République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la

Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
Du diplôme de Master en

Spécialité : Valorisation des plantes

Filière : Biotechnologies

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Caractérisation des Huiles Essentielles du Bigaradier *Citrus aurantium l* (Feuilles et fruits) de la Région de Mitidja

Présenté par :
KORCHI Feriel SILMI Khadidja

Devant le jury :

GHENAI	Rafika	MCB	Université SAAD DAHLEB BLIDA	Présidente
ABBAD	Mohamed	MCA	Université SAAD DAHLEB BLIDA	Examinateur
BENDALI	Abdelaziz	MAA	Université SAAD DAHLEB BLIDA	Promoteur

Année Universitaire : 2020-2021

REMERCIMENTS

Nous exprimons notre profonde gratitude tout d'abord à « الله » de nous avoir donné le courage, la volonté et la force pour réaliser ce travail.

Nous tenons à remercier profondément notre encadreur Mr. BENDALI Abdelaziz, d'avoir accepté de diriger ce travail, de nous avoir guidé et fait confiance tout en nous laissant libres dans notre choix. Un grand merci pour sa rigueur, ses compétences, sa disponibilité, son soutien et aide inestimable.

Nous tenons également à remercier vivement Madame GHENAI pour sa contribution et son aide.

Notre gratitude va également à Mlle. SAADOUNE Zineb, docteur à l'université de Blida pour son aide et sa collaboration, son encouragement et sa disponibilité.

Nous ne terminerons pas sans remercier nos familles ainsi que tous ceux qui nous ont apporté de l'aide de prés ou de loin afin d'accomplir au mieux cette étude.

Dédicace

En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce travail avec une grande fierté

aux êtres les plus chers : **Mes parents,**

A mon père,

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.

J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.

A ma mère,

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous mes chers parents que je le dois,

Que Dieu vous garde.

A mes chers frères et ma belle sœur

A mon cher neveu : **Djadouni**

A mes chères cousines : **Zineb, Soumia, Racha**

A mon binôme **Khadidja**

A mes fidèles amies : **Salsabil, Radia, Wafa, Anfel, Ikram**

A toute la promotion de master 2021

Pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur solidarité envers moi.

FERIEL

Dédicace

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve... À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite.

A, ma mère **Fatima zohra** .A., mon père '**Mohamed**'. A ma chère grand-mère **Saliha** et mon cher grand-père **Ali** A mes cher frère : **farid** Et sa fiancée **Fatima** , **sidahmed ,nasr allah** A ma chère soeur :**Aya** A mon cher fiancé **Houcine** ma moitié, merci pour la patience. Que dieu vous protège et garde a moi.

A Mon oncle **walid** et sa femme,, Ma chère tante **Nafisa Siham Lamia** A mes princesses: **Abdel Rahman, Wael, Ramzy, Sarah, Aseel, Noha** A toute ma famille.

A mon binôme : **Feriel**

Ma Meilleure amie : **Hafsa**

A toutes mes amies et surtout : **Anfel,Ikram , Marwa**

A mes amies de la promotion de master valorisation.

Khadidja

Résumé

L'objectif de notre travail consiste à l'extraction et l'évaluation de l'effet antibactérien et antioxydant des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Citrus aurantium l*. Les H.E extraites par hydro distillation à partir des feuilles et des fruits de *C*itrus *aurantium l*, ont présenté un faible rendement allant de 0,16 à 0,2%.

L'activité antibactérienne a été évaluée par la technique d'aromatogramme sur trois souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*). L'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium l* a révélé une activité intéressante par rapport à l'huile essentielle des fruits de *Citrus aurantium l* avec des zones d'inhibitions qui varient entre 11 et 23mm. L'H.E des fruits de *Citrus aurantium l* était caractérisé par une faible zone d'inhibition avec un maximum de 18mm. Parmi toutes les bactéries testées, *S. aureus* était celle qui a montré la sensibilité la plus importante pour les deux extraits. L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC50. L'huile essentielle des fruits de *Citrus aurantium l* a exhibé une meilleure capacité antioxydante avec un IC50 de 350,78 µg/ml.

Mots clés : Huiles essentielles, *Citrus aurantium l*, activité antibactérienne, extraction, Hydro distillation.

Abstract

The objective of our work is the extraction and evaluation of the antibacterial and antioxidant effect of essential oils from leaves and fruits of *Citrus aurantium l*. The essential oil extracted by hydro distillation from the leaves and fruits of *Citrus aurantium l*, presented a low yield ranging from 0.16 to 0.2%.

The antibacterial activity was evaluated by aromatogram technique on three strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). The essential oil of *Citrus aurantium* leaves revealed an interesting activity compared to the essential oil of *Citrus aurantium* fruits with inhibition zones varying between 11 and 23mm. The essential oil of *Citrus aurantium l* fruits was characterized by a low zone of inhibition with a maximum of 18mm. Among all the bacteria tested, *S. aureus* showed the highest sensitivity for both extracts. The antioxidant activity of the extracts is expressed as IC50. The essential oil of *Citrus aurantium* fruits exhibited a better antioxidant capacity with an IC50 of 350.78 µg/ml.

Keywords: Essential oils, Citrus aurantium l, antibacterial activity, extraction, Hydro distillation.

ملخص

الهدف من عملنا هو استخراج وتقييم التأثير المضاد للبكتيريا ومضادات الأكسدة للزيوت الأساسية من أوراق وثمار البرتقال الحامض. أظهرت الزيوت الأساسية المستخرجة بالتقطير المائي من أوراق وثمار الحمضيات أورانتيوم 1 عائدًا منخفضًا يتراوح من 0.16 إلى 0.2٪.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة تقنية التصوير العطري لثلاث سلالات (الإشريكية القولونية ، المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية). أظهر الزيت العطري لأوراق أورانتيوم الحمضيات نشاطًا مثيرًا للاهتمام مقارنة بالزيت الأساسي لثمار بمنطقة l الحمضيات أورانتيوم 1 مع مناطق مثبطات تتراوح بين 11 و 23 ملم. يتميز الزيت العطري لثمار الحمضيات أورانتيوم هي الأكثر S. aureus منخفضة من التثبيط بحد أقصى 18 مم. من بين جميع أنواع البكتيريا التي تم اختبارها ، كانت بكتريا أظهر الزيت العطري لثمار IC50. حساسية للمستخلصين. يتم التعبير عن النشاط المضاد للأكسدة في المستخلصات بالرمز يبلغ 350.78 ميكروغرام / مل IC50 قدرة أفضل على مضادات الأكسدة مع تركيز l aurantium الحمضيات.

الكلمات المفتاحية: زيوت عطرية ، حمضيات أورانتيوم، نشاط مضاد للجراثيم ، استخلاص ، تقطير مائي

Table des matières

REMERCIMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABBREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : DESCRIPTION BOTANIQUE DE L'ESPECE ETUDIEE

1 Présentation de la famille des rutacées : 2

1.1 Les agrumes : 2

1.2 Origine et histoire des agrumes 2

2 Généralité sur la bigarade : 3

3 Description du *Citrus aurantium l* : 3

4 Classification botanique : 5

5 Morphologie du Bigaradier : 6

5.1 Epicarpe ou Flavédo : 6

5.2 Mesocarpe ou albédo : 6

5.3 Endocarpe ou pulpe : 6

6 Composition chimique et biochimique de la bigarade et d'autres agrumes : 7

7 Le bigaradier et sa culture : 8

7.1 Les variétés et hybrides : 8

8 Utilisation de bigaradier : 9

CHAPITRE 2 : HUILES ESSENTIELLES

1. Définition des huiles essentielles : 10

1.1 Huiles essentielles d'agrumes : 10

1.2 Localisations des huiles essentielles : 11

2. Propriété physique-chimique des huiles essentielles : 11

3. Composition chimique des huiles essentielles : 12

3.1 Les Terpenoïdes 12
3.2 Les monoterpènes 13
3.3 Les Sesquiterpènes 13
4. Techniques d'extraction : 13
4.1 Hydro distillation : 13
4.2 Entrainement à la vapeur d'eau : 14
4.3 Expression à froid : 15
4.4 Hydro diffusion : 15
4.5 Extraction par CO_2 supercritique 16
4.6 Extraction assistée par des micro-ondes : 16
4.7 Extraction par les corps gras : 17
4.8 L'enfleurage : 17
5. Conservation des huiles essentielles : 18
6. Toxicité des huiles essentielles 18
7. Caractérisations des huiles essentielles 19
7.1 Caractéristiques organoleptiques : 19
7.1.1 L'odeur 20
7.1.2 La couleur 20
7.1.3 L'aspect 20
7.2 Propriétés physico-chimiques 20
7.2.1 Densité : 20
7.2.2 Indice de réfraction : 20
7.2.3 Indice d'acide : 20
7.2.4 Potentiel d'hydrogène : 21
8. Analyse physico-chimique des huiles essentielles 21
8.1 La spectrométrie de masse 22
8.2 Analyse par couplage CPG/SM 22
9. Les activités biologiques des huiles essentielles : 23
10. Les huiles essentielles comme agents antimicrobiens : 23
10.1 Généralités : 23
10.2 Activité antimicrobienne : 24
10.3 Activité antifongique : 24

11. Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries : 25
12. Domaine d'utilisation des huiles essentielles :.....26
12.1 Parfumerie et cosmétologie : 27
12.2 Industrie alimentaire :.....27
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES
1 Matériels : 28
1.1 Appareillages et équipements : 28
1.2 Matériel végétal :.....28
1.3 Matériel biologique : 28
Souches microbiennes:.....28
2 Extraction des huiles essentielles de bigaradier : 29
2.1 La récolte : 29
2.2 Procédé d'extraction :.....30
3 Analyses physico-chimiques des huiles essentielles de *Citrus aurantium l :* ...31
3.1 Calcul du rendement :.....31
4 Caractérisation des huiles essentielles extraites 32
4.1 Caractéristiques organoleptiques 32
4.2 Détermination des propriétés physico-chimiques.....32
4.2.1 Densité relative : 32
4.2.2 L'indice de réfraction :.....33
4.2.3 Indice d'acide Ia.....34
4.2.4 Potentiel d'hydrogène :.....34
5 Analyses pharmacologiques des huiles essentielles extraites.....35
5.1 Effet antioxydant.....35
5.2 Effet scavenger du radical DPPH.....35
5.2.1 Mécanisme d'action de DPPH.....35
5.2.2 Courbe d'étalonnage 35
5.2.3 Mode opératoire 36
6 Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : 37
6.1 Technique en milieu solide (Aromatogramme) : 37
6.2 Préparation de préculture :.....37

6.3 Préparation de l'inoculum : 37
6.4 Ensemencement : 37
6.5 Dépôts des disques : 38
6.6 Lecture : 38

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1 Extraction et rendement en huiles essentielles 39
2 Caractérisation des huiles essentielles extraites 40
2.1 Caractéristiques organoleptiques 40
2.2 Propriétés physico-chimiques 40
2.2.1 Densité relative 40
2.2.2 Indice de réfraction 41
2.2.3 Indice d'acide 42
2.2.4 Potentiel d'hydrogène 43
3 Effet antioxydant 43
3.1 Détermination des IC50 45
4 Activité biologique des huiles essentielles 47
4.1 Aromatogramme: 47
4.2 Essai avec l'huile essentielle *Citrus aurantium l* 47
4.3 Etude de l'activité antimicrobienne de l'HE des feuilles de *Citrus aurantium l* 47
4.4 Etude de l'activité antimicrobienne de l'HE des fruits de *Citrus aurantium l* 49

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Coupe équatoriale d'une orange amère (Susser, 1997). 6
Figure 2.1 .Montage hydrodistillation 14
Figure 2.2 .Montage L'entraînement à la vapeur de l'eau 14
Figure 2.3 .Schéma du procédé d'hydro-diffusion. 15
Figure 2.4 .Principe d'extraction par CO2 supercritique. 16
Figure 2.5 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes 17
Figure 2.6. Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne. 25
Figure 3.1: les fruits et les feuilles de *Citrus aurantium l* 30
Figure 3.2.Montage d'hydro-distillation manipulé (Clevenger) 31
Figure 3.3. Réfractomètre 33
Figure 3.4.pH-mètre 34
Figure 4.1 : Rendement des HE extraits des fruits et des feuilles *Citrus aurantium l* 39
Figure 4.2: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de l'hydrolat des fruits et des feuilles du*Citrus aurantium l* 43
Figure 4.3: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de l'HE des fruits et des feuilles du*Citrus aurantium l* 44
Figure 4.4: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique. 44
Figure 4.5 : Valeurs des IC50des différents extraits et de vitamine C 46
Figure 4.6 : Effet inhibitrice provoqués par l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+ 48
Figure 4.7 : Effet inhibitrice provoqués par l'huile essentielle des fruits de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+ 50
Figure 4.8 :Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de*Citrus aurantium l* des feuilles et des fruits contre les bactéries à Gram-. 50
Figure 4.9 :Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de*Citrus aurantium l*des feuilles et des fruits contre les bactéries à Gram+. 51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1Description du Citrus aurantium L 4
Tableau 1.2 : Classification botanique du bigaradier..... 5
Tableau 1.3 : Composition et valeur nutritive de quelques espèces d'agrumes 7
Tableau1.4 : Composition en vitamine des oranges amères et oranges douces 8
Tableau 3.1. : Provenance des germes utilisés. 29
Tableau 4.1: Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites 40
Tableau 4.2 : Valeurs des densités des huiles essentielles extraites 41
Tableau 4.3 : Valeurs d'indices de réfraction des huiles essentielles extraites 41
Tableau 4.4: Valeurs d'indices d'acide des huiles essentielles extraites 42
Tableau 4.5. Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+. 48
Tableau 4.6 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle des fruits de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+. 49

LISTE DES ABBREVIATIONS

AFNOR : Association française de normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

E. Coli *: Escherichia coli*

Gram- : Gram négative.

Gram+ : Gram positive.

H.E : Huile essentielle

I% : pourcentage d'inhibition

IC50 : Concentration donné 50% d'inhibition

IPA-Alger : Institut Pasteur d'Algérie

MS : La spectrométrie de masse

P.aeruginosa *: Pseudo aeruginosa*

S.aureus *: Staphylococcus aureu*

Introduction générale

La famille des Rutacées comprend plusieurs fruits importants comme les oranges, les mandarines, les limes, les citrons, les oranges amères et pamplemousses. Les études statistiques rapportent qu'environ 124 246,0 milliers de tonnes d'agrumes ont été produits dans le monde en 2015/2016 (73 %) de la production est consommée en frais, 26% pour la transformation et 9% pour l'exportation). L'Algérie est le 16ème producteur mondial et le 3ème dans l'Union du Maghreb Arabe **(Haraoui et *al*., 2019)**

La Bigarade de *Citrus aurantium l* est l'une des espèces des agrumes qui sont considérés comme les fruits les plus importants dans le monde. Ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus. La consommation des agrumes est associée à la réduction de l'apparition de plusieurs maladies. Les effets bénéfiques de ces fruits sont souvent attribués à la présence des composés bioactifs (la vitamine C, les composés phénoliques, les caroténoïdes...) **(Abeysinghe et *al*., 2007).**L'objectif principal visé par ce travail est la mise en valeur d'une plante aromatique et médicinale très connue : c'est le *Bigaradier* , et en particulier , le *bigaradier* de la région de Mitidja , en caractérisant les deux huiles essentielles de la plante, partie feuille et partie fruit. Afin de déterminer leur composition et d'évaluer leur pouvoir biologique pour bénéficier de cette plante dans la pharmacie, cosmétique, l'industrie alimentaire et dans la lutte biologique.

Notre travail est réparti en deux parties et chaque partie est divisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre explique la description botanique de l'espèce étudiée ;
- Le deuxième chapitre passe en revue en généraliste sur les huiles essentielles et les différentes techniques d'extraction ;
- Le troisième chapitre s'articule à la méthode et matériels utilisés tels que :

1. L'extraction de l'huile essentielle d'espèce végétale étudiée l'orange amer ;
2. L'analyse physico-chimique ;
3. Les activités biologiques (anti microbiennes, anti oxydantes) ;

- Le quatrième chapitre présente les résultats et leurs discussions ;

Ce travail se terminera par une conclusion générale qui récapitule notre étude

1 Présentation de la famille des rutacées :

Cette famille comprend plus de 700 espèces, en grande partie arborescentes, appartenant aux pays chauds. C'est une famille qui n'offre qu'un petit nombre de caractères constant, la famille des Rutacées, à laquelle appartiennent les agrumes, comprend entre autre les trois genres suivants : *Poncirus, Fortunella* et *Citrus.* Le genre *citrus* constitue avec ses 145 espèces dénombrées le genre le plus important. Les agrumes sont de petits arbres ou arbustes de taille moyenne, cultivés dans l'ensemble des régions tempérées chaudes, tropicales et subtropicales **(Amir et *al.*, 2020).**L'agrumiculture des pays du bassin Méditerranéen est diversifiée, au niveau des variétés cultivées (Oranges, Mandarines, Thomson, Clémentines, Pomelos, Citrons, Limes, Pamplemousses…..), et reflète d'une certaine manière la richesse et la variabilité de ces arbres, du fait de l'extension de cette culture **(ARABA Oum Hani, 2016)**.Les agrumes représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes dans le monde. **(Lagha-Benamrouche et *al*., 2018)**

1.1 Les agrumes :

Le terme générale agrume, par lequel on désigne les oranges, les citrons, les mandarines, est assez peu précis. Dérivé de l'adjectif « aigre », il signifie simplement que l'on parle des fruits acides. Ce n'est pas toujours vrai car l'on parle des variétés, de citrons ou de limes dénués d'acidités, et ce n'est pas caractéristique car bien d'autres fruits sont aussi acides et même bien davantage que les agrumes. En Espagne, de la même façon, le terme agrio employé comme adjectif signifie aigre, acide et comme substantif, au pluriel, désigne les agrumes**.(Huet, 1991)**

1.2 Origine et histoire des agrumes

L'histoire des agrumes, d'après **(Reuther et *al*., 1967)** remonte à 4000 ans avant J-C. où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du Sud-est Asiatique. La première mention écrite sur les agrumes se trouve dans la littérature Sanskrit environ800 ans avant J-C. La culture des agrumes a commencé en Chine probablement 500 ans avant JC. Le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Theophrastus en 310 avant J-C. Les botanistes grecs qui suivirent Alexandre le Grand dans ses conquêtes, ont découvert le cédratier en Perse et l'ont baptisé « Pomme de midi ». Le cédrat fut d'abord utilisé comme parfum et comme insecticide. Plus tard, il fut jugé comestible lorsqu'il était correctement préparé. Les romains ont importé les oranges et les citrons de leur

province comme un luxe couteux pour leurs banquets. Les plantes qu'ils cultivaient à Rome ont survécu mais portaient peu de fruits.

Au 10ème siècle, les conquérants arabes réintroduisent le cédrat en Europe et introduisent de nombreuses nouveautés telles que le citron et l'orange amère (bigaradier). Ces fruits ont été répartis autour de la méditerranée orientale, l'île de Sicile, le Nord d'Afrique jusqu'au Sud de l'Espagne (zone de Séville vers 1150). Aux XI et XIIème siècles et de retour de Jérusalem, les Croisés propagent en Europe occidentale l'utilisation et la culture du citron, du bigaradier et de la lime.

Les grands navigateurs, ont non seulement élargi notre vision du monde mais également joué un rôle important dans la diffusion des agrumes. C'est lors de son deuxième voyage que Christophe Colomb introduisit en 1493 le citron et la lime dans l'île d'Hispaniola (Haïti). Vasco De Gama découvreur de la route de l'Inde introduit en 1494 l'orange douce dans le Portugal.

C'est par hasard que ces navigateurs, lors des grands voyages, découvrent le rôle de la vitamine C présente dans le citron comme moyen de lutte contre le scorbut. Depuis ce temps-là les agrumes partent à la conquête du monde. Les premières plantations dans le continent américain furent introduites sur la côte de l'actuel Mexique en l'an 1518, ensuite au Brésil en l'an 1540, en Floride en 1565, en Caroline du Sud en 1577, au Pérou en 1609, en Arizona en1707, en Australie en 1718, en Californie en 1769 et au Texas en 1890.

Le dernier agrume arrivé en Europe fut le mandarinier au début du 19ème siècle. Depuis, il est devenu l'un des agrumes les plus populaires et une source de développement continu.

2 Généralités sur la bigarade :

Citrus aurantium (la bigarade, l'orange amère ou l'orange de Séville) est l'un des agrumes appartenant à la famille rutaceae, est connue pour son gout extrême amer et aigre. Elle se distingue des oranges douces par leurs fruits à peau plus épaisse et plus rugueuse et à pulpe acide et amère.

En raison de leur gout aigre et amer, les oranges amères ne sont pas employées comme fruits comestibles, elle sont plutôt utilisées pour la fabrication de jus et des marmelades (des confitures d'orange) **(Ersus and Cam, 2007)**

3 Description du *Citrus aurantium l* :

Le bigaradier est un arbrisseau fruitier de 5 à 10 mètres de hauteur à branches épineuses, il vit sous les climats tempérés, mais dispose d'une résistance au froid jusqu'à 2C°.

Ces feuilles vertes, brillantes ont une odeur faible et une saveur amère, elles sont ovales, luisante, persistante, avec des épines a l'aisselle inferieur. Elles mesurent environ 8cm de longueur et 4cm de largeur.

Les fleurs pouvant atteindre 25mm, sont blanches et très odorantes. Possèdent de 4 à 5 pétales imbriqués, et sont souvent recourbés vers l'arrière.**(Ersus and Cam, 2007)**

Le fruit appelé « Bigarade » est rond parfois ovalisant ou aplati. Tient longtemps sur l'arbre sans perdre leur parfum, les fruits sont des oranges à jus très chargé d'acidité et d'amertume. Au mois de 15 à 20 pépins par fruit. La peau rugueuse plus ou moins épaisse et piquetée.

Les graines sont de couleur blanchâtre à verdâtre pale, aplaties et angulaires. Elles sont poly embryonnaires, ce qui signifie qu'elles ont plusieurs embryons qui peuvent germer. Les embryons sont soit zygotiques, dérivent de la pollinisation de l'ovaire par reproduction sexuée. Sont Nucellaire, provenant entièrement à partir de la plante mère et présentent des caractéristiques très similaire à la plante mère.**(Ersus and Cam, 2007)**

Tableau 1.1 Description du Citrus aurantium L (Teuscher et *al*., 2005)

Espèce	***Citrus aurantium L***
Nom Commun	Bigaradier orange amère
Taille de L'arbre	5 à 10 m
Couleur de Fruit	Rouge Orange
Forme de Fruit	Taille moyenne à peau rugueuse, rond ou ovale
La Pulpe	Acide et amère
Épine	A court épine
Feuille	Bien verte pointue fortement ailées
Fleurs	Blanche et très parfumée

4 Classification botanique :

D'après la position systématique du bigaradier est comme suite :

Tableau 1.2 : Classification botanique du bigaradier (Manner et al., 2006)

Règne	Végétale
Division	Embroyophyta
Sous-division	Angiospermes
classe	Dicotyledoneae
Sous-classe	Archychalmydeae
Ordre	Géraniale
Sous-ordre	Géraniineae
Famille	Rutaceae
Sous-famille	Aurantiodeae
Tribus	Citreae
Sous-tribus	Citrinae
Genre	Citrus
Espèces	*Citrus aurantium*

5 Morphologie du Bigaradier :

Les agrumes présentent la même structure anatomique qui comprend trois parties :**(Teuscher et *al.*, 2005)**

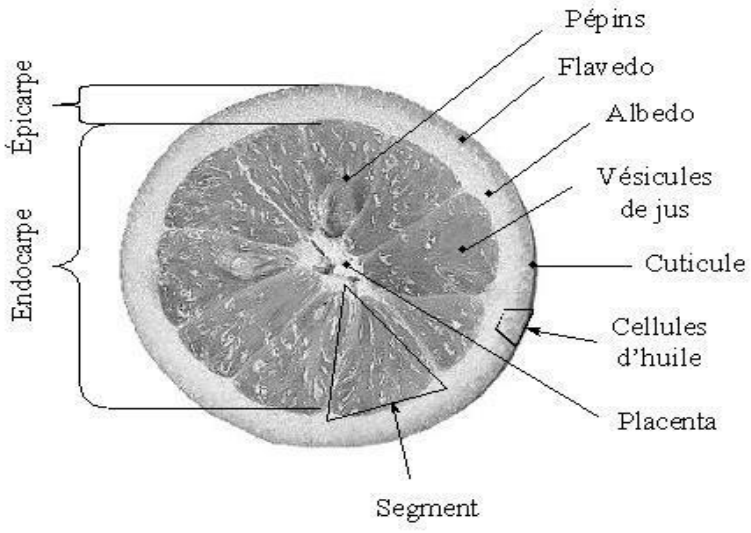


Figure 1.1 : Coupe équatoriale d'une orange amère (Susser, 1997).

5.1 Epicarpe ou Flavédo :

C'est la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jeune orangé ou en rouge. Elle comprend de nombreuses poches sécréteuses d'huiles essentielles.

5.2 Mesocarpe ou albédo :

Est la couche intérieure blanche et spongieuse et riche en pectines. La combinaison flavédo et albédo est appelée péricarpe, communément connu sous le nom d'écorce ou peau.

5.3 Endocarpe ou pulpe :

C'est la partie comestible du fruit, elle est composée de segments, recouverts par une membrane mince, distribué autour d'un axe central ayant la même composition que l'albédo. Les segments sont composés de vésicules de jus recouvertes par les membranes plus fines et contiennent les cellules de jus. Pendant que le fruit murit, le jus s'accumule dans les vacuoles et occupe la majeure partie du volume des cellules mures.

6 Composition chimique et biochimiques de la bigarade et d'autres agrumes :

La composition des agrumes est diverse. Ils contiennent très peu de fibres, Les protéines et les graisses sont d'excellentes sources de vitamine C, contenant Aussi : Vitamine A (rétinol), B3 (niacinamide), B5 (acide pantothénique), B6 (Pyridoxine) et E (Tocophérol). **(Souci et *al.* 1994).**

Le composant principal de l'écorce d'orange (Bigarade) est la cellulose, Hémicellulose, substances pectiques, pigments (flavonoïdes, anthocyanes et caroténoïdes) et huiles essentielles. Il contient également d'autres composés, par exemple, Glucides, minéraux, protéines et une petite quantité de matières grasses. (**Lu et *al.* 2009**).

Les feuilles sont principalement composées de grosses molécules chimiques emprisonnant de nombreux éléments minéraux, tels que le calcium, le potassium, le sodium, Magnésium, soufre et phosphore. Elles contiennent également de la chlorophylle, Nutriments (glucides, lipides et protéines), acides aminés, composés aromatiques compliqués. Acides gras, alcools primaires, esters et glucides. Il est identifié comme le composant principal des feuilles d'agrumes.

Tableau 1.3 : Composition et valeur nutritive de quelques espèces d'agrumes (Souci et *al.* 1994).

Composant (g)	Bigarade	Citron	Clémentine	Pamplemousse
Eau (%)	85,70	90	86,9	90
Glucide (g/100g)	8,25	2,5	10 ,4	7,55
Fibres alimentaires (g/100g)	1,6	2,1	1,4	0,1
Acides organiques (g/100g)	1,13	3,5-7,2	0,6-1,00	1,76
Protides (g/100g)	1,00	1,00	0,7	0,4
Lipide (g/100g)	0,2	0,2	0,2	0,1

Tableau1.4 : Composition en vitamine des oranges amères et oranges douces (Souci et *al.* 1994).

Vitamine	Bigarade	Citron	Clémentine	Pamplemousse
Vitamine C (mg/100g)	49,35	129	41	33
Carotène (µg)	19,83	18.5	300	14
Vitamine B1 (thiamine) (µg)	79	60	80	35
Vitamine B2 (riboflavine) (µg)	42	80	40	20
Vitamine B3 (nicotinamide) (µg)	300	400	300	200
Vitamine B5 (Ac. pantothénique)	240	319	200	189
Vitamine B6 (pyridoxine)	104	172	40	37
Vitamine B8 (biotine) (µg)	2,3	-	1	-
Vitamine B9 (Ac. folique) (µg)	42	13	26	17
Vitamine E (tocophérol) (µg)	320	240	550	110

7 Le bigaradier et sa culture :

Sa grande résistance au froid ne dépasse pas des températures comprises entre – 8°C et– 10°C. Très tolérant au calcaire, il s'adapte à beaucoup de sols mais craint les excès d'eau en sol lourd. Il se reproduit généralement par semis pour être utilisé comme arbre d'ornement dans les régions méditerranéennes.**(Bousbia, 2011)**

7.1 Les variétés et hybrides :

Elles se divisent en deux classes, les variétés d'oranges amères et ses hybrides :

- **Variétés d'Oranges amères *:*** orange amère commune ; orange de Séville ; Orange Bitterswett du Paraguay, Apepu ; Variété parfumerie Bouquetier ; Orange amère panachée, Abers feuille étroite, Orange amère Willowleaf ; Goutou (orange amère cuir-tête) ; orange feuilles Myrtle : Chinotto.

- **Hybrides d'oranges amères *:*** Bergamote ; Smooth flat Séville ; Kikudaidai (*Citrus canaliculata*) Yama (*Citrus intermedia*) ; Karna (*Citrus karna*) ; Kithcli (*Citrus maderaspatana*) ; Miaray (*Citrus miaray*) ; Natsumikan (*Citrusnatsudaidai*) ; Tosu (*Citrus neoaurantium*) ; Zadaïdai (*Citrus* rokugatsu) ; Sanbokan (Citrus sulcata) ; Nanshodaidai (Citrus taiwanica).

8 Utilisation de bigaradier :

L'écorce d'orange amère contient de la synéphrine et de la N-méthyl téramine, qui a incité les médecins chinois à inventer un Adrénaline (semblable à l'effet stimulant de l'adrénaline). En concentrant ces deux .La substance est produite par un processus semi-synthétique, qui est en fait un véritable extrait Médicaments sympathomimétiques utilisés pour lutter contre les effets du choc allergie. L'extrait d'orange amère est une substance produisant de la chaleur, il augmente le métabolisme de base, il augmente également la quantité de calories brûlées au cours de la journée et stimule le système nerveux, semblable à l'adrénaline.

Le Petit grain est utilisé pour des propriétés antispasmodiques, nourrissantes et Antipyrétiques et traitement de l'excitation nerveuse et des palpitations.

La décoction des feuilles peut provoquer un goût très amer, particulièrement désagréable à boire. Pour les enfants, il est recommandé d'utiliser des feuilles ajoutées à la confiture pour corriger le goût désagréable.

En phytothérapie, ce fruit est utilisé pour favoriser la digestion et réduire les flatulences. En infusion, il devrait soulager les maux de tête et faire baisser la fièvre. Il peut aussi réguler le rythme cardiaque, calmer les palpitations et favoriser le sommeil. On peut aussi utiliser de l'extrait de fleur d'oranger dilué pour un massage relaxant. Enfin, les huiles essentielles et les extraits de feuilles de néroli et de petit grain sont utilisés dans les parfums **(De Rochefort, 1793)**

1. Définition des huiles essentielles :

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeurs et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques. Les huiles essentielles sont des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques »

Les huiles essentielles sont des mélanges odorants comportants de nombreuses molécules, obtenus par entrainement à la vapeur d'eau (hydro-distillation) de matière végétale d'origine botanique spécifiée ou par expression du péricarpe des agrumes, et séparés de la phase aqueuse par des procédés physique. Les huiles essentielles d'agrume sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles dans le secteur agroalimentaire (boissons, crème glacées, condiments) comme cosmétique (savons, parfums) ou encore pharmaceutique.

1.1 Huiles essentielles d'agrumes :

Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus.

Ces huiles volatiles sont associées aux saveurs et arômes caractéristiques des agrumes, il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (mono terpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils.

Ces huiles sont généralement présentes dans l'écorce au flavedo mais se trouvent aussi dans les sacs d'huiles intégrés dans les vésicules de jus. Cependant, la quantité présente dans les vésicules à jus est plus faible que la quantité présente dans le flavedo; de même, leur composition diffère de l'un à l'autre. **(Kehal, 2013)**

1.2 Localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées et peuvent être stockées dans tous les organes végétaux **(Laurent, 2017)**

• les **feuilles** : eucalyptus, citronnelle, laurier noble…
• les **fleurs** : camomille, lavande…
• les **zeste**s : 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. On retrouve par exemple :

• les **cellules à huiles essentielles** : chez les *Lauracées* et les *Zingibéracées*
• les **poils sécréteurs** : chez les *Lamiacées*
• les **poches sécrétrices** : chez les *Myrtacées* et les *Rutacées*
• les **canaux sécréteurs** : chez les *Apiacées* et les *Astéracées.*

2. Propriété physique-chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles représentent l'ensemble des substances volatiles de faible masse moléculaire extraites du végétale, on les appelle parfois essences parce que, comme l'essence elles s'enflamment, **(Laurent, 2017)**

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène, les principales propriétés à température ambiante, les huiles essentielles sont liquides sauf la Myrrhe et le Santal qui peuvent être visqueuses ainsi que la Rose et le Camphrier qui peuvent être cristallisées,

Les huiles essentielles sont volatiles et entrainables à la vapeur d'eau,

À basse température, certaines se cristallisent comme par exemple les huiles essentielles d'Anis, de Menthe des champs ou de Thym saturéoïde **(Pierron, 2014)**

Elles sont généralement incolores ou jaune pâle,

Elles sont peu solubles dans l'eau, elles sont solubles dans les alcools de titres élevés, solubles dans les huiles fixes et la plupart des solvants organiques apolaires,

Leur densité est généralement à 1 sauf (HE de sassafras, de girofle ou de cannelle),

Leur indice de réfraction est souvent élevé et elles sont dotées de pouvoir rotatoire

Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité.**(Pierron, 2014)**

3. Composition chimique des huiles essentielles :

Les composants des huiles essentielles sont groupés en plusieurs familles biochimiques. L'effet thérapeutique de ces huiles varie d'une huile à une autre, et l'action de chacune d'elles ne peut se résumer qu'aux caractéristiques d'un seul de ses composants :

3.1 Les Terpenoïdes

Dans le monde végétal, les terpènes sont connus comme principes odorants des végétaux, du fait de la grande volatilité de ces molécules.

Les terpènes sont les molécules les plus répandues et connues dans les HE pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques. Les plus importantes sont : le limonène, le δ-3-carène, le carotène, le β-pinène et l'α-pinène.

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures. Ils sont produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères et les agrumes. Les terpènes sont des dérivés de l'isoprèneC_5H_8 et ont pour formule de base des multiples de celle-ci. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles.

Les terpènes sont divisés en plusieurs classes en fonction des unités pentacarbonéesramifiées (C_5). On distingue donc les mono terpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les poly terpènes (comme le caoutchouc naturel). Seuls les terpènes les plus volatils, mono (C_{10}) et sesquiterpènes (C_{15}) sont retrouvés dans la composition chimique des HE**. (Laurent, 2017)**.

De nombreux composés terpéniques sont employés en parfumerie ou dans diverses autres industries et d'autres parts certains représentants de cette classe jouent des rôles biologiques importants (hormones, vitamines) **(Lamamra, 2018)**

3.2 Les monoterpènes

Les mono terpènes et leurs dérivés (alcools, esters, acétates, …) sont les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante. Leur étude chimique est compliquée, par la difficulté d'obtenir ces produits purs du mélange complexe dans lequel ils sont présents et les réarrangements qu'ils peuvent subir. Exemple de quelques mono terpènes: menthol, alpha terpinéol, linalol, lavndulol, géraniol… **(Benzeggouta, 2005)**

3.3 Les Sesquiterpènes

L'allongement de la chaine des Sesquiterpènes amplifie le nombre des cyclisations possible, plus d'une certaine de squelettes différents ont été décrits. On trouvera également des Sesquiterpènes avec des fonctions chimiques caractéristiques : alcool (farnésol, carotol), carbures (β-caryophylléne), cétones, ester.**(El Haib, 2011)**

4. Techniques d'extraction :

A l'intérieure de leurs cellules, les végétaux renferment des essences, c'est-à-dire des sécrétions naturelles que l'on extrait pour obtenir les huiles essentielles **(Boutekedjiret, 1999).** De ce fait, Il existe plusieurs méthodes d'extraction, dont nous citons les plus importantes qui sont les suivantes :

4.1 Hydro distillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolysat par simple différence de densité.

L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysat. Cependant, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques **(Boutekedjiret, 1999).**

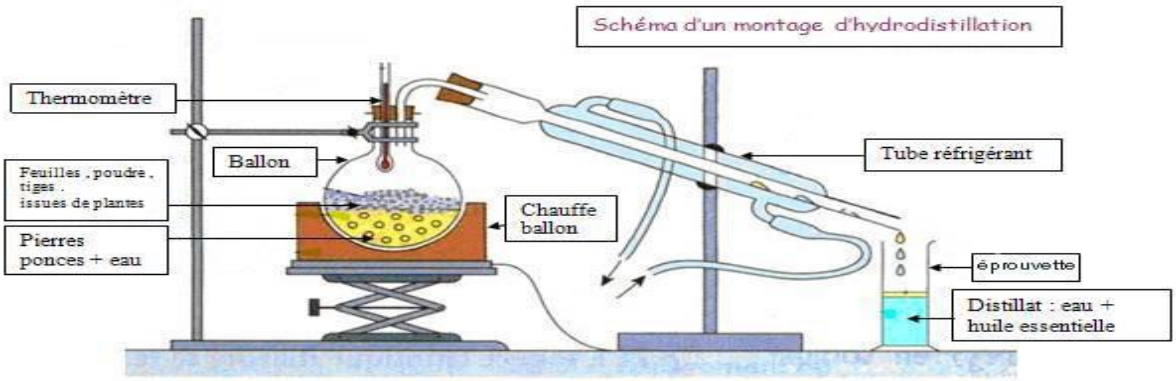


Figure 2.1 .Montage hydro distillation

4.2 Entrainement a la vapeur d'eau :

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques.

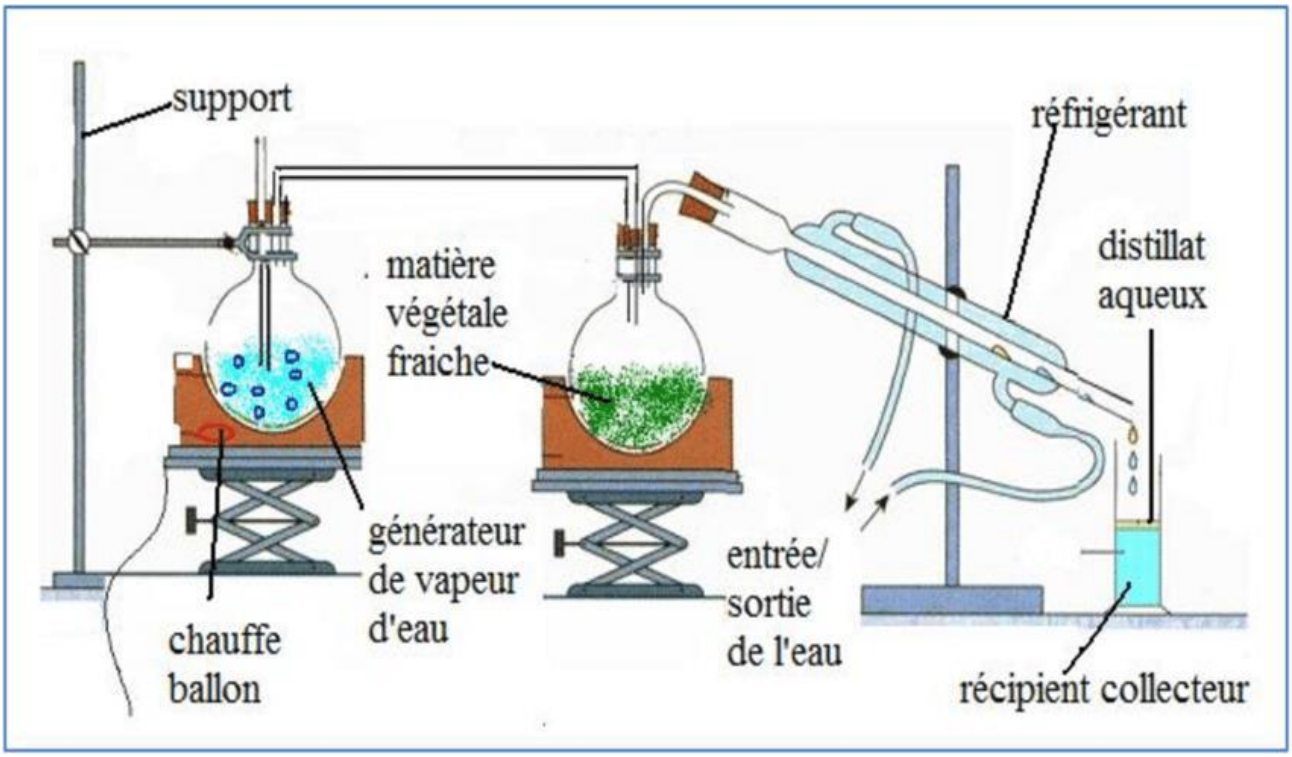


Figure 2.2 .Montage L'entraînement à la vapeur de l'eau

4.3 Expression à froid :

Elle constitue le plus simple des procèdes, mais ne s'applique qu'aux agrumes (orange, citron, bergamote) dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique. **(Boutekedjiret, 1999)**

4.4 Hydro diffusion :

Cette méthode d'extraction est une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau, relativement récente. C'est un procédé qui consiste à injecter de la vapeur d'eau du haut vers le bas, à pression réduite, soit l'inverse de la distillation classique. Cette technique utilise l'action osmotique de la vapeur d'eau et met à profit la pesanteur pour évacuer et condenser le mélange eau / HE dispersé dans la charge végétale.

L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatiles **(Piochon, 2008).**

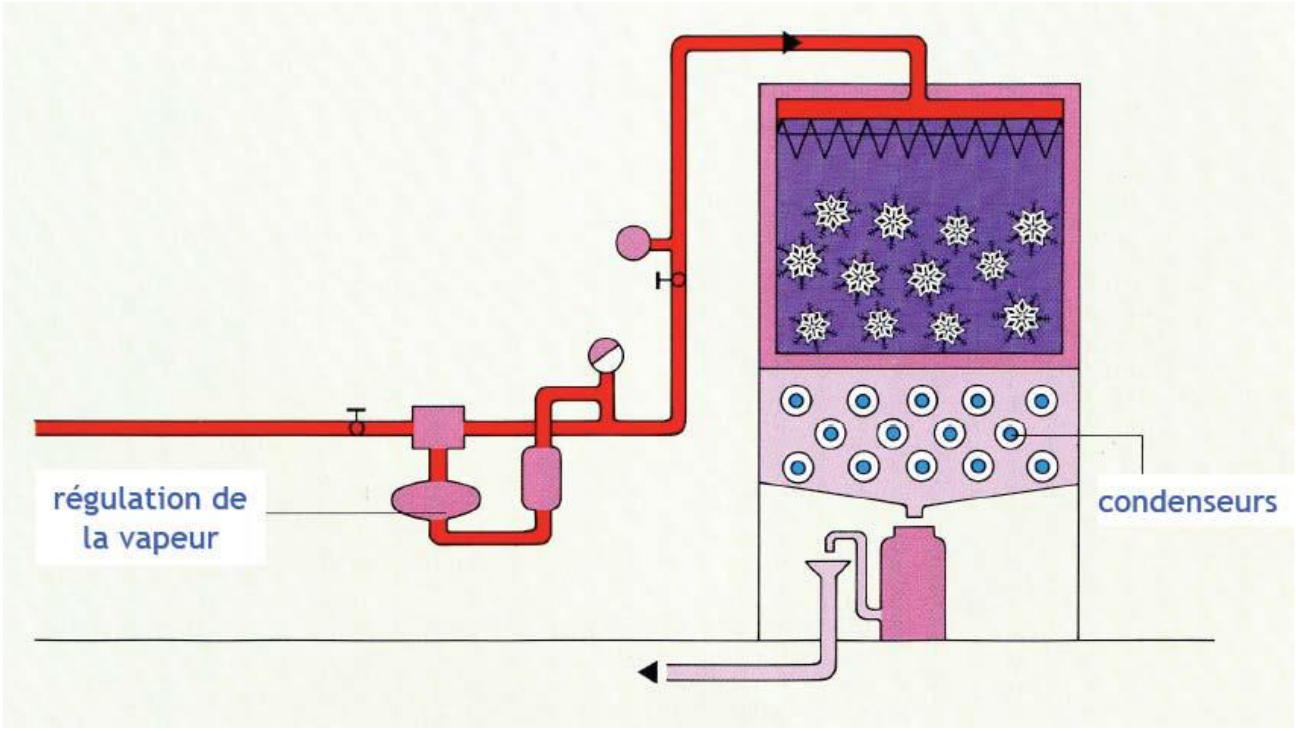


Figure 2.3 .Schéma du procédé d'hydro-diffusion.

4.5 Extraction par CO_2 supercritique

Le CO_2 permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Il est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite, il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur ou il sera séparé en extrait et en solvant **(Chemat et *al.*, 2004).**

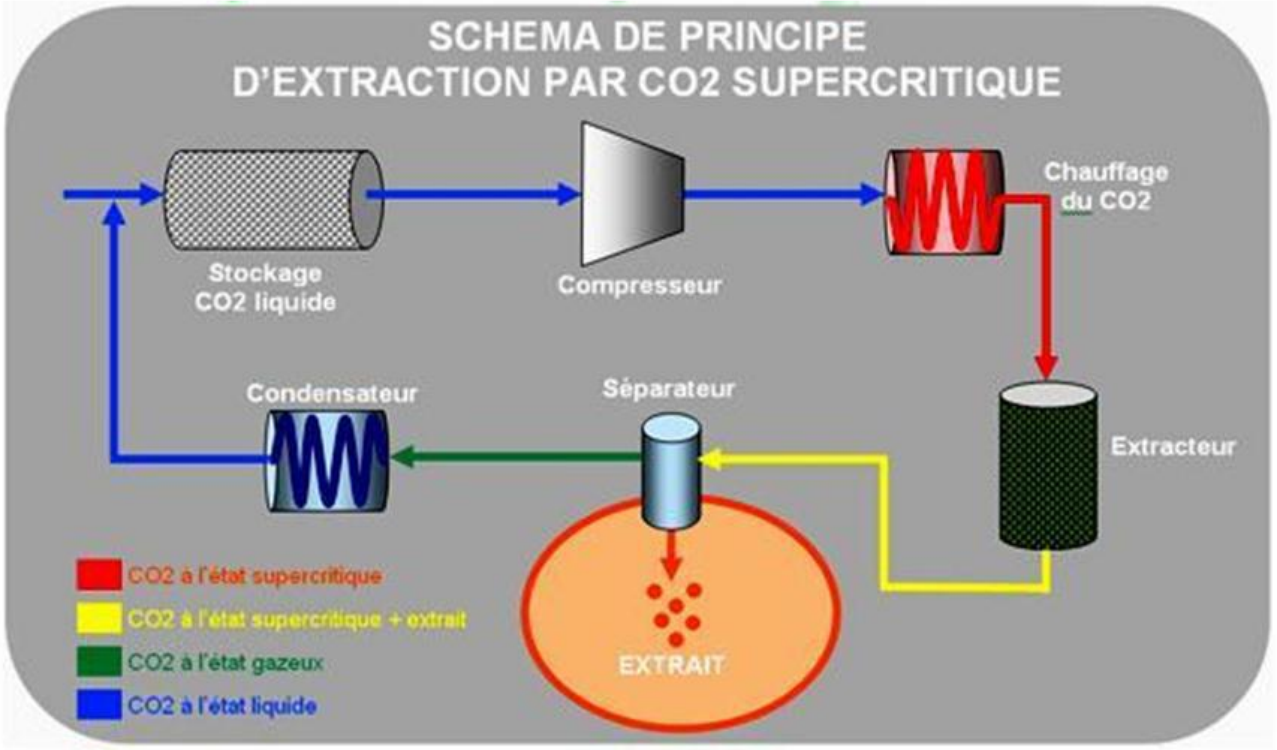


Figure 2.4 .Principe d'extraction par CO2 supercritique.

4.6 Extraction assistée par des micro-ondes :

Cette technique repose sur le principe de l'entrainement à la vapeur pour extraire des huiles essentielles. Elle consiste à injecter en continu de l'air comprimé dans le réacteur d'extraction où la matrice végétale est immergée dans de l'eau et chauffée sous micro-ondes. La vapeur d'eau saturée en molécules volatils est ensuite entrainée vers un vase de récupération plongée dans un système de réfrigération, situé à l'extérieur du four à micro-ondes. L'eau ainsi que les composés volatils

constituants l'huile essentielle sont donc condensés et récupérés dans des proportions identiques à celle d'un procédé classique.**(Mnayer, 2014).**

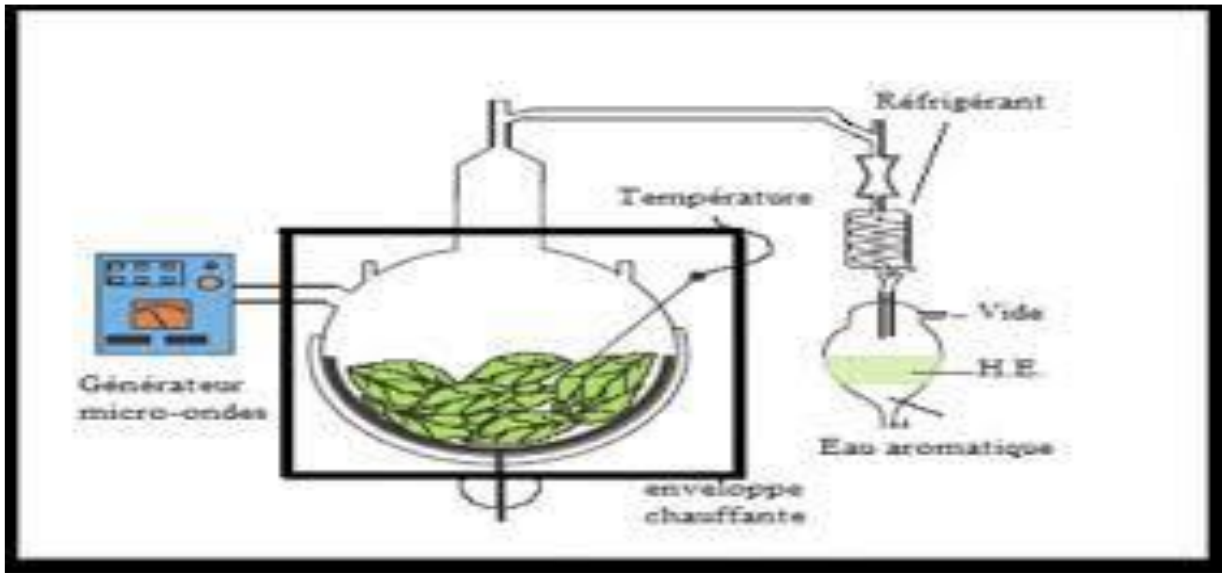


Figure 2.5 : Hydro distillation assistée par micro-ondes

4.7 Extraction par les corps gras :

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la lipo-solubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes Végétaux dans le corps gras.

4.8 L'enfleurage :

C'est une méthode qui n'est plus guère utilisée. Il s'agit de placer les fleurs sur un corps gras purifié et de laisser les arômes pénétrer le corps gras. Une fois l'arôme des fleurs « pompe » on les retire et on remet des fleurs fraîches, jusqu'à saturation du corps gras, on obtient une pommade qu'il suffit

de purifier avant d'y adjoindre de l'alcool. Au bout de 24 heures, les corps gras et les huiles essentielles sont séparés. Il ne reste plus qu'à recueillir la précieuse huile essentielle.

5. Conservation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions. Certaines d'entre elles s'améliorent avec le temps à l'exception des huiles essentielles extraites des écorces d'agrumes.

Les huiles essentielles sont fragiles et peuvent se détériorer dans de mauvaises conditions de stockage. Elles doivent donc être conservées dans leurs contenants en verre d'origine. Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF 75-002, 1996) dans un endroit frais à l'abri de la lumière et des sources de chaleur. Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons. Évitez de vous allonger sur les bouteilles afin que les huiles essentielles n'entrent pas en contact avec le compte-gouttes en plastique pendant une longue période car les huiles ont un effet corrosif sur le plastique **(Jouault, 2012)**

6. Toxicité des huiles essentielles

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaisie, aneth, rue, anis, carvi, romarin. D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques.

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : une DL 50 comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées : anis, eucalyptus, girofle….ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL 50 inférieure à 1g/kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg, convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg) ; l'essence de moutarde (0.34 g/kg) ; l'origan et

la sarriette (1.37 g/kg) ; le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue. Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits.**(Benzeggouta, 2005)**

La majorité des intoxications par les plantes connues est la cause d'un surdosage car leur accumulation dans l'organisme crée des affections dégénératives et même des effets secondaires plus banales (vomissements, vertiges, syncopes). L'abus d'essences concentrées peut aussi provoquer l'engorgement du foie et la rétention d'urine.

Il ne faut pas la prescrire pour les enfants <6ans et les femmes enceintes et celles qui allaitent. Les posologies devront être respectées quelle que soit la voie d'administration, 1 à 2 gouttes d'HE sont déjà actives, il ne faut pas dépasser 6 gouttes/jr réparties en 3 prises et le traitement doit être de courte durée**(Benzeggouta, 2005)**

7. Caractérisations des huiles essentielles

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

• Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur) ;

• Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, et indice d'acide) ;

• Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

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

7.1 Caractéristiques organoleptiques :

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

7.1.1 L'odeur

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

7.1.2 La couleur

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

7.1.3 L'aspect

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

7.2 Propriétés physico-chimiques

7.2.1 Densité :

La densité d'une substance est égale à la masse volumique de la substance divisée par la masse volumique du corps de référence à la même température. Pour les liquides et les solides, l'eau est utilisée comme référence, pour les gaz, la mesure s'effectue par rapport à l'air. Elle est notée et n'a pas d'unité.

7.2.2 Indice de réfraction :

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

7.2.3 Indice d'acide :

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

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

7.2.4 Potentiel d'hydrogène :

PH est un sigle signifiant potentiel hydrogène, il permet de mesurer la concentration d'une solution aqueuse en protons et le degré d'acidité ou de basicité d'une solution.

8. Analyse physico-chimique des huiles essentielles

Les propriétés physico-chimiques sont des indices propres constants d'une substance pure. Elles sont toujours mesurées, mais elles sont indiquées à titre indicatif, car la complexité des huiles essentielles ne permet pas de détecter les fraudes uniquement grâce à elles. L'analyse physico-chimique reste donc indispensable et la mieux adaptée pour connaître la composition exacte d'huile essentielle, et donc la plante de laquelle elle est extraite. L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes micro-analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces. Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

Chromatographie en phase gazeuse. Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilisables sans dégradation (non-thermolabiles). Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles. La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt **(Rouessac and Rouessac, 2013)**

La technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés **(Mendham, 2005)**

Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est en fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules **(Burgot and Burgot, 2011)**

8.1 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse, et cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces (quelques nano grammes de mélange). Le principe de la spectrométrie de masse est le suivant :

• Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé.

• Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés

. • Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur.

• L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

8.2 Analyse par couplage CPG/SM

L'analyse chimique permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CG/SM). Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Ce couplage est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles et réunir le meilleur de ces deux techniques permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. **(Proestos et *al*., 2006)**

9. Les activités biologiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont été jadis utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l'Égypte ancienne, les techniques de l'embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l'huile essentielle, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les anciens ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l'huile essentielle étaient les principes actifs qu'on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives**.(Hammer et *al.*, 1999).**Les huiles essentielles possèdent plusieurs activités biologiques, Fongistatique ; Insecticide ; Nématicide ; Herbicide ; Antioxydante ; Bactériostatique.

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens.

10. Les huiles essentielles comme agents antimicrobiens :

10.1 Généralités :

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie. Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans ces plantes.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entrainé un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est

principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.**(Knobloch et *al.*, 1989)**

10.2 Activité antimicrobienne :

Les H.E les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae :* origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à H.E riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries *: E.coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Clostridium spp,*Helicobacter pylori **(Pauli, 2001)**

(Fisher and Phillips, 2008) ont démontré que les huiles essentielles de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que *Mycobacterium jejuni, Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157 :H7, Staphylococcus aureus, Salmonella Thyphimurium***,** et *Acrobacterbutzleri.*

10.3 Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes contre les dermaphytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans*et *aspergillus fumigatus***(Knobloch et *al.*, 1989)**

Selon les travaux de**(Prudent et *al.*, 1995);(Silva et *al.*, 2014)**; et **(Viuda-Martos et *al.*, 2008)**les H.E de *Citrus* : d'orange douce, de citron, de mandarine et pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger, A. flavus, Penicillium chrysogenum et P. verrucosum*.Il a été établi d'après**(Cox et *al.*, 2000)** que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

11. Mode d'action des Huiles essentielles contre les bactéries :

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. Compte tenu de la diversité des molécules et la complexité de leur composition chimique présentes dans ces huiles, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action impliquant différentes cibles cellulaires, due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à GRAM négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à GRAM positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir.

La cellule est enveloppée par une paroi rigide, qui lui donne sa forme et sa résistance. Épaisse chez les bactéries à GRAM positif et plus mince chez les bactéries à GRAM négatif; la paroi entoure une membrane cytoplasmique, plus fine et plus délicate. Les bactéries à GRAM négatif possèdent une seconde membrane, qui est la membrane externe pour la distinguer de la membrane cytoplasmique, dite interne.

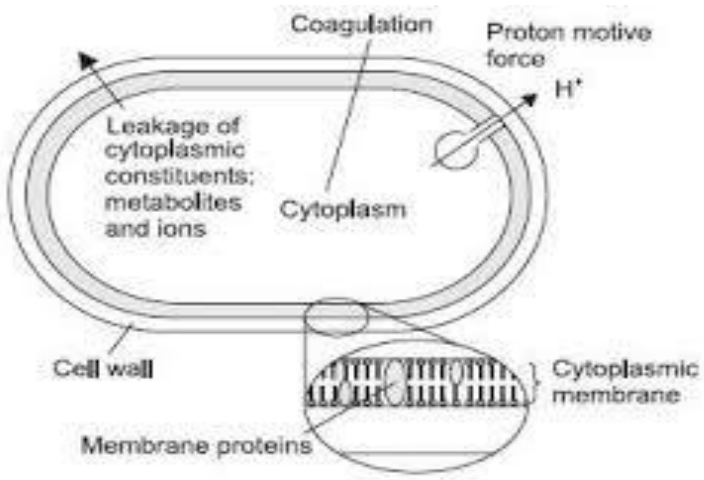


Figure 2.6. Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne.

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une

déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entrainent une fuite d'ions et de composés intracellulaires .**(Guinoiseau, 2010)**

Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Le mode d'action des huiles essentielles dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries GRAM négatifs sont plus résistantes que les bactéries GRAM positifs grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des GRAM négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêchent les terpènes hydrophobes d'y adhérer **(Tantaoui-Elaraki et *al.*, 1993).**

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

12. Domaine d'utilisation des huiles essentielles :

Les drogues à HE ont un grand intérêt en pharmacie, elles s'utilisent soit en :

→ Nature sous forme d'infusion pour leurs usages pharmacologiques.

→ Préparations galéniques simples.

→ Pour l'extraction des HEs.

Les HEs sont utilisées soit comme :

→ Aromatisant pour masquer l'odeur désagréable des médicaments destinés à la voie orale.

→ Pour l'isolement de certains constituants (eugénol, anéthol, pinènes…)

→ En Aromathérapie : une thérapeutique qui utilise les huiles essentielles pour traiter un certain nombre d'états pathologiques.

12.1 Parfumerie et cosmétologie :

Les propriétés odorifantes des HEs sont derrière leur consommation importante en parfumerie et en cosmétique. Exemple : rose, jasmin, vétiver, Ylang-ylang… Elles représentent environ 60% des matières premières de l'industrie des parfums.

12.2 Industrie alimentaire :

Ce sont les HE qui donnent aux aromates et aux épices leurs saveurs. Les essences d'anis et de badiane sont la principale source d'anéthol naturel, composé utilisé en liquoristerie (fabrication des boissons anisées) et en confiserie (bonbon, chocolat…) **(SAHRAOUI et *al*., 2015)**

Introduction

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce à leurs différents principes actifs notamment les huiles essentielles. En effet, le présent chapitre est consacré à l'extraction de l'huile essentielle d'agrumes des deux parties de bigaradier *Citrus aurantium l (*fruits et feuilles) par la méthode d'hydro-distillation, ainsi que la caractérisation physico-chimique des huiles extraites et l'étude de leur effet antioxydant et antibactérien, dont l'objectif est d'établir une étude comparative afin d'évaluer les caractéristiques de chaque huile essentielle extraite. Dans ce chapitre on va présenter les différentes étapes de préparation de matières végétales investiguées, la méthodologie adoptée pour le travail expérimental et le matériel manipulé.

L'extraction a été réalisée au Laboratoire de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Biotechnologie, Université de Blida

1 Matériels :

1.1 Appareillages et équipements :

Clevenger
Balance
Chauffe ballon
pH mètre
Réfractomètre
Spectrophotomètre UV-Visible

1.2 Matériel végétal :

Les fruits et les feuilles de bigaradier *citrus aurantium l* fraichement récoltés, sont nettoyés, lavés, et coupées en petits morceaux.

1.3 Matériels biologiques :

Souches microbiennes:

Lors de cette étude, les deux huiles essentielles ont été testées in vitro sur 03 souches bactériennes (01 Gram+ et 02 Gram–)

Ces germes pathogènes font partie de la collection ATCC et ont été délivrées par l'institut Pasteur d'Alger**(**Tableau 3.1).Ces espèces sont souvent responsables de problèmes majeurs de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens. Les souches bactériennes sont des souches hospitalières isolées à partir des prélèvements sur des malades. Les souches bactériennes dô*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches hospitalières et celle de *Staphylococcus aureus* est d'origine alimentaire.

Tableau 3.1. : Provenance des germes utilisés.

Souches utilisées **Bactéries** **Bactéries à Gram(+)**	**Code de la souche**	**Provenance**
Staphylococcus aureus	ATCC6538	IPA-Alger
Bactéries à Gram(-)		
Escherichia coli	ATCC25922	
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	

2 Extraction des huiles essentielles de bigaradier :

2.1 La récolte :

Les fruits ont été récoltés dans la région de Mitidja, durant la période de Mois de Mars 2021, alors que les feuilles sont récoltées au Mois d'Avril 2021.

Figure 3.1: les fruits et les feuilles de *Citrus aurantium l*

2.2 Procédé d'extraction :

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydro-distillation avec un Clevenger, Le dispositif d'extraction de l'HE de *Citrus aurantium l* (fruits et feuilles) par hydro-distillation est illustré dans la **figure 3.2**.200 g de l'écorce d'agrume frais et de feuilles sont introduits dans un ballon de 500ml imprégné d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 1heure30 à 2heures. Les vapeurs chargées de substances volatiles sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité en deux phases :

Phase organique : huileuse et très odorante appelée" huile essentielle" contenant la majorité des composés odorants.

Phase aqueuse : odorante appelée " eaux aromatiques" contenant que très peu de composés odorants.

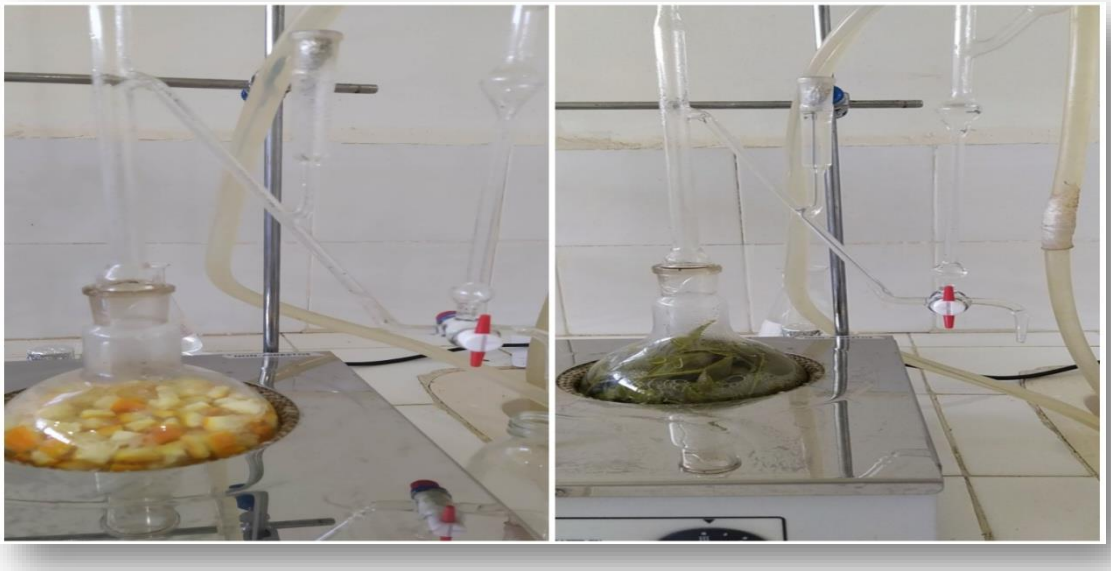


Figure 3.2.Montage d'hydro-distillation manipulé (Clevenger)

Les H.E extraites sont conservées à une température voisine de 6 ± 1°C, dans des flacons en verre opaque, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont de principaux agents de dégradation.

3 Analyses physico-chimiques des huiles essentielles de *Citrus aurantium l :*

3.1 Calcul du rendement :

Le rendement en H.E est le rapport entre le poids du H.E extraite et le poids de la biomasse végétale à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R(\%) = \frac{m_h}{m_V} x\ 100}$$

R = rendement en huile essentielle en %.

$\mathbf{m_h}$= masse de l'huile essentielle en gramme.

$\mathbf{m_v}$= masse de la matière végétale en gramme.

4 Caractérisation des huiles essentielles extraites

La caractérisation des huiles essentielles se fait afin d'évaluer la qualité de nos extraits. Nous avons réalisé une étude analytique, tout d'abord en déterminant les caractéristiques organoleptiques, puis les propriétés physico-chimiques.

4.1 Caractéristiques organoleptiques

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

4.2 Détermination des propriétés physico-chimiques

Les HEs sont caractérisées par leurs propriétés physiques (densité relative, indice de réfraction) ainsi que par leurs propriétés chimiques (indice d'acide, pH)

4.2.1 Densité relative :

C'est le rapport du poids d'un certain volume d'huile au poids du même volume d'eau distillée à la température 20°C. La masse des huiles essentielles a été déterminée par la pesé de 1ml à l'aide d'une balance électronique de précision à une température bien définit.

$$\mathbf{d^{20} = d\theta + 0{,}00068*(\theta - 20°C)}$$

Où :

d^{20} = Densité à 20°C.

$d\theta$ = Densité à la température de mesure.

θ= Température de mesure.

0.00068 : c'est le constant de variation de la densité quand la température varie de 1°C

4.2.2 L'indice de réfraction :

L'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable.

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre. On place une goutte d'huile essentielle sur le prisme de refractomètre et on attend que la température se stabilise et on effectue le mesurage.

Quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule :

$$\eta_D^{20} = \eta_t + 0{,}00045\ (T - 20°C)$$

η_D^{20}= Indice à 20°C.

η_t= Indice à la température ambiante ou de mesure.

T = Température ambiante.

Figure 3.3. Réfractomètre

5 Analyses pharmacologiques des huiles essentielles extraites

Afin de déterminer la valeur et d'évaluer la qualité pharmacologique et thérapeutique de nos huiles essentielles, nous proposons de tester leur effet antioxydant et antibactérien in vitro comme analyses primaires donnant un aperçu initial sur leurs propriétés médicinales.

5.1 Effet antioxydant

On peut définir les antioxydants comme des molécules qui empêchent ou diminuent l'oxydation d'autres molécules. Une réaction d'oxydoréduction, dont fait partie l'oxydation, assure le transfert des électrons d'une molécule donnée vers un agent oxydant. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer le pouvoir antioxydant in vitro, parmi eux nous avons choisi d'appliquer la méthode de piégeage de radical libre 2,2-diphényl-1- picryl-hydrazyl (DPPH) vu sa simplicité, rapidité, sensibilité et sa reproductibilité.

5.2 Effet scavenger du radical DPPH

5.2.1 Mécanisme d'action de DPPH

L'activité anti radicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante **(Brand-Williams et *al*., 1995)**

Le DPPH (2,2 -diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncé bien caractéristique de la solution DPPH.

Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH*, ce qui nous amène au 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), passant au jaune pâle ; et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu **(Talbi et *al*., 2015)**. Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm

5.2.2 Courbe d'étalonnage

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée

plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert : A=ε.l.C.

5.2.3 Mode opératoire

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 3,9mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu (99,8%) afin d'obtenir une solution de (0,1mM). Un volume de 3ml des huiles essentielles diluées dans le méthanol à différentes concentrations (200, 4000, 600 et 800 µg/ml) a été ajouté à 1ml de la solution méthanolique de DPPH, le mélange réactionnel incubé 30min à l'obscurité et à température ambiante.

Les absorbances ont été mesurées à 517nm contre le contrôle négatif (blanc). Le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution méthanolique de DPPH• additionné à 3ml de méthanol. L'acide ascorbique (vitamine C) a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence (contrôle positif) à différentes concentrations (200, 4000, 600 et 800 µg/ml) dont la lecture se fait dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

La capacité de l'antioxydant (huiles essentielles ou acide ascorbique) à piéger le radical libre est estimé en déterminant le pourcentage de décoloration (réduction) du DPPH en solution dans le méthanol, le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\%\text{Inhibition} = \frac{Abs_{controle} - Abs_{échantillon}}{Abs_{controle}} * 100$$

6 Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :

La recherche de l'activité antimicrobienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'H.E du bigaradier. Dans ce test, la méthode effectuée : Aromatogramme (Technique en milieu solide).

6.1 Technique en milieu solide (Aromatogramme) :

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale ; l'antibiogramme. Dans cette méthode nous utilisons des disques de 6mm de diamètre imprégné d'une quantité de l'H.E. Le disque déposé au centre d'une boite Pétrie contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne.

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques.

6.2 Préparation de pré culture :

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de 18 à 24 heures. Le repiquage des souches est effectué par ensemencement de la souche microbienne dans un milieu liquide. Les germes utilisés ont été cultivés sur gélose nutritive, les boites ainsi ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18 heures.

6.3 Préparation de l'inoculum :

A l'aide d'une pipette Pasteur, on racle 2 à 3 colonies bien isolés et identiques à partir d'une culture pure de 24 heures d'incubation sur milieu d'isolement. On dilue dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Il faut noter que l'inoculum bactérie peut être ajustée en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort et il doit être ensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

6.4 Ensemencement :

On trempe un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée et on l'essore en le passant fermement(en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

On répète l'opération deux fois, en tournant la boite de pétrie 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. À la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur le périphérique de la boite de pétrie. Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois, dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites.

6.5 Dépôts des disques :

A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles de papier de Wathman6mm du diamètre sont imbibés avec l'H.E en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'H.E. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque, ensuite ces disques contenant l'HE sont déposés sur la surface gélosé. Après diffusion de l'H.E dans la gélose pendant 4 heures à température ambiante, les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

6.6 Lecture :

La lecture s'effectue après l'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (le diamètre du disque inclus), les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des H.E sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes.

Non sensible(-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
Peu sensible(+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
sensible (++) ou intermédiaire : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

La lecture des résultats consiste à observer :

- La présence d'une zone claire autour du disque : Présence d'une activité inhibitrice.
- L'absence d'une zone claire autour du disque : Absence d'une activité inhibitrice

1 Extraction et rendement en huiles essentielles

Nous rappelons que l'huile essentielle des écorces et les feuilles d'agrumes de bigaradier : *Citrus aurantium l* ont été récoltées en mois de MARS/AVRIL et ont été extraites par hydro-distillation, une technique qui est très reconnue pour l'obtention des huiles essentielles.

Une deuxième récolte a été faite en mois de JUIN afin de pouvoir finaliser et réaliser d'autres activités de nos huiles essentielles.

Les taux de rendement de chaque partie analysée de *Citrus aurantium l* sont exprimés en pourcentage (%) et sont illustrés dans la figure ci-dessous.

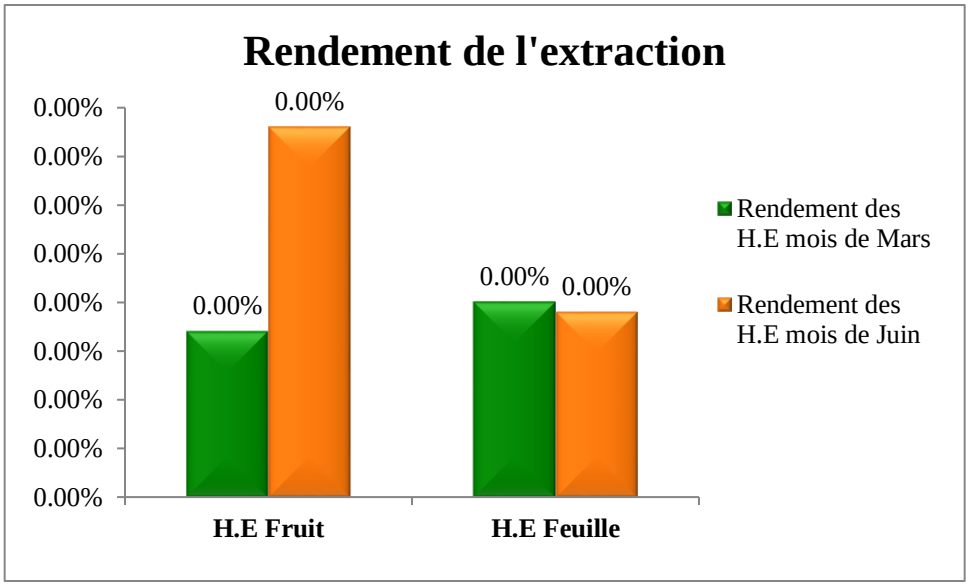


Figure 4.1 : Rendement des HE extraites des fruits et des feuilles *Citrus aurantium l*

Par comparaison aux autres études qui ont été faites sur les huiles essentielles extraites à partir de l'écorce de la même espèce du *Citrus aurantium l,* L'extraction de l'HE des feuilles du *Citrus aurantium l* révèle à une valeur de rendement de l'ordre de 0,2% et 0,165% pour l'HE des feuilles et du fruit du *Citrus aurantium l* récoltés en mois de MARS/AVRIL respectivement. Par contre, l'extraction des huiles essentielles du *Citrus aurantium l* récoltées en mois de JUIN révèle une valeur de rendement de 0,38% pour l'H.E des fruits et 0,19% pour l'H.E des feuilles.

Ces résultats restent en accord avec **(Djenane, 2015)** et celui obtenu par **(Zineb and Yacine)** (0,60%) récolté en Algérie.

L'ensemble des paramètres comme l'origine géographique, la méthode et la période d'extraction de l'huile ainsi que la maturité du fruit mais également l'organe de la plante utilisée et le degré de fraîcheur peuvent être la cause de ces différents rendements **(Djenane, 2015).**

2 Caractérisation des huiles essentielles extraites

2.1 Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des quatre huiles essentielles sont résumées dans le **tableau 4.1**. Les huiles essentielles des espèces de *Citrus aurantium* présentent un aspect liquide visqueux, blanc transparent pour les fruits et jaune pour les feuilles du bigaradier**.** Les deux HE sont caractérisées par une odeur citronnée.

Tableau 4.1: Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites

	Fruits	**Feuilles**
Couleur	Transparente	Jaune pale
Odeur	Citronné	Citronné
Aspect	Liquide visqueux, plus mobile et très volatil	Liquide visqueux, Camphré, mobile et volatil

2.2 Propriétés physico-chimiques

2.2.1 Densité relative

La densité relative constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une huile essentielle dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, etc.…). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité des produits ainsi que les tentatives de fraudes et d'altérations.

On remarque que le résultat de la densité des HEs obtenue est inférieur à celui de l'eau (1kg/L). On peut dire que l'huile essentielle de *Citrus aurantium l* extraite à partir des écorces fraiches est conforme aux normes internationales. Selon l'association Française de Normalisation, les HE appartenant aux genres *Citrus* doivent avoir une densité maximale de 0,876 **(Afnor, 2000).** La densité est un critère très important pour évaluer la qualité et la naturalité d'une H.E dans différents domaines**(des Normes Françaises, 2000)**.

Tableau 4.2 : Valeurs des densités des huiles essentielles extraites

	d^{20}	
	Fruits	**Feuilles**
Hydro distillation	0.2089	0.2091
Normes	≤ 0,876	

2.2.2 Indice de réfraction

L'indice de réfraction est un paramètre d'identification qualitative et une manière de vérifier le degré de pureté des huiles essentielles **(Hellal, 2011)**

Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Les valeurs d'indice de réfraction des HEs extraites sont du même ordre que celles des normes témoignants la haute pureté de nos extrais (**tableau 4.3**). On note que les deux HEs ont aussi presque le même indice de réfraction.

Tableau 4.3 : Valeurs d'indices de réfraction des huiles essentielles extraites

	η^{20}	
	Fruits	**Feuilles**
Hydro distillation	1.6768	1.6958
Normes	1.470-1.478	

2.2.3 Indice d'acide

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans nos huiles essentielles. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité des huiles à subir des altérations, notamment l'oxydation. Donc il indique d'une part le degré de conservation des huiles extraites et d'autre part leur qualité. Souvent cet indice est de valeur inférieure ou égale à 2. Les valeurs d'indices d'acide de nos huiles sont résumées dans le **tableau 4.4**.

Tableau 4.4: Valeurs d'indices d'acide des huiles essentielles extraites

	Ia	
	Fruits	**Feuilles**
Hydro distillation	1,12	1,16
Normes	≤ 2	

Les valeurs d'indices d'acide de l'huile essentielle des fruits et des feuilles de *Citrus aurantium l* sont respectivement 1,12 et 1,16. Nos valeurs sont comparables à ceux citées par **(Zineb and Yacine)**

Une faible valeur d'indice d'acide nous laisse penser qu'elle ne contient pas beaucoup d'acides libres et ne sont pas altérées **(De Cliff and Harerimana, 2013) ,** donc un indice d'acide faible indique que les huiles essentielles sont stables et ne provoquent pas d'oxydation car l'huile, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acide. Un indice d'acide faible pour les HEs peut être bénéfique si ces essences ont été ajoutées à un produit alimentaire possédant des matières grasses oxydables. Cet effet stabilisateur se manifeste dans la mesure où l'oxydation affecte plutôt les essences utilisées comme conservateur et protège ou limite donc l'oxydation des produits alimentaires. Ce qui améliore à la fois la qualité nutritionnelle et organoleptique de ces produits.

Les résultats obtenus indiquent que les caractéristiques organoleptiques et les propriétés physicochimiques des échantillons analysés oscillent dans des intervalles comparables aux normes.

2.2.4 Potentiel d'hydrogène

Les valeurs de pH de l'huile essentielle des fruits et des feuilles de *Citrus aurantium l* sont respectivement 5,05 et 6,8. Selon **(OUGUELMANE and HOUICHITI, 2020)**, le pH des oranges varie entre 3.0 et 3.5 .

3 Effet antioxydant

Nous avons évalué l'activité antioxydante des différentes parties du *Citrus aurantium l* à savoir : l'hydrolat et l'huile essentielle , extraits à partir des fruits et feuilles par cette méthode de DPPH afin de déterminer l'extrait ou la partie de l'orange la plus active ou l'acide ascorbique est utilisé comme molécule de référence.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées dans les figures 4.2 et 4.4 qui montrent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits.

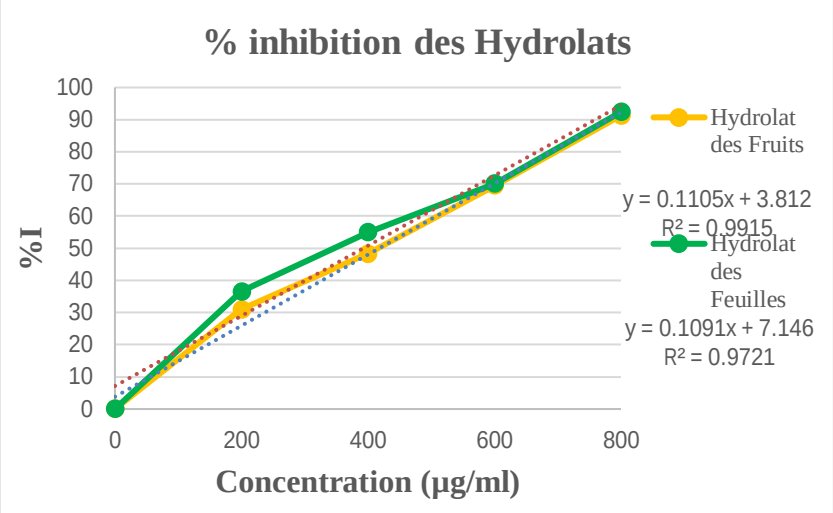


Figure 4.2: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de l'hydrolat des fruits et des feuilles du *Citrus aurantium l*

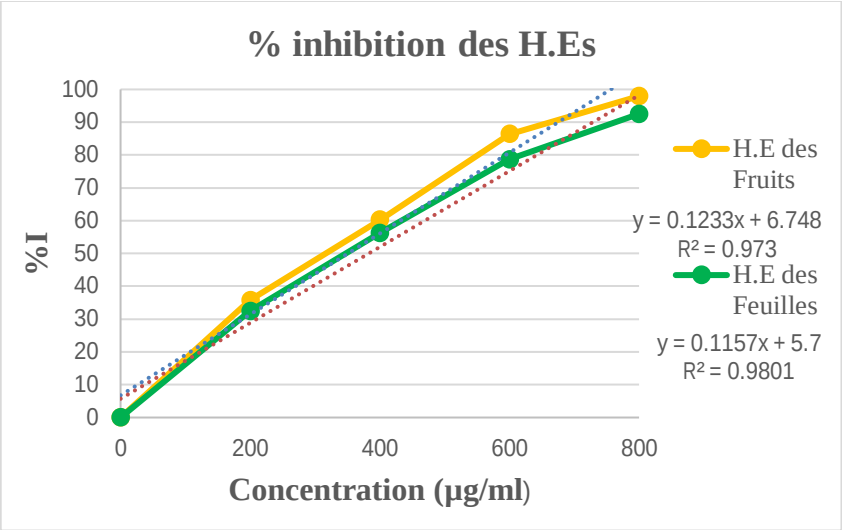


Figure 4.3: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de l'HE des fruits et des feuilles du *Citrus aurantium l*

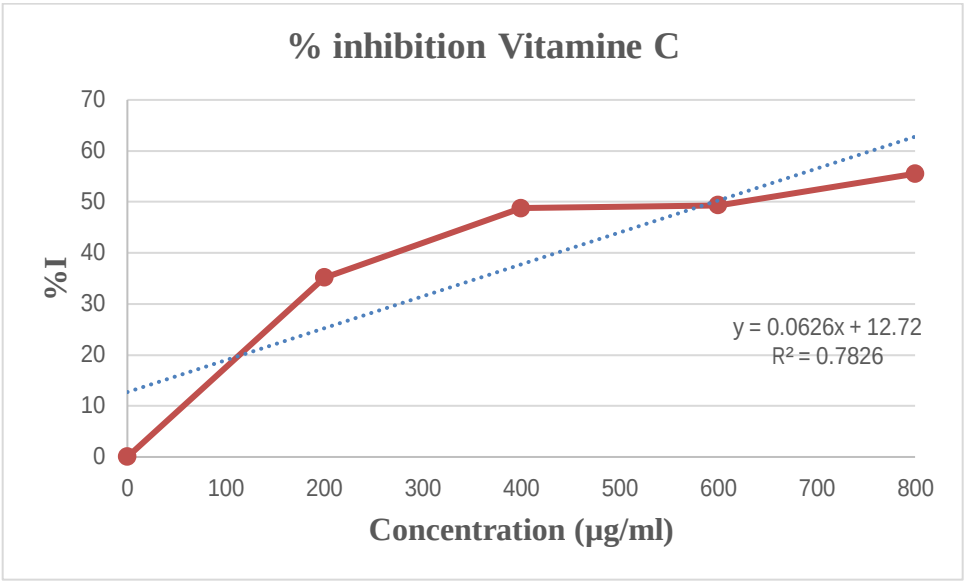


Figure 4.4: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

D'après les courbes illustrées précédemment, on remarque que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration pour tous les extraits étudiés. Il semble que l'activité anti radicalaire est fortement dépendante des concentrations des extraits, Plus l'extrait est concentré, plus

l'activité est élevée. Autrement dit, le pourcentage d'inhibition du radical est proportionnel à la concentration des différents extraits utilisés.

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'extrait. En présence d'un radical libre DPPH, l'atome H est transféré sur ce dernier pour le transformer en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de l'antioxydant donneur d'hydrogène **(Khoudali et al., 2014)**, se traduisant par une phase constante qui s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical **(Bouyahya et *al.*, 2017)**.Nous remarquons que l'extrait des HEs présente un pourcentage d'inhibition plus élevé par rapport au Hydrolat .Le pourcentage d'inhibition pour l'HE des feuilles est estimé à 92,54%, suivi par l'extrait de l'HE des fruits , avec un pourcentage d'inhibition de 97,97% .Alors que l'hydrolat des feuilles a montré un pourcentage d'inhibition de 92,36% ,et enfin l'hydrolat des fruits avec un pourcentage d'inhibition de 91,29%. L'acide ascorbique a montré une capacité à inhiber le radical DPPH égale à 55,53 %.

L'étude réalisée par **(Lagha-Benamrouche and Madani, 2013)** a montré que les feuilles de bigaradier présentent un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 99,5% et celui des fruits est de 88%. Ces valeurs sont très proches de nos résultats. Ces différences s'expliqueraient par les différentes compositions chimiques des mêmes espèces d'agrumes dans différentes régions **(Teneva et *al.*, 2019)**

3.1 Détermination des IC50

Nous avons déterminé à partir des graphes la concentration correspondante à 50% d'inhibition (IC50, concentration inhibitrice à 50%) pour chaque extrait, c'est-à-dire la concentration requise pour piéger les radicaux DPPH à 50%, exprimées en déviation standard moyenne**.(Talukder et *al.*, 2013)**

Plus la valeur de l'IC50 est petite, plus l'activité anti radicalaire de l'extrait est grande. Les valeurs d'IC50 obtenues (Figure 4.4) permettent de classer la capacité de piégeage du radical DPPH par les extraits testés par rapport à l'acide ascorbique et entre elles.

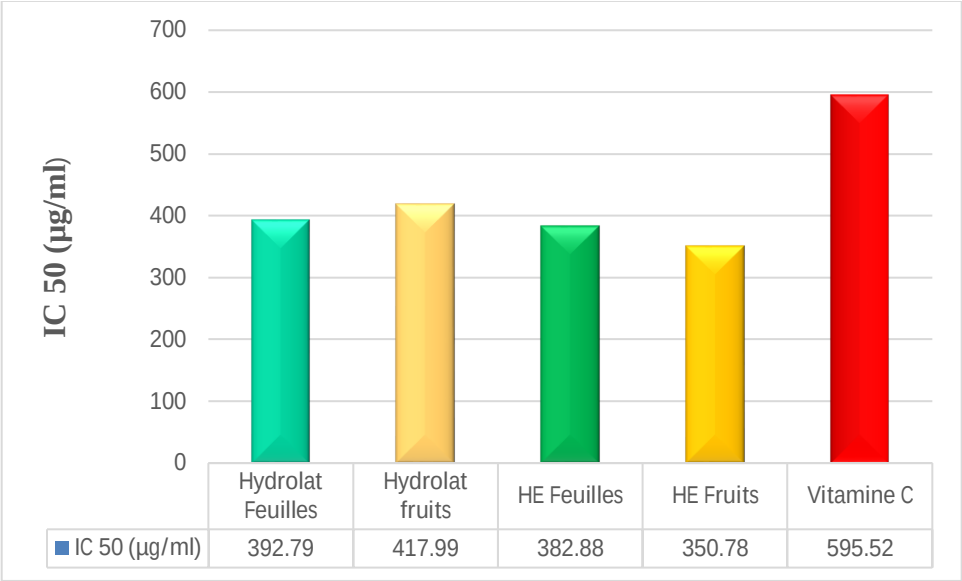


Figure 4.5 : Valeurs des IC50 des différents extraits et de vitamine C

D'après les valeurs des IC50 obtenues dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que l'HE des fruits du *Citrus aurantium l* présente l'IC50 la plus faible (350,78 µg/ml), suivi par l'extrait des HE des feuilles (382,88µg/ml) ensuite l'hydrolat des feuilles (392,79µg/ml) et l'hydrolat des fruits (417,99 µg/ml). Cependant, l'acide ascorbique ayant un IC50 le plus grand par rapport à tous les extraits, de 595,52µg/ml, possède alors la plus faible activité anti radicalaire comparativement aux autres extraits testés.

Des travaux réalisés sur l'écorce du *Citrus aurantium* ont montré des valeurs d'IC50 (190µg / ml) **(Marzouk, 2013)**. Ce qui est largement inférieur à celles de notre analyse.

D'autre travaux sur l'extrait de feuilles ont montré une valeur IC50 (142,25 µg/ml) **(Muthiah et *al.*, 2012)**et (68,44 µg/ml) par **(Khettal et *al.*, 2017)**, ce qui reste toujours inférieur à nos analyses.

On constate que notre huile essentielle est moins active, ce qui est peut-être dû à sa composition chimique. Il a été rapporté que l'activité de piégeage des radicaux libres est fortement influencée par la composition de l'échantillon étudié. Cependant, les huiles essentielles sont riches en mono terpènes oxygénés et ont des propriétés de piéger DPPH relativement importantes **.(Zouari et *al.*, 2011)**

En plus, Plusieurs auteurs attestent que la composition chimique et l'activité antioxydante des sous-produits d'agrumes peuvent varier en fonction du type de culture et du stade de maturation **(Castillo et *al*., 1993); (Sun et *al*., 2005)**.

4 Activité biologique des huiles essentielles

4.1 Aromatogramme:

L'activité antibactérienne des H.E a été testée par la méthode de l'aromatogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Le potentiel antibactérien des huiles essentielles des feuilles et des fruits du *Citrus aurantium l*, a été évalué sur 03 souches bactériennes (01 Gram+ et 02 Gram–) provenant d'IPA-Alger.

4.2 Essai avec l'huile essentielle *Citrus aurantium l*

La sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'H.E de *Citrus aurantium l* extraite des feuilles et fruits, est déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose (Aromatogramme) en mesurant le diamètre de l'halo d'inhibition. Après les 24 heures d'incubation, les boites imprégnées par l'H.E de *Citrus aurantium l* à l'état pur ont montré une inhibition importante de la croissance des bactéries testées.

4.3 Étude de l'activité antimicrobienne de l'HE des feuilles de *Citrus aurantium l*

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es des feuilles de Citrus *aurantium l* sur la croissance des souches bactériennes testées: *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli*, sont représentées dans la Figure 4.6 et le tableau 4.5

Tableau 4.5. Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle [redacted] feuilles de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+

	HE des feuilles de *Citrus aurantium l*
Souches bactériennes (Gram-)	

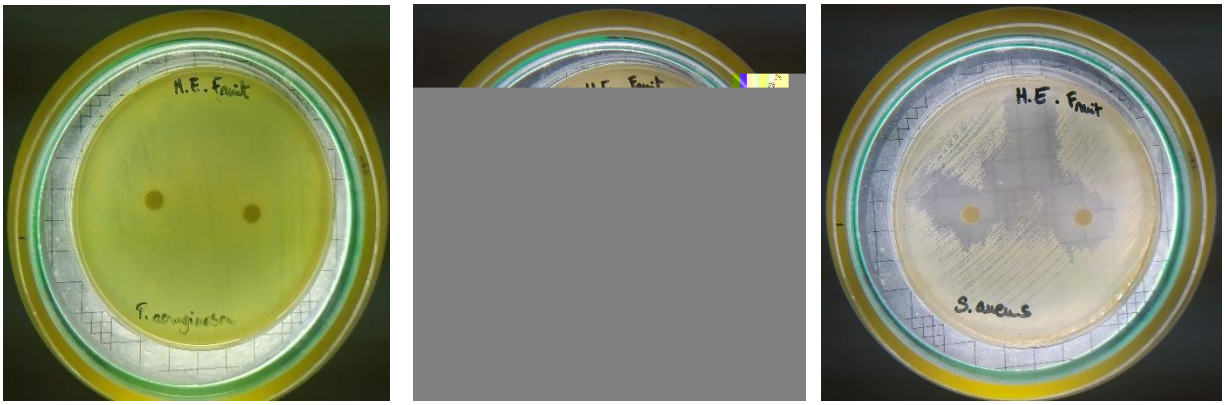
4.4 Étude de l'activité antimicrobienne de l'HE des fruits de *Citrus aurantium l*

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es des fruits de Citrus *aurantium l* sur la croissance des souches bactériennes testées: *S. aureus, P. aeruginosa, E. coli*, sont représentées dans la Figure 4.7 et le tableau 4.6

Tableau 4.6 : Halos moyennes d'inhibition en (mm) provoqués par l'huile essentielle des fruits de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+.

		HE des fruits de *Citrus aurantium l*
Souches bactériennes (Gram-)	*Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*	6,46±0,28
	Escherichia coli (E.Coli)	8,9±0,06
Souches bactériennes (Gram+)	*Staphylococcus aureus (S. aureus)*	18,72±0,75

Une activité inhibitrice a été observée pour *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 18 mm. On peut dire alors que cette souche est sensible. Alors que *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont marqués par une résistance à l'H.E des fruits de *C. aurantium l.*



(a) **(b)** **(c)**

Figure 4.7 : Effet inhibitrice provoqués par l'huile essentielle des fruits de *Citrus aurantium l* contre les souches bactériennes à Gram- et Gram+ : (a) : *P.aeruginosa* ;(b) :*E.Coli* ;(c) :*S. aureus*

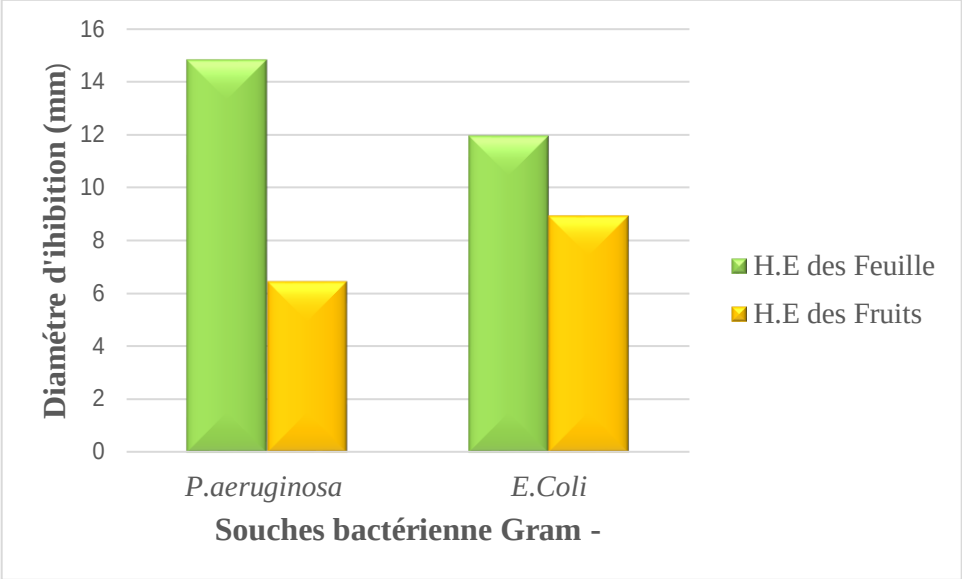


Figure 4.8 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus aurantium l* des feuilles et des fruits contre les bactéries à Gram-.

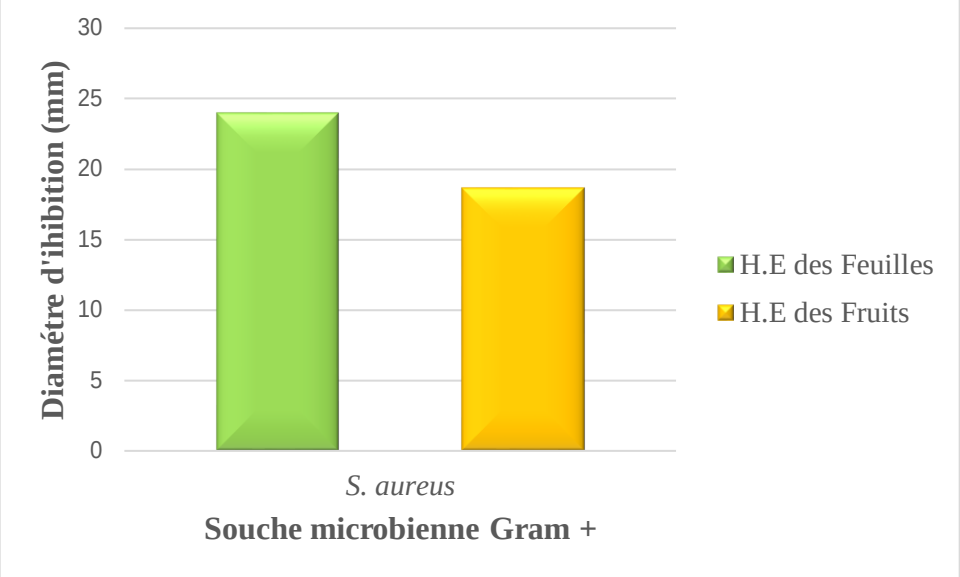


Figure 4.9 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de *Citrus aurantium l* des feuilles et des fruits contre les bactéries à Gram+.

Les mécanismes d'action des HEs contre les micro-organismes sont complexes et incluent l'inhibition séquentielle d'une voie biochimique commune. L'inhibition d'enzymes protectrices et l'utilisation d'agents actifs de la paroi cellulaire pour améliorer l'absorption d'autres agents antimicrobiens. Une synergie entre le carvacrol et certains hydrocarbures mono terpènes (tels que l'α-pinène, le camphène, le myrcène, l'α-terpinène et le p-cymène) présentant généralement de faibles propriétés antimicrobiennes a été observée .**(Bassolé and Juliani, 2012)**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée. Les composées les plus antimicrobiens sont les phénols (carvacrol, thymol, eugénol), viennent ensuite les alcools (cinéole, linalol...) et dans une faible mesure les alcènes (p-cymène, pinène, terpinène...) **(Burt, 2004)**

Les HE contenant du phénol ou de l'alcool comme composés majoritaires sont plus actives, que celles contenant le limonène (hydrocarbure monoterpènique) comme composé majoritaire (**Inouye et *al*., 2001)**

Ces observations ont été également partagées par **(Dorman and Deans, 2000).**, et ont montré que les hydrocarbures mono terpéniques, abondants dans les HE de Citrus contenant le limonène comme constituant principal est faiblement inhibiteur contre une panoplie de microorganismes. Les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques dans des préparations pharmaceutiques**(Inouye et *al*., 2001)** Très probablement l'absence de ces composés dans nos huiles testées a été le facteur défavorable à son activité antibactérienne. En effet, plusieurs travaux ont démontré que le pouvoir antimicrobien élevé des huiles essentielles de plusieurs espèces de plantes médicinales est attribué à leur richesse en composés phénoliques comme le carvacrol et le thymol **(Friedman et *al*., 2002)**,**(Ložienė et *al*., 2007) (Nevas et *al*., 2004)**

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane .**(Lemes et *al*., 2018).**

En général, le premier site d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires **(Carson et *al*., 2006)**

En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intra cytoplasmiques **(Cristani, 2007)**

Des études antécédentes ont démontré que la majorité des HE testées pour leurs propriétés antibactériennes ont un effet plus prononcé contre les Gram +. La résistance des Gram – est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible **(Wan et *al*., 1998)**

Conclusion et Perspectives

Les H.Es sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et anti oxydantes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires. Les travaux réalisés dans notre étude ont permis de mettre en évidence les activités antibactériennes et anti oxydantes des H.Es de *Citrus aurantium l* extraites à partir des feuilles et des fruits.

L'extraction de l'essence aromatique a été réalisée au Département de Biotechnologie. Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* ont été analysées selon la méthode standard AFNOR afin de déterminer les constantes physiques habituelles définissant l'huile essentielle extraite par hydro-distillation : densité relative, l'indice de réfraction, l'indice d'acide. Les résultats obtenus sont conformes aux normes en vigueur.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode d'aromatogramme. Une activité intéressante a été obtenue avec l'huile essentielle des feuilles de *C. aurantium l* dont les zones d'inhibitions varient entre 11et 23mm.Par contre l'huile essentielle des fruits de *C. aurantium l* s'est montrée résistante vis-à-vis *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeroginosa*. Tandis qu'une activité sur la croissance de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 18mm a été observée.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la souche bactérienne à Gram positif (*Staphylococcus aureus)* est la souche la plus sensible par rapport aux souches à Gram négatif (*Escherichia coli*) par la mesure d'une zone d'inhibition. Cela pourrait être attribué à la structure de la membrane bactérienne pour les bactéries à Gram négatif (-) qui possèdent une membrane riche en liposaccharides qui fournissent une surface hydrophile, et donc ce dernier agit comme une barrière de pénétration qui bloque les macromolécules de pénétrer dans la cellule.

L'activité antioxydante des deux huiles de *Citrus* a été également étudiée par le test du radical libre DPPH. D'après nos résultats, nous avons constaté que toutes les huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir antioxydant dont le plus important est celui de l'H.E des fruits de *C.aurantium l* .Elle a exhibé une capacité antioxydante élevée en enregistrant ainsi des IC50 de 350,78 µg/ml par rapport à l'H.E des feuilles de *Citrus aurantium l.*

En perspectives il serait intéressant de poursuivre ce travail par :

Des études in vivo et chercher les stratégies à adapter pour une application potentielle des H.E pour la lutte antimicrobienne et antifongique.

La détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) et la réalisation des tests complémentaires avec d'autres souches bactériennes et fongiques.

Une analyse chromatographique par CPG (chromatographie en phase gazeuse) afin d'identifier les constituants responsables de l'activité de ces huiles

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABEYSINGHE, D., LI, X., SUN, C., ZHANG, W., ZHOU, C. & CHEN, K. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food chemistry,* 104, 1338-1344.

AMIR, B., RIHAB, S. & NAHLA, G. 2020. Etude du potentiel de rendement en huiles essentielles de deux espèces végétales du Nord-Est Algérien (Eucalyptus camaldulensis et Citrus sinensis).

ARABA OUM HANI, B. H. 2016. Contribution à l'étude de la biodiversité entomologique dans un verger d'agrumes dans la région de Guelma.

BASSOLÉ, I. H. N. & JULIANI, H. R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules,* 17, 3989-4006.

BENZEGGOUTA, N. 2005. Etude de l'activité antibacterienne des huiles infusées de quatre plantes medecinales connues comme aliments.

BOUSBIA, N. 2011. *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires.* Université d'Avignon.

BOUTEKEDJIRET, C. 1999. Étude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences de romarin. Transfert de matière et modélisation. *Diss. Thèse de doctorat d'État, École nationale polytechnique, Alger, Algérie*.

BOUYAHYA, A., ABRINI, J., BAKRI, Y. & DAKKA, N. 2017. Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'Origanum compactum. *Phytothérapie,* 15, 379-383.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.-E. & BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology,* 28, 25-30.

BURGOT, G. & BURGOT, J.-L. 2011. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques*, Lavoisier.

BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology,* 94, 223-253.

CARSON, C., HAMMER, K. & RILEY, T. 2006. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical microbiology reviews,* 19, 50-62.

CASTILLO, J., BENAVENTE, O. & DEL RIO, J. A. 1993. Hesperetin 7-O-glucoside and prunin in Citrus species (C. aurantium and C. paradisi). A study of their quantitative distribution in immature fruits and as immediate precursors of neohesperidin and naringin in Citrus aurantium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 41, 1920-1924.

CHEMAT, S., LAGHA, A., AITAMAR, H., BARTELS, P. V. & CHEMAT, F. 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal,* 19, 188-195.

COX, R. J., SUTHERLAND, A. & VEDERAS, J. C. 2000. Bacterial diaminopimelate metabolism as a target for antibiotic design. *Bioorganic & medicinal chemistry,* 8, 843-871.

CRISTANI, M. 2007. D' Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem,* 55, 6300-8.

DE CLIFF, S. & HARERIMANA, P. C. 2013. Extraction de l'Huile Essentielle Complète des Fleurs de Cananga Odorata de la Plaine de l'Imbo: Vers la Vulgarisation d'une Nouvelle Filière de Plante Industrielle au Burundi. *Revue de l'Université du Burundi-Série Sciences Exactes N° 28*, S. De Cliff et PC Harerimana Extraction de l'huile essentielle...

DE ROCHEFORT, L. D. 1793. *Cours élémentaire de matière médicale: suivi d'un précis de l'art de formuler*, Chez Méquignon l'aîné.

DES NORMES FRANÇAISES, R. 2000. Huiles essentielles. *Editions AFNOR, Paris, France*.

DJENANE, D. 2015. Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in Sardina pilchardus. *Foods,* 4, 208-228.

DORMAN, H. D. & DEANS, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology,* 88, 308-316.

EL HAIB, A. 2011. *Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques.* Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

ERSUS, S. & CAM, M. 2007. Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour Citrus aurantium fruits. *Chemistry of Natural Compounds,* 43, 607-609.

FISHER, K. & PHILLIPS, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in food science & technology,* 19, 156-164.

FRIEDMAN, M., HENIKA, P. R. & MANDRELL, R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. *Journal of food protection,* 65, 1545-1560.

GUINOISEAU, E. 2010. *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action.* Université de Corse.

HAMMER, K. A., CARSON, C. F. & RILEY, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology,* 86, 985-990.

HARAOUI, N., ALLEM, R., CHAOUCHE, T. M. & BELOUAZNI, A. 2019. In-vitro antioxidant and antimicrobial activities of some varieties citrus grown in Algeria. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 1-12.

HELLAL, Z. 2011. *Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus).* Université Mouloud Mammeri.

HUET, R. 1991. Les huiles essentielles d'agrumes. *Fruits,* 46, 501-513.

INOUYE, S., YAMAGUCHI, H. & TAKIZAWA, T. 2001. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy,* 7, 251-254.

JOUAULT, S. 2012. *La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité.* Université de Lorraine.

KEHAL, F. 2013. Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche.

KHETTAL, B., KADRI, N., TIGHILET, K., ADJEBLI, A., DAHMOUNE, F. & MAIZA-BENABDESLAM, F. 2017. Phenolic compounds from Citrus leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine,* 14.

KHOUDALI, S., ESSAQUI, A., ZERTOUBI, M., AZZI, M. & BENAISSA, M. 2014. Study of antioxidant activity and anticorrosion action of the methanol extract of dwarf palm leaves (chamaerops humilis l.) from morocco|[Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (chamaerops humilis l.) du maroc].

KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, B., WEIGAND, H. & WEIS, N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research,* 1, 119-128.

LAGHA-BENAMROUCHE, S., ADDAR, L., BOUDERHEM, H., TANI, S. & MADANI, K. 2018. Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology*, 28-35.

LAGHA-BENAMROUCHE, S. & MADANI, K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products,* 50, 723-730.

LAMAMRA, M. 2018. *Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'Ammiopsis aristidis Coss.(Syn. Daucus aristidis Coss.) et d'Achillea santolinoides Lag.*

LAURENT, J. 2017. ***Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine.*** **Université Toulouse III-Paul Sabatier.**

LEMES, R. S., ALVES, C. C., ESTEVAM, E. B., SANTIAGO, M. B., MARTINS, C. H., SANTOS, T. C. D., CROTTI, A. E. & MIRANDA, M. L. 2018. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Citrus aurantifolia leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. ***Anais da Academia Brasileira de Ciências,*** **90, 1285-1292.**

LOŽIENĖ, K., VENSKUTONIS, P. R., ŠIPAILIENĖ, A. & LABOKAS, J. 2007. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different Thymus pulegioides L. chemotypes. ***Food chemistry,*** **103, 546-559.**

MANNER, H. I., BUKER, R. S., SMITH, V. E., WARD, D. & ELEVITCH, C. R. 2006. Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat). ***Species profile for pacific island agroforestry,*** **2, 1-35.**

MARZOUK, B. 2013. Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (Citrus aurantium L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. ***BioMed research international,*** **2013.**

MENDHAM, J. 2005. ***Analyse chimique quantitative de Vogel*****, De Boeck Supérieur.**

MNAYER, D. 2014. ***Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens.*** **Université d'Avignon.**

MUTHIAH, P., UMAMAHESWARI, M. & ASOKKUMAR, K. 2012. In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of Citrus. ***International Journal of Phytopharmacy,*** **2, 13-20.**

NEVAS, M., KORHONEN, A.-R., LINDSTRÖM, M., TURKKI, P. & KORKEALA, H. 2004. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. ***Journal of food protection,*** **67, 199-202.**

OUGUELMANE, A. & HOUICHITI, R. 2020. ***Etude des activités biologiques d'une plante aromatique médicinale locale" Citrus aurantium.*** **.**

PAULI, A. 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. ***International Journal of Aromatherapy,*** **11, 126-133.**

PIERRON, C. 2014. ***Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France: exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs.*** **Université de Lorraine.**

PIOCHON, M. 2008. ***Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse*****, Université du Québec à Chicoutimi.**

PROESTOS, C., SERELI, D. & KOMAITIS, M. 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. ***Food chemistry,*** **95, 44-52.**

PRUDENT, D., PERINEAU, F., BESSIERE, J., MICHEL, G. & BACCOU, J. 1995. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (Coleus aromaticus Benth.)—evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. ***Journal of Essential Oil Research,*** **7, 165-173.**

REUTHER, W., WEBBER, H. & BATCHELOR, L. 1967. The citrus industry. v. 1: History world distribution, botany and varieties. v. 3: Production technology. University of California, Berkeley, CA (EUA). Division of Agricultural Sciences.

ROUESSAC, F. & ROUESSAC, A. 2013. ***Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*****, John Wiley & Sons.**

SAHRAOUI, N., ERRAHMANI, M. B., AMMI-BAAZIZ, D., HEZIL, N., BENNADJI, M., BOULARIAH, H., CHAOUADI, D., HORNICK, J. & GUETARNI, D. 2015. L'effet de l'extrait végétal de Yucca Schidigera sur l'excrétion oocystale chez le poulet de chair. ***Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires,*** **3, 53-57.**

SILVA, A. C. D., SOUZA, P. E. D., AMARAL, D. C., ZEVIANI, W. M. & PINTO, J. E. B. P. 2014. Essential oils from Hyptis marrubioides, Aloysia gratissima and Cordia verbenacea reduce the progress of Asian soybean rust. ***Acta Scientiarum. Agronomy,*** **36, 159-166.**

SUN, C., CHEN, K., CHEN, Y. & CHEN, Q. 2005. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. ***Food chemistry,*** **93, 599-605.**

SUSSER, A. 1997. ***The Great Citrus Book: A Guide with Recipes*****, Ten Speed Pr.**

TALBI, H., BOUMAZA, A., EL-MOSTAFA, K., TALBI, J. & HILALI, A. 2015. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la Nigella sativa L. ***J Mater Environ Sci,*** **6, 1111-1117.**

TALUKDER, M. E. U., AKLIMA, J., EMRAN, T. B., ISLAM, S., RAHMAN, A. & BHUIYAN, R. H. 2013. In vitro antioxidant potential of Momordica charantia fruit extracts. ***Journal of Pharmaceutical Research International*****, 963-971.**

TANTAOUI-ELARAKI, A., LATTAOUI, N., ERRIFI, A. & BENJILALI, B. 1993. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Thymus broussonettii, T. zygis and T. satureioides. ***Journal of Essential Oil Research,*** **5, 45-53.**

TENEVA, D., DENKOVA-KOSTOVA, R., GORANOV, B., HRISTOVA-IVANOVA, Y., SLAVCHEV, A., DENKOVA, Z. & KOSTOV, G. 2019. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from Citrus aurantium L zest against some pathogenic microorganisms. ***Zeitschrift für Naturforschung C,*** **74, 105-111.**

TEUSCHER, E., ANTON, R. & LOBSTEIN, A. 2005. ***Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles*****, Tec & Doc.**

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. ***Journal of food science,*** **73, R117-R124.**

WAN, J., WILCOCK, A. & COVENTRY, M. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens. ***Journal of applied microbiology,*** **84, 152-158.**

ZINEB, S. & YACINE, B. Impact of the Composition of the Essential Oils of Citrus sinensis (orange) and Citrus limonum (lemon) on the Microbiological Activity.

ZOUARI, N., FAKHFAKH, N., ZOUARI, S., BOUGATEF, A., KARRAY, A., NEFFATI, M. & AYADI, M. 2011. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian Thymus algeriensis Boiss. et Reut.(Lamiaceae). ***Food and Bioproducts Processing,*** **89, 257-265.**