

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Saad Dahlab Blida



Faculté des Sciences de la nature et de la vie  
Département de Biologie des Populations et Organismes

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du  
Diplôme de Master en biologie  
Option : Génomique et biotechnologie végétale

### Thème

**Etude de quelques activités biologiques Antimicrobienne,  
antioxydant et cicatrisante  
de deux agrumes « *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* »**

#### Présenté par :

M<sup>elle</sup> KAIBI Fatima Zohra

M<sup>r</sup> TIMIZAR AYOUB

#### Devant le jury :

M <sup>me</sup> AYADI R	MCB	UB1/BPO	PRESIDENTE
M <sup>me</sup> BENASSEL N	MAA	UB1/BPO	EXAMINATRICE
M <sup>me</sup> ZERKAOUI A	MAA	UB1/BPO	PROMOTRICE

**Promotion : 2015-2016**

# *Dédicaces*

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

*A mes sœurs, oncles, tantes et cousins (es).*

*A mon binôme Fatima*

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

*A tous mes miens.*

*Ayoub*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail comme preuve d'amour :*

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

*Je leur souhaite le bonheur et la bonne santé.*

*Qu'ALLAH me les gardes.*

*À mon frère et mes sœurs,*

*À toute ma famille*

*À mon binôme Ayoub*

*À mes amies et mes collègues ;*

*À tous les personnes, qui m'ont encouragé, aidé, conseillé et orienté de près ou de loin.*

*Fatima*

# Remerciement

*Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant qui nous a permis de réaliser notre travail.*

*M<sup>me</sup> ZARKAOUI .A, notre promotrice pour avoir accepté d'encadrer ce travail qui nous a suivis tout au long de notre stage, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité, sa gentillesse et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire*

*Nos vifs remerciements sont adressés aux membres de jury :*

*La présidente du jury M<sup>me</sup> AYADI.R qui nous a fait l'honneur de présider l'examen de ce travail.*

*L'examinatrice M<sup>me</sup> BENASEEL. N d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Tous les enseignants et enseignantes ayant participé à notre formation en graduation.*

*Je voudrai également remercier le personnel de laboratoire PFE du département de chimie industrielle, le personnel technique du complexe Antibiotical Médéa, et le personnel technique de laboratoire d'hygiène de Blida pour leurs collaborations et leurs conseils.*

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

# ANNEXES

## ANNEXES

# Introduction

## Introduction

# Partie bibliographique

## **Partie bibliographique**

# Matériel et méthode

## Matériel et méthodes



# Résultats et discussion

## Résultats et discussion

**Conclusion**

**Conclusion**

# Référence bibliographique

## **Référence bibliographique**

## *Liste des abréviations*

---

AFNOR: Association Française de normalisation

ATCC: Collection américaine des cultures type (American Type Culture Collection).

*C. limonum* : *Citrus limonum*.

*C. sinensis* : *Citrus Sinensis*.

CE : Concentration efficace

CFU : Unité formant colonie

$d^{20}$ : densité relative.

Dm : dilution mère

DO : densité optique

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines.

Ech : Echantillon

GN : gélose nutritive

HE : huile essentielle.

IA: indice d'acide.

IC : Concentration inhibitrice.

$I_E$  : indice d'ester.

IR: indice de réfraction.

$I_S$ : indice de saponification.

M: molaire.

MH : Muller-Hinton

NF ISO : Norme française Organisation Internationale de Normalisation

nm : nanomètre.

PFE : Projet de fin d'étude.

PI : Pourcentage d'inhibition

SAB : sabouraud

Soja Agar : Soja Agar

V : volume

Var : variété.

# Liste des figures

---

<b>Figure n°1 :</b> Aspect morphologique des feuilles et du fruit de <i>Citrus limonum</i>	4
<b>Figure n°2 :</b> Aspect morphologique des feuilles et du fruit d'oranger	6
<b>Figure n°3 :</b> Poches sécrétrices des huiles essentielles des <i>Citrus</i> dans feuilles	10
<b>Figure n°4:</b> Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	15
<b>Figure n°5:</b> montage d'hydrodistillation (Clevenger)	15
<b>Figure n°6 :</b> Dispositif d'extraction des HEs par entraînement à la vapeur d'eau	19
<b>Figure n°7:</b> Illustration de la méthode Aromatogrammes	25
<b>Figure n°8 :</b> Illustration de la méthode des micro-atmosphères	27
<b>Figure n°9:</b> Les pommades testées sur les lapins	29
<b>Figure n°10 :</b> Les deux témoins testés sur les lapins	29
<b>Figure n°11:</b> Les scarifications réalisées	30
<b>Figure n°12 :</b> Huile essentielle de citron et orange	32
<b>Figure n°13:</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'huile essentielle de <i>C. sinensis</i> .	35
<b>Figure n°14:</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'huile essentielle de <i>C. limonum</i>	35
<b>Figure n°15:</b> Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique	36
<b>Figure n°16:</b> Comparaison de la valeur IC50 de HE de <i>C. limonum</i> , <i>C. sinensis</i> et l'acide ascorbique.	37
<b>Figure n°17:</b> Photos montrant l'effet de HE de <i>C. limonum</i> et l'effet de HE de <i>Citrus sinensis</i> sur : <i>P. vulgaris</i> , <i>C. freundii</i> , <i>K. pneumoniae</i> . par la Méthode d'aromatogramme.	40

<b>Figure n°18</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>citrus limonum</i> et l'effet de HE de <i>C. sinensis</i> sur : <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> (E1), <i>E.coli</i> (E2).	40
<b>Figure n°19</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>citrus limonum</i> et l'effet de HE de <i>C. sinensis</i> sur : <i>S. spp</i> , <i>E. faecalis</i> par la Méthode d'aromatogramme.	42
<b>Figure n°20</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>C. limonum</i> et l'effet de HE de <i>C. sinensis</i> sur : <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> (S1), <i>S. aureus</i> (S2), par la Méthode d'aromatogramme	42
<b>Figure n°21</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>citrus limonum</i> et l'effet de HE de <i>citrus sinensis</i> sur : <i>Aspergillus Niger</i> , <i>Candida albicans</i> (C2), <i>Saccharomyces cervisiae</i> . par la Méthode d'aromatogramme	43
<b>Figure n°22</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>citrus limonum</i> et l'effet de HE de <i>citrus sinensis</i> sur : <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> par la Méthode de microatmosphère	47
<b>Figure n°23</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>citrus limonum</i> et l'effet de HE de <i>citrus sinensis</i> sur : <i>M. luteus</i> par la Méthode de microatmosphère	47
<b>Figure n°24</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>C. limonum</i> et l'effet de HE de <i>C. sinensis</i> sur : <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> (S1), <i>E. coli</i> (E1) par la Méthode de microatmosphère	48
<b>Figure n°25</b> : Photos montrant l'effet de HE de <i>C. limonum</i> et l'effet de HE de <i>C. sinensis</i> sur : <i>C. albicans</i> (C1), <i>S. cervisiae</i> , <i>A. Niger</i> par la Méthode de microatmosphère	48
<b>Figure n°26</b> : Etude comparatives entre 2 méthodes aromatogramme et micro atmosphère (HE de Citron).	50
<b>Figure n°27</b> : Etude comparatives entre 2 méthodes aromatogramme et micro atmosphère (HE d' Orange)	50
<b>Figure n°28</b> : résultats de 3 <sup>ème</sup> jour	53
<b>Figure n°29</b> : résultats de 6 <sup>ème</sup> jour	53
<b>Figure n°30</b> : résultats de 8 <sup>ème</sup> jour	54

# *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau I</b> : Les principales caractéristiques de la variété <i>Eureka</i>	5
<b>Tableau II</b> : Les principales caractéristiques de la variété <i>Washington navel</i>	8
<b>Tableau III</b> : Origine et références des souches testées	18
<b>Tableau IV</b> : La distribution des lapins et les produits testé	28
<b>Tableau V</b> : Rendement en huile essentielle de <i>Citrus</i>	31
<b>Tableau VI</b> : Les indices physico-chimiques des deux HEs	33
<b>Tableau VII</b> : Diamètres des zones d'inhibition montrant l'activité antimicrobienne des deux HEs par la méthode diffusion sur gélose.	39
<b>Tableau VIII</b> : Diamètre d'inhibition (mm) des germes vis-a vis de deux HEs après dilution	45
<b>Tableau IX</b> : Diamètres des zones d'inhibition montrant l'activité antimicrobienne des deux HEs par la méthode de micro-atmosphère.	46



# Glossaire

---

Selon encyclopédie, 2015.

Synergie : action combinée de plusieurs éléments associés

Antagoniste : Substance qui empêche une autre d'agir correctement chez un être vivant.

Volatil : qui tend à s'évaporer facilement

Furocoumarine : un ensemble de substances toxiques sensibles à la lumière

Cohobage : Recyclage dans l'alambic, pendant une distillation, de l'eau recueillie à la sortie de l'appareil après séparation de l'essence.

Schizolysigène : Qualifie les poches sécrétrices qui proviennent de l'écartement et de la lyse de cellules sécrétrices, à la manière des Rutacées.

Schizogène : Se dit des poches ou des canaux sécréteurs nés de l'écartement de cellules sécrétrices comme chez les Eucalyptus.

Antiseptique : produit qui permet de supprimer ou d'empêcher le développement des bactéries ou des virus.

Exhalaisons : Gaz ou odeur qui s'exhale d'un corps.

Anti-radicalaire : molécule capable de neutraliser des radicaux libres

Génotypes : l'ensemble ou une partie donnée de l'information génétique (composition génétique) d'un individu.

# Table de Matières

---

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>Chapitre I : Partie bibliographique</b>	
I-1- Généralité sur le citronner : <i>Citrus limonum</i> . .....	3
I-1-1- Description botanique .....	3
I-1-2- Systématique .....	4
I-1-3- Principales caractéristiques de variété Eureka .....	5
I-2- Généralité sur l'oranger : <i>Citrus sinensis</i> (Orange douce) .....	5
I-2-1- Description botanique.....	5
I-2-2- Systématique .....	6
I-2-3- Principales caractéristiques de l'oranger : <i>Citrus sinensis</i> var. Washington navel.....	8
I-3- Les huiles essentielles.....	8
I-3-1- Définition .....	8
I-3-2- Rôle physiologique .....	9
I-3-3- Répartition et localisation .....	9
I-3-3-1- Répartition .....	9
I-3-3-2- localisation .....	9
I-3-4- Composition chimiques des huiles essentielles .....	10
I-3-4-1- Les terpène .....	11
I-3-4-2- Les composé aromatiques .....	11
I-3-4-3- Les composés d'origine diverses .....	11
I-3-4-4- Notion de chémotype .....	12
I-3-5- Propriétés physiques des HEs.....	12
I-3-6- Classification des HEs.....	13
I-3-7- Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles .....	13
I-3-8- Domaine d'application des huiles essentielles .....	13
I-3-9- Méthodes d'extractions des huiles essentielles.....	14
I-3-9-1- Entraînement à la vapeur d'eau .....	14

I-3-9-2– L’hydrodistillation .....	15
I-3-9-3- - L’expression à froid .....	16
I-3-9-4- Autres techniques .....	16
I-3-10- Toxicité des huiles essentielles .....	16
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	
II-1-Matériel .....	17
II.1.1. matériel non biologiques .....	17
II-1-2-1- Matériel végétale .....	17
II-1-2-2- Matériel Animal .....	17
II -1-2-3- Matériel microbiologique .....	18
II-2-Méthodes .....	19
II-2-1- Extraction de l’huile essentielle par entrainement à la vapeur à l’échelle du laboratoire.....	19
II-3- Calcul du rendement en huile essentielle .....	19
II-4- Etude analytique de l’huile essentielle .....	20
II-4-1- Les propriétés physico-chimiques .....	20
II-4-1-1- Détermination de l’indice d’acide (IA) .....	20
II-4-1-2- Indice de réfraction (IR) .....	21
II-4-1-3- Détermination de la densité relative à 20°C (d20) .....	21
II-4-1-4- Indice de saponification IS .....	22
II-4-1-5- Indice d’ester .....	22
II-4-2- Activité antioxydant des huiles essentielles extraites .....	23
II-5- Etude de l’activité antimicrobienne de l’huile essentielle .....	24
II-5-1- Technique en milieu solide : Méthode des Aromatogrammes .....	24
II-5-2- Micro atmosphère : méthode en phase vapeur .....	27
II-6- Etude de l’activité cicatrisante .....	28
<b>Chapitre III : Résultats et discussions</b>	
III-1- Analyse physicochimiques des deux HEs .....	31
III-1-1- Détermination du rendement d’extraction .....	31
III-1-2- Caractères organoleptiques .....	32
III-1-3- Les indice physico-chimiques .....	33
III-2- L’activité antioxydant .....	35

III-3-Résultats du contrôle microbiologique .....	39
III-3-1- Aromatogramme .....	39
III-3-2- L'activité antimicrobienne des deux HEs après dilution .....	45
III-3-3- Résultats de micro-atmosphère .....	46
III-4- Evaluation de l'activité cicatrisante .....	52
<b>Conclusion</b> .....	55
<b>Références bibliographiques</b>	

# Résumé

---

Dans le but de sélectionner de nouveau produit végétaux ayant des activités biologiques, la présente étude porte sur l'évaluation des effets biologiques des huiles essentielles des feuilles des deux espèces d'agrumes *C. limonum* (citron) et *C. sinensis* (orange) poussant dans la Wilaya de Blida.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau avec un faible rendement 0.31 % pour le citron et 0.22 % pour l'orange. Les résultats des analyses physicochimiques des huiles essentielles (l'indice d'acide, indice de réfraction, densité relatives, indice de saponification et l'indice d'ester) sont conformes à la norme (AFNOR), ont révélé que l'HE de citron est plus acide (1.20) que celle de l'orange (0.71).

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de réduction du radical libre DPPH a montré que l'huile essentielle de citron est plus efficace que celle d'orange. Ainsi ces HEs sont présentent pouvoir antioxydant moins efficace que l'acide ascorbique.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été déterminée in vitro par 2 méthodes différentes (Aromatogramme et micro-atmosphère) sur 16 souches bactériennes (12 bactéries et 4 levures). Le screening a mis en évidence que l'HE de citron et l'orange possèdent une activité antibactérienne et antifongique remarquable sur la croissance de la majorité des souches testées, avec notamment des diamètres d'inhibition qui varient entre 11 et 37 mm pour le citron et entre 12 et 25 mm pour l'orange et totalement inactive contre *P. aeruginosa* en aromatogramme. En micro-atmosphère, uniquement *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* et *A. Niger* qui ont été sensibles à l'action inhibitrice de la phase vapeur de l'HE de citron. Concernant HE de l'orange est totalement inactive sur toutes les bactéries testé et légèrement inhibitrice uniquement sur les *Bacillus subtilis* avec un diamètre de 12mm et présente une faible activité antifongique.

Sur le plan thérapeutique, les pommades dermiques préparées à base des deux huiles essentielles ont des propriétés cicatrisantes et la pommade préparée à base de l'huile essentielle de citron présentent une meilleure activité cicatrisante.

**Mots clés :** Les huiles essentielles, *C. limonum*, *C. sinensis*, analyse physico-chimique, activité antimicrobienne, activité anti-oxydante, activité cicatrisante.

## ملخص

من أجل اختيار مواد طبيعية جديدة ذات نشاطات بيولوجية، تركّز هذه الدراسة على تقييم التأثيرات البيولوجية للزيوت الأساسية المستخلصة من أوراق نوعين من الحمضيات، الليمون (*C. Limonum*) و البرتقال (*C. Sinensis*) التي تنمو في ولاية البليدة.

تم استخلاص الزيوت الأساسية عن طريق التقطير ببخار الماء حيث أعطت العملية مردودا ضعيفا 0.31 % بالنسبة للليمون و 0.22 % بالنسبة للبرتقال. نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية ( معامل الحموضة، معامل الإنكسار، الكثافة النسبية، معامل التصبن، معامل الأسترة) مطابقة للمعايير الدولية (AFNOR). و أظهرت أن الزيت الأساسي للليمون (1.20) أكثر حموضة من الزيت الأساسي للبرتقال (0.71).

أظهرت دراسة القدرة المضادة للأكسدة من خلال طريقة ارجاع الجذر الحر DPPH أن الزيت الأساسي للليمون أكثر فعالية من زيت البرتقال، وكذلك هذه الزيوت هي أقل فعالية بكثير من حمض الأسكوربيك.

تم تنفيذ النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية في المختبر بواسطة طريقتين مختلفتين (Aromatogramme و Microatmosphère) على 16 سلالة (12 بكتيريا و 4 خمائر) و أظهر هذا الفحص أن للزيت الأساسي لكل من البرتقال و الليمون نشاط تثبيط نمو أغلبية السلالات المختبرة البكتيرية و الفطرية، بما في ذلك أقطار التثبيط تتراوح بين 11 و 33 مم للليمون و بين 12 و 25 مم للبرتقال و غير نشطين كليا على *P. aeruginosa* في Aromatogramme، و micro-atmosphère إلا *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, التي كانت حساسة لعمل التثبيط لمرحلة البخار للزيت الأساسي للليمون. أما فيما يخص الزيت الأساسي للبرتقال فهو غير نشط على كل السلالات البكتيرية المختبرة و مثبط ضعيف إلا على *B. subtilis* مع قطر تثبيط 12مم و أعطت نشاط ضعيف ضد الفطريات.

علاجيا، المراهم الجلدية التي أعدت من الزيوت الأساسية لها خصائص الشفاء والمرهم الذي أعد أساسا من زيت الليمون يملك خاصية شفاء عالية مقارنة بالمراهم المجربة.

الكلمات المفتاحية: *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, الزيوت الأساسية، التحاليل الفيزيوكيميائية، القدرة المضادة للأكسدة، مضاد الميكروبات، نشاط الشفاء

# Abstract

---

In order to select a new natural substances with biological activity, this study focuses on the evaluation of the biological effects of essential oils extracted from leaves of two types of citrus, lemon (*C. limonum*) and orange (*C. sinensis*) growing in the Wilaya of Blida.

The extraction of essential oils was carried out by distillation with water vapor in a low yield 0.31% for lemon and 0.22% for orange.

The results of physicochemical analyzes (the acid index, refractive index, relative density, saponification value and ester value) conform to the standard (AFNOR), and it showed that the essential oil of lemon (1.20) more acidic than orange essential oil (0.71).

The study of antioxidant by reducing free radical DPPH method showed that lemon essential oil is more effective than orange. Also these are much less effective than ascorbic acid.

The antimicrobial activity of essential oils was determined *in vitro* by two different methods (Aromatogram and micro-atmosphere) on 16 strains (12 bacterial and 4 yeasts). This examination showed that the oil for each of the orange and lemon activity inhibition of the growth of the majority of the strains tested bacterial and fungal, including inhibition zone diameters which vary between 11 and 37 mm for the lemon and between 12 and 25 mm for the orange and completely inactive against *P. aeruginosa* aromatogramme. In Micro-atmosphere, only *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *C.albicans*, *S. cerevisiae* and *A. Niger* which were sensitive to the inhibitory action of the oil vapor of lemon. About the essential oil of orange is completely inactive on all bacteria tested and only slightly inhibitory to *Bacillus subtilis* with a 12mm diameter and has a low antifungal activity.

Therapeutically, dermal ointments prepared based on the two essential oils have healing properties and the ointment prepared based essentially lemon oil have better healing activity.

Keywords: *Citrus limonum*, *Citrus sinensis*, essential oils, physico-chemical analysis, anti-oxidation activity, anti-microbial activity, healing Activity.

L'idée directrice de notre étude a consisté à extraire l'huile essentielle des feuilles de *Citrus limonum* (Citron jaune) et celle de *Citrus sinensis* (Orange douce) provenant de la région de Blida, à déterminer ses propriétés physico-chimique, à évaluer *in vitro* ses propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de différentes souches microbiennes, ainsi que ses activités anti-oxydante et cicatrisante.

L'extraction de notre échantillon (feuilles) par entraînement à la vapeur d'eau qui reste une méthode simple et efficace donne un rendement intéressant. L'étude quantitative a révélé que le rendement obtenue à partir de feuilles de *C. limonum* (0.31 %) est supérieur à celui de *C. sinensis* (0.22 %).

La détermination des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles (densité, l'indice d'acide, densité relative, indice de réfraction, indice de saponification et indice d'ester) a permis de mettre en évidence la qualité de ces huiles. La majorité de ces résultats sont conforme aux normes AFNOR.

Concernant l'activité anti-oxydante étudié par la méthode de réduction du radical libre DPPH et après comparaison des IC<sub>50</sub>, nous avons remarqué que l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle des feuilles de *C. limonum* (IC<sub>50</sub> = 395.94 µg/ml) est supérieur à celle de l'huile essentielles de *C. sinensis* (IC<sub>50</sub>= 493.98 µg/ml). D'autre part, ces valeurs sont largement inférieures à celle de l'acide ascorbique avec un IC<sub>50</sub> de 97.04µg/ml. L'étude de pouvoir anti-oxydant a confirmé la propriété anti-oxydante que possède les huiles essentielles de Citrus mais avec une efficacité anti-radicalaire beaucoup moins important que celle de l'acide ascorbique.

En outre, L' HE de *C. limonum* révèle une activité antimicrobienne significative par rapport à l'HE de *C. sinensis* à l'encontre de certaines souches microbiennes testées, à l'exception de *P. aeruginosa* qui a manifesté une résistance totale, et aussi pour les souches fongiques testées l'HE de *C. limonum* a montré un pouvoir antifongique très importante avec une inhibition peut aller jusqu'à 35 mm de diamètre.

Il a été constaté que ces activités varient en fonction de la souche microbienne testée et de la dilution de l'huile appliquée ainsi la méthode utilisée.



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

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

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

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

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses et cosmétiques. Elles peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaire, ou encore servir à la préparation de boissons hygiéniques (tisane). Pour ces diverses utilisations, il s'agit soit des mêmes parties de plantes, soit de parties différentes **(Küdjüed-bünneton, 1989)**.

L'Algérie de par son climat (méditerranée, aride) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation des plantes médicinales et aromatiques, est un domaine particulièrement intéressant à développer car c'est une source de produits à haute valeur ajoutée **(Felidj et al., 2010)**.

Les plantes aromatiques ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments **(Wang et al., 2010)**. La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire **(Rashid et al., 2010)**.

La production mondiale en huiles essentielles est en nette évolution. Elle atteint plus de 35000 tonnes ces dernières années.

Parmi l'ensemble des plantes médicinales qui se trouvent en Algérie, nous avons choisi deux plantes d'agrumes qui sont le citron et l'orange. La production mondiale en huiles essentielles du citron occupe une place non négligeable ; elle vient en 3<sup>ème</sup> rang après celles de l'orange et de la menthe japonaise avec 9200 tonnes. Les principaux producteurs sont l'Argentine, l'Italie et l'Espagne certains pays producteurs des huiles essentielles en Afrique, incluant le Maroc, la Tunisie, l'Egypte et l'Algérie avec la Côte d'Ivoire, l'Afrique du Sud, le Ghana, le Kenya, la Tanzanie et l'Ouganda, ont des productions mineures. **(Perfumer et Flavorist, 2009)**.

Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités anti-oxydante, antibactérienne et antifongique **(Dung et al., 2008)**.

Dans cette optique, nous nous sommes assignés, dans le présent travail, les objectifs suivants :

- Extraction des huiles essentielles des feuilles du citron (*Citrus limonum*) et d'orange (*Citrus sinensis*).

- Evaluation des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de citrus.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles in vitro vis-à-vis des souches microbiennes de référence (études comparative).
- Evaluation de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles en la comparant avec celle de l'acide ascorbique.
- Evaluation de l'activité cicatrisante sur des lapins.

Notre étude s'est étalée sur une période de 4 mois, de mars jusqu'à juin 2016. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- ✚ Laboratoire PFE du département de chimie industrielle (Université de Blida) pour l'extraction de l'HE à l'échelle de laboratoire.
- ✚ Laboratoire de microbiologie de l'unité Antibiotical SAIDAL (Médéa) pour l'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE *in vitro*.
- ✚ Laboratoire pharmacotoxicologie de l'unité Antibiotical SAIDAL pour l'effet cicatrisant.
- ✚ Laboratoire physico-chimique de la même unité pour la détermination des paramètres physico-chimiques de l'HE et pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante.
- ✚ Laboratoire d'hygiène de Blida pour l'étude de la sensibilité des souches bactérienne et fongique isolées cliniquement, vis-à-vis de l'HE d'agrumes.

## **II-1-Matériel :**

### **II.1.1. matériel non biologiques :**

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

### **II-1-2- Matériel biologique :**

#### **II-1-2-1- Matériel végétale :**

Les plantes choisies comme modèle d'étude sont : *Citrus limonum* Var. *Eureka* et *Citrus sinensis* Var. *Washington navel*. La partie végétale choisie pour réaliser cette étude est les feuilles à l'état frais, récoltées au niveau de la wilaya de Blida (Boufarik), au mois de Mars 2016.

#### **II-1-2-2- Matériel Animal:**

Les animaux de l'expérimentation sont des lapins (4 lapins) de race Néozélandaise, sexes (femelles) de poids moyen d'environ  $(3,420 \pm 0,11)$  Kg, provenant de l'animalerie du complexe antibiotique SAIDAL de MEDEA.

**II -1-2-3- Matériel microbiologique :**

Les bactéries, levures et moisissures utilisées sont représentées dans le tableau III.

**Tableau III :** Origine et références des souches testées.

	Les souches microbiennes	Origine	Gram	Provenance
<b>Les souches Bactériennes</b>	<i>Proteus vulgaris</i>	Eau	-	ECBU et les germes hospitalier (laboratoire d'hygiène Blida)
	<i>Citrobacter freundii</i>	Eau	-	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ECBU	-	
	<i>Serratia spp.</i>	Eau	-	
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	+	laboratoire d'hygiène (Blida).
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC	+	
	<i>Staphylococcus aureus(S1)</i>	ATCC 25923	+	laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire (Frantz Fanon)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	
	<i>Escherichia coli (E1)</i>	ATCC 25922	-	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	+	
	<i>Escherichia coli (E2)</i>	ATCC 10536	-	Saidal (Médéa)
	<i>Staphylococcus aureus (S2)</i>	ATCC 6538	+	
<b>Levures et moisissures</b>	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231		Saidal (Médéa)
	<i>Candida albicans</i>	ATCC2091		laboratoire d'hygiène (Blida).
	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	Miel		
	<i>Aspergillus Niger</i>			

ATCC : American Type Culture Collection ; ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines.

## II-2-Méthodes :

### II-2-1- Extraction de l'huile essentielle par entrainement à la vapeur à l'échelle du laboratoire :

#### Présentation du dispositif :

Le dispositif d'extraction de l'HE de citron et orange par entrainement à la vapeur d'eau est illustré dans la (Figure n°6). Nous avons introduit une quantité de 300 g de matière végétale (feuilles) dans un ballon, alimenté par un courant de vapeur qui entraine les constituants volatiles dans un tube principal, pour ensuite se condenser. Nous récupérons les constituants volatils dans une ampoule à décanter sous forme liquide.



**Figure n°6 :** Dispositif d'extraction des HEs par entrainement à la vapeur d'eau (Originale, 2016).

### II-3- Calcul du rendement en huile essentielle :

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

$$R = \frac{m_{HE}}{m_v} \times 100$$

**R** : rendement en huile essentielle en %.

**m<sub>HE</sub>** : la masse de l'huile essentielle récupérée en gramme.

**m<sub>v</sub>** : la masse de la matière végétale fraîche en gramme.

## II-4- Etude analytique de l'huile essentielle :

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

### II-4-1- Les propriétés physico-chimiques :

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

#### II-4-1-1- Détermination de l'indice d'acide (IA) :

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

##### ❖ Mode opératoire :

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

Il est calculé par la formule suivant :

$$I_A = \frac{V \times 5,61}{M}$$

**I<sub>A</sub>** : Indice d'acide.

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

**M** : La masse en gramme de la prise d'essai.

**II-4-1-2- Indice de réfraction (IR) : (ISO 280 :1999 (75-112))**

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

**❖ Mode opératoire et calcul :**

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

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

**II-4-1-3- Détermination de la densité relative à 20°C ( $d^{20}$ ) :**

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

**❖ Mode opératoire et calcul :**

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

$$d^{20} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} + (0.00073 \times (T^{\circ}_{Ech} - 20))$$

$m_0$  : La masse en gramme de la fiole vide.

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

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

$T^{\circ}_{Ech}$  : température en °C.



**II-4-1-4- Indice de saponification  $I_S$  (pharmacopée européenne, 2001) :**

**Principe :** C'est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance.

**❖ Mode opératoire et calcul :**

- Dans une fiole conique de 250 ml et muni d'un réfrigérant à reflux, introduire la prise d'essai. Ajouté 25 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0.5 M quelques billes de verre. Adapter le réfrigérant et chauffer à reflux pendant 30 min.
- Ajouter à la solution chaude, 0.5 ml à 1 ml de la solution phénolphtaléine et titrer immédiatement avec l'acide chlorhydrique (HCl) 0.5 M jusqu'à disparition de la couleur rose de l'indicateur, le volume de HCl ajouté est noté ( $n_1$ ).
- Effectuer un essai à blanc en suivant le même mode opératoire ( $n_2$  ml d'acide chlorhydrique 0.5 M).

L'indice de saponification  $I_S$  est donné par la formule suivante :

$$I_S = 28.05 \times \frac{(n_2 - n_1)}{m}$$

**$I_S$**  : indice de saponification.

**$n_1$**  : Volume en ml d'acide chlorhydrique 0.5M utilisé pour l'essai à blanc.

**$n_2$**  : Volume en ml d'acide chlorhydrique 0.5M utilisé pour la détermination de l'indice.

**$m$**  : la masse en gramme de la prise d'essai.

**II-4-1-5- Indice d'ester (Pharmacopée européenne, 2001) :**

L'indice d'ester (IE) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1 g d'huile essentielle.

Il est calculé à partir d''indice de saponification  $I_S$  et l'indice d'acide  $I_A$ .

$$I_E = I_S - I_A$$

## II-4-2- Activité antioxydant des huiles essentielles extraites :

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

### ▪ Piégeage du radical libre DPPH :

**Principe:** Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (**Gachkar et al., 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH, pour une concentration en extrait donné et un temps donné. Le test de réduction du DPPH permet aussi de calculer la CE<sub>50</sub> (**Dongmo et al., 2010**). La valeur CE<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH. (**Simionatto et al., 2007**).

### ❖ Mode opératoire :

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

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

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque huile essentielle (de 80 à 849 µg/ml dans le méthanol) ont été mélangés avec 1.95 ml de la solution méthanolique de DPPH dans des tubes à essai secs. Après 30 min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm. Le contrôle négatif est composé de 50 µl du méthanol et de 1.95 ml de la solution de DPPH (Solution de contrôle).

Une expérience de contrôle a été effectuée en utilisant l'acide ascorbique dont les concentrations varient entre 20 et 200 µg/ml.

**❖ Expression des résultats:****✓ Calcul des pourcentages d'inhibitions :**

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

$$PI \% = [(A C - A E) / A C] \times 100$$

- Avec : A C : absorbance du contrôle négatif.

A E : absorbance de l'extrait.

**✓ Calcul des concentrations 50 " IC50" :**

IC50 (aussi appelée EC50 pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle, nous permet de calculer le paramètre CE<sub>50</sub>. La CE<sub>50</sub> « Concentration Efficace » est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (ou de la vitamine C) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Plus la valeur de CE<sub>50</sub> est basse, plus l'activité anti-radicalaire est élevée, et vice versa (**Gramza et al., 2005**).

**II-5- Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :**

La recherche de l'activité antimicrobienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des micro-organismes soumis à l'HE de citron et orange. Dans ce test, deux méthodes ont été effectuées : Aromatogramme (Technique en milieu solide) et Micro-atmosphère (méthode en phase vapeur).

**II-5-1- Technique en milieu solide : Méthode de l'Aromatogrammes :**

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle. La méthode de diffusion des disques appliquée est celle décrite par **Mayachiew & Devahastin (2008); Hussain et al. (2010)**. (Figure n°7).

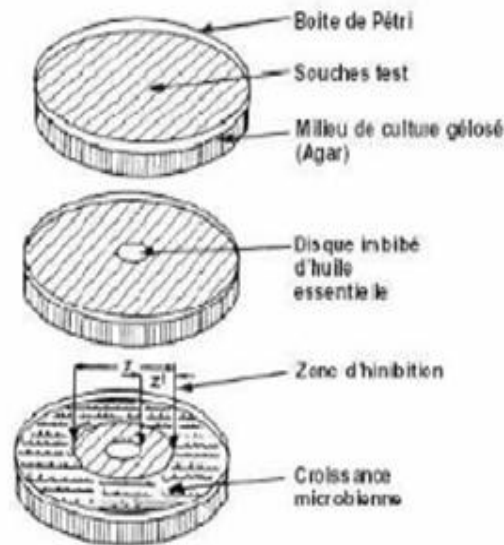


Figure n°7: Illustration de la méthode Aromatogrammes. (Zaika, 1988)

### ➤ Préparation des suspensions bactériennes :

Les bactéries à tester sontensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boîtes, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl) (Mohammedi, 2006). L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

### ➤ Ensemencement :

- Les milieux des cultures utilisée sont : Muller-Hinton (MH) et Soja agar (SA) pour les bactéries, et Sabouraud (SAB) pour les levures et champignons.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération quatre fois, en tournant la boîte de Pétri de 45° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

➤ **Dépôt des disques :**

- A l'aide d'une pince stérile, nous avons prélevé à chaque fois un disque stérile. Ce dernier est imbibé avec l'HE en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'HE. Celle-ci est absorbée progressivement jusqu'à imprégnation totale de tout le disque.
- Nous avons déposé les disques sur la surface du milieu de culture.
- Les boîtes sont laissées diffuser pendant 1h30.
- Les boîtes sont ensuite mises à incuber à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les champignons.

➤ **Expression des résultats**

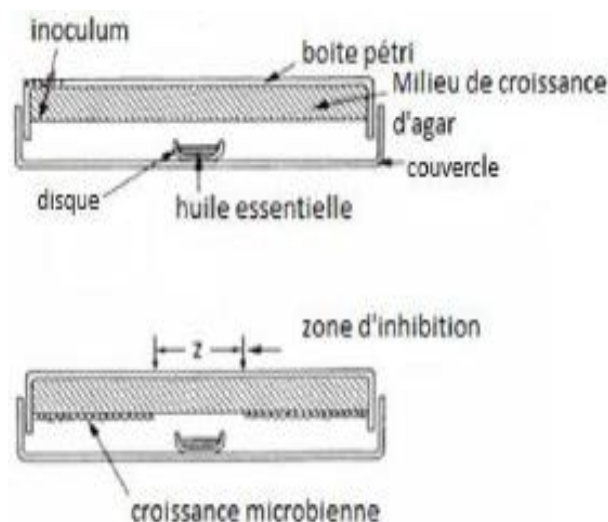
Après 24h pour les bactéries et 48h pour les levures, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 9 mm). Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm (**Baser & Buchbauer, 2010**).

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

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

### II-5-2- Micro atmosphère : méthode en phase vapeur :

Cette technique permet d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase volatile de l'HE. Le mode opératoire consiste à ensemencer un milieu gélosé avec une souche microbienne. Un disque imprégné avec une goutte d'HE sera déposé au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles (Figure n°8). En se volatilisant, l'HE va inhiber la croissance du germe en créant une zone d'inhibition. La seule différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside dans la position du disque (**Tyagi et Malik, 2001**). La préparation de suspension bactérienne, l'ensemencement, l'incubation et l'expression des résultats ont été faites de la même manière que la première méthode (Arommatogramme).



**Figure n°8** : Illustration de la méthode de micro-atmosphères. (**Zaika, 1988**)

### ✚ Méthode de dilution :

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité antimicrobienne de l'HE après une série de dilution, en mettant cette dernière en présence des germes.

#### ➤ Préparation des dilutions (**Pharmacopée Européenne, 2004**)

On introduit aseptiquement 0.5 ml de l'HE à l'aide d'une pipette graduée stérile dans un tube stérile contenant 0.5 ml du diluant (Myristate d'isopropyle). Cette suspension constitue la dilution mère (Dm) qui correspond donc à la dilution 1/ 2 ou 50%. La Dm est mis dans une étuve à 37°C pendant 20 min avec agitation du tube de temps en temps pour homogénéiser les deux phases du milieu.

- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 0.5 ml de la Dm dans un tube à vis stérile contenant 0.5 du même diluant au préalable. Cette dilution est alors au 1/4 ou 25%.
- Suivre la même méthode jusqu'à l'obtention d'une dilution de 1/16 ou 6,25%.

### Etude de l'effet antimicrobien de l'HE dilué par la méthode de diffusion sur milieu solide

La préparation, l'ensemencement et l'incubation ont été réalisés de la même manière que l'aromatogramme.

## II-6- Etude de l'activité cicatrisante :

### ➤ But :

Le but de notre travail est de tester l'effet cicatrisant de l'HE de citronnier et l'oranger en les comparant avec un médicament « Madécassol<sup>®</sup> ».

### ➤ Principe :

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

### ➤ Mode opératoire :

Nous avons utilisé 4 lapins, femelles, dont l'âge moyen est de 1 an.

Ils sont répartis en 4 lots : un lapin par lots.

**Tableau IV:** La distribution des lapins et les produits testés.

Les lots	Lots N°1	Lots N°2	Lots N°3	Lots N°4
Nombre d'animaux	1 lapin	1 lapin	1 lapin	1 lapin
Le produit testé	Pommade à base de l'HE d'orange	Pommade à base de l'HE de citron	Madécassol <sup>®</sup>	L'eau physiologique (témoin)
Préparation du produit	Mélange 1g de l'HE d'orange avec 40g de vaseline	Mélange 1g de l'HE de citron avec 40g de vaseline	Tube 10 g (utilisé 1g)	Flacons de 5 ml (utilisé 1 ml)



Figure n°9: Les pommades testées sur les lapins.



Figure n°10 : Les deux témoins testés sur les lapins.

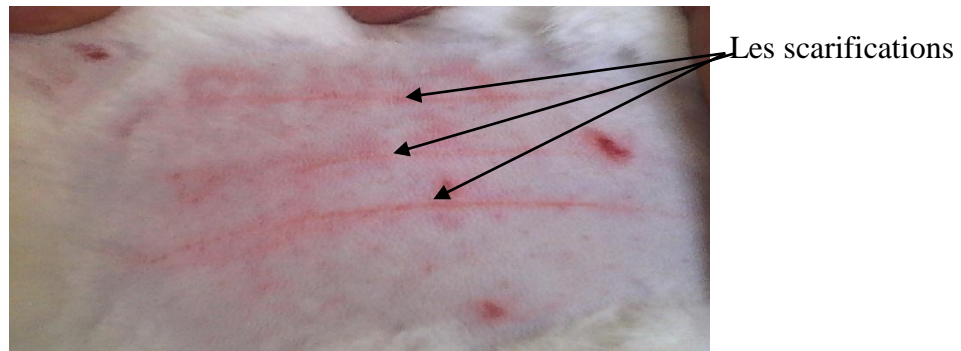
### ➤ Préparation de l'animale :

Pour provoquer des plaies superficielles sur le lapin, nous avons fait des scarifications

L'opération est réalisée selon les étapes suivantes :

- Epilation des lapins par une tondeuse électrique pour dégager une surface d'environ 5×5cm.
- Désinfecté les régions tondues avec l'alcool chirurgical.
- Après la préparation des lapins, on a effectué pour chaque lapin à l'aide d'une lame de scalpel, une série de 3 plaies parallèles (des scarifications peu profondes) (Figure n°11).





**Figure n°11:** Les scarifications réalisées (Originale, 2016).

➤ **Application des traitements :**

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

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

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

### III-1- Analyses physicochimiques des deux HEs :

#### III-1-1- Détermination du rendement d'extraction :

L'entraînement à la vapeur d'eau est réalisé sur les feuilles d'agrumes de deux espèces de *Citrus* : *C. limonum* et *C. sinensis* avec le rapport eau/matière végétale. Le tableau V résume les rendements moyens en HE extraite.

**Tableau V** : Rendement en huile essentielle de *Citrus*.

	HEs de <i>C. limonum</i>	HEs de <i>C. sinensi</i>
<b>Rendement (%)</b>	0.31	0.22

Les résultats représentés dans le tableau V montre que le rendement moyen en HE de *C. sinensis* obtenus (0.22%) est plus faible que chez *C. limonum* (0.31%) (Le détail de calcule des rendements est mentionné dans l'annexe 2).

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'HEs. Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités par **Anton et Silano, (2001)** qui ont obtenu des rendements compris entre 0.2 et 0.6% pour *C. limonum* et se rapprochent des résultats de **Madjene et Madani, (2010)** qui notent un rendement de 0.4% par hydrodistillation. En effet **Jeannot et al., (2005)** et **Fuselli et al., (2008)** ont observé des rendement allant de 0.6 à 0.8 % pour l'HE de *C. sinensis* et 0.7 à 0.9% pour l'HE de *C. limonum*. **Rega et al., (2003)** ont rapporté que les rendements en HEs chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et ont signalé des rendements de 1 à 3 %. Cette différence pourrait être expliquée selon **Kelen & Tepe (2008)** par le choix du la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'HE, le climat, la zone géographique, la génétique de la plante l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la méthode d'extraction employé, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en HEs (**Vekiari et al., 2002**).

### III-1-2- Caractères organoleptiques :

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

Les résultats des caractéristiques organoleptiques obtenus de nos HEs sont conformes aux normes d'AFNOR (2000). (Figure n° 12) :



**Figure n°12 :** Huile essentielle de citron et orange (Originale, 2016).

### III-1-3- Les indice physico-chimiques :

Le tableau VI regroupe les résultats des mesures réalisées.

**Tableau VI :** Les indices physico-chimiques des deux HEs.

	HEs de <i>C. limonum</i>	HEs de <i>C. sinensi</i>	Norme AFNOR
<b>l'indice d'acide (IA)</b>	1.20	0.71	≤ 2
<b>Indice de réfraction (IR)</b>	1.475	1.471	1.470-1.478
<b>densité relative à 20°C (<math>d^{20}</math>)</b>	0.849	0.842	≤ 0.876
<b>Indice de saponification <math>I_S</math></b>	24.8	14.01	-
<b>Indice d'ester</b>	23	13.3	-

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

Un indice d'acide inférieur à deux (2), est une preuve de bonne conservation de l'huile. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acide libre. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradation telle l'hydrolyse des esters (Kaloustian et al., 2013). Nous avons obtenus dans notre étude un indice d'acide inférieur à deux pour les deux huiles essentielles étudiées.

L'indice d'acide permet de donner une appréciation sur le taux d'acides libres (Salle, 1991).

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

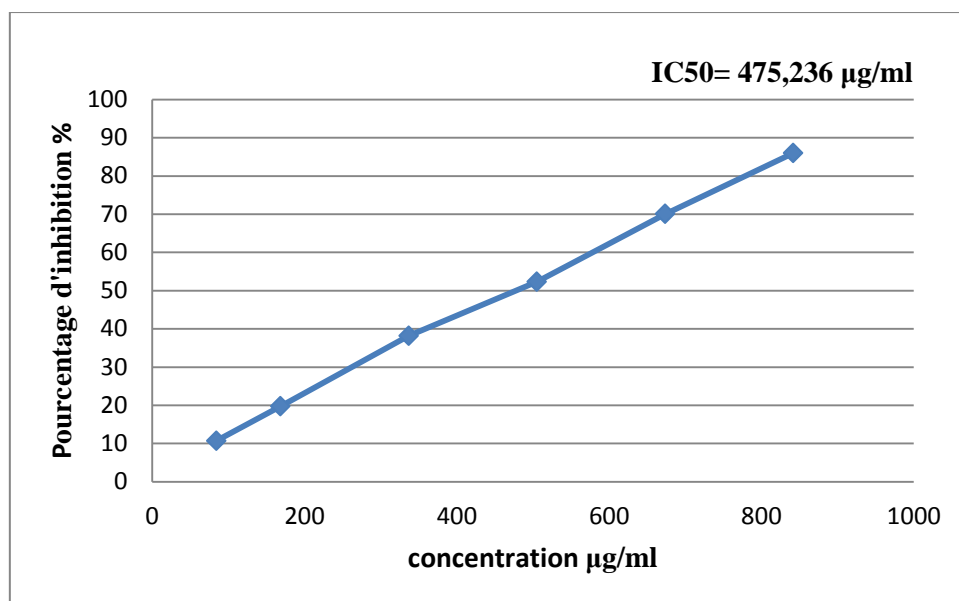
La détermination de la densité relative peut être considérée comme un critère de pureté qui indique la présence de corps étrangers (**Kaloustian et al., 2013**), la densité des huiles essentielles est inférieure à celle de l'eau et selon l'Association Française de Normalisation, les HES appartenant aux espèces *Citrus* doivent avoir une densité maximale de 0.876 (**AFNOR NF T.75-202**), ce qui le cas pour les huiles essentielles de *C. limonum* et *C. sinensis* (0.849, 0.842 respectivement).

D'autre part et pour mieux caractériser la qualité des huiles essentielles nous avons mesuré l'indice d'ester qui est égale à 23 pour HE de *C. limonum* et 13.3 pour celle de *C. sinensis*. Les huiles essentielles de très bonne qualité renferment une très grande quantité d'esters (**Othmer, 2012**). L'indice d'ester renseigne sur la quantité des acides gras liés (**Gouguam et Baiteche, 1989**).

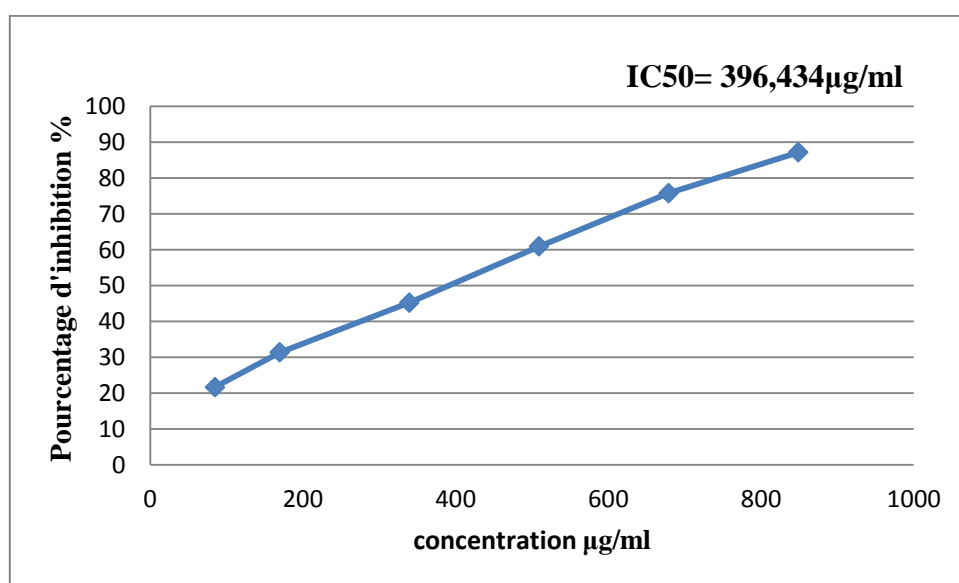
La majorité des paramètres physico-chimiques de notre huile essentielle sont en accord avec l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

### III-2- L'activité antioxydant :

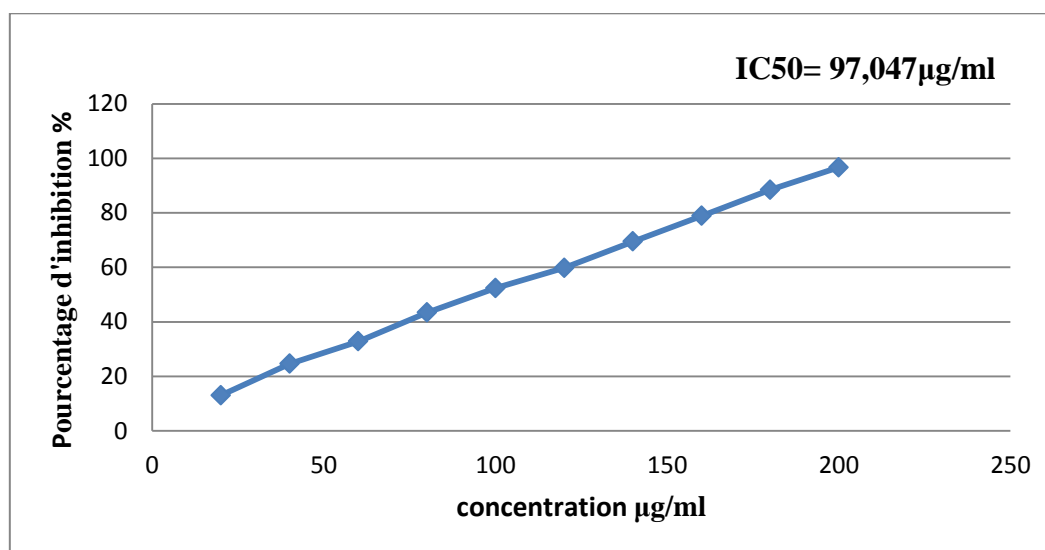
L'évaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielle de *C. sinensis* et *C. limonum* été faite en comparaison avec celle de l'acide ascorbique. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes, à partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC50. Les résultats sont représentés dans les tableaux (Annexe 3) et les figures n°(13, 14, 15) :



**Figure n°13:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'huile essentielle de *C. sinensis*.



**Figure n°14:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'huile essentielle de *C. limonum*.



**Figure n°15:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique.

### Pourcentage d'inhibition

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure n°13,14 et 15) révèlent que les deux huiles essentielles testées ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence, sont des anti-radicalaires.

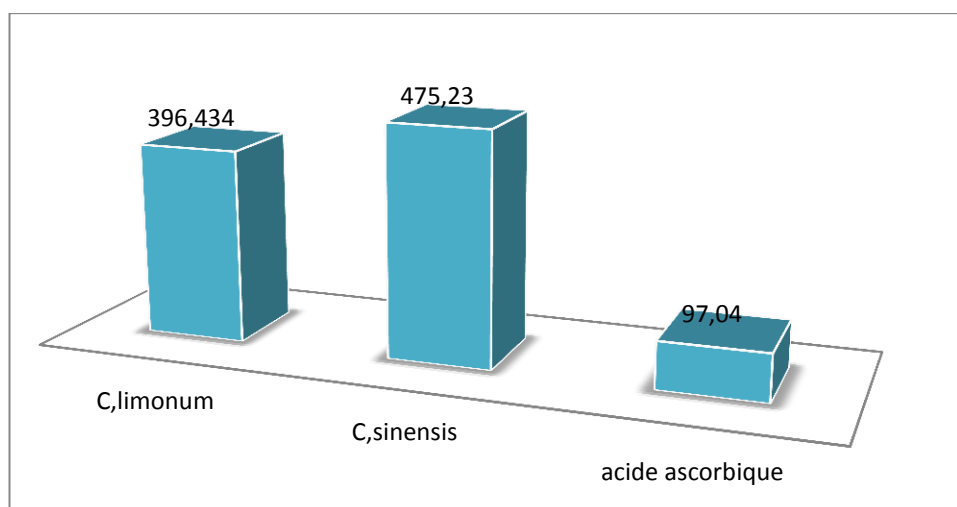
Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le standard ou pour les deux HEs *C. limonum* et *C. sinensis*.

Le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé a été observé pour l'huile essentielle de *C. limonum* suivi par celle de *C. sinensis*. Nous remarquons aussi que le pourcentage d'inhibition du radical libre, soit pour l'huile essentielle de *C. limonum* ou de *C. sinensis*, est inférieur à celui de l'acide ascorbique.

### Détermination des IC50

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

L'huile essentielle de *C. limonum* et *C. sinensis* pouvaient transformer le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (coloré en violet) au diphenylpicrylhydrazine (coloré en jaune) avec des IC<sub>50</sub> de (396,43 µg/ml, 475,236 µg/ml respectivement) montrant ainsi une activité anti-oxydante largement inférieure à celle de l'acide ascorbique avec un IC<sub>50</sub> de 97,04 µg/ml (Figure n°16). Il semble d'après ces résultats que l'acide ascorbique est l'antioxydant le plus efficace par rapport à l'huile essentielle étudiée.



**Figure n°16:** Comparaison de la valeur IC<sub>50</sub> de HE de *C. limonum*, *C. sinensis* et l'acide ascorbique.

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles ou l'application par vaporisation en surface des aliments, contribue à les préserver des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007). Parmi ces huiles, les huiles essentielles des *Citrus*. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes dont le *d*-limonène est le constituant majeur, jouant un rôle principal dans l'activité anti-oxydante (Girenavar *et al.*, 2007; Ao *et al.*, 2008 ; Buchbauer, 2010).

D'après Hellal (2011) ; l'HE de *Citrus limonum* a réduit de manière significative l'oxydation des lipides de la sardine, qu'elle constituerait une solution alternative aux conservateurs synthétiques dans le domaine agro-alimentaire.



L'activité anti-oxydante de l'HEs testées est probablement liée aux composants majoritaires qui sont principalement les monoterpènes notamment le D- limonène, le  $\beta$ -pinène et le  $\gamma$ -terpinène (**Misharina et Samusenko, 2008**). Selon **Tang et al., (2001)**, le  $\beta$ -pinène et le limonène présentent des propriétés anti-oxydantes importantes ; ils ont minimisé le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyle.

**Moufida & Marzouk, (2003)** ont confirmé que ces HEs sont constituées majoritairement de limonène.

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de cette activité anti-oxydante, mais il peut avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libre (**Svoboda et Hampson., 1999**).

### III-3-Résultats du contrôle microbiologique :

#### III-3-1- Aromatogramme

Les observations effectuées sur l'effet des HEs de *Citrus* sur la croissance des souches bactérienne testées sont représentées dans le tableau VII et les Figures n° (17, 18, 19, 20 et 21) :

**Tableau VII** : Diamètres des zones d'inhibition montrant l'activité antimicrobienne des deux HEs par la méthode diffusion sur gélose.

Souche bactériennes	HE de <i>citrus Limonum</i>		HE de <i>citrus Sinensis</i>		
	Diamètre d'inhibition (mm)	Classement de l'HE	Diamètre d'inhibition (mm)	Classement de l'HE	
Gram <sup>-</sup>	<i>Proteus vulgaris</i>	11	±	9	-
	<i>C. freundii</i>	12	±	12	±
	<i>K. pneumoniae</i>	12	±	12	±
	<i>Serratia spp.</i>	22	++	13	±
	<i>P. aeruginosa</i>	9	-	9	-
	<i>E. coli (E1)</i>	15	±	14	±
	<i>E. coli (E2)</i>	15	±	13	±
Gram <sup>+</sup>	<i>B. subtilis</i>	37	+++	25	++
	<i>M. luteus</i>	27	++	12	±
	<i>E. faecalis</i>	18	+	15	±
	<i>S. aureus (S1)</i>	21	++	13	±
	<i>S. aureus(S2)</i>	21	++	14	±
Levure / moisissure	<i>C. albicans (C1)</i>	30	+++	17	+
	<i>C. albicans (C2)</i>	31		19	+
	<i>S. cerevisiae</i>	35	+++	19	+
	<i>A. Niger</i>	18	+	17	+

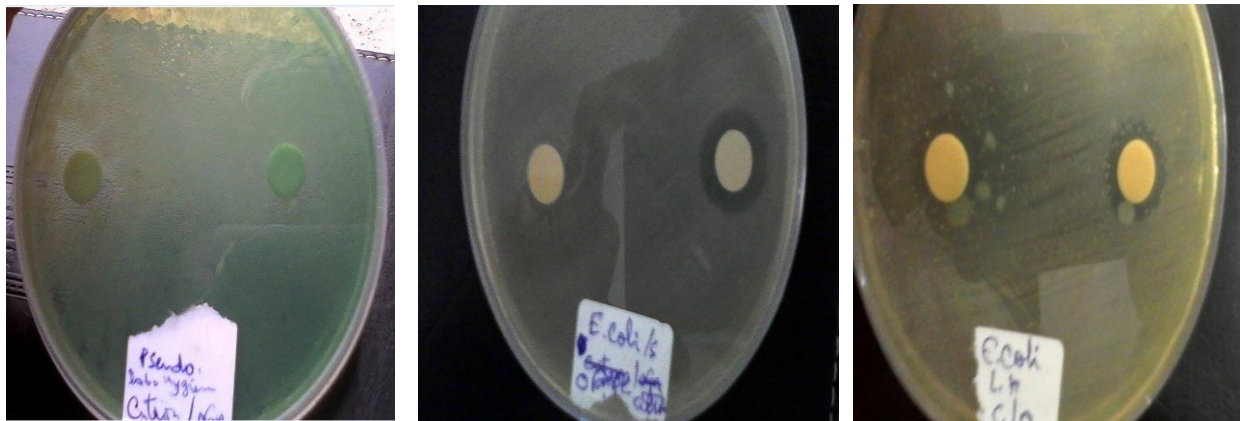
Le diamètre du disque (9mm) est inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures.

Il est noté que les *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (S1) ont le même degré de sensibilité que les *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (S2) vis-à-vis des 02 HE.

L'*E.coli* ATCC 25922 (E1) ont le même degré de sensibilité que l'*E.coli* ATCC 10536 (E2) vis-à-vis des 02 HE.



**Figure n°17:** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* par la Méthode d'aromatogramme (Originale, 2016).



**Figure n°18 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (E1), *Escherichia coli* (E2) par la Méthode d'aromatogramme (Originale, 2016).

Les HEs présentent, *in vitro* une activité inhibitrice sur la croissance de certains germes microbiens, la sensibilité des bactéries aux HE est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) (Tableau VII)

Les résultats obtenus, montrent que la variation de l'activité antimicrobienne des HE testés est en fonction de la souche cible. Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *P. Aeruginosa*. Cette bactérie possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des HEs de *Citrus*. En revanche les souches *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* ont manifesté une résistance relative vis-à-vis de *C. limonum* malgré les faibles zones d'inhibitions observées (12, 12, 11) mm respectivement (Figure n°17).

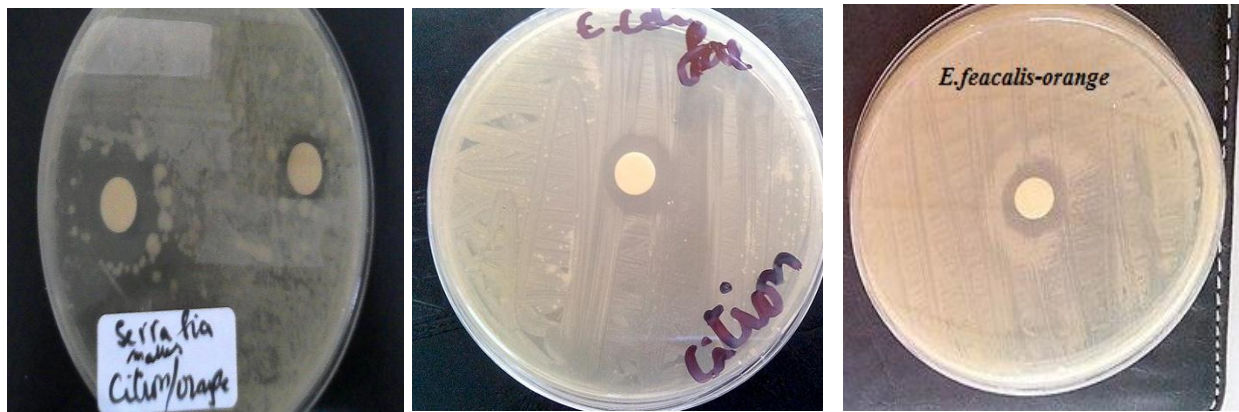
On ce qui concerne l'HE d'orange est légèrement inhibitrice possède presque la même activité que celle d'HE du citron à l'encontre du *Citrobacter freundii* (12mm) et *Klebsiella pneumoniae* (12mm) en revanche elle est totalement inactive vis-à-vis de *Proteus vulgaris*.

Le Gram négatif de ces bactéries peut expliquer cette résistance. Les bactéries Gram négatif sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huile ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis de l'huile. La membrane externe des lipopolysaccharides des bactéries Gram négatif constitue une barrière à la perméabilité des substances hydrophobes, qui en entrant, empêchent la croissance des bactéries (**Chao et al., 2000**).

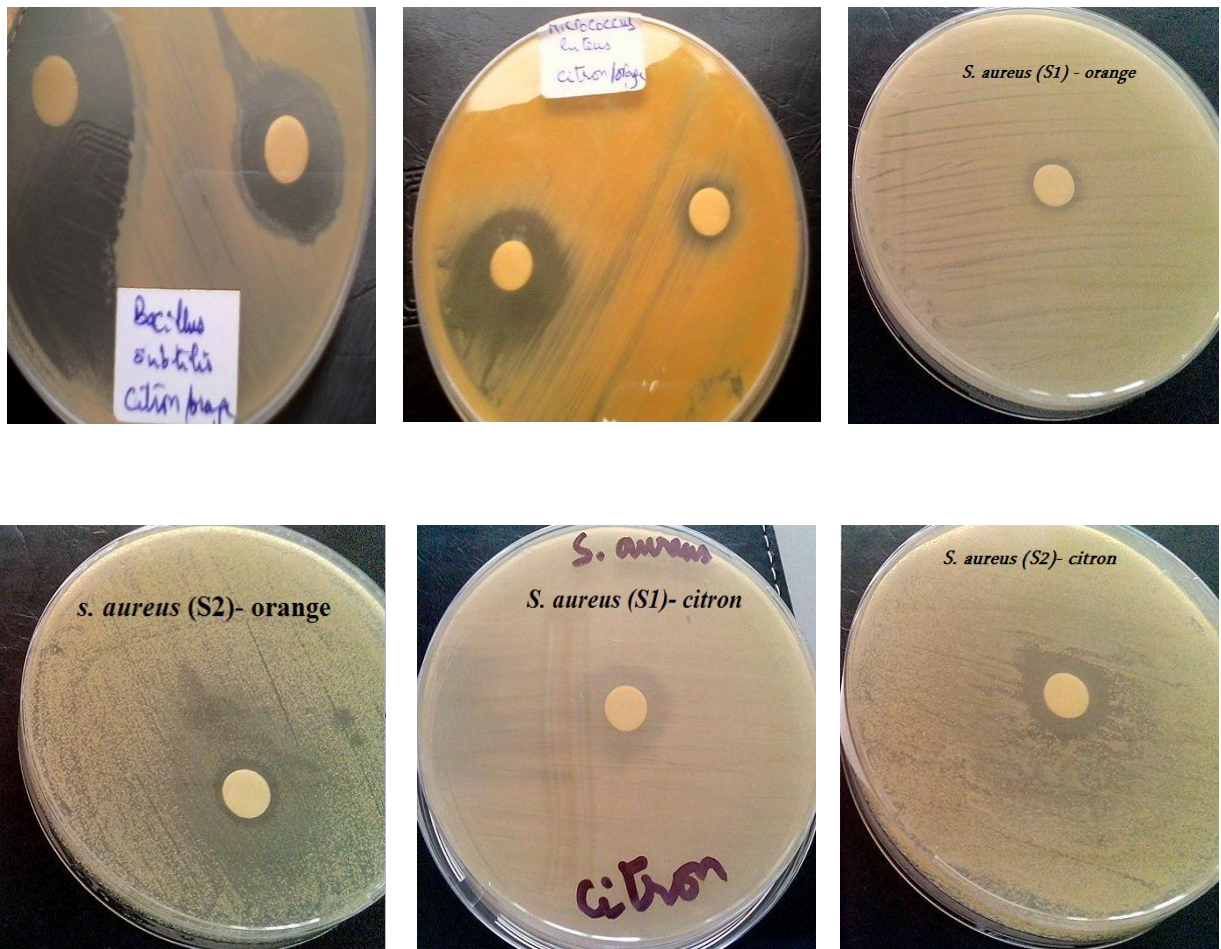
La haute résistance constatée de *P. aeruginosa* peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un éventail composé organiques (**Ferhat et al., 2010**).

**Hinou et al., (1989)** ont prouvé que *P. aeruginosa* est la bactérie la plus résistante à 32 huiles essentielles différentes.

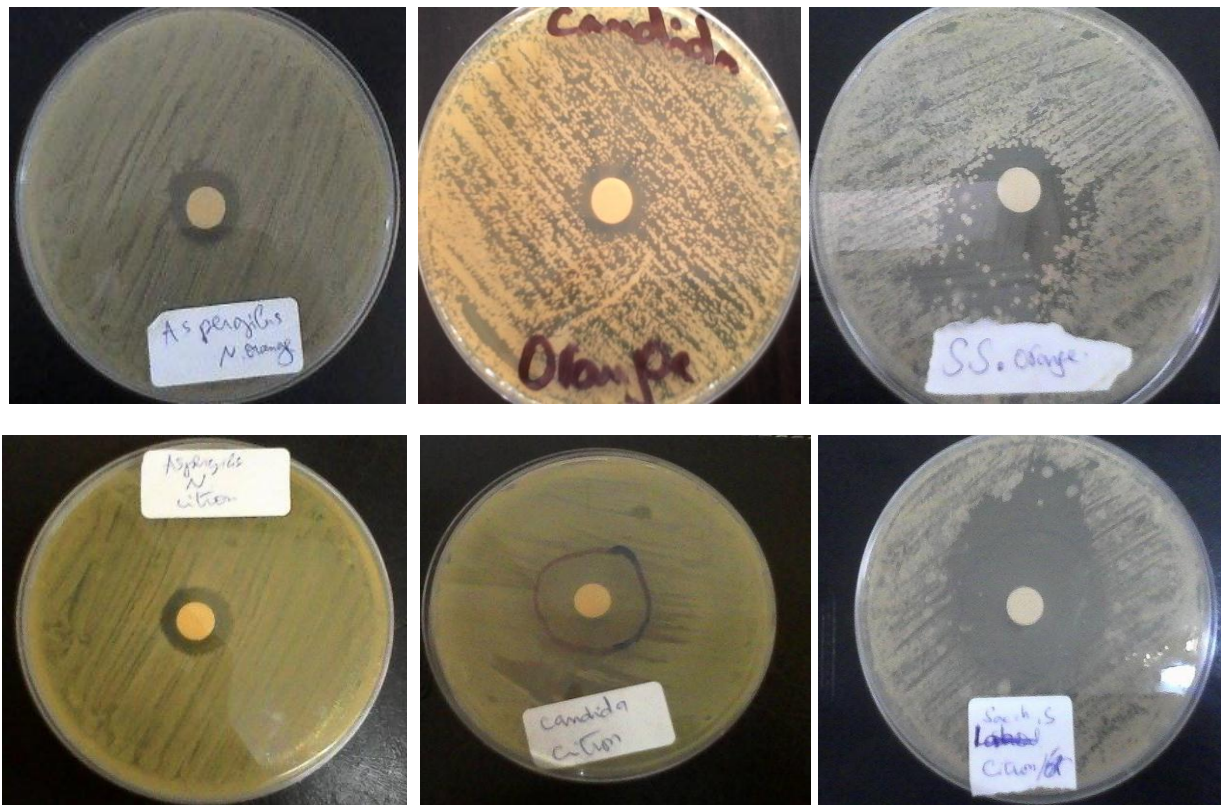
L'HE de *C. limonum* et *C. sinensis* s'est révélé légèrement inhibitrice pour la bactérie d'*E. Coli* avec des zones d'inhibition (15 mm, 13 mm respectives). Plusieurs auteurs ont démontré que les bactéries à Gram (-) peuvent être sensibles à l'action des HEs. **Moreira et al, (2005)**, ont montré que l'HE de *C. limonum* était efficace contre 3 souches d'*E. Coli*.



**Figure n°19 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Serratia spp*, *Enterococcus faecalis* par la Méthode d'aromatogramme (Originale, 2016).



**Figure n°20 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (S1), *Staphylococcus aureus* (S2), par la Méthode d'aromatogramme (Originale, 2016).



**Figure n°21 :** Photos montrant l'effet de HE de *Citrus limonum* et l'effet de HE de *Citrus sinensis* sur : *Aspergillus Niger*, *Candida albicans* (C2), *Saccharomyces cerevisiae*. par la Méthode d'aromatogramme (Originale, 2016).

Il est noté que l'HE de *C. sinensis* est légèrement inhibitrice à l'encontre du *Serratia spp*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis* par contre l'HE de *C. limonum* inhibe très fortement les *Bacillus subtilis* (37mm) et fortement active contre *Serratia spp* (22mm), et *Micrococcus luteus* (27 mm) (Figure n°19).

Un fait saillant pourrait être dégagé de ces résultats et qui concernent *S.aureus*. En effet, cette bactérie a manifesté une certaine sensibilité variable à ces HEs. L'HE de *C. sinensis* a montré l'activité la plus faible par rapport aux HE de *C. limonum* avec un diamètre d'inhibition moyen de 13 mm. De Billerbeck (2007) a rapporté que *S. aureus* a présenté une sensibilité variable envers les HEs de quelques espèce de *Citrus* testées.

Concernant l'activité inhibitrice des HEs sur les souches fongique utilisées (levures), il apparait clairement que l'HE de *C. Limonum* présente un très fort pouvoir anti-fongique contre *Candida albicans* et *Saccharomyces cervisia* avec des diamètres d'inhibition (31, 37mm respectives), et modérément inhibitrice contre *Aspergillus Niger* (18mm). Par contre l'HE de *C. sinensis* est modérément inhibitrice contre *Candida albicans* et *Saccharomyces cervisia* et *Aspergillus Niger* avec des zones d'inhibition (19, 19, 17 mm respectivement). Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules bactériennes et fongiques (**Cristiani et al., 2007**). Les constituants majeurs de l'huile essentielle du citron  $\beta$ - pinene et le D-limonene, peuvent inhiber l'activité respiratoire dans les cellules intactes de levures et dans les mitochondrie isolées (**Uribe et al., 1985**).

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

**Zaika, (1988) et Hussein, (1990)**, ont indiqué que les bactéries Gram<sup>+</sup> sont plus résistantes aux HEs que les bactéries Gram<sup>-</sup> ce qui est le contraire des résultats trouvés par **Farbood et al, (1976)**, **Jay (1996)**, **Marino et al, (1999)**, qui ont montré que les bactéries Gram<sup>+</sup> sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram<sup>-</sup>. Cependant, **Elgayyar et al, (2001)** et **Delaquis et al, (2002)** donnent un autre avis et notent qu'il est très difficile de faire de telles généralisation, parce que chaque HE est unique dans sa composition et chaque bactérie diffère considérablement en structure et en fonctionnalité.

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limonum* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalool (**Alma et al., 2004; Tepe et al., 2006**). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (**Deba et al., 2008**). **Veldhuizen et al., (2006)** ont attribué cette activité aux composés phénoliques dont l'amphipathicité de ces composés peut expliquer leurs interactions avec les constituants membranaires et ainsi l'activité antimicrobienne.

**III-3-2- L'activité antimicrobienne des deux HEs après dilution :**

Nous apportons dans le tableau VIII le diamètre d'inhibition des germes vis-a-vis de l'HE par dilution dans le mérystate d'isopropyle.

Concernant l'évaluation de l'activité antibactérienne après dilution, cette technique a été faite uniquement sur quelques souches qui ont présenté une grande sensibilité vis-a-vis de l'action antibactérienne de l'HE.

**Tableau VIII :** Diamètre d'inhibition (mm) des germes vis-a-vis de deux HEs après dilution.

Les souches	Dilution (%) HE <i>C. Limonum</i>				Dilution (%) HE <i>C. Sinensis</i>			
	50	25	12.5	6.25	50	25	12.5	6.25
<i>B. subtilis</i>	12	10	9	9	-	-	-	-
<i>S. aureus (S1)</i>	13	12	11	9	10	9	9	9
<i>S. aureus(S2)</i>	12	12	9	9	11	9	9	9
<i>E. faecalis</i>	12	10	9	9	-	-	-	-
<i>Serratia spp.</i>	14	12	11	9	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	15	10	9	9	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	17	12	10	9	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	17	13	11	9	-	-	-	-

Le diamètre du disque (9mm) est inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures.

Les résultats obtenus révèlent que la majorité des bactéries sont sensibles pour les doses 50% et 25% de l'HE de *C. limonum* avec des diamètres qui varient entre 17 mm et 10 mm. Pour la dose 6.25% l'HE de *C. Limonum* ne possède aucun effet inhibiteur pour toutes les bactéries testées. Concernant l'HE de *C. Sinensis* possède un effet contre les *S. aureus* pour la dose 50% et aucun effet pour les dose 25%, 12.5% et 6.25%.

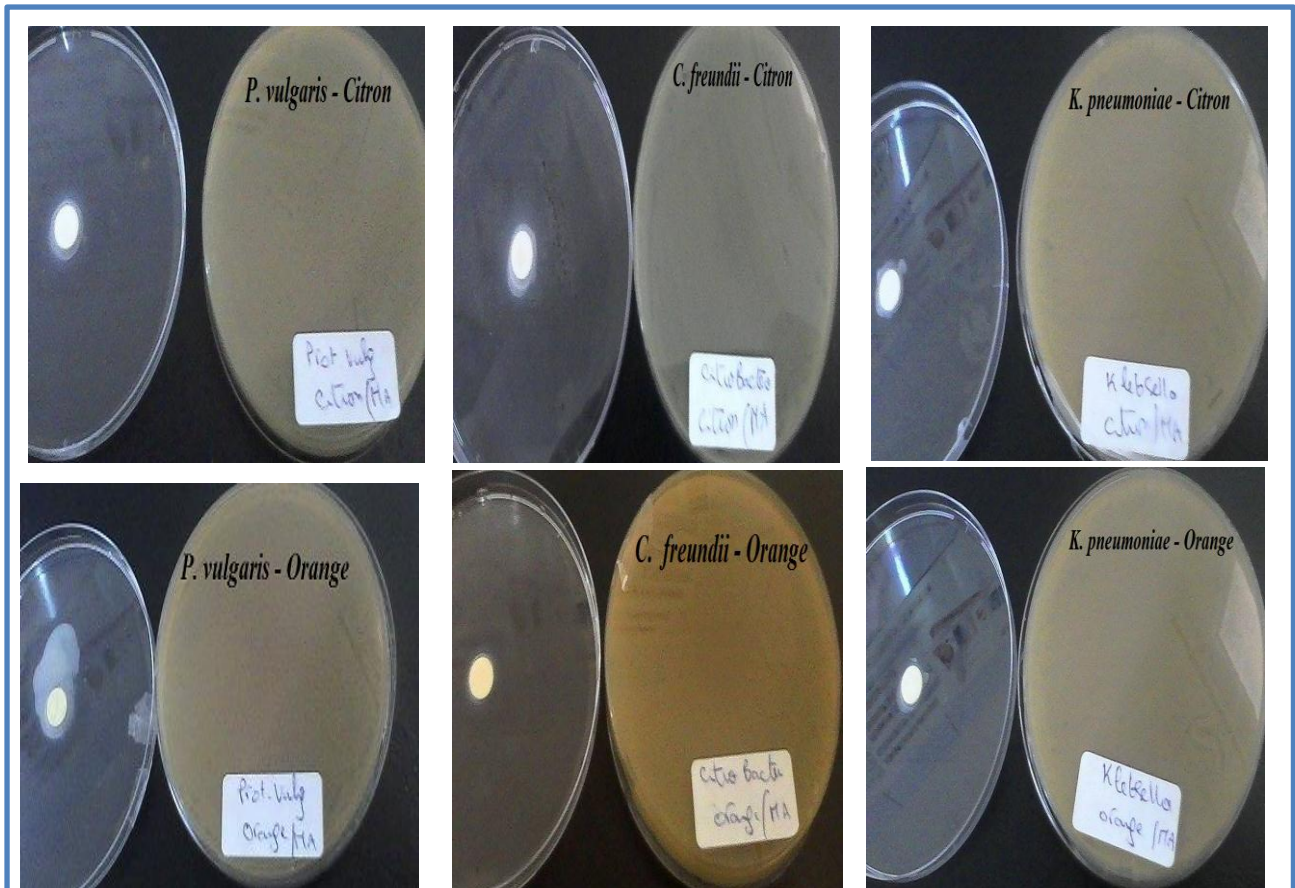


### III-3-3- Résultats de micro-atmosphère :

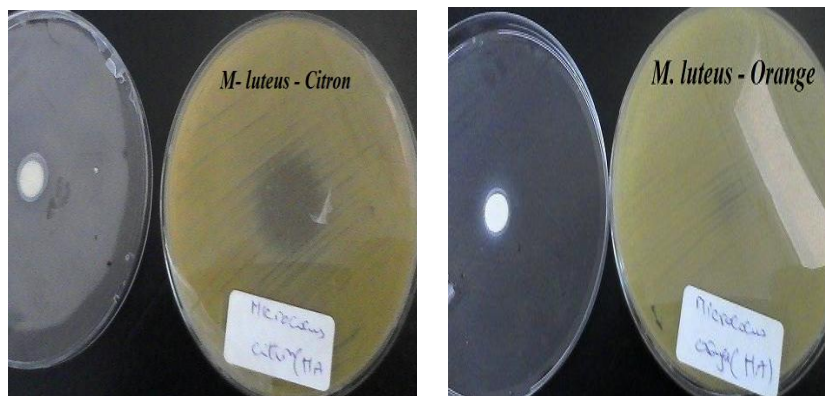
Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la phase vapeur de deux HEs, nous avons utilisé la technique de la micro-atmosphère. Les résultats de cette étude sont rapportés dans le tableau IX et les Figure n° (22, 23, 24 et 25).

**Tableau IX** : Diamètres des zones d'inhibition montrant l'activité antimicrobienne des deux HEs par la méthode de micro-atmosphère.

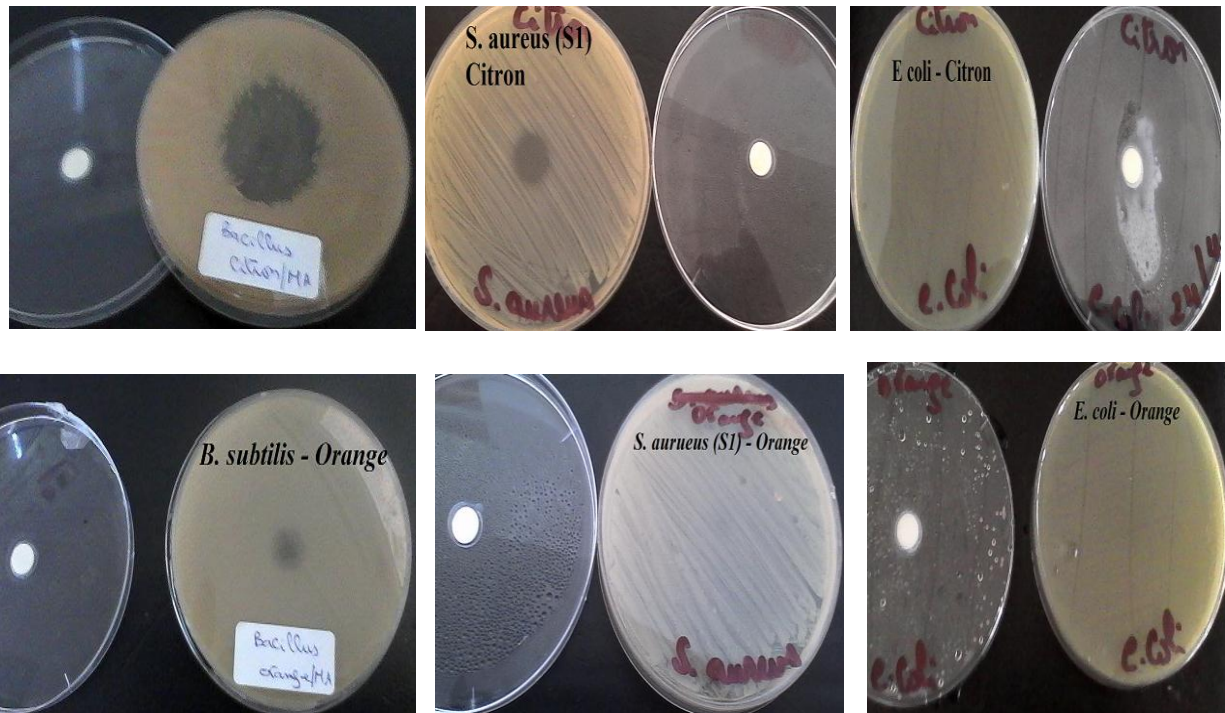
Souche bactériennes	HE de <i>citrus Limonum</i>		HE de <i>citrus Sinensis</i>		
	Diamètre d'inhibition (mm)	Classement de l'HE	Diamètre d'inhibition (mm)	Classement de l'HE	
Gram <sup>-</sup>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	
	<i>C. freundii</i>	-	-	-	
	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	
	<i>Serratia spp.</i>	-	-	-	
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	
	<i>E. coli (E1)</i>	-	-	-	
	<i>E. coli (E2)</i>	-	-	-	
Gram <sup>+</sup>	<i>B. subtilis</i>	35	+++	12	±
	<i>M. luteus</i>	20	++	-	-
	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-
	<i>S. aureus (S1)</i>	13	±	-	-
	<i>S. aureus(S2)</i>	15	±	-	-
Levure / moisissure	<i>C. albicans (C1)</i>	31	+++	10	-
	<i>C. albicans (C2)</i>	32	+++	10	-
	<i>S. cerevisiae</i>	24	++	11	-
	<i>A. Niger</i>	15	+	-	-



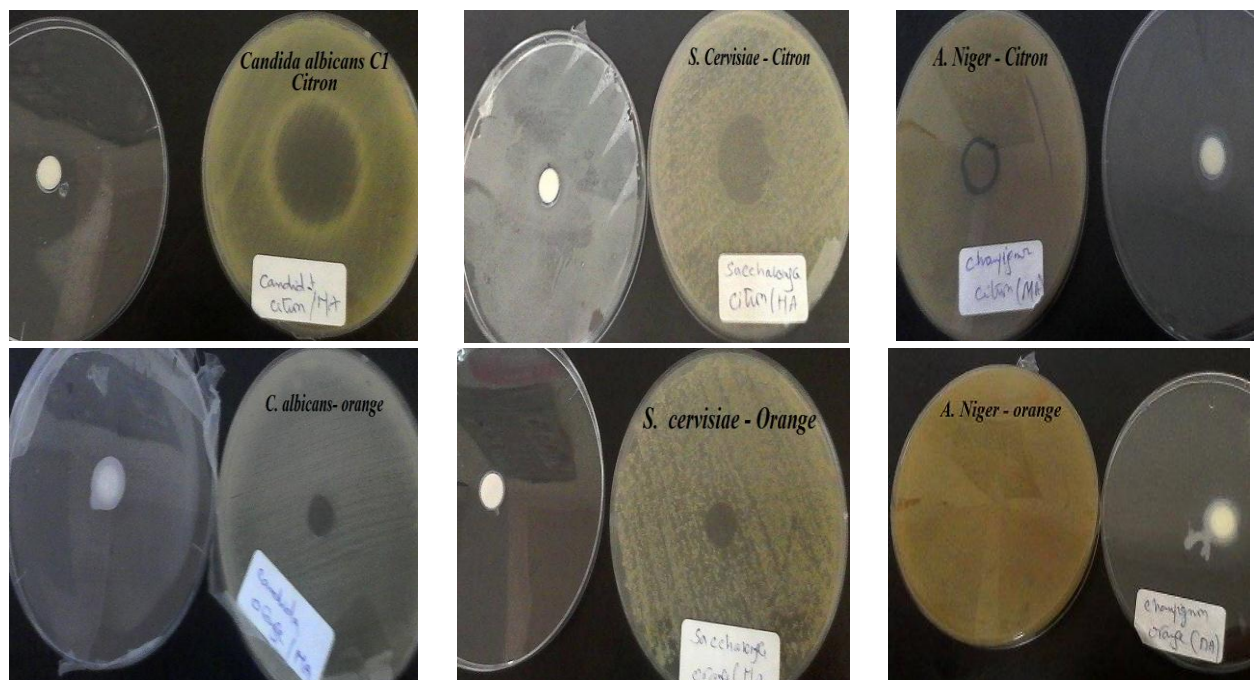
**Figure n°22 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* par la Méthode de microatmosphère (Originale, 2016).



**Figure n°23 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Micrococcus luteus* par la Méthode de microatmosphère (Originale, 2016).



**Figure n°24 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (S1), *Escherichia coli* (E1) par la Méthode de microatmosphère (Originale, 2016).



**Figure n°25 :** Photos montrant l'effet de HE de *citrus limonum* et l'effet de HE de *citrus sinensis* sur : *Candida albicans* (C1), *Saccharomyces cervisiae*, *Aspergillus Niger* par la Méthode de microatmosphère (Originale, 2016).

A la lecture de ces résultats, il apparaît clairement que l'action inhibitrice de la phase vapeur (micro atmosphère) est inférieure à celle de la phase liquide (aromatogramme). Nous avons constaté que les deux HEs sont non inhibitrice sur toutes les bactéries Gram négative testé.

Il noté que la majorité des bactéries Gram positive sont sensibles à la rencontre de HE de *C. limonum* avec des diamètres qui variant entre 15 mm et 35 mm et concernant *Enterococcus faecalis* cette HE ne possède aucun effet inhibitrice. En revanche l'HE de *C. sinensis* est totalement inactive sur toutes les bactéries Gram positive testé elle est légèrement inhibitrice uniquement sur les *Bacillus subtilis* avec un diamètre de 12mm.

L'HE de *C. limonum* présente une bonne activité antifongique par cette méthode elle est active sur toutes les levures et champignons utilisé avec des diamètres qui variant entre 15mm et 32mm, et pour l'HE de *C. sinensis* est légèrement active à *Candida albicans* (C1), *Candida albicans* (C2), *Saccharomyces cerevisiae*. Avec des diamètres (10mm, 10mm, 11mm respectivement) est totalement inactive à *Aspergillus Niger*.

**Giordani et Kaloustian (2006)** ont souligné que les composés terpéniques des H.E. et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure.

A la lecture de la littérature scientifique, il apparaît que la micro atmosphère est très peu documentée. En effet, rares sont les articles qui traitent de cette méthode car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase vapeur sont encore peu nombreux.

A la lecture comparative entre les deux méthodes utilisées (Figure n°26 et 27), aromatogramme et micro atmosphère, nous avons constaté que cette dernière a présenté une activité inhibitrice minimale, en comparaison avec l'aromatogramme pour les deux HEs. Ceci valable pour toutes les souches sauf *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* (C1, C2), *Saccharomyces cerevisiae*. *Aspergillus Niger* les deux méthodes ont donné des résultats presque similaires pour HE de *C. limonum*.

Selon **Bousbia, (2004)**, la méthode de micro atmosphère ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des H.E. elle montre seulement la sensibilité du microorganisme présent aux constituants volatils à la température d'incubation.

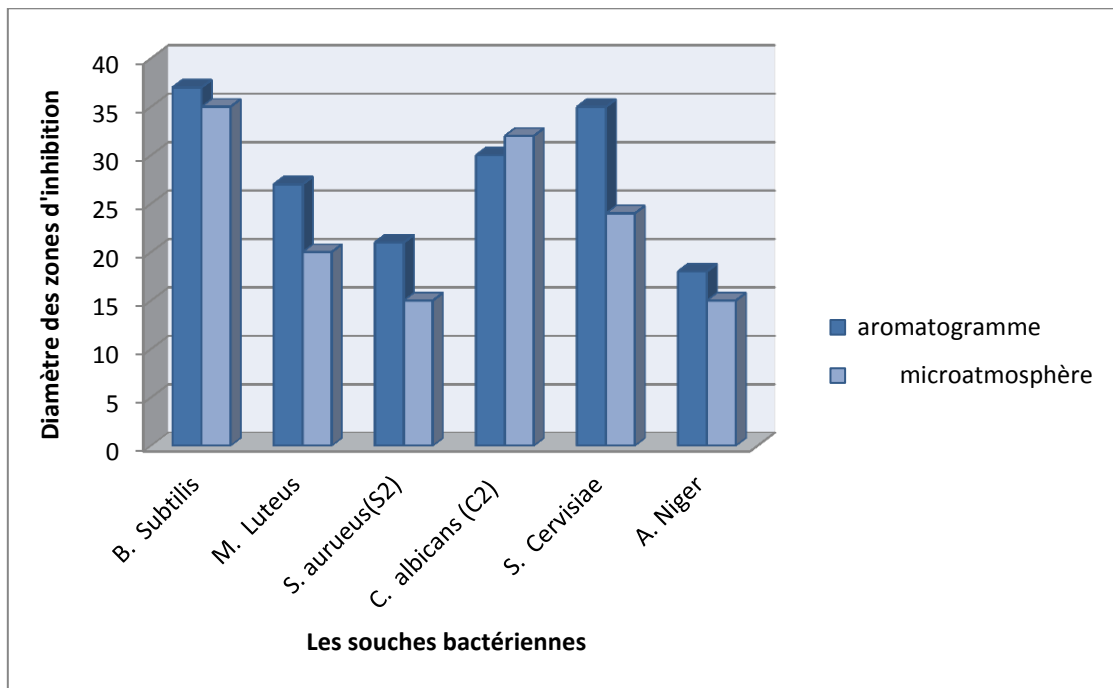


Figure n°26: Etude comparatives entre 2 méthodes aromagramme et micro atmosphère (HE de Citron).

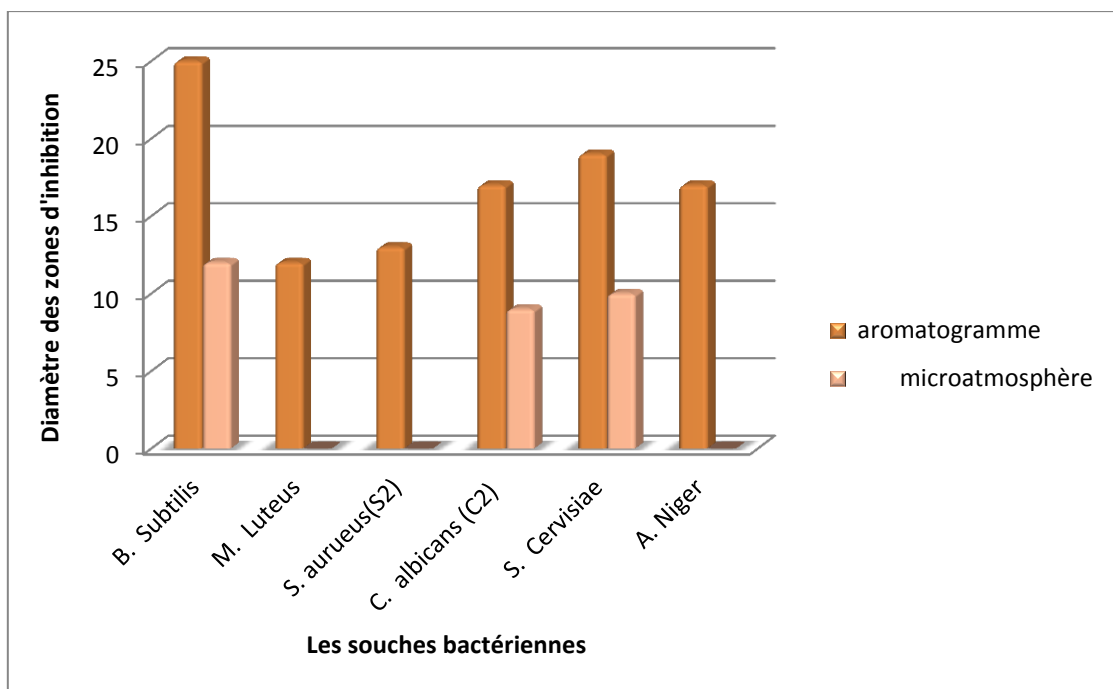


Figure n°27: Etude comparatives entre 2 méthodes aromagramme et micro atmosphère (HE d' Orange).

L'activité antibactérienne des HEs est le sujet de plusieurs études scientifique *in vitro* depuis plusieurs années. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur. Donc les activités antimicrobiennes d'une HE peuvent changer par sa composition chimique, par les génotypes aux méthodes employées (la technique de diffusion sur gélose ou par méthode de dilution) les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes sont différents selon la dose de l'HE utilisées.

**Oussalah et al, (2007)**, ont rapporté que la différence dans les activités antibactériennes des HEs peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et leur interaction synergique possible.

La comparaison de l'efficacité des HEs à travers les différentes publications reste difficile à réaliser et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables, comme la composition chimique des HE qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce (**Hellal, 2011**) et les conditions expérimentales, la dose de l'HE appliquée sur le disque, l'émulsifiant utilisé, la température d'incubation, etc.

Selon les résultats obtenus l'HE de *C. limonum* a présenté une meilleure activité antimicrobienne et antifongique que celle de l'HE de *C. sinensis*.

### III-4- Evaluation de l'activité cicatrisante :

Les résultats obtenus après application journalière des pommades préparées (pommade à base d'huile essentielle de *Citrus limonum* et de *Citrus sinensis*) et les deux témoins (Madécassol et l'eau physiologie) sont reportés dans les figures n° (28, 29,30) :

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

D'une façon générale, l'observation montre l'absence d'œdème pour la zone traitée par les deux pommades préparées et par la pommade de référence Madécassol ce qui signifie que ces deux traitements ne favorisent pas le processus inflammatoire, par contre pour le lot témoin un œdème léger apparaît dès le premier jour et s'estompe pour disparaître le 4eme jour.

Aucun signe de toxicité locale ou systémique n'a été noté chez les lapins traités par les deux pommades préparées. Au terme de la période de traitement, aucunes lésions ou perturbation dans la repousse des poils n'ont été observées.

L'examen macroscopique journalier des plaies permet de constater une action très nette de Madécassol et la pommade à base d'HE de citron sur la vitesse et la qualité de cicatrisation superficielle, Les figures qui récapitulent les résultats de l'activité cicatrisante, montre que la cicatrisation des lots traités par Madécassol, et par la pommade préparé à base de l'HE de citron augment progressivement avec le temps de traitement.

Les trois traitements ont donné une bonne cicatrisation avec des délais de guérisons un peu différentes et qui est de 6 jours pour la pommade à base d'HE de *C. limonum*, de 8 jours pour Madécassol et 11 jours pour la pommade à base d'HE de *C. sinensis*. La cicatrisation naturelle et complète de témoins (l'eau physiologie) se fait au bout du 15<sup>ème</sup> jour.

Nous observons une meilleure cicatrisation de la pommade à base d'HE de citron en comparaison avec celle de l'orange et Madécassol.

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

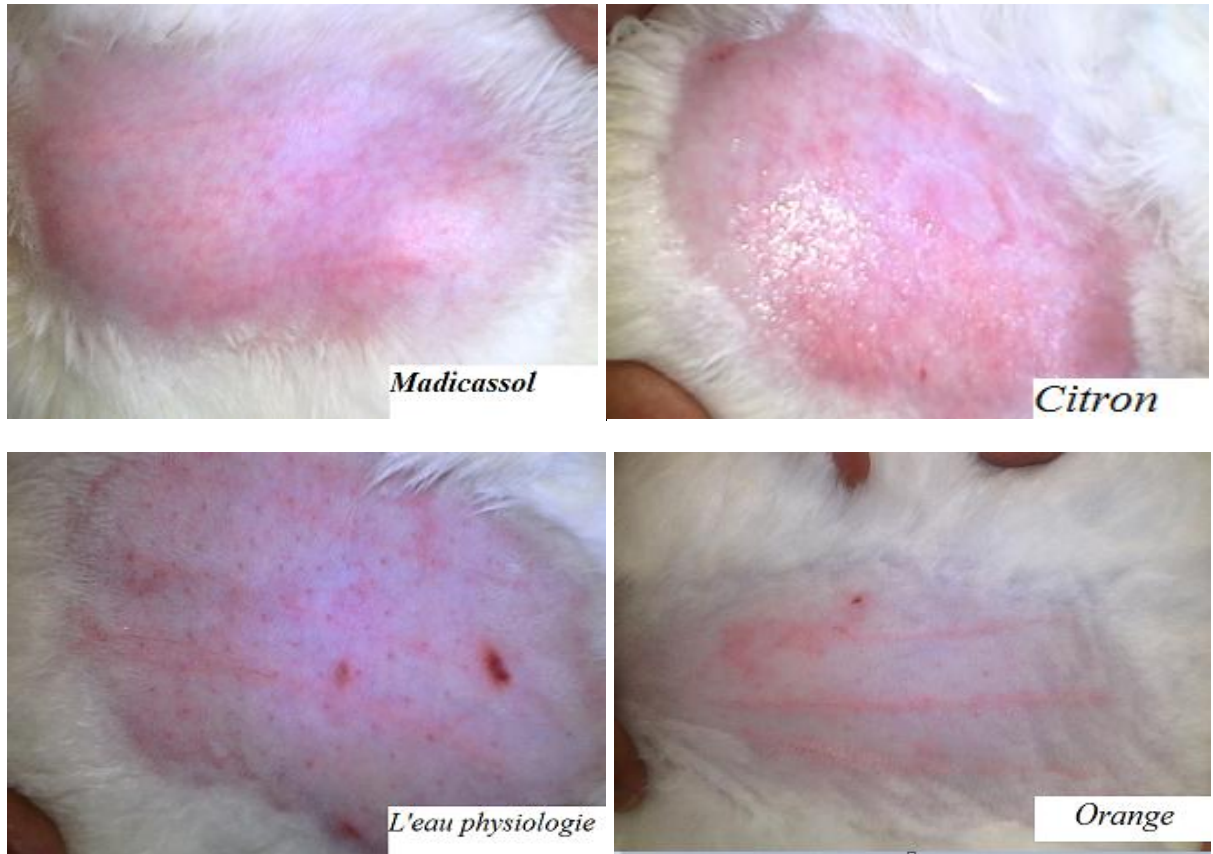


Figure n°28 : résultats de 3<sup>ème</sup> jour (Originale, 2016).

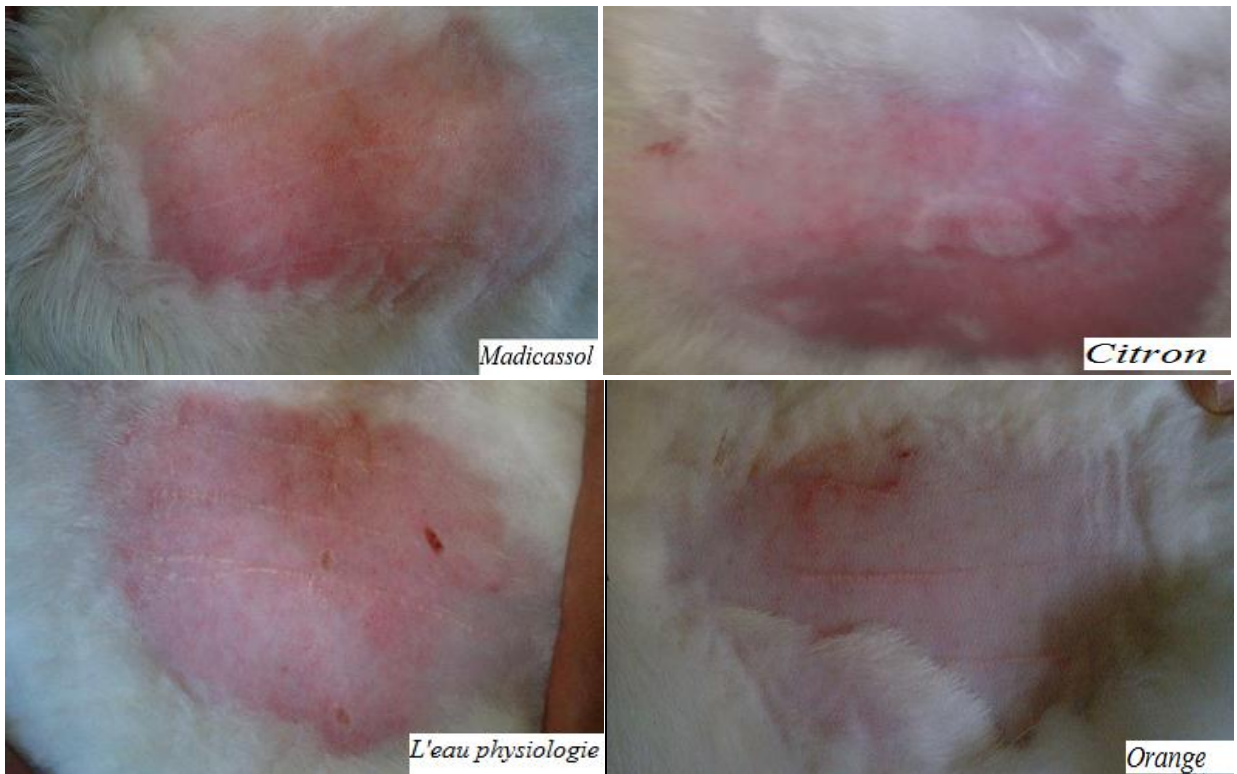
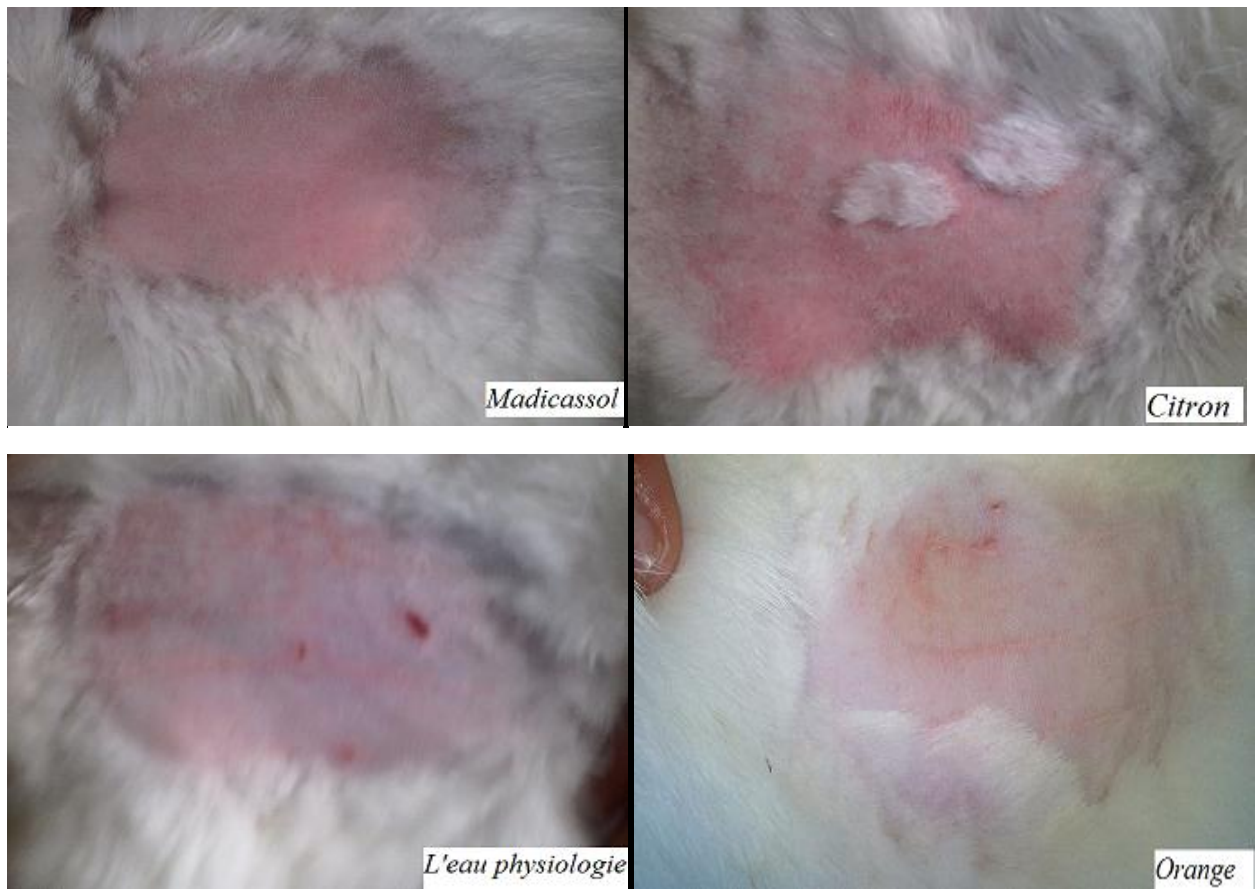


Figure n°29 : résultats de 6<sup>ème</sup> jour (Originale, 2016).





**Figure n°30 : résultats de 8<sup>ème</sup> jour (Originale, 2016).**

## I- Huile essentielle de *Citrus limonum* (citron) et de *Citrus sinensis* (orange) :

### I-1- Généralité sur le citronnier : *Citrus limonum*

D'après **Dubois (2006)**, le citron est d'abord appelé « limon », terme emprunté à l'italien *limone*, qui venait lui-même de l'arabo-persan « limûn ». Le mot Citron est apparu dans la langue française en 1351, et il dérive du latin *citrus*, il a graduellement remplacé « limon » dans la langue populaire Française.

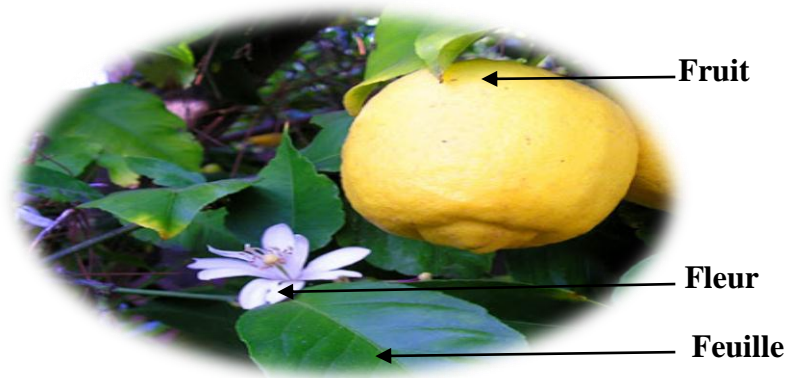
Selon le même auteur, cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment. La fructification de l'hiver est plus importante et représente de 60 à 70 % de la production annuelle de l'arbre.

#### I-1-1- Description botanique :

D'après **Loussert (1989)** et **Bärtels (1998)**, *Citrus limonum* (famille des Rutacé) est un petit arbre persistant de 2 à 7m de haut, rameaux plus ou moins couverts d'épines courtes, épaisses et rigides :

- **Les feuilles** sont persistantes, oblongues ovales, à sommet aigu, plus ou moins dentées. Le limbe est de couleur verte. Le pétiole est ailé et étroit.
- **Les fleurs** solitaires ou fasciculées, bourgeons teintés rougeâtre, les pétales sont de couleur blanchâtre et leur extérieur est teinté de pourpre. L'androcée est formé de 20 à 40 étamines.
- **Les fruits** sont de forme ovale (7 à 12cm de long et de 5 à 7cm de large). Ils sont renflés ou en forme tétine.
- **L'écorce** est rugueuse à presque lisse, verte à jaune blanchâtre et spongieuse à l'intérieur, renfermant 7 à 10 loges contenant des pépins ovales (Figure n° 1).

Le système racinaire est essentiellement localisé dans les premiers 100 cm de profondeur. Il ancre solidement l'arbre au sol en se développant jusqu'à 1 ou 2 m de profondeur.



**Figure n°1 :** Aspect morphologique des feuilles et du fruit de *Citrus limonum* (lousert, 1989).

### **I-1-2- Systématique :**

Selon **Paris et Moise (1981)**, le citron jaune est classé comme suit :

**Embranchement :** Spermaphytes.

**Sous embranchement :** Angiospermes.

**Classe :** Dicotylédones.

**Ordre :** Sapindales.

**Famille :** Rutaceae.

**Genre :** *Citrus*.

**Espèce :** *Citrus limonum.L* (Variété : *Eureka*)

Les principales variétés sont : Bears sicilienne, Berna verna, Eureka, Eureka panachée (citron de chair rose), Genova, Interdonato, Lisbonne, Monachello, Primofiori Fino, Mesero, Santa Teresa, Citron sans pépins, Villa Franca (**Mabberley, 2008**).

### I-1-3- Principales caractéristiques de variété Eureka :

Cette variété est introduite en Algérie dans les années quarantes à partir de la Californie (Rebour, 1950).

Elle est la plus cultivée du fait de sa mise à fruits rapide et de ses floraisons très remontantes permettant la production des fruits au printemps et en été (Tableau I).

**Tableau I :** Les principales caractéristiques de la variété *Eureka*:

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

(Medjdoub, 2002)

## I-2- Généralité sur l'oranger : *Citrus sinensis* (Orange douce)

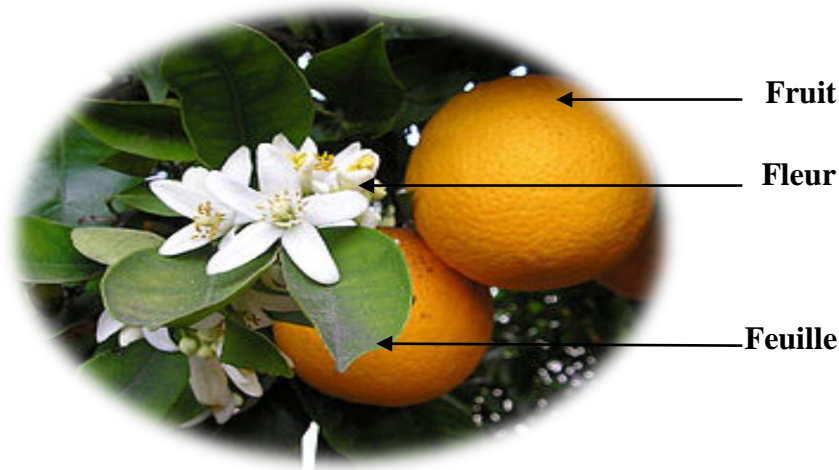
Au 17ème siècle, son appellation était Orange du Portugal, Orange douce et le plus populaire Orange de la Chine. Depuis, son nom scientifique est devenu *Citrus sinensis* (agrumes chinois). Elle représente l'espèce commerciale de *Citrus* la plus importante dans le monde (Mabberley, 2008).

### I-2-1- Description botanique :

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10m de hauteur environ (Loussert, 1987) (Figure n°2).

- **Les feuilles :** sont persistantes, vert foncé et légèrement ailées.
- **Fleur :** la floraison blanche est printanière et agréables parfumée.

- **Fruit** : il est bien connu, largement répandu sur les étales des marchés pratiquement pendant toute l'année ; le fruit est de forme et de couleur variable suivant les variétés, mais en général sphérique et de couleur orangée, c'est un fruit très prisé en frais et en jus.



**Figure n°2** : Aspect morphologique des feuilles et du fruit d'oranger  
(Ioussert, 1989).

### I-2-2- Systématique :

La classification botanique de l'oranger (Judd *et al.*, 2002).

**Règne** : plantae.

**Embranchement** : Spermaphytes.

**Sous embranchement** : Angiospermes.

**Classe** : Dicotylédones.

**Ordre** : Sapindales.

**Famille** : Rutaceae.

**Genre** : *Citrus*.

**Espèce** : *Citrus sinensis*. L (Var. Washington navel).

Les différentes variétés de *Citrus sinensis* selon (Mabberley, 2008) :

- **Oranges précoces douces, blondes et oranges communes** : Ambersweet, Berna, Cadenera, Castellana, Comuna, Hamline, Jaffa (Jaffa de Florida), Jincheng, Mars, Parson Brown, Pineapple (pomme de pin), Rotuna Island, Salustiana, Shamonti (Jaffa de Palestine), Trovita.
- **Orange de Valence (variétés juteuses)** : Valencia, Campbell Valencia, Valencia Panachées Cotidan, Cutter Valencia, Delta Valencia, Dom Joao, Frost Valencia, Harward Late Valencia, Midnight Valencia, Olinda Valencia, Valencia Late.
- **Oranges Navel**
  - **Oranges Navel précoces**: Atwood, Fisher, Navelina, Skagg's bonanza, Tompson Zimmerman.
  - **Navel mi-saison**: Caracara, Fukumoto, New Hall, Spring, Washingto Navel.
  - **Navel tardives**: Autumn Gold, Barnfield, Chislett, Lane late, Navel Late, Powell, Ricalate, Rhode Navel, Wiffen.
- **Hybrides d'orange douce**: Chironja, Nucellar embryony, Poorman orange.
- **Oranges sanguines**
  - **Oranges légèrement sanguines** : Caracara, Caracara panachée, Maltaise sanguine, Rhode Valencia rouge, Ruby, Vainiglia sanguigno, Washington sanguine.
  - **Oranges complètement sanguines** : Delfino, Doble fina, Entrefina, Sanguinello, Sanguinello a Pignu, Sanguinello Moscato, Sanguinello Moscato di Cuscuna.
  - **Oranges profondément sanguines** : Bream Tarocco, Moro, Sanguinelli, Smith Valencia rouge, Tarocco, Thermal Tarocco.

### I-2-3- Principales caractéristiques de l'oranger : *Citrus sinensis* var. Washington navel:

Washington navel est la variété la plus cultivée et la plus appréciée des consommateurs pour sa précocité, elle se récolte de novembre à février et fait l'objet d'un important commerce d'exportation (Loussert, 1987) (Tableau II).

**Tableau II** : Les principales caractéristiques de la variété *Washington navel* :

Espèce	Variété	Caractéristiques
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Washington Navel</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le port de l'arbre en pépinière est retombant.</li> <li>- La couleur de la feuille de plus de 6 mois est d'un vert foncé mais plus clair pour les jeunes pousses.</li> <li>- La longueur de la feuille de 10 à 12 cm.</li> <li>- La largeur de la feuille est de 3 à 7 cm.</li> <li>- La pointe du limbe est douce (légèrement arrondie).</li> <li>- A l'aisselle de chaque feuille pousse une épine qui disparaît avec l'âge.</li> <li>- Le pétiole et d'environ 20 mm muni d'une bractée pas très large, mais apparente.</li> </ul>

(Medjdoub, 2002)

### I-3- Les huiles essentielles :

#### I-3-1- Définition :

Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (Pharmacopée Européenne).

Selon **Bernard *et al.*, (1988)** Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

Les huiles essentielles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles. Elles sont de très faibles masses moléculaires, très odorantes et de nature hydrophobe : elles sont totalement solubles dans l'alcool et les huiles (végétales ou minérales) mais pas dans l'eau. Bien qu'on les appelle huile, ces substances ne contiennent aucun corps gras : contrairement à une huile végétale, une goutte déposée sur un papier s'évaporerait sans laisser de trace (**Degryse *et al.*, 2008**).

### **I-3-2- Rôle physiologique :**

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires. Ces derniers ne sont pas essentiels pour la croissance des plantes (**Croteau *et al.*, 2000**). Dernièrement, des études ont montré que dans les plantes, les huiles essentielles ont pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs ou repousser les insectes hostiles. Un certain nombre d'entre elles ont également des propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides (**Carson et Hammer, 2011**).

### **I-3-3- Répartition et localisation :**

#### **I-3-3-1- Répartition :**

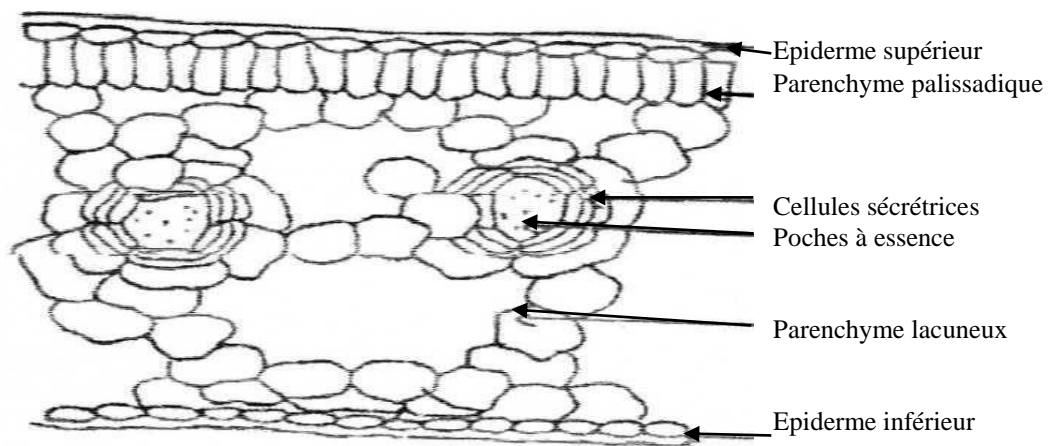
Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles: Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées, Poacées. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleuries (lavande, menthe...), mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), dans les écorces (cannelles), le bois (camphrier), les fruits (poivres), les graines (Muscade) (**Mann, 1987**)

#### **I-3-3-2- localisation :**

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, localisées dans la plante : cellules à huile essentielle (Lauracée), poils sécréteurs (Lamiacées), poches sécrétrices (Rutacées) ou des canaux sécréteurs (Apiacées) (**Bruneton, 1993**).



Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique (Figure n°3). Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (**Goris, 1967**).



**Figure n°3** : Poches sécrétrices des huiles essentielles des *Citrus* dans feuilles.

(**Ferhat et al., 2010**).

#### **I-3-4- Composition chimiques des huiles essentielles :**

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir (**Bacis, 1999**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

D'après **Mondello et al., (2005)**, les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges comportant plus de 200 composés qui peuvent être regroupés en fractions non volatile (1-15 %) et volatile (85-99 %).

Selon **Nogata et al., (2006)** les flavonoïdes retrouvent dans des huiles de *Citrus* et composent la partie non volatile des huiles et ils sont utiles dans la différenciation entre les espèces d'agrumes.

#### **I-3-4-1- Les terpène :**

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprénique en monoterpènes formés de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ), les diterpènes, les sesquiterpènes, formé de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ). Les tétraterpènes huit isoprène qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub> ou n peut être de 9 à 30 (**Hernandez-Ochoa, 2005**).

Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, etc.).

Les monoterpènes sont volatiles entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HEs, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone,  $\beta$ -vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate  $\alpha$ -terpinyle).

Concernant les sesquiterpènes, il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple :  $\beta$ -caryophyllène,  $\beta$ -bisabolène,  $\alpha$ -humulène,  $\alpha$ -bisabolol, farnesol (**Bruneton, 1999 ; Hernandez- Ochoa, 2005**).

#### **I-3-4-2- Les composé aromatiques :**

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils plus fréquents dans les HEs d'*Apiaceae* (anis, fenouil, cannelle, basilic).

#### **I-3-4-3- Les composés d'origine diverses :**

Ils existent un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de

l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique en (3- cis hexanol, decanal,  $\beta$ -ionone) (**Piochon, 2008**).

#### **I-3-4-4- Notion de chémotype :**

Le chémotype d'une HES est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HES. C'est l'élément qui permet de distinguer des HES extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les HES pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces telles que *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les HES à chemotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (**Pibiri, 2006**).

Les HES de *C. limonum* pourrait être de chimiotypes  $\beta$ -pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, citronellal et *C. sinensis* de chimiotypes D- limonène, géraniol, linalol, citral, citronellal, terpinéol et décanal (**Smith et al., 2001**).

Les composés chimiques ayant une efficacité à large spectre antibactérien et antifongique sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques (**Valnet, 2005**).

#### **I-3-5- Propriétés physiques des HES :**

Selon **Catier et Roux, (2007)** les HES possède en commun un certain nombre de propriétés physiques qui permettent avec leur composition chimique de les identifier :

- Elles sont généralement liquides à température ordinaire.
- Elles sont volatiles et entraînables à la vapeur d'eau.
- Elles sont peu solubles dans l'eau mais lui communiquent leur odeur.
- Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques.
- Elles sont sensibles à l'oxydation et donc de conservation limitée.

### I-3-6- Classification des HEs :

Selon la fonction du constituant prédominant, **Le Laurant (1994)** classe les HEs en trois catégories :

- 1- HE hydrocarbonées riches en terpènes (pin, citron : 90% en limonène).
- 2- HE oxygénés riches en alcools et esters comme celles de (roses : (50% en géraniol ; Thym :  $\geq$  30% en thymol ; Coriandre : 70 à 80% en linalol).
- 3- HE sulfurées (Conifères).

### I-3-7- Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée (**Besombes, 2008**). Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences (**Olle et Bender, 2010**). Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (**Aprotosoiaie et al., 2010**).

Les *citrus* ont une teneur importante en HE lorsque la température est élevée (**Bruneton, 1999**).

### I-3-8- Domaine d'application des huiles essentielles:

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (**Grysole, 2005**). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Aprotosoiaie et al., 2010**). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (**Grysole, 2005**).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et

antioxydants (**Conner, 1993 ; Hammer et al., 1999**). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (**Grysole, 2005**).

Les huiles essentielles de *Citrus limonum* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (**Bisignano et al., 2011**). Récemment, certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limonum* comme agent antioxydant (**Hellal, 2011**).

### **I-3-9- Méthodes d'extractions des huiles essentielles:**

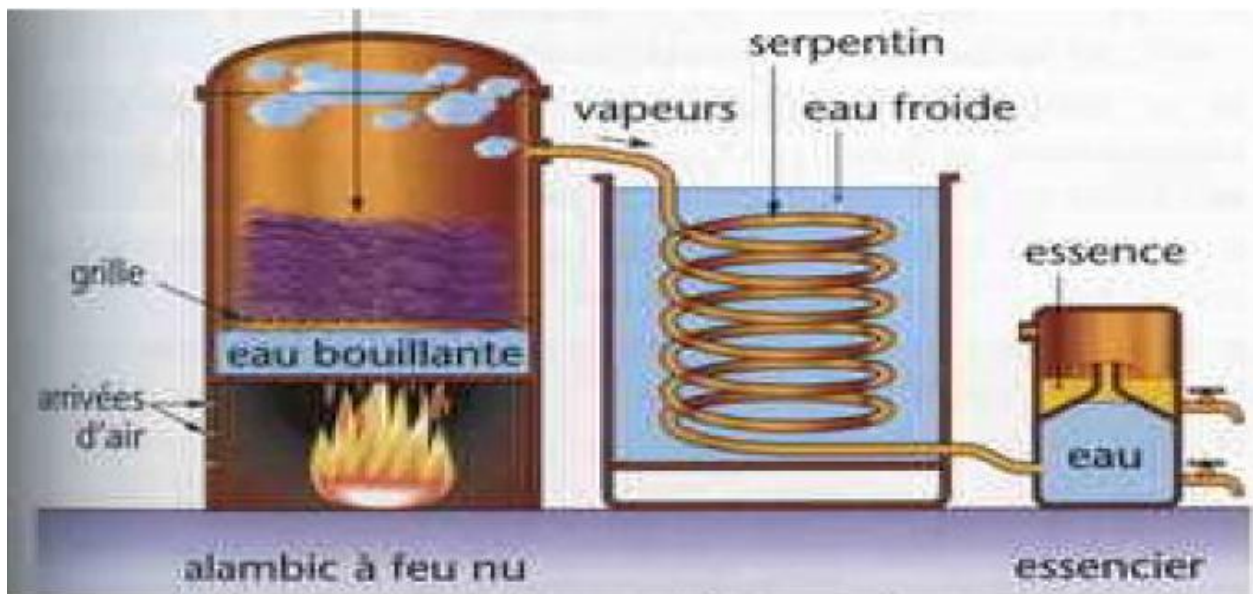
Le choix de la technique dépend principalement de la matière première: son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite. Le rendement « HE/matière première végétale » peut être extrêmement variable selon les plantes (**Desmares et al., 2008**).

Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation et une méthode d'expression à froid (**Lagunez Rivera, 2006**) :

- L'entraînement à la vapeur de l'eau.
- L'hydrodistillation.
- L'expression à froid (cas particulier des agrumes).

#### **I-3-9-1- Entraînement à la vapeur d'eau:**

Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable, qui traverse les végétaux et emporte avec elle les molécules aromatiques. La vapeur chargée de l'arôme se condense alors en traversant une cuve réfrigérante pour être récupérée en phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) où l'huile essentielle est séparée de l'eau par décantation (**Smadja, 2009**) (**Figure n°4**).



**Figure n°4:** Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Lucchesi, 2005).

### I-3-9-2- L'hydrodistillation :

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors la décantation (Lagunez Rivera, 2006) (Figure n°5).



**Figure n°5:** montage d'hydrodistillation (Clevenger) (Smadja, 2009).

### **I-3-9-3- - L'expression à froid :**

Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes par des procédés mécaniques à température ambiante. L'expression à froid consiste à soumettre la substance végétale à une forte pression à l'aide d'une presse hydraulique (**Desmares et al., 2008**).

### **I-3-9-4- Autres techniques :**

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités (**Ferhat et al., 2010**). Parmi ces techniques, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons (**Ferhat et al., 2010 ; Dupuy, 2010**), l'extraction par les fluides supercritiques ou encore l'eau à l'état subcritique (**Ferhat et al., 2010 ; Dupuy, 2010**), l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par le flash détente (**Ferhat et al., 2010**).

### **I-3-10- Toxicité des huiles essentielles :**

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques (**Hammer et Carson, 2011**). 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 (**Bernadet, 1983**).

Les huiles essentielles de *Citrus* sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photosensibilisantes. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus limon* extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (**Robert et Lobstein, 2005**).

## Références bibliographiques

---

- **AFNOR, 2000.** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6<sup>ème</sup> édition. AFNOR, Paris.
- **Afssaps. 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.17
- **Alma M. H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F. T.,Yilmaz N. 2004.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3911–3914
- **Anton R et Silano V., (2001).** Plants in cosmetics, Volume II, édition Conseil de l'Europe, Allemagne,pp 41-43.
- **Ao Y., Satoh K., Shibano K., Kawahito Y., Shioda S. 2008.** Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from rutaceae. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43(1) pp. 6–12.
- **Aprotosoai A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V.,Stanescu U.2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 53-54
- **Bacis, 1999** Boelens Aroma Chemical information Service - ESO 2000, the complete Database of Essential Oils. Leffingwell and Associates publisher, Georgia, USA.
- **Bärtels A, 1998 :** Guide des plantes du bassin méditerranéen. Ed Eugen Ulmer, 5. Paris. France. 432P.
- **Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010.** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994P.
- **Belleti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R., Gardini F. (2004).** Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52 (23), 6932-6938.
- **Bentabet et al. (2008)**



- **Bernadet M., 1983.** Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles, Eds. Dangles, France. 384 p.
- **Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. In *Information chimie*, 229 pp. 179-184
- **Besombes C. 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289 p.
- **Bisignano G., Cimino F., Saija A. 2011.** Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group. pp 529-548
- **BOUSBIA N. 2004.** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique, Alger (Algérie).
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier, 2<sup>ème</sup> édition, Paris. 915p.
- **Bruneton, J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris. 1120p.
- **Buchbauer G., 2010.** Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, pp.235 – 280.
- **Caillet S. et Lacroix M. 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA). pp. 1-8.
- **Carson C. F. et Hammer K. A., 2011.** Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. United Kingdom : John Wiley et Sons Ltd. pp. 204-238.
- **Catier Oet Roux D, 2007.** Botanique, pharmacognosie et phytothérapie, 3<sup>ème</sup> édition, Walter's Kluwer, Paris, pp 112.
- **Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J. 2000.** Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., 12, pp. 639-649.

- **Conner D. E., 1993.** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. ; Branen A. L. Antimicrobials in foods, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.
- **Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. et Micieli D. 2007.** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 6300-6308.
- **Croteau R.,Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000.** Natural products (secondary metabolites), in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA, pp. 1250–1268.
- **De Billerbeck V.G. 2007.** Huiles essentielles et bactérie résistantes aux antibiotiques phytothérapies, 5, 249-253.
- **Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control*. 19, pp. 346–352.
- **Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP. Thèse de Génie sanitaire.
- **Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. and Mazza G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74 :101-109.
- **Desmares et al., 2008**
- **Devahastin S & Mayachiew P., 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41; pp. 1153-1159.
- **Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A. & Menut C., 2010.** Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 1 (4): pp. 606-611.
- **Dubois C., 2006.** Les arbres fruitiers Ed ; Rustica, Paris, 127p.
- **Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., 2008.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* 46: pp.3632-3639.

- **Dupuy A. 2010.** Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).France. 305 p.
- **Elgayyar M., Draughon F.A. Golden D.A et Mount J.R., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selectes pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food protects, 64 : pp 1019-1024.
- **Farbood M. I., Marcnelil J.H et Ostovar K., 1976.** Effects of rosmaroy spice extractive on Growthth of microorganisms in meats. J. Milk foof technol., 39: pp 675-679.
- **Felidj .M, Bouazza M, et T. Ferouani, 2010** «Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale Ammoidespussila (verticillata) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale) Short paper about the floristiccommunity and the interest of Ammoidespussila (verticillata), a medicinal plant fromMounts of Tlemcen National Park (Western Algeria), Geo-Eco-Trop., 2010, 34 : 147 - 154 » P :154.
- **Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010.** Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157p.
- **Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J.& Rosalia F., 2008.** Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essence on honeybee bacterial pathogen *Paembacillus larvae*, the causal agent American Foulbrood. World journal of microbiology and biotechnology,., pp; 2067-2072.
- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007.** Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chem.,102, pp 904.
- **Giordani R., Kaloustian J. (2006).** Action anticandidosique des huiles es sentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. Phytothérapie. pp 121-124.
- **Girenavar B., Jayaprakasha G.K., Jadegoud Y., Nagana Gowda G.A., Patil B.S. 2007.** Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. Bioorg Med Chem. 15(11) pp. 3684–91.
- **Goris A. 1967.** Manuel de botanique. Ed. Clin. pp. 265-268
- Gouguam et baiteche, 1989)
- **Gramza A., Pawlak-Lema ńska K., Korczak J., sowicz E.W. and Rudzinska M., 2005.** Tea extracts as free radical scavengers. Polish Journal of Environmental Studies

Vol. 14, N° 6 pp. 861-867. MEMOIRE Présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Sciences Alimentaires Option : biotechnologies alimentaire.

- Grysole J. 2005. La commercialisation des huiles essentielles in Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162.
- **Hammer K. A. Carson C. F. 2011.** Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. pp. 255 – 295.
- **Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86,(6), pp. 985-990.
- **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*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.
- **Hernandez-Ochoa L.R, 2005.** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
- **Hinou J.B. Harvala C.E., Hinou E.B. 1989.** Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie* 44, 4 p.
- **Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S., Nigam P.S. 2010.** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, pp.1070-10780.
- **Hussein A.M.S., 1990.** Antibacterial and antifungal activity of some Libyan aromatic Plants. *Planta medica*, 56, pp 644-649.
- **Jay J.M., 1996.** Microorganisms in fresh ground meat : the relative safety of product with low versus high numbers. *Meat sci*, 43: S59-S66.
- **Jeannot V., Chahboune J., Russell D. et Baret P. 2005.** Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium L. ssp. aurantium*). *International journal of aromatherapy*, 15 (2), pp 94-97.
- **Judd W. S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P. 2002.** Botanique systématique une perspective phylogénétique. Edition De Boeck université.sa, Paris, p.333.

- **Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., Vanella. P ., 2013.** La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : Entre science et tradition pour unne application médicale raisonnée. Ed Springer Verlag., France. 226p.
- **Kelen M. & Tepe B., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource technology*, 99, pp 4096-4104.
- **Koba K., Sanda K., Raynaud C Mandin D., Millet J., Chaumont J.P., 2003.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cympogon citratus L. naradus L et C. schoenanthus*. *Journal de Mycologie médicale*, Vol 13, N°4, (décembre 2003), pp 175-180.
- **Küdjüed-bünneton, J-F., 1989.** Pharmacien phytochimique chargé de cette étude pour L'orstom Dr : Possibilité de valorisation de plante médicinales et aromatiques en Gyrene Dr.
- **Lagunez Rivera L., 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse. 331p.
- **Le Lourant P., 1994.** Guide pratique de l'aromathérapie : Mieux être, mieux vivre par l'aromathérapie. ED : De Vecchis S.A Paris. 13p.
- **Loussert R., 1989.** Les agrumes (1 Arboriculture). Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris, France. 177P.
- **Loussert, 1987.** Les agrumes, l'arboriculture. Ed. Lavoisier, Vol.1, Paris, 80P.
- **Lucchesi M.E., 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Science, discipline : Chimie. Université de la Réunion, Faculté des sciences et technologies.
- **MABBERLEY D.J., 2008.** *Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications and uses, third edition.* Cambridge University Press. 1040 p.
- **Madjene A et Madani F., 2010.** Contribution à la mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire et analgésique de l'huile essentielle des feuilles et du péricarpe de Citronnier. 35p.
- **MANN J. (1987),** *Secondary metabolism. Second edition,* Clarendon press, Oxford, p.374

- **Marino M., Bersani C. et Comi G., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* L. Measured using a bioimpedometric method. *J. Food protect.* 62: 1017-1023.
- **Mayachiew P. & Devahastin S., 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41; pp. 1153-1159.
- **Medjdoub J C., 2002.** Reconnaissance visuelle de quelques variétés d'agrumes- CNCC-juin.
- **Misharina T.A., Samusenko A.L. 2008.** Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 44(4), pp. 482-6.
- **Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse magistère*, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- **Molyneux P., 2004.** Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 26 № 2. 212p.
- **Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Dugo P., Dugo G. 2005.** Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal.*, 20(2), pp.136-140.
- **Moreira M. R., Ponce A. G., Del Valle C. E. & Roura S. I., 2005.** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT.* 38: pp. 565-570.
- **Moufida S. et Merzouk B., 2003.** Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.
- **Mutai C. Bii C. Vagias C. Abatis D et Roussis V., 2009.** Antimicrobial activity of acacia mellifera extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, pp 10-1016.
- **Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M. & Ohta H., 2006.** Flavonoid composition of fruit tissue of citrus species. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 70 (1), 178-192.
- **Olle M. and Bender I., 2010.** The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8 (3), pp.687-696.
- **Othmer K., 2012.** Kirk- Othmer Chemical Technology of Cosmetic. Ed. Dunod, 2ème éd Paris, 832P.

- **Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria. *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 414-420.
- **Paris M. et Murabielle H., 1981.** Abrégés de matière médicale pharmacognosie, Tome I, édition Masson, Paris, pp 181-194.
- **Perfumer et Flavorist, 2009.** A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34, January 2009.
- **Pharmacopée européenne, 2001.**
- **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.
- **Piochon M, 2008.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- **Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M., 2010.** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universității din București – Chimie (serie nouă)*, vol. 19 №1, pp. 23-30.
- **Rebour H., 1950.** Les agrumes en Afrique de NORD, union des syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, pp 498-502.
- **Rega B., Fournier N., Guichard E. & Russell R., 2003.** Citrus flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp 117-133.
- **Rehman S. U., Hussein S., Nawaz H., Mushtaq A. M., Murtaza M. A. & Rizvi A. J., 2007.** Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistanian Journal of Nutrition*, pp 558-561.
- **Robert A. et Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- **Salle J.L. et Pelletier J. 1991.** Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, 220P.
- **Simionatto E., Bonani V.F.L., Morel A.F., Poppi N.R., Júnior J.L.R., Stuker C.Z., Peruzzo G.M., Peres M.T. and Hess S.C., 2007.** Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 18, №5, pp. 879-885.

- **Smadja J., 2009.** Les Huiles Essentielles. Colloque GP3A - Tananarive 2-3 juillet.
- **Smith D. C., Forland S., Bachanos E., Matejka M. & Brrett V. 2001.** Quantitative analysis of Citrus fruits extracts by GC/MS. An undergraduate experiment. Chemical Educator. 28-31.
- **Svoboda K. P. and Hampson J. B. 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Ed Plant Biology Departement , SAC Auchincruive, Ayr, Scotland.
- **Tang S., Shechan D., Buckley D.J., Morrsey P.A., Kerry J.P. 2001.** Anti-oxidant activity of added tea catechines on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. International Journal of Food Science and Technology, 36, pp. 685- 692.
- **Tepe B., Akpulat H. A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E. 2006.** Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. Food Chemistry, 97(4), pp.719 –724.
- **Teusher E., Anton R. & Lobstein A., 2005.** Plantes aromatique. Epices aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.
- **Uribe S., Ramirez J., Pena A. 1985.** Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. Journal of Bacteriology, 161, pp.1195–1200.
- **Valnet J., 2005.** L'aromathérapie Ed. Maloine S. A ISBN. 2-253-03564-5.
- **Vekiari S.A., Protopapadakis E.F., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C. & Vamvakias M., 2002.** Composition and seasonal variation of the essential oil leaves and peel of a lemon variety. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 147-153.
- **Veldhuizen E. J., Tjeerdsma-van Bokhoven J. L., Zweijzer C., Burt S. A., Haagsman H. P. 2006.** Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, pp. 1874–1879.
- **Wang H.F., Yih K.H. and Huang K.F., 2010.** Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 18, №1, pp. 24-33.
- **ZAIKA L.L., 1988.** Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. J. Food Nutr. Vol. 9, pp : 97 – 118.



# ANNEXE 1

---

## *Appareillage, verrerie et consommables*

- Appareillage
  - Agitateur
  - Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau)
  - Autoclave
  - Bain marie
  - Balance de précision
  - Bec bunsen
  - Etuve
  - Hotte à flux laminaire avec lampe UV
  - Incubateur bactériologique (25°C, 37°C)
  - Réfractomètre
  - Réfrigérateur
  - Spectrophotomètre UV
  
- Verrerie et consommable
  - Anse de platine
  - Béchers
  - billes de verre
  - Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
  - Burette
  - Disques d'aromatogramme stériles 9mm (Schleicher & Schuell Ref ; 321260)
  - Ecouvillons stériles
  - Eprouvettes
  - Erlenmeyer
  - Fioles
  - Flacon avec bouchon
  - Lame de scalpel

- Les lapins
- Madicassol
- Micropipette
- Pied à coulisse
- Pincés
- Pipettes graduées stériles
- Pipettes pasteurs
- Réfrigérants à reflux
- Seringues
- Spatule inox
- Tubes à essai
- Vaseline

- Solutions et réactifs

- 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Acide ascorbique
- Acide chlorhydrique (HCl)
- Alcool chirurgical
- Alcool et d'éther
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- L'eau distillée
- L'eau physiologique
- Méthanol
- Myristate d'isopropyle
- Phénophtaléine

## ANNEXE 2

### Détermination du rendement en huile essentielle

- *Citrus. Limonum*

	Ech 1	Ech2	Ech3	Ech4	Ech5
Poids de la matière fraîche en g	300	300	300	300	300
Masse de l'huile essentielle en g	0.93	0.84	0.99	0.90	0.99
Rendement %	0.31	0.28	0.33	0.30	0.33
Rendement moyen %	0.31				

- *Citrus. Sinensis*

	Ech 1	Ech2	Ech3	Ech4	Ech5
Poids de la matière fraîche en g	300	300	300	300	300
Masse de l'huile essentielle en g	0.57	0.75	0.69	0.69	0.60
Rendement %	0.19	0.25	0.23	0.23	0.20
Rendement moyen %	0.22				

## ANNEXE 3

### Résultats de l'activité anti-oxydante

- *Citrus. Limonum*

**Absorbance contrôle = 0,8746**

<b>µl (HE)</b>	100	200	400	600	800	1000
<b>µg/ml</b>	84,9	169,8	339,6	509,4	679,2	849
<b>DO</b>	0,68	0,600	0,478	0,342	0,212	0,115
<b>% inhibition</b>	21,678	31,340	45,254	60,884	75,748	86,793

- *Citrus. Sinensis*

**Absorbance contrôle = 0,8746**

<b>µl (HE)</b>	100	200	400	600	800	1000
<b>µg/ml</b>	84,9	169,8	339,6	509,4	679,2	849
<b>DO</b>	0,781	0,702	0,541	0,417	0,262	0,128
<b>% inhibition</b>	10,702	19,734	38,143	52,321	70,043	85,364

- Acide ascorbique

<b>µg/ml</b>	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
<b>DO</b>	0,601	0,521	0,464	0,391	0,329	0,278	0,211	0,146	0,079	0,023
<b>% inhibition</b>	13,024	24,602	32,850	43,415	52,387	59,768	69,464	78,871	88,437	96,642