

-les **émulsions hydrophile-lipophile** ou H/L , couramment appelées "eau dans huile", dont la phase externe est la phase lipophile.

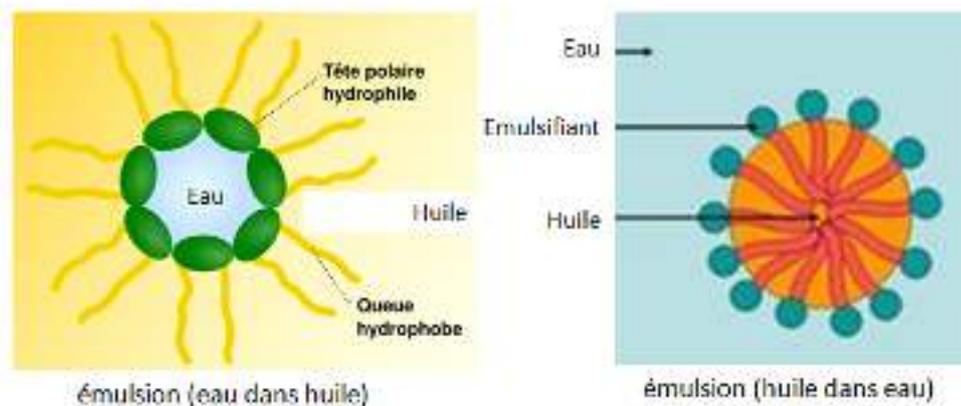


Figure20: les différents types d'émulsions .

Pour réussir à mélanger les deux phases et obtenir un mélange qui reste stable, on doit ajouter un tensio-actif

a) Tensio-actif

C'est une molécule présentant la particularité d'avoir une double polarité lipophile hydrophile, constituée de deux parties : une tête polaire hydrophile et une queue lipophile.

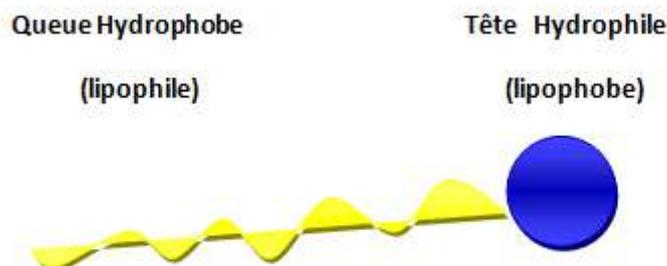


Figure21: Schéma d'un tensio-actif .

Les émulsions multiples

sont constituées de trois phases: L/H/L ou H/L/H .leurs structures les permettent de le considérer comme des systèmes réservoirs .Ces émulsions présentent l'avantage d'offrir une meilleure pénétration des actifs ,ainsi que des textures aux qualités cosmétiques remarquables (finesse, onctuosité ,absence d'effet gras).

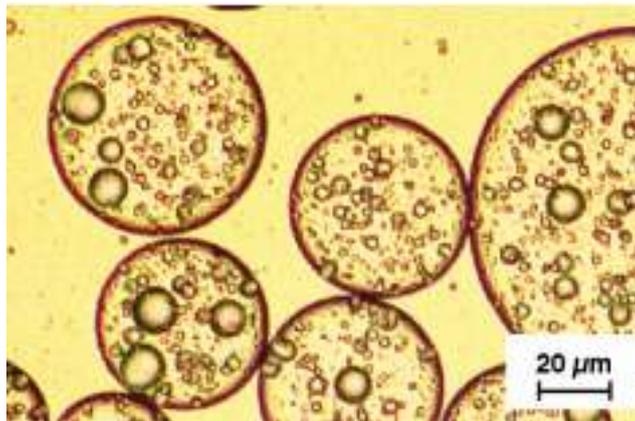


Figure 22:Vue microscopique des émulsions multiples H/L/H ;L/H/L.

- **Les microémulsions** sont des émulsions de type L/H ou H/L dont la taille des particules dispersées se situe entre 10 et 100 micromètre (μm).Leurs textures très fluide peut être pulvérisée ,la pénétration des actifs est alors immédiate.
- **Les nano émulsions** sont des émulsions ultrafines dont les globules mesurent environ 150 nanomètre (nm) ,soit trente fois moins que les globules des émulsions classiques.les nano émulsions ,très fluides, peuvent être utilisées sous forme de spray

IV .3.2.Les excipients

Sont des substances qui véhiculent les principes actifs dans l' épiderme, ils vont moduler la pénétration de l'actif à travers la peau et peuvent avoir une activité par eux-mêmes .

IV .3.3.L'adjuvant

C'est toutes substances qui aident à renforcer l'accomplissement d'un processus de traitement tout en améliorant les caractéristiques du produit fini

Son rôle varie d'un domaine à l'autre

- **Agrochimie** : pour renforcer l'absorption ,pénétration ,mouillabilité, diffusion ,...foliaire de produit agrochimique par la plante.
- **Cosmétique**: pour faire une crème stable .
- **Médecine** : pour encapsuler ,enrober ,protéger ,stabiliser ,et contrôler la libération des principes actifs.
- **Agroalimentaire**: pour protéger et stabiliser les aliments.

Les additives

Qui présents en petite quantité pour améliorer la présentation et la conservation du produit, ce sont

- Des agents conservateurs, qui évitent la contamination bactérienne et des antioxydants qui protègent les produits de l'oxydation .
- Des parfums destinés à rendre agréable l'utilisation du produit de beauté ou à masquer l'odeur de certains ingrédients .
- Des colorants.

Partie expérimentale

Matériel & Méthodes

I .1.L'Extraction de l'huile essentielle de citron

I .2.Matériel végétale

On a choisis pour cette études la variété Eurêka (4 saisons) obtenu dans un verger qui se situe au sein d'une zone agricole dans la plaine de la MITIDJA et exactement à la commun de Chiffa ,wilaya de BLIDA .



Figure23:espèce de citrus limon (arbre et fruit).

L'extractionpratique de l'huile essentielle de citron a été réaliser à deux reprises ,la première au niveau de laboratoire de phytopharmacie université de BLIDA 1, et ce en utilisant l'écorce en **petits morceaux** ,et la deuxième fois au niveau de l'atelier Bio lera, en utilisant l'écorce **pulvérisée**.

On a choisis d'utiliser une matière végétale sous deux formes dans le but de connaitre leur l'impact sur le rendements de notre huile essentielle.

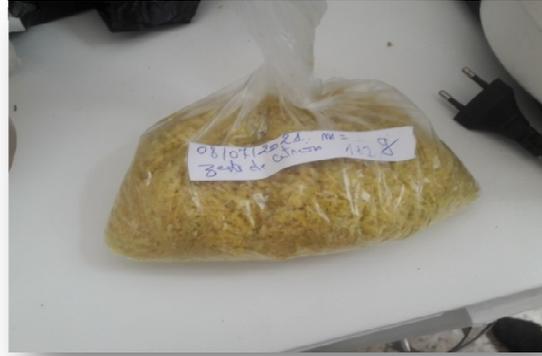


Figure 24:écorce de citron pulvérisé.



Figure 25:écorce du citron en petits morceaux.

I .2.1.l'extraction par HD

L'extraction par hydrodistillation (HD) avec un appareil de type Clévenger consiste à baigner directement notre matière végétal dans un ballon rempli d'eau a certain niveau ,cet ensemble est ensuite porté à l'ébullition à pression atmosphérique .

Sous l'action de la chaleur lorsque la température d'eau est 100°C à peu près ,les molécules odorante qui se trouve au niveau des glandes sécrétrices des végétaux commence à se libérer et entraîné par la vapeur d'eau (la condensation) ,le refroidissement par cette dernière conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation .

Ce mélange qui contient deux phases ,la phase aqueuse (hydrolat) et la phase organique surnageant (huile essentielle) sont séparées par leurs différences de densité (**Venturini,2012;Herzi,2013**).

I .2.2.Méthodologie

L'extraction de l'huile essentielle de citron (*Citrus Limon*) a été effectuée par la technique d'hydrodistillation , le montage est réalisé à l'Atelier **Bio Lera** (BLIDA) .

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

1. Préparer les citrons ,les laver soigneusement ,les éplucher en évitant de prendre la partie interne blanche de la peau
2. Peser à l'aide d'une balance analytique 182,2 g de zeste de citron râpé , les introduire dans un ballon d'un litre de volume remplie de l'eau jusqu'à deux tiers 2/3
3. Placer ce ballon dans le chauffe-ballon et fixer l'ouverture du Clevenger sur le ballon
4. Allumer le chauffe ballon.

Lorsque la température est presque à 100°C ,notre mélange est porté à ébullition, les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielle et de composés odorants passe dans le système Clevenger qui permet leur condensation dans le réfrigérant et l'obtention d'une solution à deux phases non miscibles la plus dense qui est la phase aqueuse (hydrolat) et la moins dense qui surnage au dessus de la quelle (huile essentielle).

L'huile essentielle obtenu est stocké dans des éprouvettes transparents et bien scellés avec un para- film et recouvertes avec du papier aluminium ou bien dans des flacons opaques, elles sont conservées à 4°C au réfrigérateur.

* l'hydrolat est récupéré dans un bécher

5. Mentionner toutes les informations nécessaire sur une étiquette (la date d'extraction, le nom ,etc.) Et poster l'étiquette sur le flacon.

Les mêmes procédures sont suivies lors de l'extraction en utilisant écorces découpées en morceaux .



Figure26:Montage d'hydro distillation manipulé (Clevenger)

I .3.Les Caractéristiques organoleptiques

Les huiles essentielles doivent répondre aux caractéristiques analytiques standard établies par les commissions d'experts nationales et internationales.

Pour avoir si l'huile essentielle de citron est conforme et de bonne qualité il faut effectué des tests organoleptiques (couleur, odeur et aspect) .

Ces caractères n'est pas suffisant pour connaitre la qualité de l'huile essentielle il faut se baser sur d'autres propriétés physico-chimiques.

I .4.Les propriétés physico-chimiques

Les propriétés des huiles essentielles se varient selon la partie de la plante (fleur ,feuille, racines ,etc.) Dont l'huile extrait .

Chaque huile essentielle possède plusieurs propriétés dont les plus importants sont

- **Le rendement**

Calcul du rendement

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage est donné sous la formule suivante

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

Avec :

R : rendement en huile essentielle en pourcentage. .

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

M: la masse de zeste de citron en g.

- **Détermination du pH**

C'est une valeur, comprise entre 0 et 14, qui traduit l'acidité ou la basicité d'une solution .

Une solution est acide si son $pH < 7$. Plus on se rapproche de 0 , plus la solution est acide .

Une solution est basique si son $pH > 7$. Plus le pH se rapproche de 14 , plus la solution est basique

- **La Mesure du pH**

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le pH d'une solution:

- les appareils électroniques comme le **pH- mètres (figure 27)** permettent une mesure plus précise de la valeur pH

-les papiers indicateurs de pH dont la couleur varie en fonction du pH , permettent une mesure moins précise de la valeur pH

-Les bandelettes -tests , basées sur le même principe que les papiers indicateurs , permettent aussi de mesurer d'autres facteurs. (Dureté, teneur en nitrates...) (**Danielle, 2003**)

- **Mode opératoire**

Le ph de l'huile essentielle du citron a été mesurer à l'aide d'un pHmètre (marque: **CRISON**)

Pour les échantillons des cas suivants:

- Gel frais.
- Gel conservé au réfrigérateur 4°C
- Gel laissais dans la pailasse



Figure 27 : pH mètre (marque: **CRISON**).

- **Indice de réfraction**

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à la masse égale du volume d'eau distillé à 20 °c ,cette valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'He .

L'indice de réfraction des huiles essentielles est supérieur à celui de l'eau ,ce qui indique leur richesse en composants déviant la lumière polarisé).

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

- **Mode d'emploi**

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



Figure 28 : Réfractomètre type ABBE.

- **La densité**

$$D = \rho_{(he)} / \rho_{(eau)} = \rho_{(he)} = m_{he} / v_{he}$$

Avec:

- D: la densité en g/ml
- $\rho_{(he)}$: la masse volumique de l'huile essentielle en g/ml.
- $\rho_{(eau)}$: la masse volumique de l'eau en gramme par millilitre ($\rho_{eau} = 1,000 \text{ g.ml}^{-1}$).
- M_{he} : la masse de l'huile essentielle.
- V_{he} : le volume de l'huile essentielle.

I .5.Evaluation Des activités biologique du *Citrus Limon*

I .5.1.L'activitéantioxydante

I .5.1.1.Test au DPPH°

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 ; Chaabi ,2008**).

Cette activité a été évaluée par la méthode du piégeage du radical ((1,1-diphényle-2- picrylhydrazy) DPPH décrite par(**Akrami et al.2015**) avec quelques modification

La mesure de piégeage des radicaux libre DPPH en solution méthanoïque est une mesure de la capacité d'huile essentielle de citron à réduire le radical chimique DPPH par une décoloration observé lors de l'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH

Cette technique se déroule en préparant 50 ul de chacune des solutions méthanoïques de l'huile essentielle , de l'hydrolat, et de la vitamine C à différentes concentrations (200,400,600,800,1000 ug/ml)qui sont mélangées avec 5ml de solution méthanoïque de DPPH (0,004%) .



Figure29: un flacon contient la solution méthanoïque.

Après 30min d'incubation à la température de laboratoire ,l'absorbance est lue à 517nm a été mesurée en utilisant le spectrophotomètre(THERMO SIENTIFIC).

I .5.1.2.Méthodologie

- Préparation de la solution mère méthanoïque à DPPH:

On mélange 4mg de DPPH avec 100 ml de méthanol

- Préparation de solution méthanoïque à l'huile essentielle de citron :

On introduit un volume de (200,400,600,800,et 1000) µg d'huile essentielle de citron avec 1ml de méthanol.

- Préparation de solution méthanoïque à l'hydrolat de citron :

On introduit un volume de (200,400,600,800,et 1000) µg l'hydrolat de citron avec 1ml de méthanol.

- Préparation de solution méthanoïque à vitamine C

On introduit un volume de (200,400,600,800,et 1000) µg l'hydrolat de citron avec 1ml de méthanol.

Puis a l'aide d'une micropipette on prend 50ul de chacune des solutions méthanoïques d'huile essentielle de citron est on les mélange avec 5ml de solution méthanoïque de DPPH (0,004%), le même procédure est pour l'hydrolat et la vitamine C .

Les tubes sont maintenues dans l'obscurité à température ambiante pendant 30min ,après on peut lire nos résultats avec le spectromètre à 517nm.



Figure 30: spectrophotomètre(THERMO SIENTIFIC).

- **Calcul des pourcentages d'inhibitions PI**

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

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

Avec :

A C : absorbance du contrôle négatif.

A E : absorbance de l'extrait.

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

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

I .5.2.L'activité Antibactérienne

L'activité antibactérienne a été effectuée au niveau de laboratoire de la recherche des plantes Médicinales et Aromatiques de l'université de Blida 1 avec deux souches bactériennes dont une bactérie Gram négatives et une bactérie Gram positives *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Ces bactéries sont pathogènes et connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'homme. Ce sont des agents de pourriture fréquente des denrées alimentaires et des fruits et peuvent être toxiques.

I .5.2.1.les antibiotiques

Des substances qui sont capables d'inhiber le développement des bactéries ou de les détruire, lorsque on dit inhibition on parle d'un effet bactériostatique, et lorsque on dit destruction on parle d'un effet bactéricide. L'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action, vu qu'il possède une haute activité contre gram positives, mais demeurent peu actifs contre les bactéries gram négatives et les levures.

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de l'antibiogramme. La classification des souches bactériennes en catégories « sensibles, (s) », « intermédiaire, (i) » ou « résistant, (r) » aux antibiotiques est définie par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Claudiatuerek and Florian c. Stintzing. 2013).

I .5.2.2.La Détermination De La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

L'antibiogramme permet la détermination du diamètre de la zone d'inhibition et puis l'évaluation de **CMI**. Le but de cette technique qui se réalise que in vitro, c'est de tester la sensibilité d'une souche bactérienne envers un ou plusieurs antibiotiques pour savoir leur impact sur le développement et la survie de celle-ci.

I .5.2.3.Mode opératoire d'antibiogramme

- **L'identification des souches bactériennes**

Avec l'observation macroscopiques (couleur, aspect, texture...) et microscopique après réalisation de la coloration de Gram on peut identifier ces deux souches .

- **Préparations des milieux de cultures**

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne on a utilisé deux milieux nutritifs :

Mueller Hinton qui est un milieu non sélectif et qui favorise une bonne diffusion des antibiotiques décongeler les milieux de culture **MullerHinton** et dans un bain marie à **95°C** et garder en surfusion dans une étuve à **45°C**.

Sous la hotte a flux lumineaire ,verser les milieux de culture gélosé sur les boites pétri (15ml par boite).

Laisser refroidir et coaguler a température ambiante ,et garder dans des conditions évitant toute changement de leur composition.

- **Préparation de l'inoculum**

Réaliser des suspensions microbiennes à partir d'une culture jeune de bactérie bien isolées. (incubées à 37°C pendant 24 heures) .

On prélève les deux colonies bactériennes qui sont parfaitement identiques et incorporer la crème bactérienne dans un tube qui contient 5ml d'eau physiologique stérile.cet ensemble est homogénéisé à l'aide d'un vortex jusqu'a la dissolution totale des colonies dans l'eau physiologique.

Incuber les suspensions bactériennes dans des étuve pendant 30 min (37°C) .

- **L'ensemencement:**

Mouiller l'écouvillon avec la suspension microbienne ,ensuite essorer en pressant fermement et en sinueux sur la paroi interne de tube ,pour atténuer le excès de suspensions .

Dans les boites de Pétri, et à l'aide d'un écouvillon chaque suspension bactérienne est étalé en surface des boites gélosées de **Mueller-Hinton** ,une dispersion homogène est appliqué dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boite gélosée .

- **Dépôt des disques**

Des disques de papier **Wathman** stériles (**6 mm** de diamètre) sont déposés sur la surface de la gélose (1 seul disque par boite), puis imprégné de **10µl** de l'huile essentielle du citron (figure31) .

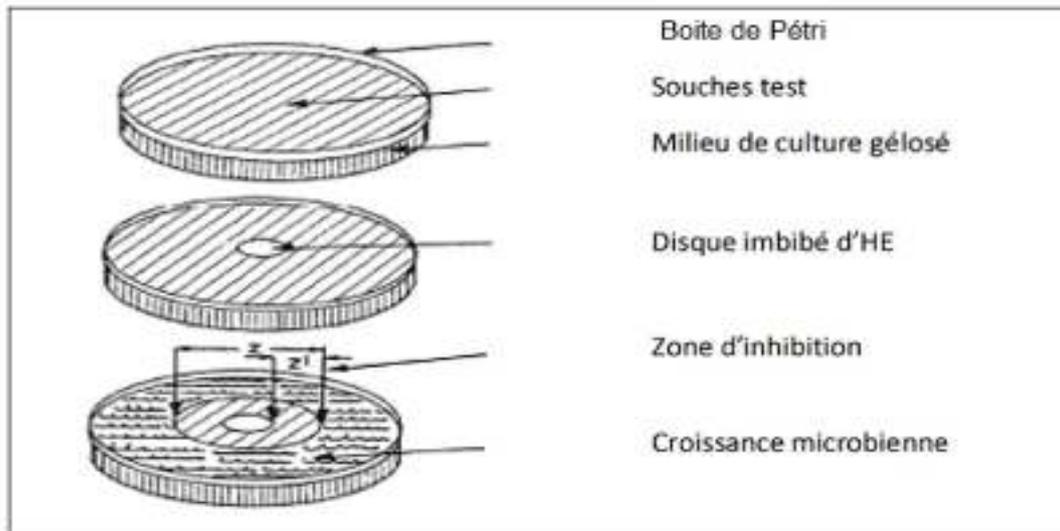


Figure 31: Illustration de la méthode de diffusion sur le milieu gélosé

Imbiber le bout de disque avec l'huile essentielle de citron avec concentration connue, et qui va être absorbé par le disque .

Déposer le disque à l'aide d'une pince stérile au centre de la boîte pétri, à la surface du la gélose.

Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 20 min pour que l'huile essentielle puisse diffuser puis incubée à 37°C pendant 24 heures pour la lecture . La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre .

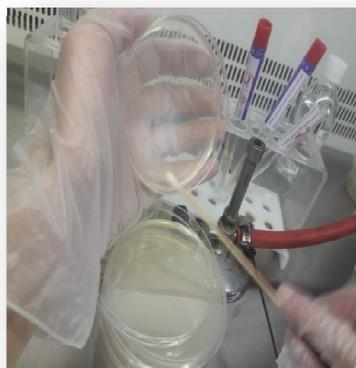


Figure32: Les différents étapes de l'activité antibactérienne.

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

Tableau4:Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (**Ponce et al ; 2003**).

I .6.La formulation d'une crème hydratante

I .6.1.Composants et fonctionnement

La préparation d'une crème hydratante (de nuit) à base de l'huile essentielle du citron de type émulsion H/E a été réalisé au niveau de laboratoire de la société Vague de Fraicheur (ZI Blida) .

Cette formulation a été réalisée selon trois phases ,les tableaux ci-dessous (**Tableau 5,6,7**) montrent les différents composants, leurs quantités ainsi que leurs fonctions dans la crème.

Phase A:

A 80°C

Matière première	Fonctionnalité	Pourcentage%
Eau		30
Glycerylstearate SE	Emulsionnant anionique H/E	4
Cetearylalcohol	Epaississant	2
Isopropyl palmitate	Emollient	1
Huile essentielle de citron	Anti oxydant	1.5

Phase B:

A 80°C

Matière première	Fonctionnalité	Pourcentage%
Eau		32
Carbomer	Epaississant	0.5
EDTA disodique	Séquestrant	0.7
glycérine	Humectant	5
NaoH (aq.Sol.30%)	Régulateur de pH	0.1-0.2

Phase C :

A 40-45 °C

Matière première	Pourcentage%
Alcool éthylique 96°C	4
Conservateur	0.4
Parfum	0.3

Tableaux 5,6,7 :les différents composants, leurs quantités ainsi que leurs fonctions dans la crème.

I .6.2.Procédure de Fabrication

1. Dispersez toutes les matières de la phase 1 dans l'eau.
2. Ajoutez le reste des ingrédients de la phase B .
3. Chauffez les phases A et B séparément à 75-80°C .
4. Ajouter la phase A dans la phase B sous agitation (300 tr/min).
5. Homogénéiser pendant 1h30 .
6. Neutraliser lecarbomère à 6.50 avec NAOH(aq.Sol.30%) .
7. Refroidir sous faible agitation jusqu'à 40-45 °C .
8. Ajouter la phase progressive C sous faible agitation.
9. Refroidir sous faible agitation.
10. Ajustez le ph nécessaire à 6.5 .



Figure33 : formulation d'une crème hydratante à base de l'huile essentielle de citron .

Résultats et discussion

I .1.Analyses des huile essentielle de Citron

I .2.Caractéristiques physico-chimiques

I .2.1.Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle de *Citrus Limon* présente un aspect liquide, d'une couleur jaune claire, caractérisée par une odeur forte, fraîche et aromatique.

Tableau 8 : aspect, couleur et odeur et type de l'huile essentielles de *Citrus Limon*

Caractère	Aspect	Couleur	Odeur	type
Citrus limon	Liquide Visqueux	Jaune claire	Forte, citronné, fraîche	volatile



Figure 34: aspect et couleur de l'huile essentielle *Citrus limon* (Originale, 2021).

I .2.2.Détermination du rendement d'extraction

Le rendement moyen de l'huile essentielle de citrus limon obtenue par Hydro distillation sur:

- 182,2 g d'écorce fraîche pulvérisé pendant 35 minutes (R1) .
- 842g d'écorce fraîche pendant découpée en petits morceaux 1h30 (R2) .

Méthode d'extraction		Hydrodistillation
Rendement %	R 1	0,006 ± 0,6%
	R 2	0,038 ± 3,2 %
Rendement moyen R %		0,022 ±2,2%

Après l'extraction par HD ,on constate que le rendement de l'huile essentielle du Citron extraite avec une écorce pulvérisé est plus élevé que celui de l'écorce en morceaux .

Donc la taille des particules joue un rôle très importants sur la quantité d'Heobtenue plus elle est minuscule plus elle favorise une meilleure extraction ,etpuis bon rendement .

I .2.3.La densité

La densité est très importante pour l'évaluation de la qualité de l'huile essentielle dans plusieurs domaines (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, chimique...etc.).

Huile essentielle	Citrus limon
Densité (g/ml)	0,7

D'après les résultats des densités obtenues, on peut dire que notre huile est conforme aux normes internationales. Selon l'Association Française de Normalisation, les HE appartenant aux espèces *Citrus* doivent avoir une densité maximale de 0,876 (AFNOR NF T. 75-202) .

I .2.4. La Mesure de ph

La mesure du ph de l'huile essentielle du citron en utilisant l'appareil CRISON à 25°C est estimée à **1,27** .

I .2.5. Indice de réfraction

Indice de réfraction a été mesuré avec un refractomètre selon la formule suivante :

$$N^{20} = n^1 + 0,00045(t-20) \text{ à } 31,2^\circ\text{C}$$

Indice de réfraction (IR)	1.63
---------------------------	------

I.3. Activité antioxydante

Après 30 mn d'incubation de la solution DPPH-extrait (à différentes concentrations), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les deux extraits, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH. Les résultats du pouvoir antiradicalaire par le DPPH des différents extraits de citruses sont rassemblés dans la figure (11).

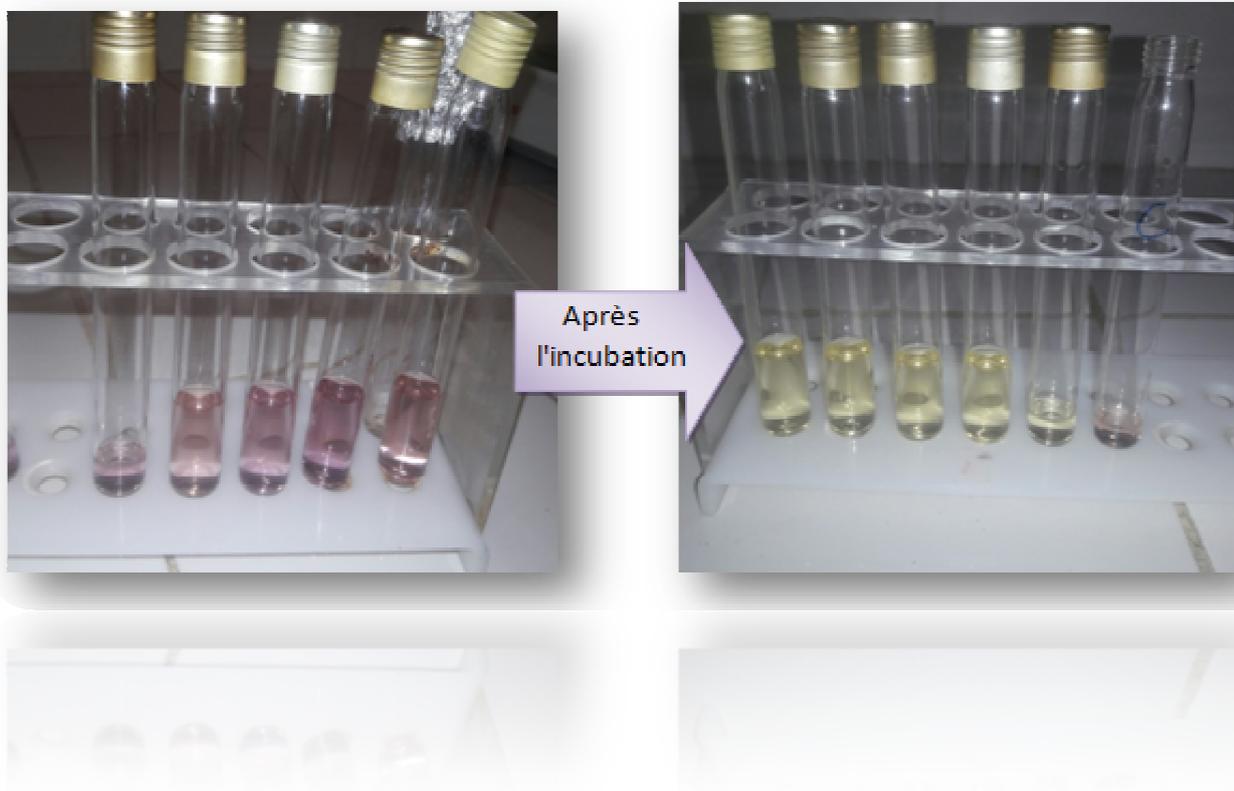


Figure35: Le résultat du pouvoir antiradicalaire par le DPPH après la période d'incubation.

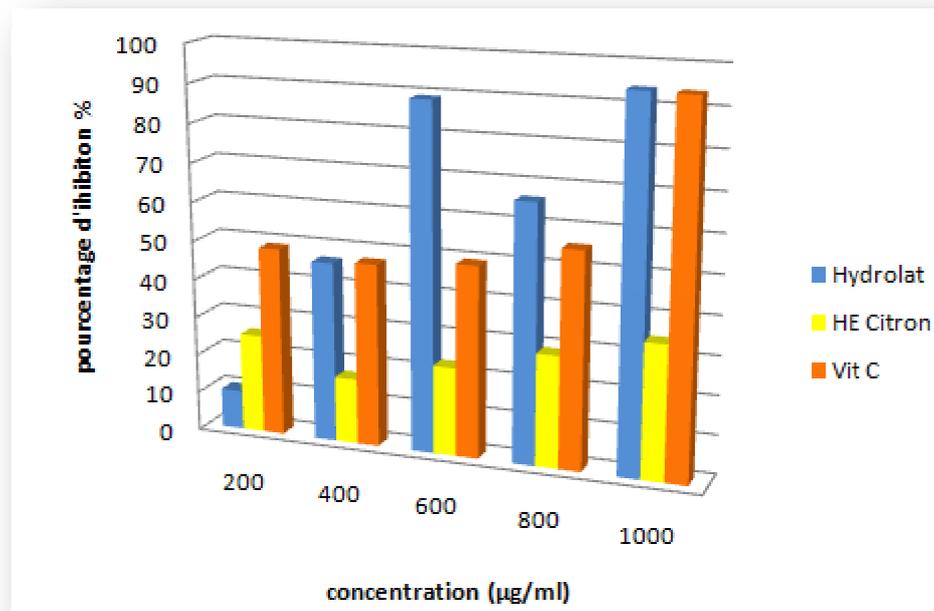


Figure36: Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'Hydrolat , HE de Citron , et la Vit C

D'après les valeurs de IC_{50} obtenu graphiquement par régressions linéaires des pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chacun des extraits testés les valeurs IC_{50} des échenillions comprises entre $2.4 \mu\text{g/ml}$ et $10.81 \mu\text{g/ml}$.

Selon **laib(2011)**, la IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydant d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est grande.

L'évaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* de Mitija a montré que activité est moins importante avec une valeur d' $IC_{50}=10.81 \mu\text{g/ml}$ par rapport a l'hydrolat qui donne une valeur d' IC_{50} de $2.4 \mu\text{g/ml}$.

Ceci nous a permis de constater que l'huile essentielle de citron a un faible pouvoir antioxydant .

I .4.Etude de Activité antibactérienne de l'huile essentielle de citron

I .4.1.Evaluation de la sensibilité aux antibiotique

L' antibiotiques testé CEFTRIAXONEa un effet inhibiteur sur *Staphylococcies aureus* (18mm) ,en revanche il est pas actif pour *Escherichia coli* (-6mm).

La sensibilité aux antibiotique a été évaluée sur 02 souches bactériennes par la méthode de l'antibiogramme. Les zones d'inhibition autour les disques de l'antibiotique sont exprimés en mm.

On constate que la souche de *Staphylococcus aureus* marque une sensibilité importante vis-à-vis de cet antibiotique avec des zones d'inhibitions de **18 mm** par contre *Escherichia coli* étaient donc résistantes (diamètre d'inhibition de **-6 mm**).

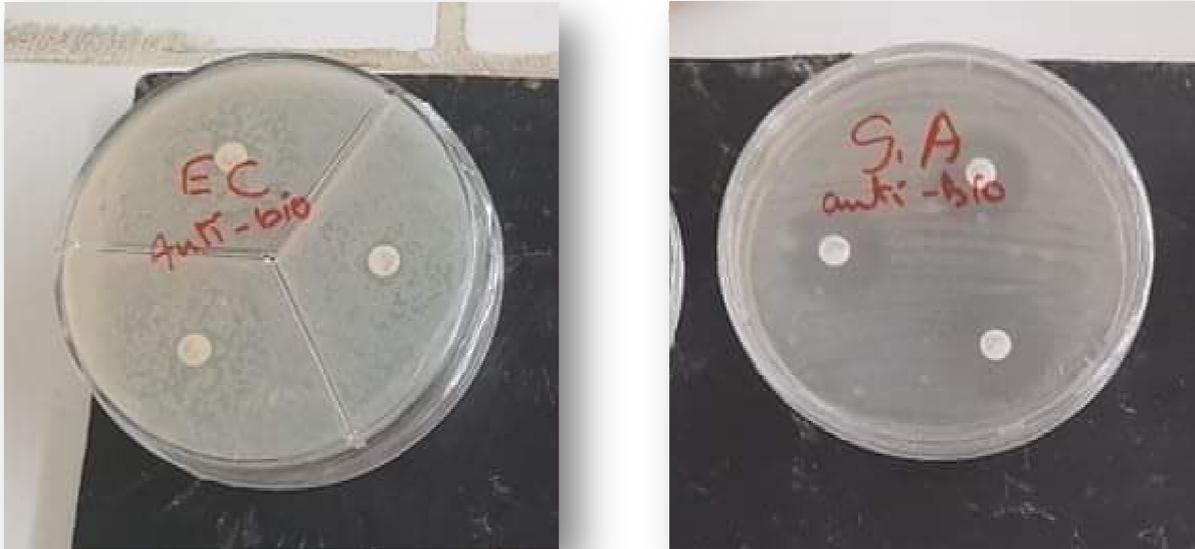


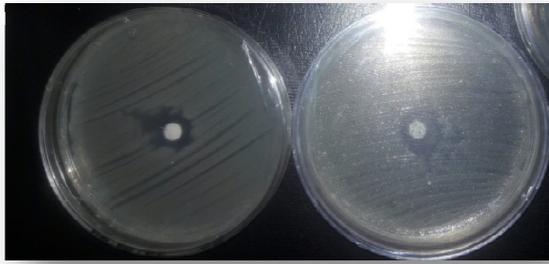
Figure 37: l'effet de l'antibiotique sur E. coli et S. aureus.

I .4.2. Evaluation de la sensibilité à l'huile essentielle de *C. limon* contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

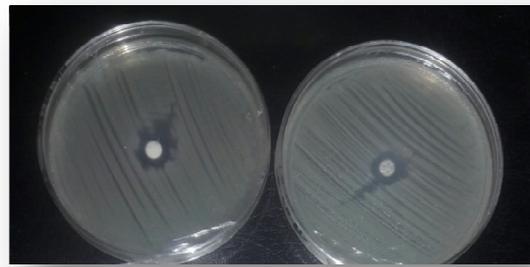
L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. limon* a été déterminée avec la méthode d'antibiogramme, contre les bactéries à Gram positifs et Gram négatif (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*).

Une activité inhibitrice a été observée pour *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de **9.26 mm** pour **10 µl** de l'extrait, Alors que diamètre d'inhibition pour **10 µl** de l'extrait est de **9.89 mm** pour *Escherichia coli*, donc on peut dire alors que les deux souches sont sensibles à l'effet de l'huile essentielle de citrus limon.

L'huile essentielle de *C. Limona* montrée une activité vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.



(1)



(2)

Figure38 :l'effet de l'He de Citrus limon sur : 1 :E. Coli, 2 : S. Aureus.

I .5. La crème hydratante

Selon cette formulation on a obtenu 188g de crème avec 3ml de l'huile essentielle de citron .

I .5. 1.Contrôle organoleptique sur la crème

Le tableau ci- dessous représente les résultats des tests sensoriels sur la crème

Aspect	Couleur	Odeur	Etatement
Onctueux Visqueux	Blanche	Caractéristique Forte	Facile

Tableau 9:les résultatsContrôle organoleptique sur la crème .

I .5. 2.Analyses physicochimique

- Mesure de ph à 32°C: 5.32
- Mesure de la viscosité a T 31.9°C : 7130 cp(71.3% ,mobile 6, vitesse 100 tour/min) .
- Test de stabilité : notre crème montre une stabilité pendant 2 mois ,car les paramètre organoleptiques restes les même pendant cette période .Les produits stables pendant un mois donne une estimation de stabilité de 3 ans .

Conclusion

L'extraction par hydro distillation nous a permis d'obtenir **13 ml** d'huile essentielle de citron .

La détermination des propriétés physico-chimiques de notre huile essentielle (densité, pH, indice de réfraction) a permis de mettre en évidence la qualité de cet huile, car ces propriétés relèvent que cette dernière est un liquide huileux homogène d'une couleurs jaune claire avec une odeur caractéristique forte et un ph très acide .la majorité de ces résultats sont conformes aux normes **AFNOR** .

D'après nos résultats, l' huiles essentielle du citron et son hydrolat sont dotées d'un pouvoir antioxydant dont le plus important est celui de l'hydrolat avec **2,4 µg/ml** ,et une faible capacité antioxydante enregistrée pour l'huile essentielle de citron avec une valeur de **10,81µg/ml** .

D'autre part ,Il a été relevé que l'huile essentielle du citron relève une activité antibactérienne contre les deux souches bactérienne testées *Escherichia Coli*; *Staphylococcies Aureus*avec une inhibition de **9.89mm** et **9.26mm**.

Notre l'huile essentielle *citrus limona* une activité antibactérienne et anti-oxydante complètement en accord avec l'efficacité qui lui est reconnue dans la littérature.

Enfin on a pu formuler avec succès une crème hydratante a base de l'huile essentielle du Citron.

En perspective il serait intéressant de poursuivre ce travail par:

- Tester d'autres méthodes d'extractions pour connaitre leurs effets sur le rendement
- Etudier l'huile essentielle de citron de divers régions d'Algérie .
- Une analyse chromatographique par CPG (chromatographie en phase gazeuse) pour identifier les molécules actives de cette huile .
- Tester d'autre méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante comme, les tests de blanchiment β -carotène .
- Tester l'activité antibactérienne sur d'autres souches bactérienne (*pseudomonasaeruginosa*; *listeria monocytogenes*; *proteusvulgaris*) .
- Etudier d'autre activités biologique tels que l'activité anti-inflammatoire ,insecticides , antifongique) .
- Formuler d'autres produits cosmétiques avec l'huile essentielle de citron tels que le sérum visage, sérum cheveux ,anti-transpirant) .

Références Bibliographiques

- Afnor NF T90-415 Octobre 1985, Essais des eaux - Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de {Clostridium} sulfito-réducteurs - Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds.
- AFNOR, (1998). Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
- AFNOR, Association Française de Normalisation, Recueil de normes Française «Huiles essentielles ». AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006, (2000).
- AFNOR 2000 ,P.h.e .Densité relative : NFT 75 - 111 ;Indice de réfraction : NFT 75 - 112.
- Akrami.F ;Rodriguez -LafutuentaA;Bentyeb K; Pezo D;GhalebiS.R;Nerin C;(2015).Antioxydant and antimicrobial active paper based on Zataria (Zataeia multiflora) and two cumin cultivars (Cuminumcyminum).Food Sci. Technol;60,929-933.
- Bachès B. et Bachès M (2011). Agrumes, nouvelle editionULMER: 7-127.
- Barboni T. (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie ;Thèse doctorat ; Spécialité : Chimie théorique, physique et analytique ; Università de Corsica – Pasquale Paoli ; pp 287.
- Bardeau F; la médecine par les fleurs .Ed. Robert Laffont,1976.
- Bardoula M ;Les cosmétiques Bio .Ed. Alpen,Monaco.26-29p.
- BekhchiChahrazad ; AbdelouahidDjamel;Les huiles essentielles ,office des publications universitaires.2014. pp 9-17;47.
- Bernadet M ;1983 .Phyto-aromatérapie pratique ,usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles,Eds .Dangles ,France .384 p.
- Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. (1988). Extraction des huiles essentielles.Chimie et technologie. In Information chimie, 229 pp. 179-184.
- Blancke R., 2001. Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E. Richard, H., Berset, C. (1998). Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Pell and Seed Extracts. J. Agric. Food Chem, 46(6): 2123-23.
- Bruneton J., 1987. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, France.
- BrunetonJ; Huiles essentielles in Pharmacognosie-phytochimie plante medicinales .3^{ème} éd.Doc et Tec .Lavoisier 1999.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253.
- Carletto J, Lombaert E, Chavigny P, Brévault T, Lapchin L, Vanlerberghe-Masutti F (2009) Ecological specialization of the aphid Aphis gossypii Glover on cultivated host plants. Mol. Ecol 18, 2198- 2212.
- Carson C.F.et Hammer K.A ; 2011 .Chimistry and Bioactivity of Essential Oils .In ThormarH.Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents .United Kingdom : Jhon Wiley et Sons Ltd.pp.204-238.
- Claudia Turek and Florian C. Stintzing. 2013. Stability of Essential Oils: A Review.Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety In: Institute of Food Technologists®, Vol. 12.
- CroteauR;Kutchan ,T.M; Lewis ,N.G. 2000 . Natural products(secondary metabolites),in Biochemistry and Molecular Biology of Plants (edsB.Buchanan ,W.Gruissem,andR.Jones),American Society of Plant Biologists,Rockville,MD,USA,pp.1250-1268.
- DAG ; LA CULTURE DES AGRUMES EN POLYNESIE FRANÇAISE; ed.2018.13-16p.
- Danielle Cachau-Herreillat, « Des experiences de la famille acide-base »,2 ème éd.2005 ,De Boeck.13,65.

- Davies FS et Albrigo LG (1994) Citrus. Wallingford, UK : CAB International, 254p.
- Davies et Albrigo, 1994 (b) Davies F.S. ; Albrigo L.G. (1994). fruit quality, and postharvest technology. in citrus. Atherton J., Rees, A., eds. crop production science in horticulture. CAB International. Del Rio, J.A.; Fuster, M. d.; Gomez, P.; Porras, I.; Garcia-lidon, A., et Ortuno, A. (2004). Citrus limon: a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food Chem*, 84:457-461. Dugo, G.; Di Giacomo, A. (eds.), 2002. Citrus: the genus Citrus. Taylor and Francis, London, UK.
- Deans S.G. & Ritchie G., 1987.- Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5:165-180.
- 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.
- Del Rio, J.A; Fuster, M. d.; Gomez, P.; Porras, I.; Garcia-lidon, A., et Ortuno, A. (2004). Citrus limon: a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food Chem*, 84:457-461.
- DESCHPPER R. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de la chémotype en aromathérapie, thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Faculté de la pharmacie Marseille .2017.
- Dubois C; 2006. Les arbres fruitiers Ed ; Rustcia, Paris , 127p.
- Dugo, G.; Di Giacomo, A. (eds.), 2002. Citrus: the genus Citrus. Taylor and Francis, London, UK.
- Ecormier, J. (2001). Les arbres fruitiers, le grand tamarinier, Azalées. Ed. Sainte Marie.
- Elhaib A. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse. 2011.
- El Kassouan Nadia . Les produits cosmétiques pour les soins visage ; thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie; Université Mohammed V - Souissi., pp 41.
- Espirade E., 2002 introduction à la transformation industrielle des fruits ed tec a doc.
- FAO 2013. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx/PageID=567#ancor>.
- FAO, 2017: food and agriculture organization of the united nations Rome, 2017 <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf> .
- FANNY B; 2008 . effet Larvicide des huiles essentielles sur stomoxys calcitrans à la Réunion. Thèse pour obtenir le grade Docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse . p 78.
- France Agri Mer ; 2020 . pp 3-4.
- Fruitrop , Recueil statistique d'agrumes, .53-65pp .
- 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. 898-904.
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois et thérapeutique. *Phytothérapie* 17(4), 162-169.
- Gollouin F., Tonelli N. 2013. Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Edition Brigitte Peyrot Poos, Paris Lavoisier SAS. PP. 186-195.
- Granados –Covarrubias E.H. et Maldonado L.A. (2009). A Wacker Cook synthesis of isoflavones : formononetin *Tetrahedron Letters* . 50:1542 -1545.
- HAMDANI S, Etude chimique et activité antioxydante des huiles essentielles des agrumes cultivés dans la région de Tlemcen, thèse de doctorat en chimie, TLEMEN : UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID, 2018, 48p.

- Hammer K.A. Carson C.F .2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thomar H .Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.Ed.John Wiley & Sons,Ltd ,United Kingdom .pp.255-295.
- JazetDongmo, P.M., Kuate, J., Ngouana, V., Damesse, F., Sonwa, E.T., AmvanZollo, P.H. et Menut, C. (2008). Comparaison des propriétés anti-radicalaires et anti inflammatoires des huiles essentielles de Citrus reticulata var. Madagascar et Citrus sinensis var. Casagrande du Cameroun. Fruits, 63: 201–208.
- Jean -Philippe Zahalka ;Dictionnaire Complet D'aromathérapie ;Ed Dauphin,Paris .2015.
- KAIBI F, TIMIZAR A, 2016, Etude de quelques activités biologiques Antimicrobienne, antioxydant et cicatrisante de deux agrumes « Citrus limon et Citrus sinensis », thèse de master en Génomique et biotechnologie végétale, Blida Université Saad Dahleb, ,55p .
- LadaniyaS.m. 2008. citrusfruit biology, technology, and evaluation.ed: elsevie r : 13-26 .
- Laib I, (2011).Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de Lavandulaofficinalis sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de magister, Université de Constantine, 122P.
- Lahlou M (2004). Methods of Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential oils; Phytotherapy Research 18; WILEY & SONS; p: 435- 448.
- Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benayache, F., Leghouchi, E and Bousseboua, H. (2006). The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. Thérapie, vol 61, N 4, p 347-355.
- Loussert R, 1989. Les grumes,l'arboriculture.Ed .Lavoisier ,Vol.1,Paris ,80P.
- Madjboud J C ;2002 .Reconnaissance visuelle de quelques variétés d'agrumes- CNCC-Juin .
- MADR, (2012). Ministre de l'agriculture et de développement rural algérien.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Tsujihara, N., Osawa, T. (1998). Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. Lipids, 33:689p
- Mohanpriya, M., Ramaswamy, L., Rajendran, R. (2013). Health and medicinal proprieties of lemon (Citrus limonum). International journal of Ayurvedic and Herbal medicine.3.1 (1095-1100).
- Moreau, 2003. « Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». American Perfumer& Essential OilReview, 1928, 467-503.
- Myriam Raymond, 2005. L'AROMATHERAPIE CHEZ LE NOURISSON ET LE PETIT ENFANT (thèse). Docteur en pharmacie. NANTES : faculté de pharmacie, 101.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Froelicher, Y., Luro, F., Cottin, R., 2000. La diversité des agrumes : structuration et exploitation par hybridation somatique. Compte rendu d'Académie d'Agriculture de France 86 (8), 197-221.
- Padrini, F., Lucheroni, M.T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassageEnergetiques avec Plus de100 Photographies. Paris : Ed.DeVecchi. pp.11, 15, 61 et 111.
- Pavida. D. L, Introduction to organic laboratory techniques, W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA. 1976, 567.
- Pharmacopée européenne .Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles .Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Assaps);2008.
- Ponce, A, G., Fritz, R., Delvalle, C., Roura, S, I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native micro flora of organic Swiss Shard. Lebensmwisstechnol36:697-84.

- Publications Huiles essentielles - Normes ISO - Normes AFNOR - Normes NF ISO - 2005/2006 [Internet]. [cité 19 nov 2017]. Disponible sur: https://www.doc-developpementdurable.org/file/Huiles-essentielles/FICHES_PLANTES&HUILES/Normes_AFNOR_HE.pdf.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O., Bourdon, E ET Bahorun, T. (2011). Polyohénol— composition, vitamin C content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. *Food Research International*, 44: 2088-2099.
- RebourH;1950. Les agrumes en Afrique de NORD ,union des syndicats des producteurs d'agrumes,Alger ,pp498-502.
- Remaudière G et Remaudière M (1997) Catalogue Des Aphididae Du Monde (Homoptera, Aphidoidea). p. 475. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Robert M. Douglas, HarriHemilä (2005). *PLoS Med* 2(6): e168 doi:10.1371/journal.pmed.0020168.
- Roistacher CN (2000) Diagnosis and Management of Virus and Virus like Diseases of Citrus Compendium of Citrus Diseases, Second Edition Timmer LW, Garnsey SM et Graham H (Eds.) APS Press, St. Paul, Minn. pp. 61-63.
- Safaei-Ghomi J, 2010. Composition chimique et activités:antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l’huile essentielle de Juniperusphoenicea. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- Sanago R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. *UniversitéBamako(Mali)*: 53.
- Shaaban H.A.E; El- GhorabA.H,Shibamotoand T;(2012).Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components :Review .*J.Ess. Oil Res ;24(2),203-212*.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. (1996). Fruit. In “Food composition and nutrition tables”. Ed. CRC. pp: 892, 893, 928, 929.
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt E-E (1996). *Biology of citrus*, Cambridge University Press, Cambridge,230 p.
- SPIGEL-ROY P.et GOLDSCHIMT E.E ,*"Biology of Citrus .Edition Cambridge University Press"(1996) P239*.
- USDA (Département américains de l’agriculture) <https://www.usda.gov/>
- Valnet J. (2001). *La santé par les fruits, legumes et les cereals*. Ed Vigot. Pp : 207-281.
- Valnet J; 2005 .*L'aromatherapieEd.Maloine S.A ISBINE .2-253-03564-5*.
- Venturini, N. (2012). Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples des spiritueux de myrte (*Myrtuscommunis L*) et de cédrat (*Citrus medica L*) de corse. Thèse présentée pour l’obtention du grade de docteur en chimie. Université de Corse- Pascal Paoli. Ecole doctorale environnement et société UMR CNRS 6134 (SPE). 242p
- Wang ,L .Y ;Wang , N.L;Yao,X .S ;Miyata ,S ; Kitanka ,S. (2003) .Euphane and tircullanetriperens from the roots of *Euphorbia kansui* and their in vitro effects on the cell division of *Xenopus* .*J Nat. Prod ;66,630* .
- Yanishlieva -Masalarova N; (2001).Sources of natural antioxidants: Vegetables ,fruits,herbs,spices and teas.In : *Antioxidant in Food : Pratical Applications* (Eds, YanishlievaN,PokornyJ,Gordor M.)Woodhead Publishing Ltd.Cambridge.pp.210-249.

