

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**



**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de biotechnologie et Agroécologie**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique**

**Spécialité : biotechnologie et valorisation de plantes**

**Thème**

**Extraction des huiles essentielles à partir de déchets  
d'agrumes (orange) de la région de la Mitidja**  
**Etude paramétriques et caractéristiques**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> FOUIAL Farah**

**M<sup>elle</sup> ZERROUK Selma**

**M<sup>elle</sup> HADJEB Lamia**

**Devant le jury composé de**

**Président : Mr. ABBAD M.**

**MCA**

**Université BLIDA**

**Examineur : Mme GHANAI R.**

**MCB**

**Université BLIDA**

**Promoteur : Mr. BENDALI A.**

**MAA**

**Université BLIDA**

**Année universitaire : 2022/2023**

## Résumé

---

L'orange est une plante importante des Rutacées. Elle est principalement utilisée dans l'industrie de transformation des fruits, où la peau est généralement jetée en grande quantité. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la valorisation des déchets d'orange (*Citrus sinensis*) de la région de la Mitidja par l'extraction d'huiles essentielles.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des études phytochimiques sur des extraits d'écorces phénoliques, ce qui nous a permis de mettre en évidence l'abondance de composés bioactifs (composés phénoliques, flavonoïdes, tanins, notamment catéchines, tanins, stéroïdes, terpénoïdes et quinones). La capacité antioxydante déterminée par la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH a montré que l'extrait avait une bonne activité antioxydante, et il était supérieure à 80 % à des concentrations de 1 mg/ml et 0,5 mg/ml. D'autre part, l'huile essentielle a été extraite des écorces fraîches d'agrumes par hydrodistillation de type Clevenger avec un rendement de 0,26% dans des conditions optimales de temps d'extraction = 140 min et de rapport liquide-solide (L/S) = 2 ml/g.

Par le contrôle des paramètres physiques et chimiques, polyphénols totaux, flavonoïdes, et l'analyse qualitative d'huile essentielle avec spectrophotomètre UV-visible, spectrophotomètre infrarouge et CCM, les résultats montrent que nos huiles essentielles répondent aux normes de qualité, dont le limonène représente la majorité composée.

Pour, l'activité antifongique de l'HE a été évaluée *in vitro* par la méthode de dilution en milieu liquide pour déterminer l'indice antifongique. Les résultats obtenus démontrent son efficacité fongicide, même à faible concentration de 0,003 µl. Par conséquent, nous pouvons l'utiliser comme fongicide naturel pour traiter *Botrytis cinerea*.

**Mots clés :** déchets, *Citrus sinensis*, huiles essentielles, polyphénols, fongicides.

## Abstract

---

The Rutaceae family includes the orange, a plant with significant properties. In the fruit processing industry, the orange skin is typically discarded in large quantities. Our interest lies in finding a way to recover this orange waste (*Citrus sinensis*) from the Mitidja region by extracting essential oils.

Our initial step involved conducting phytochemical studies on the bark extracts, specifically focusing on phenolic compounds. These studies revealed a rich abundance of bioactive compounds, including phenolic compounds, flavonoids, tannins (particularly catechins), steroids, terpenoids, and quinones. The antioxidant capacity, determined through the DPPH free radical scavenging method, exhibited strong antioxidant activity. At concentrations of 1mg/ml and 0.5mg/ml, the antioxidant activity exceeded 80%. Additionally, we extracted the essential oil from fresh citrus peels using Clevenger-type hydrodistillation. Under optimal conditions of extraction time (140 min) and liquid-solid ratio (L/S = 2ml/g), the yield of essential oil was 0.26%.

Through the control of physical and chemical parameters of essential oils, total polyphenols, flavonoids, and qualitative analysis of UV-Vis spectrophotometer, infrared spectrophotometer and CCM, the results show that our essential oils meet the quality standards, of which limonene accounts for the majority.

The antifungal properties of the essential oil (EO) were assessed through in vitro testing using the liquid dilution method to determine the antifungal index. The findings reveal its potent fungicidal effectiveness, even at a minimal concentration of 0.003  $\mu$ l. Hence, it can be utilized as a natural fungicide for the treatment of *Botrytis cinerea*.

**Key terms:** waste, *Citrus sinensis*, essential oils, polyphenols, fungicides.

## ملخص

البرتقال هو نبات مهم من نباتات Rutaceae. يستخدم بشكل رئيسي في صناعة تحويل الفاكهة، حيث عادة ما يتم التخلص من القشرة بكميات كبيرة. مع وضع ذلك في الاعتبار ، كنا مهتمين باستعادة مخلفات البرتقال (Citrus sinensis) من منطقة متيجة عن طريق استخراج الزيوت الأساسية.

أولاً ، أجرينا دراسات كيميائية نباتية على مستخلصات الفينول للقشرة ، والتي سمحت لنا بتسليط الضوء على وفرة المركبات النشطة بيولوجياً (المركبات الفينولية ، الفلافونويد ، التانينات ، على وجه الخصوص الكاتيكين ، التانين ، الستيغويد ، التربينويدات والكينون). أظهرت قدرة مضادات الأكسدة التي تم تحديدها بواسطة طريقة إزالة الجذور الحرة DPPH أن المستخلص كان له نشاط جيد كمضاد للأكسدة ، وكان أكبر من 80٪ بتركيزات 1 مجم / مل و 0.5 مجم / مل. من ناحية أخرى ، تم استخلاص الزيت العطري من قشور الحمضيات الطازجة بواسطة التقطير المائي من نوع Clevenger بعائد 0.26٪ في ظل الظروف المثلى لوقت الاستخلاص = 140 دقيقة ونسبة السائل-الصلب تقدر ب 2 مل / جم.

يخضع زيتنا الأساسي لمراقبة كل من المعايير الفيزيائية والكيميائية. يتضمن ذلك تقييم البوليفينول الكلي ، الفلافونويد ، بالإضافة إلى التحليل النوعي للزيوت الأساسية باستخدام معدات متخصصة مثل مقاييس الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية ، ومقاييس الطيف الضوئي بالأشعة تحت الحمراء ، و CCM. تؤكد نتائج هذه التحليلات أن زيوتنا الأساسية تلبى معايير الجودة المعمول بها. والجدير بالذكر أن المركب السائد الموجود في زيوتنا هو الليمونين.

من أجل تقييم نشاطه المضاد للفطريات في المختبر ، تم استعمال طريقة التخفيف بالوسط السائل. أظهرت النتائج فعاليتها كمبيد للفطريات حتى عند التركيز المنخفض من 0.003 ميكرو لتر. لذلك ، يمكننا استخدامه كمبيد فطري طبيعي لعلاج العفن الرمادي .

**الكلمات المفتاحية:** نفايات ، الحمضيات ، الزيوت الأساسية ، بوليفينول ، مبيدات فطريات

## REMERCIEMENTS

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ  
- وما أوتيتم من العلم إلا قليلا -

سورة الإسراء الآية 85

En préambule de ce mémoire, nous tenons à remercier «الله»  
le tout puissant de nous avoir guidé sur le bon chemin du  
savoir.

♥ فالحمد لله الذي بفضلته تتم الصالحات ♥

Nous exprimons nos respectueux remerciements et notre  
sincère gratitude à notre promoteur Mr BENDALI  
Abdelaziz, pour nous avoir proposées ce thème, nous avoir  
guidées tout au long de ce travail, pour leur compétence,  
leur gentillesse, leur patience et leurs conseils précieux qui  
ont permis d'accomplir à bon terme cette étude.

Nous remercions vivement, à Mr ABBAD et Mme GHANAI  
pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger  
cette mémoire.

Un grand merci que nous adressons aux Responsable de  
laboratoire PFE, Mme BELARBI IHSAN pour son soutien et  
sa disposition, ainsi Mr YOUSEF du laboratoire 107 pour  
son aide et sa gentillesse.

Enfin, une profonde gratitude à tous ceux qui nous aidé de  
près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui ne sont  
pas mentionnés ici, nous leurs adressons nos plus sincères  
remerciements.



## DEDICACES

Merci, Allah, le tout puissant, de m'avoir donné la force  
d'y croire et le courage d'aller jusqu'au bout et réaliser mon  
rêve, je lève mes mains vers le ciel et je dis :

♥Merci mille fois ya allah ♥

À mes très chers parents

Pour leur soutien de toujours, leurs patience, leurs  
précieux conseils, ainsi que leur encouragement et la  
confiance qui m'ont toujours accordé.

Et ma deuxième mère

SAKINA

À mes sœurs

MANEL, HIBA, SABRINA ET LILYA

Et mon frère

SALAH ADDINE

A tous ma famille et mes amis que j'aime beaucoup

Je dédie mon travail.



FARAH ♥



## **DÉDICACE**

*Grâce à Dieu qui m'a permis de terminer ce travail, je l'ai fait pour mes chers parents (Ahmed et Hakima) pour eux.*

*Et avec leurs encouragements et leurs sacrifices,*

*Sinon, je ne serais pas là où je suis.*

*A mes chères soeurs Hedil et Mounira*

*A toute ma famille*

*A mon cher fiancé*

*À mes meilleurs amis, et cousines et à tous ceux que j'aime.*

*Sarah Soumia, Asma, Khawla, Houda, Roumiassa, Iman, Sabiha et Meriem et khadidja*



**SELMA**



## *DEDICACE*

*À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre, À  
cette source de tendresse, de patience et de générosité,*

*À ma mère et mon père qui ont été crédités d'avoir  
terminé mes études supérieures.*

*A mes très chères sœurs: FATMA, FAYZA, SALIMA,  
OUAHIDA et la femme de mon frère FATMA*

*A mes frères: MEDHAMED, LAKHDAR et ISHAK.*

*A mes frères et sœurs infants: ROUNAK MARAM,  
RAOYA, HAYAT, NOUR HAN, RETAJ, MEDHAMED  
YOSIF, SAIFEDDINE ET BOCHRA*

*Mon fiancé BRAMGUI Ayeche et toute sa chère famille,*

*A mes chers ami(e)s de la classe Master Biotechnologie  
et valorisation des plantes 2022/2023... je ne les cite  
pas pour ne pas oublier personne.*



**LAMIA**



# Sommaire

---

Résumé	
Remerciements	
Dédicace	
Liste de figure	
Liste de tableaux	
Liste des abréviations	
<b>Introduction générale</b> .....	1

## **Première partie : Étude bibliographique**

<u>I. Généralités sur les agrumes</u> .....	3
<u>I.1 Définition</u> .....	3
<u>I.2 Production et consommation des agrumes</u> .....	4
<u>II. Généralités sur l'espèce étudiée: citrus sinensis</u> .....	5
<u>II.1 Description</u> .....	5
<u>II.2 Composition d'orange</u> .....	6
<u>II.3 Différentes variétés d'oranges</u> .....	6
<u>II.4 Technologie de transformation des oranges</u> .....	7
<u>II.5 Sous-produits de transformation de l'orange</u> .....	8
<u>II.5.1 Graine</u> .....	8
<u>II.5.2 Peau</u> .....	8
<u>II.6 Valorisation des sous-produits de l'orange</u> .....	8
<u>III. Les huiles essentielles</u> .....	9
<u>III.1 Définition</u> .....	9
<u>III.2 Localisation</u> .....	10
<u>III.3 Caractères physico-chimiques des huiles essentielles</u> .....	10
<u>III.4 Composition chimique des huiles essentielles d'orange</u> .....	10
<u>III.5 Procédés d'extraction des huiles essentielles</u> .....	11
<u>III.6 Toxicité des huiles essentielles</u> .....	12
<u>III.7 Conservation des huiles essentielles</u> .....	12

## **Deuxième parties: Étude experimental**

### **Chapitre I: Matériel et méthodes**

<u>I.1 Matériel végétal</u> .....	15
<u>I.2 Préparation des extraits (des composés phénoliques et des flavonoïdes)</u> :.....	16

# Sommaire

---

<u>I.3</u>	<u>Caractérisation de la poudre de l'écorce d'orange</u> .....	17
<u>I.3.1</u>	<u>Tests photochimiques:</u> .....	17
<u>I.4</u>	<u>Extraction de l'HE</u> .....	18
<u>I.4.1</u>	<u>Matériel utilisé</u> .....	18
<u>I.4.2</u>	<u>Étude paramétrique</u> .....	19
<u>I.5</u>	<u>Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes</u> .....	20
<u>I.5.1</u>	<u>Dosage des poly phénols totaux</u> .....	20
<u>I.5.2</u>	<u>Dosage des flavonoïdes</u> .....	21
<u>I.6</u>	<u>Caractérisation de l'HE extraite</u> .....	21
<u>I.6.1</u>	<u>Caractéristiques organoleptiques</u> .....	21
<u>I.6.2</u>	<u>Caractéristiques physico-chimiques</u> .....	21
<u>I.6.2.1</u>	<u>Les caractères physiques</u> .....	21
<u>I.6.2.2</u>	<u>Caractères chimiques</u> .....	23
<u>I.7</u>	<u>Analyse chromatographique</u> .....	24
<u>I.7.1</u>	<u>Protocole de la CCM</u> .....	24
<u>I.8</u>	<u>Spectroscopies FTIR et UV-Visible</u> .....	26
<u>I.8.1</u>	<u>Spectroscopie UV-visible</u> .....	26
<u>I.8.2</u>	<u>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)</u> .....	27
<u>I.9</u>	<u>Évaluation de l'effet fongicide de l'HE extraite de déchets de Citrus sinensis</u> .....	28
<u>I.9.1</u>	<u>Matériel fongique</u> .....	28
<u>I.9.2</u>	<u>Matériels utilisés</u> .....	28
<u>I.9.3</u>	<u>Méthodes</u> .....	29
<u>I.9.4</u>	<u>Tests antifongiques</u> .....	30
<u>I.10</u>	<u>Activité antioxydant</u> .....	32

## Chapitre II : Résultats et discussion

<u>II.1</u>	<u>Extrait des écorces d'oranges</u> .....	34
<u>II.1.1</u>	<u>Le rendement</u> .....	34
<u>II.1.2</u>	<u>Tests photochimiques</u> .....	34
<u>II.2</u>	<u>Extraction de l'huile essentielle</u> .....	35
<u>II.2.1</u>	<u>Résultats d'extraction par hydrodistillation</u> .....	35
<u>II.2.2</u>	<u>Étude paramétrique</u> .....	36
<u>II.3</u>	<u>Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes</u> .....	37
<u>II.4</u>	<u>Caractéristiques organoleptiques et propriétés physico-chimiques</u> .....	38

# Sommaire

---

<u>II.5</u>	<u>Chromatographie sur couche mince (CCM)</u> .....	39
<u>II.6</u>	<u>Analyse spectroscopique</u> .....	40
<u>II.6.1</u>	<u>Spectroscopie UV/Visible</u> .....	40
<u>II.6.2</u>	<u>Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (FTIR)</u> .....	40
<u>II.7</u>	<u>Activités antifongiques l'Huile Essentielle</u> .....	41
<u>I.7.1</u>	<u>Identification de la souche fongique</u> .....	41
<u>I.7.2</u>	<u>Résultats de Culture In vitro</u> .....	42
<u>II.8</u>	<u>L'activité antioxydante</u> .....	45
	<b>Conclusion Générale</b> .....	(49-50)

## Référence

**LISTE DE FIGURE**

<b>Figure 1:</b> Différentes variétés d'agrumes .....	4
<b>Figure 2:</b> Part de la production de Fruits, agrumes par région .....	4
<b>Figure 3:</b> Coupe transversale d'une orange .....	6
<b>Figure 4:</b> Quelques variétés d'orange .....	7
<b>Figure 5:</b> Diagramme de transformation de l'orange .....	7
<b>Figure 6:</b> huile essentielle d'orange .....	10
<b>Figure 7:</b> Modes d'extraction des huiles essentielles .....	11
<b>Figure 8:</b> <u>Montage d'extraction par Hydro distillation</u> .....	12
<b>Figure 9:</b> Déchets d'orange coupées .....	15
<b>Figure 10:</b> Poudre des écorces d'oranges après broyage .....	16
<b>Figure 11:</b> Différentes étapes d'extraction .....	16
<b>Figure 12:</b> Montage de l'hydro distillation de type Clevenger (originale, 2023).....	18
<b>Figure 13:</b> Dispositif de décantation .....	18
<b>Figure 14:</b> Préparation du rapport L/S pour l'étude .....	20
<b>Figure 15:</b> Dosage des poly phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu .....	20
<b>Figure 16:</b> Réfractomètre numérique .....	22
<b>Figure 17:</b> (A) : avant le changement de couleur ; (B) : après le changement de couleur après un certain volume de KOH .....	23
<b>Figure 18 :</b> Papier PH (originale, 2023). .....	24
<b>Figure 19:</b> Différentes étapes de protocole « CCM » .....	25
<b>Figure 20:</b> Spectrophotomètre UV-visible .....	26
<b>Figure 21:</b> Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier .....	27
<b>Figure 22:</b> Préparation de pastille KBr .....	27
<b>Figure 23:</b> Moisissure grise sur fruit de tomate .....	28
<b>Figure 24:</b> Préparation du milieu de culture .....	29
<b>Figure 25:</b> la purification de la souche isolée .....	30
<b>Figure 26 :</b> Solution sporale .....	30
<b>Figure 27 :</b> Étude de l'activité antifongique de l'HE de déchets de Citrus sinensis sur Botrytis cinerea.....	31
<b>Figure 28:</b> Réduction de radical DPPH. ....	32

# LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

---

## LISTE DE TABLEAU

<b>Tableau 1 :</b> Caractéristiques organoleptiques des principaux types d'agrumes.....	3
<b>Tableau 2:</b> Parts de variétés d'agrumes (%) dans la production mondiale .....	4
<b>Tableau 3:</b> Les caractéristiques d'orange. ....	5
<b>Tableau 4:</b> Composition minérale d'orange .....	6
<b>Tableau 5:</b> Quelques possibilités de valorisation de ces sous-produits issue de la transformation de l'orange (La peau). ....	9
<b>Tableau 6:</b> Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'orange .....	11
<b>Tableau 7:</b> Tests photochimiques de la poudre d'orange. ....	17
<b>Tableau 8:</b> Étude l'effet du temps sur le rendement de l'HE. ....	19
<b>Tableau 9:</b> Matériel utilisé pour l'étude de l'activité antifongique. ....	29
<b>Tableau 10:</b> Rendement en extrait obtenus à partir de poudre d'écorce d'orange. ....	34
<b>Tableau 11:</b> Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques de d'écorce d'orange étudiée. ....	35
<b>Tableau 12:</b> Rendements d'HE de Citrus sinensis extraite par hydro distillation.....	35
<b>Tableau 13:</b> Densité optique des poly phénols totaux et flavonoïdes d'HE d'orange. ....	37
<b>Tableau 14:</b> Caractéristiques organoleptiques de Citrus sinensis. ....	38
<b>Tableau 15:</b> Caractéristiques physico-chimiques de l'HE de Citrus sinensis. ....	38
<b>Tableau 16:</b> Groupes fonctionnels d'huile de Citrus sinensis de spectre IR. ....	41
<b>Tableau 17:</b> Identifications macroscopique et microscopique de souche fongique isolées du fruit de tomate. ....	42
<b>Tableau 18:</b> Calcul des indices antifongiques pour le champignon Botrytis cinerea, en fonction du la concentration en huile essentielle du Citrus sinensis. ....	44
<b>Tableau 19:</b> Valeurs des concentrations efficaces et de l'activité anti radicalaires. ....	46

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance.

**AFNOR** : Association Française de normalisation.

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**DMSO**: Diméthyl sulfoxyde.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer

**FTIR** : Spectrométrie infrarouge à transformée et fourrier

**HE** : Huile essentielle.

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide Sulfurique.

**IA**: Indice d'acide.

**IC<sub>50</sub>**: Concentration inhibitrice de 50% (Inhibitory Concentration of 50%).

**KBr** : Bromure de potassium

**KOH** : hydroxyde de potassium.

**MeOH** : Méthanol

**Min** : Minute

**N**: Normalité

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

---

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.

**NaOH** : Soude.

**PAR**: pouvoir anti-radicalaire.

**PH** : Potentiel d'hydrogène.

**Rdt**: Rendement

**Rf** : Facteur de rétention

**T°** : Température.

**UV** : Ultra-violet.

# Introduction générale



L'orange est une plante médicinale importante de la famille des Rutacées. Elle est principalement utilisée dans les industries de transformation des fruits (le jus d'orange occupe la première place avec 1,74 million de tonnes), où l'écorce et les pépins riches en ingrédients nutritionnels et métabolites secondaires, sont généralement jetés en grande quantité sans être valorisés.

Ces déchets représentent 50 à 60% de la masse des fruits pressés <sup>[1]</sup>, ils sont très périssables et créent de graves problèmes pour ces industries et pour l'environnement où ils se trouvent, et d'autre par une perte de composés à haute valeur ajoutée.

La valorisation de ces déchets consiste en la récupération des composés tels que le limonène, L'extraction d'huile essentielle permet non seulement d'alléger l'impact écologique en minimisant la pollution mais aussi de proposer de nouvelles opportunités permettant un développement économique <sup>[2]</sup>.

La conversion de ces composés d'origine biologique en nouveaux produits, offre diverses utilisations dans l'industrie agroalimentaire comme ingrédients aromatisants, additifs alimentaires, conservateurs, comme anti-inflammatoires et antibactériens dans les industries pharmaceutiques, comme parfums, antioxydants ou conservateurs dans les industries parapharmaceutiques et cosmétiques <sup>[3]</sup>.

Dans ce contexte, notre travail a comme objectif la valorisation des déchets d'agrumes (orange) par l'extraction de l'huile essentielle en utilisant la méthode de l'hydro distillation de type Clevenger.

### **Ce mémoire est structuré en trois chapitres :**

- ❖ Le premier chapitre est une synthèse bibliographique présentée en un seul chapitre sur les huiles essentielles, les agrumes et sur les orangers d'une manière spécifique.
- ❖ Le deuxième chapitre détaille la méthode d'extraction de l'huile essentielle ainsi que les différentes analyses physico-chimiques et les protocoles expérimentaux préconisés pour évaluer leurs activités antifongiques et antioxydants.

# Première partie : Étude bibliographique

## I. Généralités sur les agrumes

### I.1 Définition

Les agrumes sont des arbres fruitiers. Ils produisent des fruits à la peau épaisse gorgée d'huile essentielle et très parfumée <sup>[4]</sup>.

Le mot agrume provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides <sup>[5]</sup> Composés de deux parties :

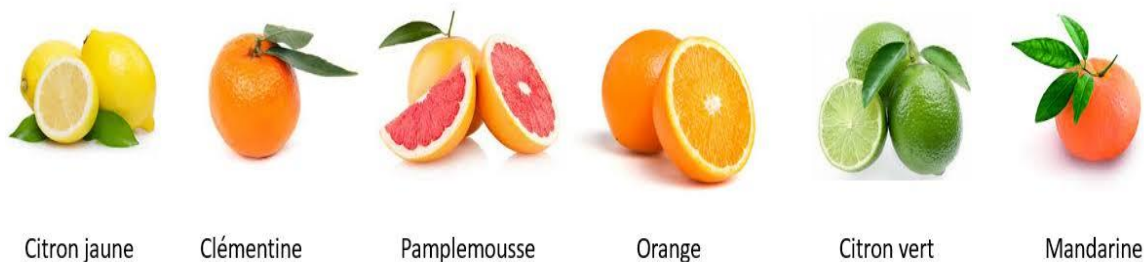
- La peau (la surface) : appelée le zeste riche en glande à huiles essentielles.
- La pulpe organisée en quartiers comprenant des pépins et de nombreux poils gorgés de jus <sup>[6]</sup>.

Les agrumes sont des baies modifiées ou ont une forme spécialisée de baie (**Hesperidium**) résultant d'un ovaire simple <sup>[7]</sup>. Ils présentent une grande diversité des fruits consommés : oranges, mandarines, clémentines, pomelos, citrons, limes, pamplemousses... <sup>[8]</sup>.

**Tableau 1 :** Caractéristiques organoleptiques des principaux types d'agrumes <sup>[9,10, 11, 12,13]</sup>.

	<b>Pamplemousse</b>	<b>Orange</b>	<b>Mandarine</b>	<b>Lime</b>
<b>Propriété gustative</b>	Doux	Doux	Doux	Acide
<b>Taille du fruit</b>	Grosse à très grosse	Moyenne	Petite à moyenne	Petite
<b>Teneur en sucre</b>	+	+ à ++	++	-
<b>Amertume</b>	- à ±	-	-	-
<b>Épaisseur de l'épiderme</b>	++	-	-	-
<b>Adhérence de l'épiderme</b>	+	++	-	++
<b>Présence de pépins</b>	- à +	- à +	- à +	- à +
<b>Teneur en jus</b>	±	++	+	+
<b>Coloration de l'épiderme</b>	<b>Climat Méditerranée</b>			
	Vert-jaune	Orange	Orange	jaune
	<b>Climat Tropical</b>			
	Verte-rose, partielle jaune	Verte	verte	verte
<b>Coloration de la pulpe</b>	Blanche, rose rouge	Orange à rouge	Orange	Jaune à verte

**Légende :** - nulle à faible ; + légère ; ± moyenne ; + important ; ++ très important.



**Figure 1:** Différentes variétés d'agrumes <sup>[14]</sup>.

## I.2 Production et consommation des agrumes

Les agrumes représentent la première catégorie fruitière en termes de valeur en commerce international ; cette importance est justifiée par leur :

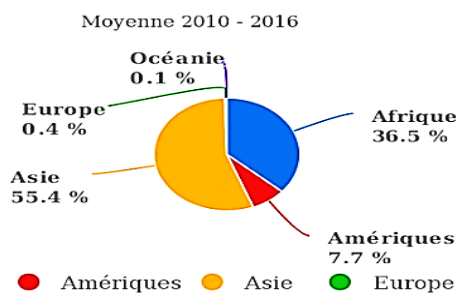
- Consommation comme des produit frais ou après leur transformation (jus ; sirop,...etc.).
- Grande qualité nutritive riche, en vitamine C, B6, et constituent une source de fibres d'acide ascorbique et folique, du potassium et du calcium.
- Effet bénéfique sur la santé en contribuant dans la diminution des risques de maladies cardio-vasculaires et d'autres maladies <sup>[15]</sup>.

### ➤ Dans le monde

Les agrumes (orange, mandarine, citron) sont parmi les fruits les plus abondants dans le monde, la production mondiale en agrume est considérée comme l'une des plus importantes dans le domaine agricole <sup>[16]</sup>, leur production se décline en quatre catégories ainsi réparties:

**Tableau 2:** Parts de variétés d'agrumes (%) dans la production mondiale <sup>[17]</sup>.

Variétés d'agrumes	Part dans la production mondiale
Oranges	54%
Tangerines, Mandarines	31%
Citrons	8%
Pamplemousses	7%



**Figure 2:** Part de la production de Fruits, agrumes par région <sup>[18]</sup>.

➤ **En Algérie**

Cette culture revêt une importance stratégique pour l'Algérie comme source d'approvisionnement en fruits et des débouchés sur le marché international des produits agrumicoles <sup>[19]</sup>.

Les agrumes se trouvent dans les plaines irrigables : la plaine de la Mitidja (44 %), le périmètre de la Mina et le Bas Cheliff (14 %), le périmètre de Bouna Moussa et la plaine de Safsaf (16%), la plaine de Hābra de Mascara (25 %) <sup>[20]</sup>. Les variétés d'oranges les plus cultivées sont la Thomson Navel et la Washington Navel avec plus de 65% alors que le reste est cultivé en citron, clémentine, mandarine et pamplemousse <sup>[21]</sup>. La consommation des fruits a rapidement augmenté en Algérie, résultat de la croissance de la population, et il n'y a pas eu d'augmentation effective de la productivité. Il faudrait créer de nouvelles plantations en utilisant des pépinières d'arbres sans virus pour pallier à ce problème, et augmenter par conséquent la production <sup>[22]</sup>.

## II. Généralités sur l'espèce étudiée: citrus sinensis

### II.1 Description

L'orange c'est un agrume de couleur orange appartient à la famille des rutacées de forme ronde ou allongée <sup>[23]</sup>, avec une peau épaisse et assez rugueuse, juteuse, sucrée ou légèrement acide et riche en vitamine C. Elles sont cultivées dans les régions temporaires et chaudes, comme les pays méditerranéens <sup>[24]</sup>.

**Les caractéristiques d'orange sont résumées dans le tableau ci-dessous**

**Tableau 3:** Les caractéristiques d'orange.

Parties de Fruit		Caractéristique
Écorce	Épicarpe	colore en orange, elle contient des glandes à huiles essentielles et présent 8 à 10 % de fruit
	Mésocarpe	partie interne colore blanchâtre, riche en pectines et présent 13 à 30 % de fruit
Pulpe		Juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés représente 50 à 80% du fruit
Les pépins		représentent de 0 à 4%,

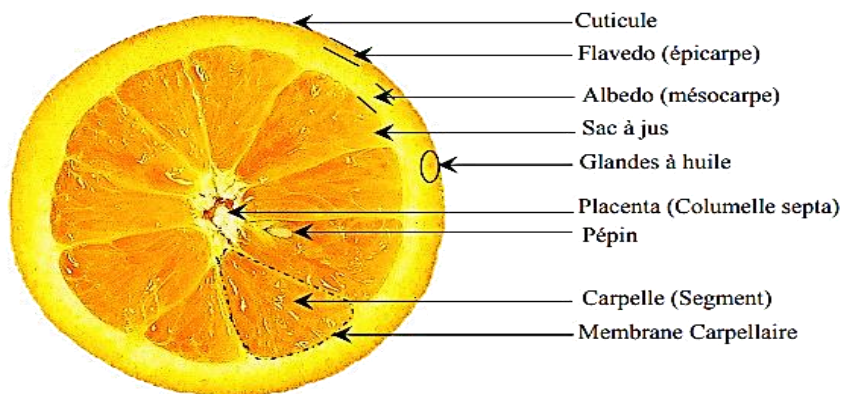


Figure 3: Coupe transversale d'une orange [25, 26].

## II.2 Composition d'orange

### ➤ Composition chimique

L'orange contient en moyenne 12 % de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C (80mg/100g), vitamines P, B1, B9, E, provitamine A. Riche en calcium (40 mg /100 g), riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion [27].

### ➤ Composition minérale

Tableau 4: Composition minérale d'orange [28].

Éléments	Quantité en mg
Potassium	126
Phosphore	23
Magnésium	11
Calcium	43
Sodium	1
Manganèse	0,029
Zinc	0,08
Cuivre	0,039
Fer	0,1

## II.3 Différentes variétés d'oranges

Le genre *Citrus* contient deux espèces d'orange. La première, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, correspond aux oranges douces, la deuxième, *Citrus aurantium* L., aux oranges amères [29].

- a. **Les Navels:** Ces oranges « blondes » leur chair est orange clair, avec peu ou pas de pépins, Parfumées et juteuses. Les plus connus sont Washington Navel, Thomson navel.

- b. **Les Valencia** : Bien colorée, juteuse et acidulée, elle est très consommée comme orange « tardive». la variété le plus connu est **Valencia late**.
- c. **Les sanguines**: Ces oranges « sanguines» leur pulpe est rouge parfois de saveur légèrement musquée. Les variétés les plus connu sont **Washington sanguine et maltais demi sanguine de Tunisie**.
- d. **Oranges douces** : la variété Meski est très connue en Afrique de nord <sup>[30,31]</sup>.



Figure 4: Quelques variétés d'orange <sup>[32]</sup>.

#### II.4 Technologie de transformation des oranges

La consommation d'orange fraîche est en baisse dans les pays industrialisés. Aujourd'hui la transformation d'agrumes représente environ un tiers de la production totale d'agrumes.

Plus de 80% de celui-ci rentre dans la transformation d'oranges, le plus souvent dans le processus de transformation en jus d'orange <sup>[33]</sup>.

Cette figure (5) **représente** le diagramme de transformation des oranges en jus :

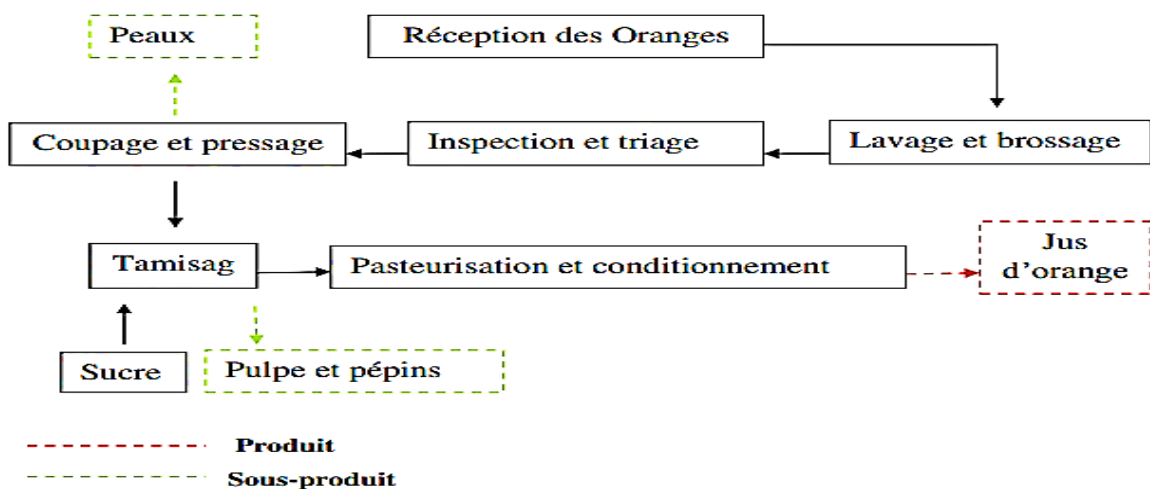


Figure 5: Diagramme de transformation de l'orange <sup>[34]</sup>.

Les oranges sont transportés en les usines de transformation (elles sont soit utilisées directement, soit déchargées dans des silos et stockées).Après la sélection et l'élimination des fruits abîmés, les oranges sont lavés à l'eau et calibrage. Le jus des fruits est extrait par pressage et centrifugation <sup>[35]</sup>.

Le jus ou le concentré du jus obtenu est stérilisé ou quelques fois pasteurisé (pour tuer les micro-organismes et d'inactiver les enzymes susceptibles d'altérer le produit et de le rendre impropre à la consommation humaine) <sup>[36]</sup>. Enfin, le jus pasteurisé ou stérilisé est transféré dans des emballages.

## **II.5 Sous-produits de transformation de l'orange**

Les produits résultant de la transformation d'orange sont les jus de fruits, les huiles essentielles et la peau. Cette dernière, avec la pulpe et les graines, constituent les résidus industriels et comptent pour 40 – 60 % du poids de la matière première <sup>[37]</sup>.

### **II.5.1 Graine**

Les graines représentent environ 0.08% du poids des oranges. Elles sont des sources importantes d'huiles d'importance alimentaire, industrielle et pharmaceutique. Les graines contiennent 17.3% de matière grasse et 477.1 mg/100 g de stérols totaux <sup>[38]</sup>.

### **II.5.2 Peau**

La peau d'orange est le sous-produit généré suite aux transformations d'orange. Elle constitue environ 50% du poids des fruits frais <sup>[39]</sup>. L'écorce d'orange est plus riche en polyphénols que la partie comestible du fruit <sup>[40]</sup>, ce qui lui confèrent une activité antioxydant et des effets thérapeutiques importants par rapport à d'autres parties du fruit <sup>[41, 42]</sup>. Mais plus souvent, elle est éliminée comme déchets contenant une grande variété de composants secondaires et d'huiles essentielles.

## **II.6 Valorisation des sous-produits de l'orange**

Les déchets résultant de la transformation des agrumes contiennent des molécules à haute valeur ajoutée telles que les flavonoïdes, les pigments, les huiles essentielles et les sucres, donc L'utilisation de ce résidu est une exigence fondamentale de l'industrie de



transformation de fruits, non seulement pour des raisons économiques, mais aussi pour réduire l'impact environnemental grave que cela pourrait induire en cas d'abandon <sup>[43]</sup>.

**Tableau 5:** Quelques possibilités de valorisation de ces sous-produits issue de la transformation de l'orange (**La peau**).

Sous-produits	Mode de valorisation	Résultat	Référence
<b>La peau</b>	Aliment pour bétail	une source appréciable d'aliments	[44]
	Extraction des composés bioactif et utilisation comme Antioxydants, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique	Des teneurs élevés en antioxydants et flavonoïdes	[45,48]
	Extraction de la pectine et utilisation comme gélifiant dans l'alimentation,	L'écorce de l'orange contient environ 50% de pectine.	[46, 44, 49]
	Les pâtes d'oranges (base naturelle pour parfumer et colorer les produits alimentaires).	richesse en pectines	[44]
	La production des biocarburants et des biogaz	richesse en sucre	[47]
	Extraction de Vitamines (vitamine C)	les écorces d'orange sont les plus riche en vitamine C (1,15 mg/ 100g bs)	[49]
	Extraction des huiles essentielle et utilisation comme agent de saveur (dans l'alimentation, cosmétique, parfums, savon et d'autres produits d'entretien ménager), l'industrie pharmaceutique, agents de conservation	L'huile essentielle de l'écorce d'orange contient principalement du Limonène.	[50, 51,52, 53]

### III. Les huiles essentielles

#### III.1 Définition

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances (molécules) variées, aromatiques (odorantes) et très volatiles, produites et obtenues à partir d'une matière première (plante) et présentes sous forme de minuscules gouttelettes, Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal <sup>[54]</sup>.

Il est important de distinguer essences et huiles essentielles <sup>[55, 56]</sup> :

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



**Figure 6:** huile essentielle d'orange <sup>[57]</sup>.

### III.2 Localisation

Les **HE** sont stockées dans tous les organes de la plante ; par exemple : les fruits (agrumes, badiane, anis) <sup>[58]</sup>.

Les **HE** sont produits dans le cytoplasme des cellules sécrétrices Situées en surface de la cellule. Elles sont alors stockées dans une cellule transformée en cellule à essence, ou des poils glandulaire, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs voire des papilles <sup>[59]</sup>.

### III.3 Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Liquides à température ambiante, les **HE** sont volatiles et ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (exceptée pour celle de la cannelle, de girofle et de sassafras). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques et des matières grasses qui lui servent d'excipients. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation et doivent donc être conservées dans un flacon en verre teinté au bouchon étanche <sup>[60, 61]</sup>.

### III.4 Composition chimique des huiles essentielles d'orange

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction <sup>[62]</sup>.

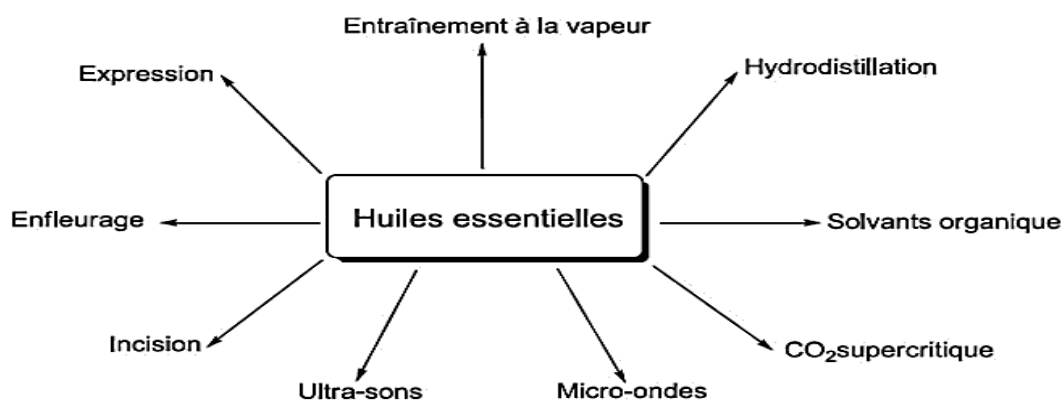
**Tableau 6:** Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'orange <sup>[63]</sup>.

Monoterpènes (Total) 89 -91(% de l'huile)	Hydrocarbures		Aldéhydes 1,8 (% de l'huile)		Alcools 0,9 (% de l'huile)		Esters 2,9 (% de l'huile)
d-limonène	83-90	α- pinène	0,5	Heptanal	3,0 %Des aldéhydes	Octanol	2,8
		β- pinène	1,0	Octanal	39,0	Décanol	-
		Myrcène	2,0	Nonanal	5,0	Linalol	5,3 (% de l'huile)
		γ- terpinène	0,1	Décanal	42,0		
		p-cymène	-	Citral	0,05 – 0,2 (% de l'huile)		

### III.5 Procédés d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction <sup>[64]</sup>.

Les principales méthodes d'extraction sont résumées dans le schéma suivant:

**Figure 7:** Modes d'extraction des huiles essentielles <sup>[65]</sup>.

La méthode d'extraction adoptée est l'hydrodistillation, elle est réalisée au Clevenger (**Figure 8**). L'hydrodistillation se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles.

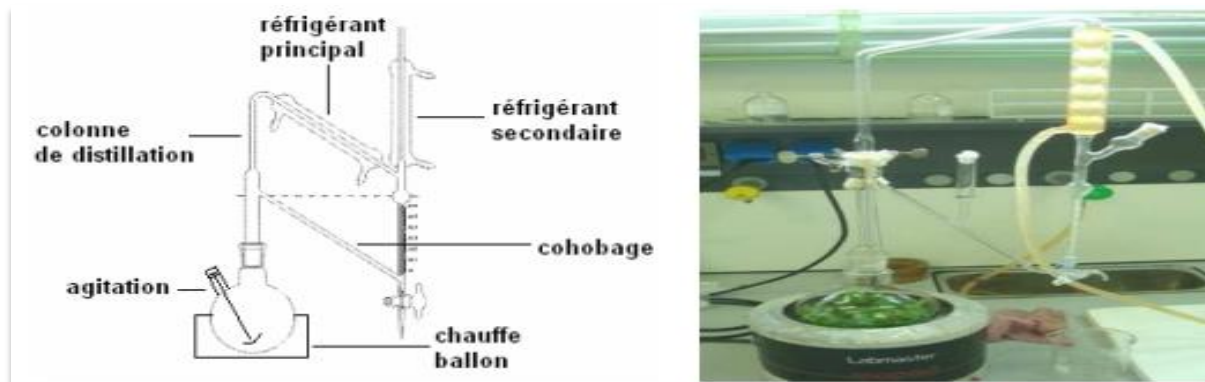


Figure 8: Montage d'extraction par Hydro distillation <sup>[66]</sup>.

On introduit une quantité suffisante de matériel végétal dans un ballon en verre contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. On chauffe le mélange à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargée d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical, puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée. En raison de la différence de densité, l'huile essentielle surnage à la surface de l'eau (La décantation) <sup>[67]</sup>.

### III.6 Toxicité des huiles essentielles

En dépit de leurs effets bénéfiques, les **HE** sont loin d'être non-toxique. La majorité des **HE**, à de très fortes doses, causent des effets toxiques <sup>[68]</sup>. Les essences d'agrumes sont toutes photo sensibilisantes, entraînant des réactions épidermiques après exposition au soleil: comme les essences de citron, d'orange douce ou encore d'orange amère <sup>[69]</sup>.

Il convient ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur les muqueuses (nez, yeux...etc.), ce type d'application nécessite une dilution systématique de l'huile essentielle <sup>[70,71]</sup>.

### III.7 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont fragiles et volatiles <sup>[72]</sup>. Elles doivent être conservées dans des flacons colorés, hermétiquement fermés, à l'abri de l'air, de la lumière et des variations de température.

Si les conditions citées ci-dessus sont respectées, les HEs Peuvent être conservées jusqu'à 2 à 5 ans en maintenant les flacons en position verticale.

# Deuxième partie : Étude expérimentale

# Chapitre I : Matériel et méthodes

L'étude expérimentale portant sur la valorisation de déchets de *Citrus sinensis* par l'extraction de l'huile essentielle à l'aide d'une hydro-distillateur type Clevenger, tests photochimiques de écorces de déchets, l'analyse de contrôle de qualité de l'huile essentielle et suivie par la méthodologie de l'étude de l'effet fongicide sur un champignon de type *botrytis cinerea* et Activité antioxydant par la méthode au DPPH.

## I.1 Matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de notre étude est un mélange de déchets des différentes variétés d'orange ^ *Citrus sinensis* ^. Celles-ci proviennent d'une Pizzeria située dans la ville de MEFTAH wilaya de BLIDA. Les fruits ont été achetés au Marché de Boufarik et ont été collectées au mois de Mars de l'année 2023.

### ➤ Écorces de déchets d'orange:

Au niveau du laboratoire 107 du département de biotechnologie agroécologie, les déchets utilisés ont été d'abord nettoyés de la poussière et des impuretés, lavées avec de l'eau de robinet en assurant qu'elles sont parfaitement propres (la partie extérieure seulement et en évitant de toucher la couche blanche intérieure) et après ils sont séchés avec du papier absorbant. Ensuite à l'aide d'un couteau de cuisine désinfecté, ils sont coupés en petits morceaux d'environ 2 cm maximum (**Figure 9**).



**Figure 9:** Déchets d'orange coupés (**originale, 2023**).

### ➤ Préparation du la poudre d'orange :

Un échantillon de 150 g a été séché à l'air libre pendant 20 jours, Une fois le matériel végétal séché, Il est par la suite broyé à l'aide d'un mixeur électrique (**Figure 10**), conservée dans des boites et stockée à l'abri de la lumière.



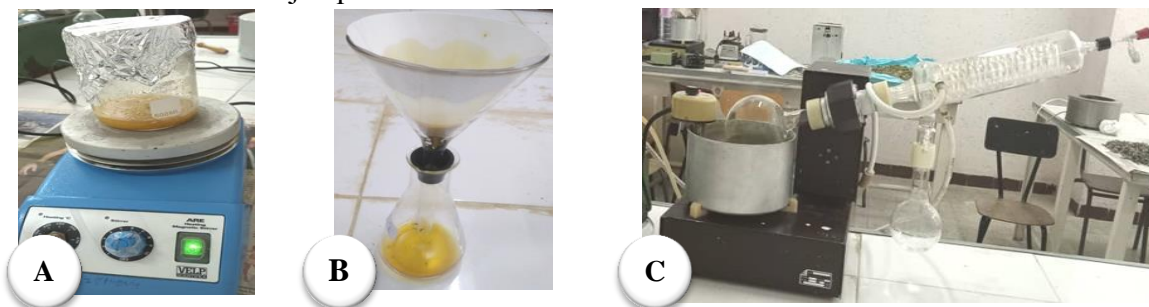
**Figure 10:** Poudre des écorces d'oranges après broyage (**originale, 2023**).

## I.2 Préparation des extraits (des composés phénoliques et des flavonoïdes) :

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser la matière végétale broyat dans l'éthanol aqueux pour extraire les composés phénoliques et flavonoïdes).

### ➤ Mode opératoire:

5 g de la poudre et 50 ml d'éthanol a 80% sont macérées sous agitateur magnétique pendant 1h, à température de 35°C (couvrir le bécher avec papier aluminium, afin d'éviter les phénomènes d'oxydation). Après filtration sur un papier filtre Wathman, Répéter la procédure trois fois (pour obtenir max quantité en composés phénoliques et flavonoïdes). La solution obtenue évapore à l'aide d'un évaporateur rotatif qui permet a éliminé le solvant sous vide. Le filtrat est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation <sup>[73]</sup>.



(A) La macération, (b) filtration, (c) Évaporateur rotatif

**Figure 11:** Différentes étapes d'extraction (**originale, 2023**).

### ➤ Détermination du rendement:

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec des écorces d'oranges, en calculant le rapport selon la formule suivante:

$$Rdt(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \quad \text{(Equation I.1)}$$

- $m_1$ : masse du ballon après évaporation.
- $m_2$ : masse du ballon avant évaporation.
- $m_3$ : masse de la matière végétale initiale.



### I.3 Caractérisation de la poudre de l'écorce d'orange

#### I.3.1 Tests photochimiques:

Cet examen permet de détecter la présence ou l'absence Certaine constituante chimique à partir d'extrait de plantes ou directement sur la poudre d'échantillon à analyser.

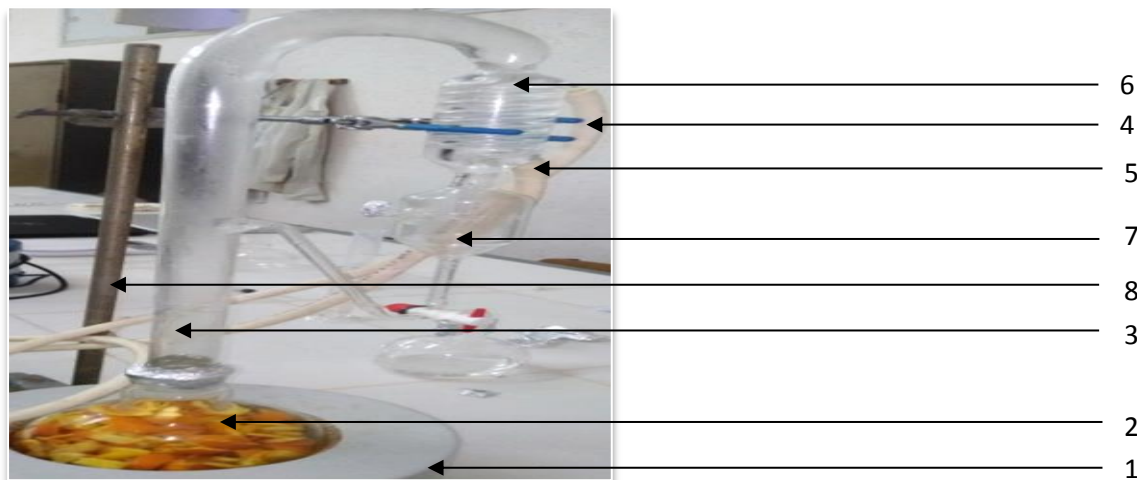
**Tableau 7:** Tests photochimiques de la poudre d'orange.

Test	Protocol	Résultat (la présence)	Référence
<b>Flavonoïdes</b>	placer 2 ml d'extrait obtenue dans un tube à essai contenant de l'alcool chlorhydrique (4ml éthanol + 1ml HCl concentré) puis ajouter 2 ou 3 morceaux de magnésium	un couleur: Rose-orange ou violacée.	[74]
<b>composés phénoliques</b>	Peser 400 mg de broyat de chaque plante dans un récipient en verre (tube à essai), puis additionner 4 ml de l'eau distillée et 12 ml d'acétone ; le tous est placer dans un bain marie à température 60°C pendant 5 min avec agitation de temps en temps. Filtrer sur un papier filtre, recueillir le filtrat obtenu dans un tube à essai et ajouter 1 à 2 gouttes de FeCl <sub>3</sub> 10%.	un couleur: vert noirâtre.	[75]
<b>Tanins</b>	La présence de tanins est démontrée en ajoutant à chaque extrait dilué (1/10), 1 à 2 gouttes de solution de FeCl <sub>3</sub> (0.1%).	un couleur: vert foncé, noir bleu	[76]
<b>Saponosides</b>	Ajoutez à 5 ml d'extrait un volume de 10ml d'eau distillée, agité pendant 2mn.	une mousse persistante pendant 15 mn	[77]
<b>Stéroïde</b>	2 ml d'anhydride d'acide acétique ont été ajoutés au résidu de chaque extrait avec 2 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	un couleur: vert, bleu ou violet	[78]
<b>Terpénoïdes</b>	5 ml de chaque extrait ont été mélangés dans 2 ml de chloroforme. 3 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré ont ensuite été ajoutés pour former une couche.	un couleur: brun rougeâtre à l'interface formée	[78]
<b>Alcaloïdes</b>	1 ml de chaque extrait est pris en tubes avec 5 gouttes de réactif Wagner	un précipité	[79]
<b>Mucilages</b>	introduire 10 ml d'NaOH de ou MeOH dans un tube à essai contenant l'extrait	un précipité violet ou bleu	[80]
<b>Quinones</b>	La présence de quinones est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10 aux résidus	un couleur vire au jaune, rouge ou viole	[80]

## I.4 Extraction de l'HE

### I.4.1 Matériel utilisé

Pour l'extraction d'huile essentielle de *Citrus sinensis*, la méthode d'hydro distillation type Clevenger. Le montage utilisé est présenté dans la **figure 12**.



- |                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| 1. Chauffe ballon.      | 5. Sortie d'eau chaude. |
| 2. Ballon.              | 6. Réfrigérant.         |
| 3. Colonne e verre.     | 7. Ampoule à décanter.  |
| 4. Entrée d'eau froide. | 8. Support métallique.  |

**Figure 12:** Montage de l'hydro distillation de type Clevenger (**originale, 2023**).

#### ➤ Mode opératoire :

Dans un ballon en verre d'une capacité de 2L, on pose 800g de déchets d'orange, puis on ajoute un volume d'eau distillé qui correspond à 2/3 de la capacité du ballon pour éviter le débordement lors de l'ébullition, On a placé le dans le chauffe-ballon pendant 2 heures et 30 min.

Les vapeurs chargées de substances volatiles passent dans un long tube vertical (colonne de distillation) traverse le réfrigérant se condensent, ensuivent le distillat (huile + eau) est récupéré dans une ampoule à décanter, les phases se séparent par une différence de densité (**Figure 13**).



**Figure 13:** Dispositif de décanation (**originale, 2023**).

On le récupère dans **des eppendorfs** transparentes couvert en papier aluminium et bien fermé, en suite les conservées au réfrigérateur à 4°C pour éviter la dégradation d'huile essentielle.

➤ **Détermination du rendement en huile essentielle**

Le rendement en huile essentielle (**RHE%**) est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE récupéré après l'extraction (**M**) et la masse de matière végétale utilisée (**M<sub>0</sub>**), exprimé dans la même unité de masse. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE \%} = M / M_0 \times 100 \quad \text{(Equation I.2)}$$

Avec:

- **RHE (%)**: Rendement de l'huile essentielle en pourcentage.
- **M** : masse d'huile essentielle récupérée exprimée en g.
- **M<sub>0</sub>** : quantité de matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

#### I.4.2 Étude paramétrique

Pour les paramètres liés à la nature du procédé d'extraction, on a essayé d'étudier l'influence du temps et le rapport liquide/solide (L/S).

➤ **Temps d'extraction**

L'étude de l'influence de ce paramètre sur l'extraction est effectuée en maintenant la température et le rapport L/S constants. Les durées d'extraction étudiées sont : 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 ; 120 ; 140 et 160 min.

**Tableau 8:** Étude l'effet du temps sur le rendement de l'HE.

Temps (min)	20	40	60	80	100	120	140	160
rapport L/S (ml /g)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

➤ **Effet du rapport liquide-solide (L/S)**

La recherche du rapport L/S optimal, c'est-à-dire le meilleur volume de solvant pour une quantité de 200 g d'écorces nécessaire à l'obtention d'un rendement maximum. Les valeurs étudiées sont : 200, 300, 400,500 ml (**Figure14**).



Figure 14: Préparation du rapport L/S pour l'étude (originale, 2023).

## I.5 Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes

### I.5.1 Dosage des poly phénols totaux

La teneur en phénols totaux des différents extraits de Juniperus a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode <sup>[81]</sup>, avec quelques modifications.

#### ➤ Mode d'opération :

On mélange **500 µl** de l'extrait dilué de chaque l'huile essentielle (d'orange) avec **2500 µl** de folin ciocalteu dilué **1/10**, le mélange est incubé pendant 3 minutes à température ambiante. Après on ajoute **2000 µl ml** de **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5 %)**

Les tubes sont ensuite passés dans un bain marie à **50°** pendant 5 min. Une fois refroidis, l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à **760 nm**.

Le blanc a été préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par l'éthanol.

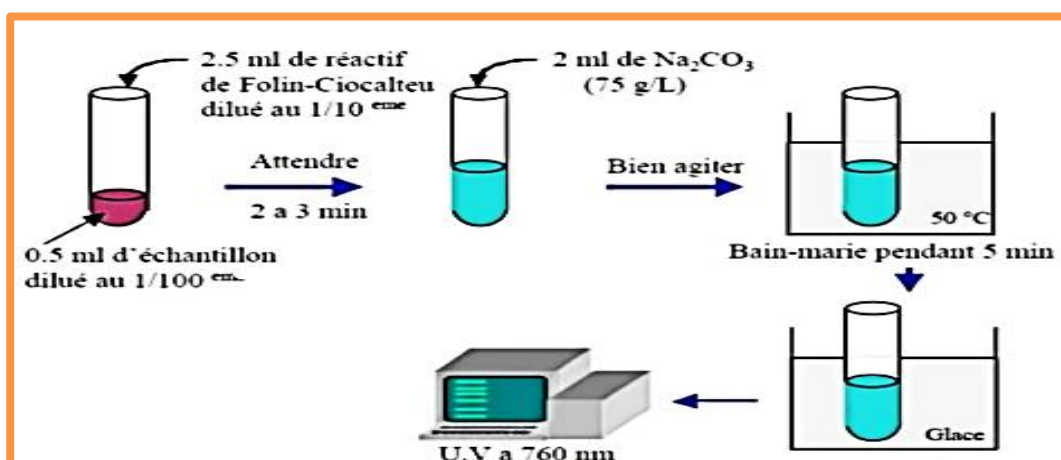


Figure 15: Dosage des poly phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu <sup>[82]</sup>.

### I.5.2 Dosage des flavonoïdes

On mélange **1000 µl** de l'extrait dilué de chaque l'HE (d'orange) avec **1000 µl** de solution de AlCl<sub>3</sub> 2%.

Après **10 min** d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la lecture de l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à **430nm**.

Le témoin est préparé de la même manière on remplace l'extrait par **1000 µl** d'éthanol <sup>[81]</sup>.

## I.6 Caractérisation de l'HE extraite

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

### I.6.1 Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques : aspect, odeur, couleur, de l'huile essentielle *Citrus sinensis* obtenues ont été notées par l'utilisation des différents organes des sens.

### I.6.2 Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques organoleptiques donnent des informations très limitées sur ces essences donc, il est nécessaire de faire d'autres techniques de caractérisation plus précises pour la qualité d'huile essentielle et sa valeur commerciale.

Ces analyses sont faites en conformité aux normes A.F.N.O.R (1994).

#### I.6.2.1 Les caractères physiques

##### a. Détermination de la densité relative d<sup>20</sup>:

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport entre la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C, et la masse du même volume d'eau distillée pris à la même température.

##### ➤ Mode opératoire :

- A l'aide d'une balance électronique, **un eppendorf** propre, sec et vide a été pesée.
- On remplit l'**eppendorf** avec 1,5 ml d'eau distillée puis on pèse l'ensemble.

- De la même manière, on répète les étapes avec le même volume l'huile.

➤ **Méthode de calcul :**

La densité est donnée par la formule:

$$d^{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \quad \text{(Equation I.3)}$$

Avec :

- $m_0$  : masse de l'épandeur vide en g.
- $m_1$  : masse d'ensemble (l'épandeur et l'eau distillée) en g.
- $m_2$  : masse de (l'épandeur et l'HE) en g.

Dans le cas où l'expérience est effectuée à une température (T) différente à 20°C, on ajoute le facteur de correction :

$$d^{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) + 0.0007 (T - 20) \quad \text{(Equation I.4)}$$

**b. Indice de réfraction  $I_{20}$  :**

L'indice de réfraction est considéré comme un critère de pureté d'une huile, Il consiste à déterminer le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'HE à une température constante (20°C).

La mesure des indices de réfraction de notre échantillon a été réalisée au niveau du Laboratoire **VENUS SAPECO** à l'aide d'un réfractomètre numérique de marque Anton Paar Abemat (**Figure 16**).



**Figure 16:** Réfractomètre numérique (**originale, 2023**).

➤ **Mode opératoire :**

- Réglage du réfractomètre en mesurant les indices de réfraction à 20 °C.
- Après nettoyage de milieu du prisme avec l'eau distillée, déposer quelques gouttes de l'HE sur la platine de l'échantillon.
- ensuite fermer le prisme et appuyer sur la touche READ.
- finalement, on lise le résultat.

➤ **Méthode de calcul**

L'indice de réfraction, à la température de référence 20 °C, est donné par l'équation suivante :

$$I_d^{20} = I + 0,0003 (T - 20 \text{ °C}) \quad \text{(Equation I.5)}$$

Avec:

**I** : la valeur l'indice de réfraction obtenu à la température de mesure.

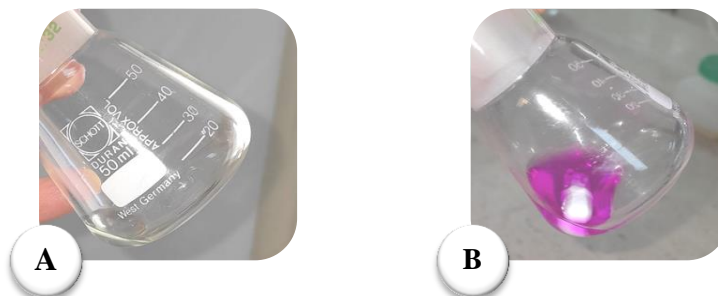
### I.6.2.2 Caractères chimiques

#### a. Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide  $I_A$  est défini comme le nombre qui exprime en milligrammes la quantité à (**KOH**) nécessaire pour neutraliser les acides libres présents dans 1g d'**HE**.

➤ **Mode opératoire :**

- A l'aide d'une balance analytique, 0,5g d'huile essentielle ont été pesés dans une erlenmeyer de 50 ml et on les dissout dans 5 ml d'éthanol de 96 % puis on ajoute 3 gouttes de phénol phtaléine comme indicateur coloré.
- Avec agitant, on Titre la solution obtenue par KOH (0,1N) contenue dans la burette jusqu'au virage de la couleur vire vers le rose, on arrête le titrage.
- A la fin on prend le volume exact de KOH (0,1N) utilisé pour le calcul de l'indice.



**Figure 17:** (A) : avant le changement de couleur ; (B) : après le changement de couleur après un certain volume de KOH (**originale, 2023**).

➤ **Méthode de calcul**

L'indice d'acide ( $I_A$ ) est donné par l'équation suivante :

$$I_A = \frac{(V \times 56,1 \times N)}{m} \quad \text{(Equation I.6)}$$

Avec:

- $I_A$  : Indice d'acide
- $V$  : volume de KOH utilisé pour le titrage (en ml).

- **56,1** : est la masse molaire de KOH, exprimée en grammes par mole.
- **N** : normalité de la solution de KOH.
- **m** : Masse d'huile essentielle en gramme.

### b. Détermination du pH

Le pH s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide (si le pH est inférieur à 7), basique (s'il est supérieur à 7) ou neutre (le PH égale à 7).

Cette grandeur permet d'évaluer la concentration de l'ion hydrogène (H<sup>+</sup>) en solution.

#### ➤ Mode opératoire

En raison de l'insuffisance d'huile essentielle disponible, nous mesurons le pH de l'HE de *Citrus sinensis* à l'aide d'un papier pH au lieu d'un pH mètre.

On a mis quelques gouttes des HE sur un bout de papier pH, après le changement de la couleur du papier on la compare avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH.



Figure 18 : Papier PH (originale, 2023).

## I.7 Analyse chromatographique

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique et contrôle, repose sur la séparation différence d'affinités des composés du mélange étudié à l'aide de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile.

### I.7.1 Protocole de la CCM

#### a) Préparation de la cuve

- l'éluant ou La phase mobile : dans un bécher de 250 ml et à l'aide d'un éprouvette en verre, on verse 5 ml de l'Acétone et 5 ml d'autre avec l'Hexane puis on mélange l'ensemble.
- On verse environ 0,5 à 1 cm d'éluant dans la cuve à chromatographie que l'on referme avec un couvercle afin d'éviter l'évaporation des solvants.

#### b) Préparation de la plaque chromatographique

- Prendre une plaque d'aluminium recouverte de silice, elle est très fragile. Éviter de la toucher avec les doigts.



- Avec crayon et sans appuyer, on trace un trait à 1,5cm (la ligne de dépôt) du bas de la plaque de CCM.
- On Marque légèrement sur cette ligne, le (ou les) emplacement(s) où l'on déposera les solutions à analyser, elles doivent être distants d'environ 1cm et à 1 cm des bords de la plaque.

### c) Dépôt de l'échantillon

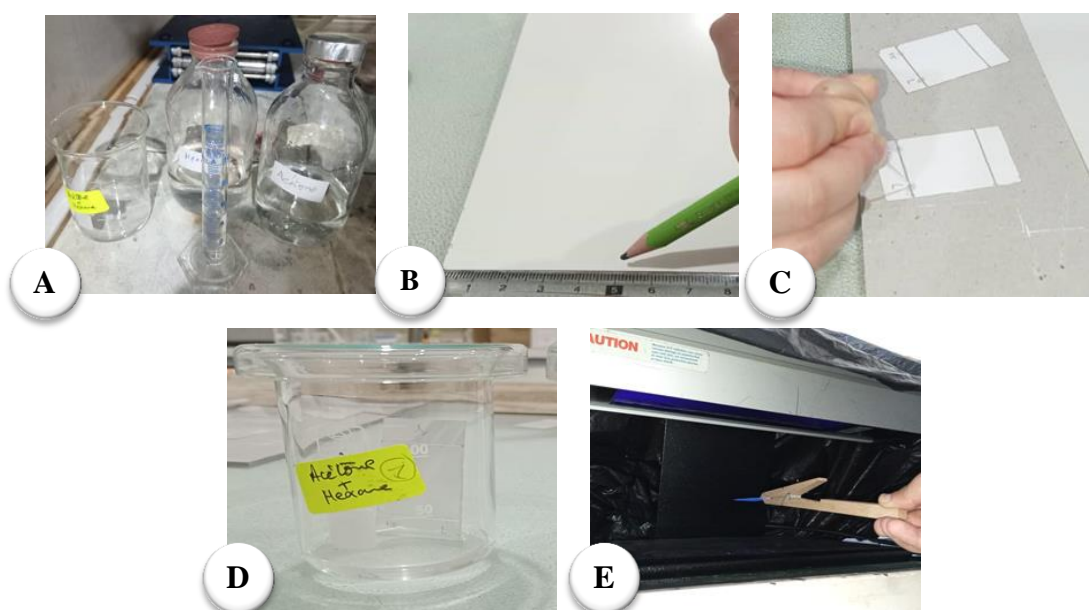
- On dissout l'huile essentielle et le référence (limonène) dans l'Hexane, puis à l'aide d'un capillaire les échantillons sont déposés sur la ligne de dépôt.

### d) Éluion

- On introduit la plaque verticalement dans une cuve et on s'assurer que le niveau de l'éluant dans la cuve ne dépasse pas la ligne de dépôt.
- Une fois que qu'il arrive à ligne de front, on retire la plaque puis nous la séchant à l'air libre.

### e) Révélation

- Pour les composés incolores, il est nécessaire de faire apparaître les taches, pour cela On utilise une lampe à ultraviolet ensuite entoure chaque tache au crayon.



**Figure 19:** Différentes étapes de protocole « CCM » (originale, 2023).

Pour caractériser la position du limonène sur la plaque, nous calculons le rapport frontale  $R_f$  qui est défini par l'expression suivante :

$$R_f = \frac{\text{hauteur du tache}}{\text{hauteur du front de l'éluant}} \quad \text{(Equation I.7)}$$

## I.8 Spectroscopies FTIR et UV-Visible

Les deux analyses sont effectuées au niveau du Laboratoire 140 au Département de Génie des procédés à l'Université de Blida 1.

### I.8.1 Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance du rayonnement par les espèces chimiques présentes dans une solution.

Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un UV-VIS Spectrophotomètre 1700 de type Shimadzu.



**Figure 20:** Spectrophotomètre UV-visible (**originale, 2023**).

➤ **Mode opératoire :**

- On nettoie la cuve en quartz avec du solvant (cyclohexane).
- On remplit la cuve de référence avec du cyclohexane, le placer dans le spectromètre UV et appuyer sur zéro.
- On dissout quelques gouttes d'HE dans le cyclohexane, puis on remplit une nouvelle cuve en quartz avec l'ensemble.
- On met la cuve pleine dans le spectromètre UV.
- On répète les mêmes étapes et remplace l'HE avec limonène.

### I.8.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge est une méthode de mesure qualitative et quantitative basé sur l'analyse d'un rayonnement infrarouge à travers l'échantillon. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer une topographie des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

L'appareil utilisé pour réaliser cette analyse est un spectrophotomètre **IRTF -8900** de type Shimadzu.



**Figure 21:** Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (**originale, 2023**).

#### ➤ Mode opératoire :

- On Mettre 20 mg de KBr dans le moule pour obtenir une pastille translucide, place le dans la presse à pastille et presser l'échantillon jusqu'à 5 tonnes maximum.
- On démoule la pastille de KBr et placer dans le support, puis on verse quelques gouttes d'huile essentielle à la surface.
- La pastille introduit dans l'appareil pour l'analyse qui se fait en mode transmission.
- Le test est piloté par ordinateur pour permettre l'analyse statistique des données spectrales.



**Figure 22:** Préparation de pastille **KBr** (**originale, 2023**).

## I.9 Évaluation de l'effet fongicide de l'HE extraite de déchets de *Citrus sinensis*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de P F E au Département de biotechnologie et science agronomie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Univers Blida1.

Le but principal de ce test est d'étudier la possibilité d'appliquer l'huile essentielle de *Citrus sinensis* et d'évaluer leur effet antifongique sur le champignon ***Botrytis cinerea*** s'il existe.

### I.9.1 Matériel fongique

L'espèce fongique qui a fait l'objet de cette étude est :

***Botrytis cinerea***: est un champignon Ascomycète de croissances très rapides responsables de la pourriture grise de nombreuses plantes cultivées et sauvages. Cette maladie se développe plus facilement dans certaines circonstances liées aux conditions climatiques, à la sensibilité de la plante elle-même et aux facteurs culturaux.

Dans le cas de tomate qu'est un produit stratégique en Algérie et classée la cinquième culture dans le pays <sup>[83]</sup>. Elle est sujette aux attaques de nombreuses maladies cryptogamiques ayant un impact décroissant sur le rendement et la qualité des fruits. La moisissure grise causée par *Botrytis cinerea* est l'une des maladies redoutable et importante sur cette culture.

Elle possède une large gamme d'hôtes et conduit à des pertes importantes de rendement <sup>[84]</sup>.



**Figure 23:** Moisissure grise sur fruit de tomate (originale, 2023).

### I.9.2 Matériels utilisés

Le matériel utilisé pour réaliser les différents tests est le suivant :

**Tableau 9:** Matériel utilisé pour l'étude de l'activité antifongique.

Matériel
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ huile essentielle de Citrus sinensis</li><li>▪ l'eau distillée</li><li>▪ l'eau physiologique</li><li>▪ solution DMSO</li><li>▪ Tween 20</li><li>▪ PDA (Potato Dextrose Agar)</li><li>▪ acide citrique</li><li>▪ bleu de Méthylène</li><li>▪ Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre</li><li>▪ tubes à essai</li><li>▪ Pipettes Pasteur</li><li>▪ Tubes coniques en plastique stérile</li><li>▪ Micropipette (20µL et 50µL)</li><li>▪ Papier Wattman</li><li>▪ Bécher</li><li>▪ Microscope optique</li><li>▪ Vortex</li><li>▪ Autoclave</li><li>▪ Étuve</li></ul>

### I.9.3 Méthodes

#### a) Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture a été préparé comme suivant :

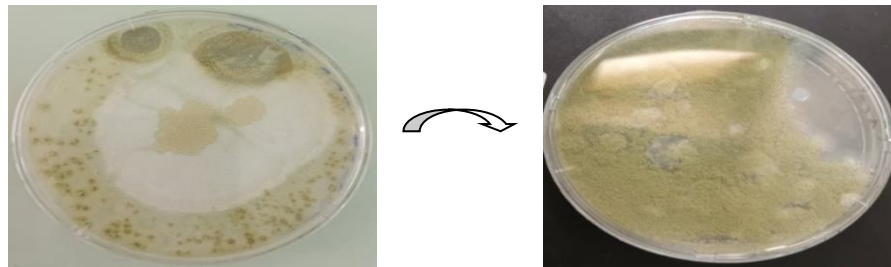
- 39g de PDA sont solubilisées dans 1 litre d'eau distillée et mis chauffer doucement jusqu'à homogénéité de mélange. Ce milieu est autoclavé à 121 °C pendant 30 mn sous une pression inférieure à 2 bars.
- Une fois le milieu refroidit, l'acide citrique (bactéricide) est ajouté au moment de sa distribution dans les boîtes de pétri, puis On laisse ces boîtes sur la paillasse pour solidifier.



**Figure 24:** Préparation du milieu de culture (originale, 2023).

**b) Purification**

A partir d'une tomate contaminée, nous avons procédé à la purification d'une souche de champignon, en fait plusieurs répétitions avec les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention des colonies pures (**Figure 25**).



**Figure 25:** la purification de la souche isolée (**originale, 2023**).

**c) Identification des isolats**

L'identification des champignons contaminants le tomate repose sur :

- **Identification macroscopique :** Cette étude s'est basée sur l'observation à l'œil nu des colonies qui ont développé sur le milieu PDA (L'aspect et la texture de la colonie, La couleur de la surface (recto) et du revers de la boîte (verso), La vitesse de croissance, la pigmentation des spores).

- **Identification microscopique :** on fait une observation au microscope à l'objectif 40 (Gx400) avec une coloration au Bleu de méthyle.

**I.9.4 Tests antifongiques****a) Préparation de suspension sporale de la souche fongique**

On racle à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et identiques âgées de 5 jours. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans tube conique en plastique, contenant une solution de l'eau physiologique à 0.9 % et 2 gouttes de Tween 20. Finalement, on homogénéise la suspension à l'aide d'un vortex.



**Figure 26 :** Solution sporale (**originale, 2023**).

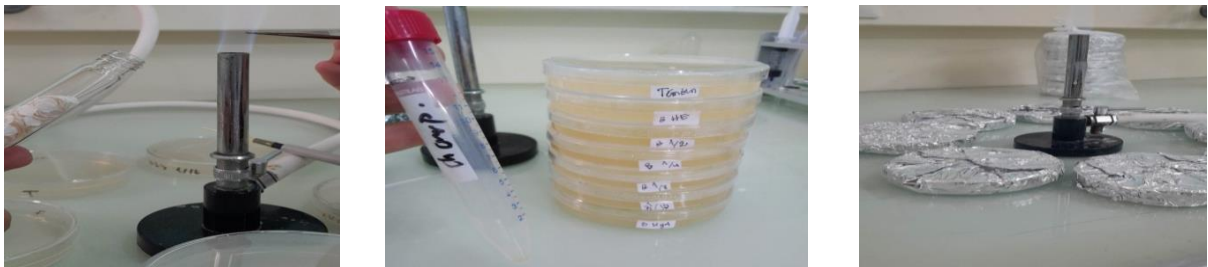
### b) Préparation des dilutions d'huile essentielle

Pour pouvoir obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle de déchets d'orange, Une solution mère SM a été préparée par un mélange de L'extrait avec le DMSO ensuite quatre concentrations des dilutions ont été réalisées :  $\frac{1}{2}$  ;  $\frac{1}{4}$  ;  $\frac{1}{8}$  ;  $\frac{1}{16}$  (en  $\mu\text{l}$ ).

### c) Culture in vitro

La méthode de dilution en milieu liquide est utilisée, elle consiste à :

- huit tubes à essais sont préparés de la façon suivante :
  - **Tube 1 (témoin) :** 15ml PDA + sans HE
  - **Tube 2 (contrôle positive) :** 15ml PDA+50 $\mu\text{l}$  de DMSO
  - **Tube 3:** 15ml PDA + 50 $\mu\text{l}$  d'HE pure
  - **Tube 4:** 15ml PDA + 50 $\mu\text{l}$  de HE concentration  $\frac{1}{2}$
  - **Tube 5:** 15ml PDA + 50 $\mu\text{l}$  de HE concentration  $\frac{1}{4}$
  - **Tube 6:** 15ml PDA + 50 $\mu\text{l}$  de HE concentration  $\frac{1}{8}$
  - **Tube 7:** 15ml PDA + 50 $\mu\text{l}$  de HE concentration  $\frac{1}{16}$
  - **Tube 8:** 15ml PDA + 50 $\mu\text{l}$  d'hydrolat d'HE
- On passe chaque tube au vortex pour homogénéiser, verser dans les boîtes de pétri et laisse sur la paillasse pour solidifier.
- A l'aide d'une anse stérile, on place les disques de champignon au centre des boîtes (1disque/boîte).
- Chaque concentration est répétée trois fois.
- Les boîtes préparées ont été fermées et incubées 5 jours à l'étuve à température 24°C.
- Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition mesuré à l'aide d'une règle en (mm).



**Figure 27 :** Étude de l'activité antifongique de l'HE de déchets de *Citrus sinensis* sur *Botrytis cinerea* (**originale, 2023**).

## I.10 Activité antioxydant

### ➤ Estimation du pouvoir anti radicalaire par la méthode au DPPH

Le **DPPH** est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons <sup>[85]</sup>.

### ➤ Mode opératoire

1950µL de solution méthanolique de **DPPH** est ajouté à 50µL de différentes concentrations de la solution d'extraits, on agite chaque mélange, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Le blanc (le contrôle négatif) est préparé par remplacement d'extrait par le méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard.

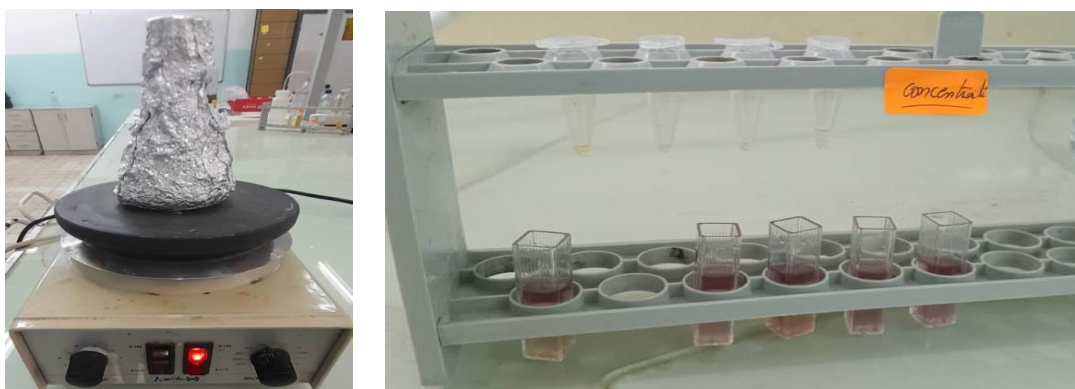
La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### ➤ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition et d'IC50 (concentration inhibitrice de 50 %).

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon **équation I.7** <sup>[86]</sup>:

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \quad (\text{Equation I.7})$$



**Figure 28:** Réduction de radical DPPH (originale, 2023).



# Chapitre II : Résultats et discussion

Dans ce dernier chapitre, nous présenterons les résultats des expérimentations que nous avons obtenus dans notre étude à partir de l'extraction et la caractérisation d'extrait de poudre d'écorce, d'huile essentielle jusqu'aux résultats de l'étude de l'activité antifongique et activité antioxydante de cette huile.

## II.1 Extrait des écorces d'oranges

### II.1.1 Le rendement

L'extraction des composés phénoliques dans l'écorce d'orange nous a permis de calculer le rendement de l'extrait en pourcentage (%) (**Tableau 11**).

**Tableau 10:** Rendement en extrait obtenus à partir de poudre d'écorce d'orange.

L'extrait	Le solvant utilisé	Rendement %
Extrait brut	éthanol	<b>38,3</b>

Le taux de rendement d'écorce obtenu dans notre travail est supérieur à celui obtenu par <sup>[86]</sup> avec **32,83 %**, ils ont utilisé l'éthanol comme solvant d'extraction. Et pour <sup>[87]</sup> avec un pourcentage de 36% ; ce dernier a utilisé le méthanol comme solvant d'extraction.

Cette différence dans les résultats peut être liée à plusieurs facteurs tels la méthode d'extraction choisie, le solvant utilisé et sa polarité, l'origine géographique de la plante étudiée ainsi que sa préparation (conservation, séchage et broyage) <sup>[88]</sup>.

### II.1.2 Tests photochimiques

Les tests photochimiques consistent à détecter les familles de métabolites secondaires existants dans **l'écorce d'orange** réduit en poudre par des réactions qualitatives de caractérisation, qui sont des réactions basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques.

Les résultats effectués sur l'extrait brut de **Citrus sinensis** sont regroupés dans le (**Tableau 12**).

**Tableau 11:** Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques de d'écorce d'orange étudiée.

Familles chimiques	Réaction de caractérisation	Résultats
Flavonoïdes	orange	++
composés phénoliques	vert noirâtre	+++
Tanins	vert foncé	+++
Saponosides	Absence	–
Stéroïde	vert	++
Terpénoïdes	brun rougeâtre	+++
Mucilages	Absence	–
Quinones	jaune	++

(-) : Absence. (++) : Présence moyenne. (+) : Présence faible. (+++) : Présence forte.

Nous remarquons que l'extrait testé est riche en composés phénoliques, flavonoïdes, les tanins tel que les tanins catéchiques, en Stéroïde, Terpénoïdes et Quinones. Ces composés possédant diverses propriétés notamment anti-inflammatoires, antibactériennes, antiseptiques, antioxydants et antivirales <sup>[89]</sup>. Par contre, les Saponoside et les Mucilages sont absents dans l'extrait étudié.

Les résultats photochimiques de <sup>[90]</sup> ont montré la présence des alcaloïdes et les terpénoïdes et l'absence des quinones dans l'écorce d'orange, ce qui est contraire avec nos résultats.

Cette différence peut être liée à la composition chimique de l'ensemble des agrumes et de leurs sous-produits peut varier en fonction de l'écologie et du stade de maturation de ces derniers <sup>[91, 92]</sup>.

## II.2 Extraction de l'huile essentielle

### II.2.1 Résultats d'extraction par hydrodistillation

Le résultat du rendement de l'huile essentielle des écorces obtenu par hydro distillation type Clevenger est exprimé en pourcentage dans le (Tableau 13).

**Tableau 12:** Rendements d'HE de Citrus sinensis extraite par hydro distillation.

Poids végétal(g)	Rendement en H.E(%)
800	0,26

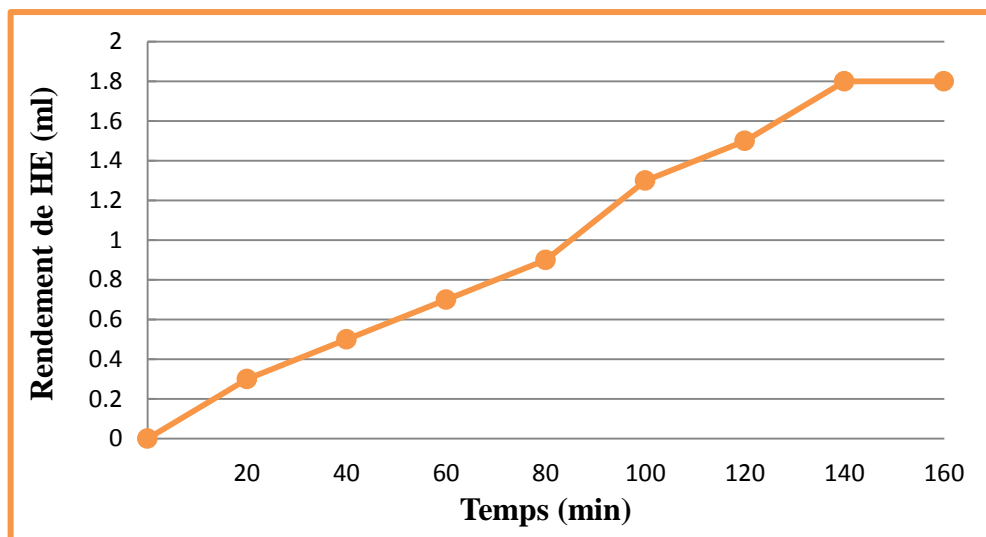
Par comparaison aux autres études qui ont été faites sur les huiles essentielles extraites à partir de l'écorce d'orange, le résultat obtenu **0,26%** est supérieur à ceux rapportés par <sup>[93]</sup> qui ont obtenu un rendement de **0,12%**. Par contre, notre résultat est inférieur à celui obtenu par <sup>[94]</sup> avec **0.43 %**.

Ces différences des teneurs en **HE** peuvent être expliquées par la nature de l'espèce d'agrume utilisée et par le choix de la période de récolte.

## II.2.2 Étude paramétrique

### ➤ Temps d'extraction

L'évolution du rendement de l'extraction de l'huile essentielle en fonction du temps, les résultats ont été représentés graphiquement sur la (**Figure 29**).

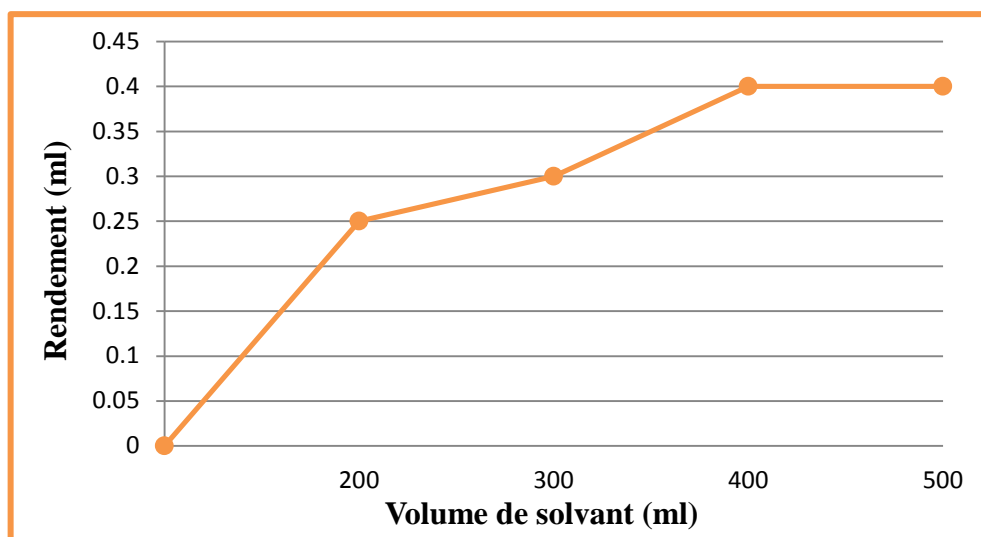


**Figure 29:** Courbe de l'Influence du temps sur le rendement d'extraction d'huile.

La **figure 29** représente la variation de le volume en huile essentielle de d'orange en fonction du temps, elle montre clairement une augmentation du rendement de l'extraction de l'huile essentielle. A partir d'une durée d'extraction de **140 min**, le rendement devient constant (**1,8 ml**). Ce temps de **140 min** constitue la valeur optimale de la durée de l'extraction.

### ➤ Effet du rapport liquide-solide (L/S)

Les valeurs des rendements de l'huile essentielle sont données dans la (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Courbe d'Évaluation du rendement en fonction du volume de solvant.

D'après les résultats donnés par la **Figure 30**, le rendement de l'extraction croit fortement avec le volume du solvant utilisé jusqu'à devient constant. Le volume optimal de solvant est dans ce cas **400 ml**. Le rendement en huile essentielle correspondant à cette valeur est de **0,4ml**.

### Conclusion :

D'après cette étude paramétrique, les conditions optimales obtenues de l'extraction sont:

- **Temps : 140 min.**
- **Rapport L/S: 2ml/g.**

### II.3 Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes

La lecture de l'absorbance des poly phénols totaux et des flavonoïdes est à **760 nm** et **430nm** successivement se fait grâce à un spectrophotomètre.

**Tableau 13:** Densité optique des poly phénols totaux et flavonoïdes d'HE d'orange.

		Notre étude	[95]
<b>Poly phénols totaux</b>	HE d'orange extrait	0.777	0.587
	HE d'orange commerciale	0.897 <sup>[95]</sup>	
<b>Flavonoïdes</b>	HE d'orange extrait	1,134	0.443
	HE d'orange commerciale	0.910 <sup>[95]</sup>	

La comparaison entre les résultats des polyphénols et flavonoïdes manifeste une similarité de densité optique de nos **HE** et commerciaux, par contre le résultat de [95] est différent. Cette différence peut être due aux différentes conditions d'extraction utilisées comme l'origine géographique, le pourcentage d'éthanol entamé, mode d'agitation, la durée de l'obscurité et d'extraction et le test de Folin-Ciocalteu.

D'après les résultats de dosage de poly phénol et flavonoïdes d'huiles essentielles extraite de déchets d'orange, elles montrent que ces HE ont une activité anti oxydante [96].

#### II.4 Caractéristiques organoleptiques et propriétés physico-chimiques

La détermination des propriétés organoleptiques est une étape nécessaire de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Les paramètres organoleptiques de nos échantillons des **HE** sont présentés dans le (Tableau 15) et physico-chimiques dans le (Tableau 16).

**Tableau 14:** Caractéristiques organoleptiques de *Citrus sinensis*.

Les Caractéristiques	
Aspect	Liquide
Couleur	Incolore
Odeur	forte, fraîche et fruité

On note que notre huile essentielle a un aspect liquide, une odeur forte, propre à la matière végétale (déchets d'orange), et incolore (Tableau 15).

**Tableau 15:** Caractéristiques physico-chimiques de l'HE de *Citrus sinensis*.

Les Caractéristiques	Notre étude
la densité relative $d^{20}$	0,874
Indice de réfraction $I_{20}$	1,4724
l'indice d'acide	1,122
pH	5

Selon l'association Française de Normalisation, les **HE** appartenant aux genres *Citrus* doivent avoir une densité maximale de **0,876** [97]. Par comparaison avec notre résultat de la densité de l'**HE** obtenue (**0,874**), On peut dire que l'huile essentielle de *Citrus sinensis* extraite à partir des écorces fraîches est conforme aux normes internationales.

L'indice de réfraction de l'huile de notre échantillon est estimé à **1,4724** et l'indice d'acide à **1,122**. Ces résultats sont correspondent aux normes d'AFNOR (**1,470 -1,478** pour l'indice de réfraction et inférieurs à **3** pour l'indice d'acide).

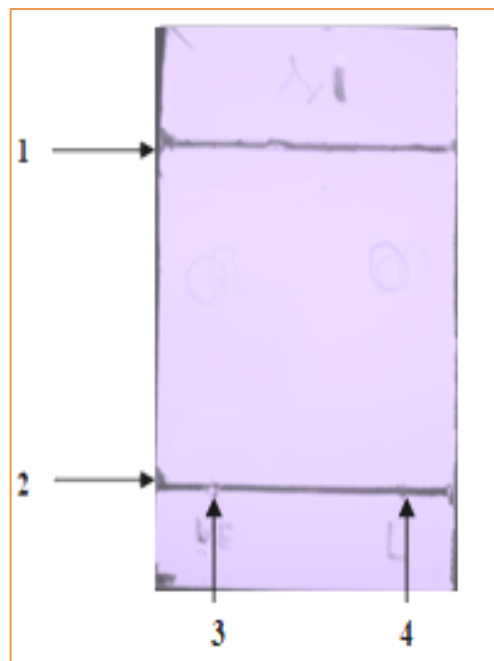
Le **pH** de l'huile extraite par **HD** type Clevenger ont un **pH** inférieurs à **7**, et nous concluons que l'huile essentielle d'orange amère est basique.

Par conséquent, Les propriétés physicochimiques des huiles essentielles obtenues par hydro distillation de déchets d'orange suggèrent une huile essentielle de très bonne qualité.

## II.5 Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par CCM (**Figure 31**) montre que les huiles essentielles extraites à partir des écorces d'orange est constituée de plusieurs tâches ,une seule tâche ayant une hauteur similaire à celui du limonène pur avec **R<sub>f</sub> = 0.66** .

Donc, la molécule principale et majoritaire de notre huile essentielle est limonène et les autres tâches pour des composés non identifiés.



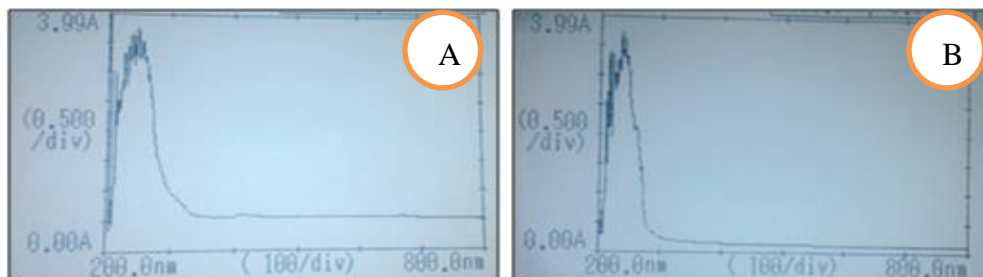
1. Ligne de front.
2. Ligne de dépôt.
3. L'HE extraite de Citrus sinensis.
4. Limonène.

**Figure 31:** Chromatogramme de l'huile essentielle De déchets d'orange extrait  
(originale, 2023).

## II.6 Analyse spectroscopique

### II.6.1 Spectroscopie UV/Visible

Le spectre UV-Visible d'huile extraite par hydro distillation et celui du limonène pur sont donnés dans les figures 32. ils sont enregistrés dans la gamme de longueurs d'ondes de 200 à 800 nm.

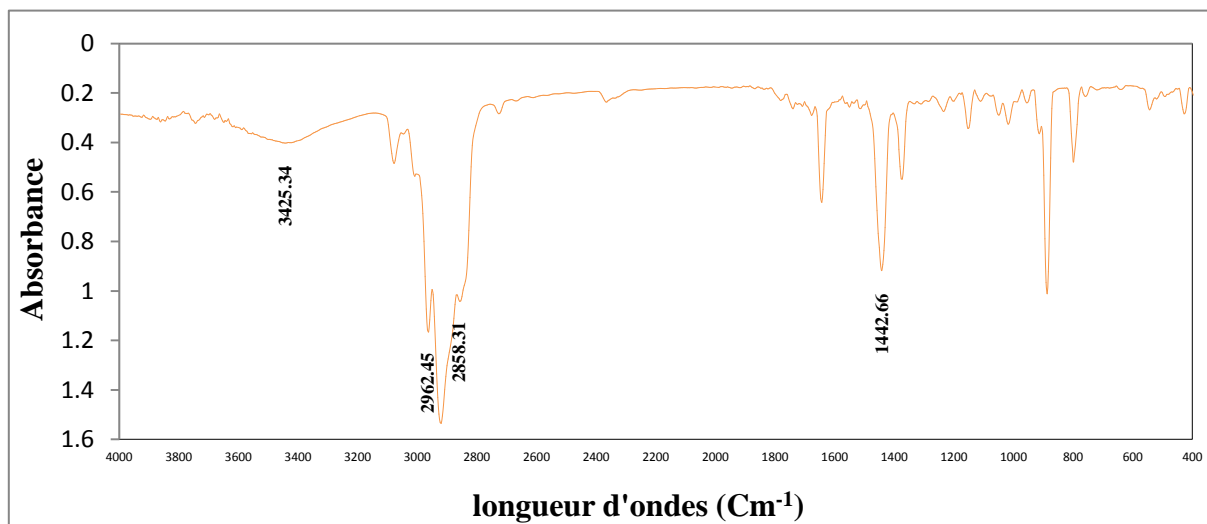


**Figure 32 :** Spectres UV/Visible de l'HE de Citrus sinensis (A) et du limonène pur(B) (originale, 2023).

A noter une similarité par comparaison de bandes d'absorption, d'HE extraite et celle du limonène pur dans l'ultraviolet entre 200 et 300 nm. Ce qui confirme la présence de limonène dans huiles essentielles de Citrus sinensis.

### II.6.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (FTIR)

Les résultats d'analyses des huiles essentielles de Citrus sinensis par spectroscopie infrarouge représentés sur le spectre ci-dessous (figure 33) et résumée dans le tableau 17.



**Figure 33 :** Spectre IR d'huile essentielle de Citrus sinensis enregistré entre 3900 et 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Les différents groupements observés sont regroupés dans le (Tableau17) suivant :



**Tableau 16:** Groupes fonctionnels d'huile de Citrus sinensis de spectre IR.

Fonction	Liaison	Nature de la vibration	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Intensité
alcool lié	O-H	élongation	3425, 34	Moyenne
Alcane	C-H	élongation	2962,45	Forte
Aldéhyde	C-H	Elongation	2858,31	Moyenne
Alcènes	C=C	élongation	1643,23	Moyenne
CH3 asymétrique	C <sub>tét</sub> -H	déformation	1442,66	Forte
Aromatique	C-H	déformation	798 ,47	Intensité et nombre variables

L'observation générale de les résultats représentés sur (**Figure 33**) montre la présence plusieurs pics d'absorption dont les plus important sont :

- Une bande Moyenne et large située à **3425, 34 cm<sup>-1</sup>** entre [**3200 cm<sup>-1</sup> à 3450 cm<sup>-1</sup>**], cette bande attribuée à la liaison (**O-H**) d'un alcool lié.
- La région [**2840 cm<sup>-1</sup> à 2980 cm<sup>-1</sup>**] se compose d'une bande Forte et fine localisé aux nombres d'ondes [**2962,46 cm<sup>-1</sup>**], cette bande correspondant à la vibration de la liaison(**C-H**) d'alcane.
- Autre Moyenne pic, localisé aux nombres d'ondes [**2858,31cm<sup>-1</sup>**], il présente dans la région [**2800 cm<sup>-1</sup> à 2900 cm<sup>-1</sup>**], qui caractérisé la liaison (**C-H**) qui d'Aldéhyde.
- On observe aussi une bande Moyenne vers **1643,23 cm<sup>-1</sup>**, de liaison (**C=C**) de l'alcène dans la région [**1625 cm<sup>-1</sup> à 1680 cm<sup>-1</sup>**], et d'autre bande Forte **1442,66 cm<sup>-1</sup>** présente **CH3** asymétrique.
- Élongation de la liaison (**C-C**) avec une bande entre [**700 et 800**] **cm<sup>-1</sup>**. Cette liaison est identifiée à **798 ,47 cm<sup>-1</sup>** qui correspondent aux l'aromatique.

L'analyse **IR** a relevé que l'**HE** de Citrus sinensis a de nombreuses fonctions chimiques qui sont principalement des alcools, des alcanes, des alcènes, des aldéhydes, **CH3** asymétrique et des aromatiques.

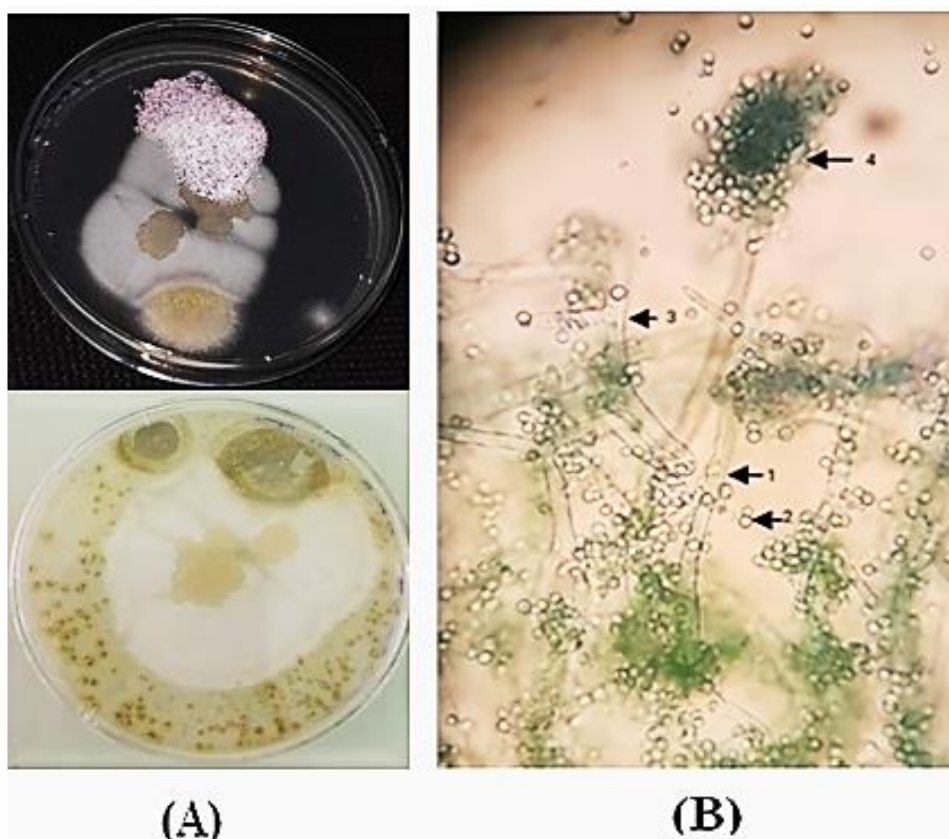
## II.7 Activités antifongiques l'Huile Essentielle

### I.7.1 Identification de la souche fongique

L'isolement et purification sont réalisés à partir d'un fruit de tomate sur le milieu **PDA**. L'identification macroscopique et microscopique moisissures a mis en évidence d'une seule souche représentant un seul genre : Botrytis cinerea (**Figure 34, Tableau 18**).

**Tableau 17:** Identifications macroscopique et microscopique de souche fongique isolées du fruit de tomate.

L'espèce	Observation	
	Macroscopique	Microscopique
<b>Botrytis cinerea</b>	une colonie de couleur blanche puis brunâtre, ayant un développement très rapide sur toute la boîte de pétri.	Filaments mycéliens portants des conidiophores à ramifications arborescentes chargés des conidies.

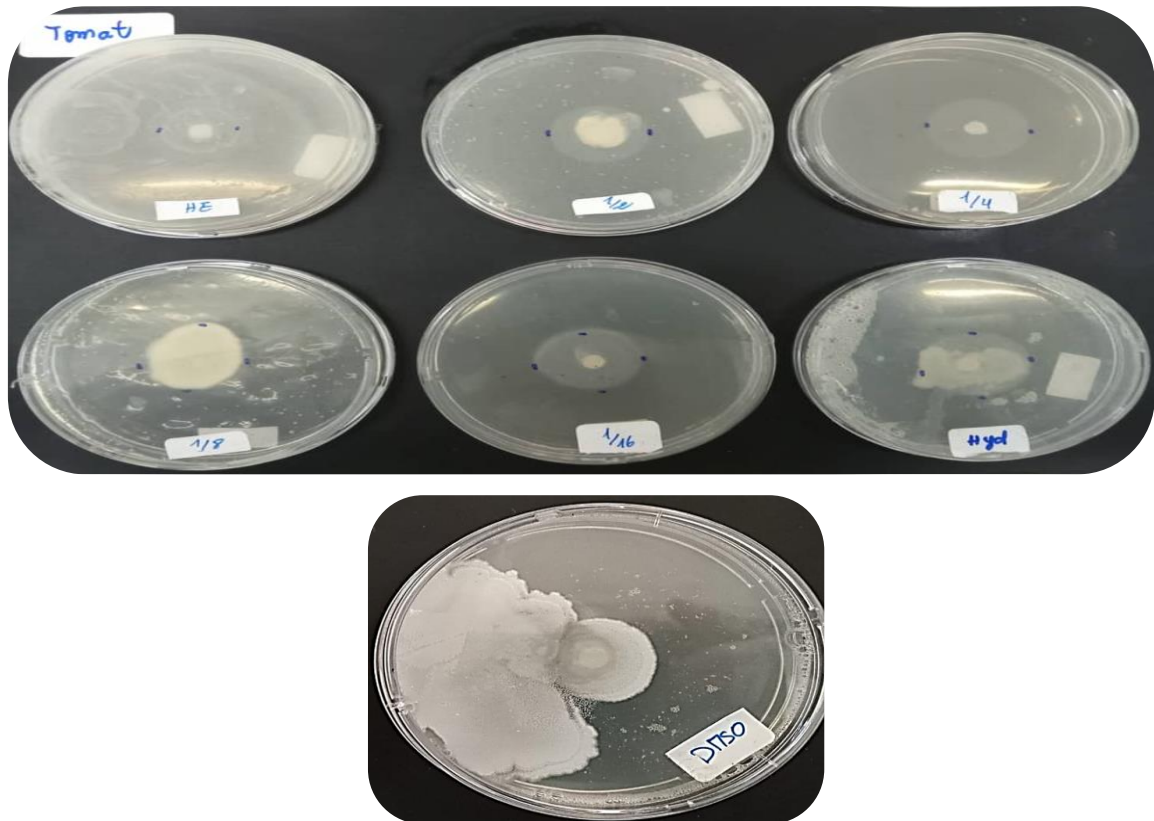


1. Mycélium cloisonné.
2. Conidies.
3. Conidies en grappe.
4. Conidiophores.

**Figure 34 :** Caractères morphologiques de ***B. cinerea*** (A) macroscopique Observation, (B) microscopique Observation (objectif x40) (originale, 2023).

### I.7.2 Résultats de Culture In vitro

L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne. Les résultats de diamètre de l'activité antifongique d'huile essentielle de Citrus sinensis, après un suivi de sept jours sont présentés dans la **Figure 35**.



**Figure 35 :** Résultats de méthode de dilution en milieu liquide après 7 jours (**originale, 2023**).

Après un suivi de sept jours, nous avons remarqué qu'il y avait une activité antifongique contre *Botrytis cinerea* les cinq concentrations d'HE et leur hydrolat aussi, et absence sur la boîte de DMSO.

➤ **Indice antifongique (IA)**

On calcule cet indice antifongique par la formule <sup>[98]</sup>, Les résultats en (%) sont représentés dans le tableau 19.

$$IA = \frac{(D_a - D_b)}{D_a} \times 100$$

**(Equation II.1).**

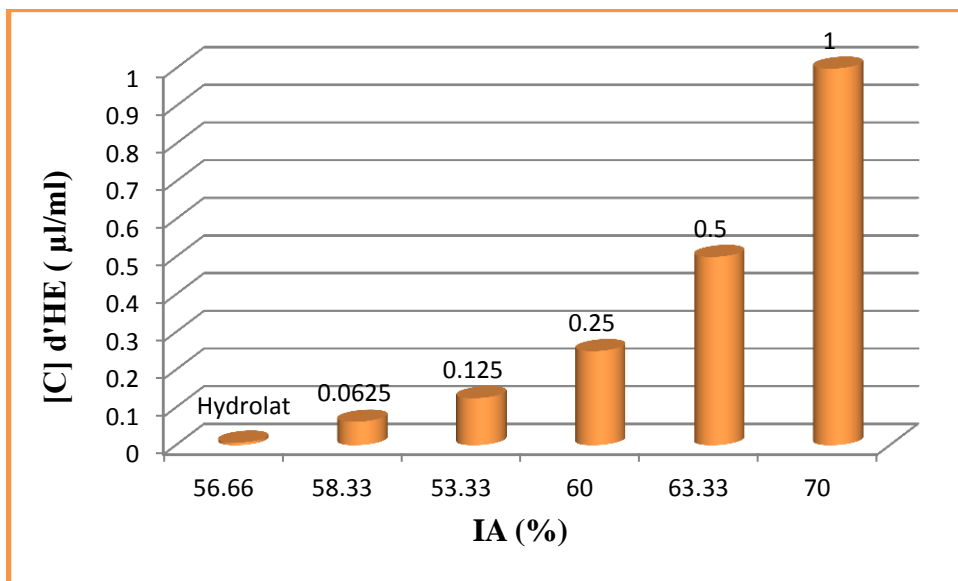
Avec :

- **IA :** Indice antifongique en (%).
- **D<sub>a</sub> :** le diamètre de la zone de croissance du témoin.
- **D<sub>b</sub> :** le diamètre de la zone de croissance de l'essai.

**Tableau 18:** Calcul des indices antifongiques pour le champignon *Botrytis cinerea*, en fonction de la concentration en huile essentielle du *Citrus sinensis*.

Concentration de l'HE (µl/ml)		Diamètre de témoin (cm)	Diamètre de l'essai (cm)	IA(%)
(C1) Solution mère	1	6	1.8	70
(C2) dilué (1/2)	0,5	6	2.2	63.33
(C3) dilué (1/4)	0,25	6	2.4	60
(C4) dilué (1/8)	0,125	6	2.8	53.33
(C5) dilué (1/16)	0,0625	6	2.5	58.33
Hydrolat		6	2.6	56.66
DMSO		6	6	0

D'après nos résultats de **Tableau 19**, on remarque que toutes Concentrations (1 à 0,0625 µl/ml), notamment pour l'hydrolat de l'HE *Citrus sinensis* appliquées, ont inhibé la croissance de la souche fongique testée *Botrytis cinerea* (**Figure 36**).



**Figure 36 :** Histogramme des indices antifongiques obtenus par différentes Concentrations de l'HE *Citrus sinensis*.

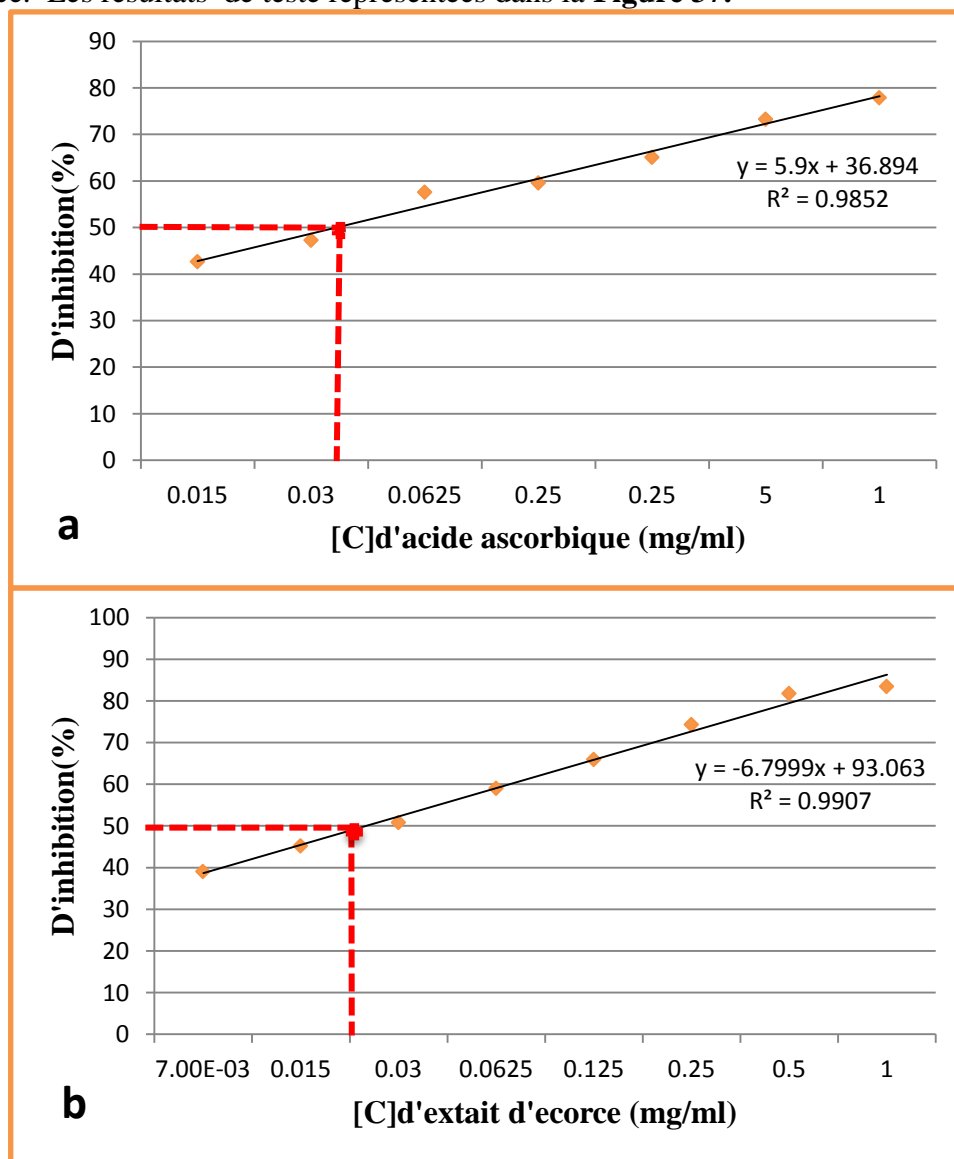
Les indices antifongiques sont augmentés avec l'augmentation de la concentration d'huile essentielle, ils dépassent 50% dans toutes les concentrations et varient entre 53.33% et 70% qu'il a été remarqué par l'application d'une concentration 1 µl/ml.

Ces résultats nous permettent de dire que l'huile essentielle de *Citrus sinensis* a une bonne activité antifongique contre *Botrytis cinerea*, qui pose un grand problème aux agriculteurs.

## II.8 L'activité antioxydante

L'extrait des résidus d'orange est une source potentielle des composants chimiques naturels responsables de différentes activités antioxydants.

Nous avons évalué cette activité antioxydante de l'**HE** extraite à partir des écorces de déchets d'orange par la méthode de DPPH et l'acide ascorbique est utilisé comme molécule de référence. Les résultats de testé représentées dans la **Figure 37**.



**Figure 37** : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits du Citrus sinensis et de l'acide ascorbique.

D'après les résultats des courbes (**Figure 37**), on remarque que le pourcentage d'inhibition d'extrait de Citrus sinensis est supérieur à 80% à des concentrations de l'ordre de **0,5 et 1 mg/ml**, (il augmente avec l'augmentation de la concentration d'extrait étudié).

L'étude réalisée par [86] a montré que l'écorce de bigarade présente un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de **53, 03%**. Cette valeur est inférieure à nos résultats.

Ces différences s'expliqueraient par les différentes compositions chimiques des mêmes espèces d'agrumes dans différentes régions [86, 99].

➤ **Détermination les IC50 et les PAR :**

A partir de ces courbes les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations, on peut déterminer la valeur d'**IC50**, (aussi appelée **EC50** pour Efficient concentration 50) de l'extrait et l'acide ascorbique. Plus la valeur de **IC50** est petite, plus l'extrait *Citrus sinensis* de à une forte activité antioxydant.

D'autre paramètre calculé à partir de la concentration efficace, Plus ces valeurs éloignent du zéro, plus la puissance antioxydant augmente. C'est le pouvoir d'activité anti radicalaire et calculé selon cette équation (**Equation II.2**) [100] :

$$\text{PAR} = \frac{1}{\text{EC } 50} \quad (\text{Equation II.2}).$$

Les valeurs des concentrations efficaces et de l'activité anti radicalaires sont représentées dans le tableau 20.

**Tableau 19:** Valeurs des concentrations efficaces et de l'activité anti radicalaires.

Extraits	IC50 (mg/ml)	Activité anti radicalaire
Écorces	0 ,026	38 ,46
AC ascorbique	0 ,034	29 ,41

Selon les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, l'extrait d'écorces présente un pouvoir antioxydant fort, de 0,026 mg/ml avec une activité anti radicalaire 38,46 que celle de 0,034mg/ml pour l'acide ascorbique.

Le travail de [101], montre que l'extrait d'écorce d'orange ne présente aucune activité anti radicalaire DPPH (**IC50 = >800 µg/ml**) comparativement aux standards (l'acide ascorbique : **IC50 = 4.39 µg/ml**).

Ces différences s'expliqueraient par les différentes compositions chimiques des mêmes espèces d'agrumes dans différentes régions [102].

On constate que notre extrait d'écorces est présente un important active, ce qui est peut être dû à sa richesse de composition chimique, spécifiquement de composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydant et antimicrobienne <sup>[103]</sup>.

# Conclusion générale



## Conclusion générale

---

Au terme de cette étude expérimentale, nous avons étudié la possibilité de valoriser les déchets de transformation de jus d'orange, par L'extraction d'huile essentielle.

Dans le présent travail, différents paramètres d'extraction, des propriétés physicochimiques et activités antioxydants, antifongique de huile essentielle même d'extrait d'écorce ont été testé.

L'un des résultats obtenus, le test photochimique d'extrait d'écorce a révélé leur richesse en métabolites secondaires, comme les composés phénoliques, flavonoïdes, les tanins spécifiquement les tanins catéchiques, en Stéroïde, Terpénoïdes et Quinones.

Ce qui confirme la capacité antioxydant élevée, réalise par la méthode de piégeage du radical libre **DPPH** d'extrait à celle de l'acide ascorbique considéré comme antioxydant de référence. Pour le test de réduction du radical libre **DPPH**, l'activité anti radicalaire est élevée aussi dans l'extrait.

L'extraction d'huile essentielle par Clevenger (hydro distillation) de déchets frais d'orange, donne un rendement de (**0.26 %**). Les conditions optimales sont:

**Temps d'extrait = 140min et un rapport Liquide - Solide (L/S) = 2m l/g.**

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, odeur, couleur) de notre huile présentent un aspect liquide, incolore, l'odeur forte, fraîche et fruité. Pour les caractéristiques chimiques, La valeur de l'indice de réfraction est **1,4724**. Cette valeur est comprise dans le domaine de l'indice de réfraction du limonène [**1.4700-1.478**]. Ainsi que leur indice d'acide égale à **1,122** avec une densité relative de **0,874** et une **PH** de **5**. Ces valeurs répondent aux critères de la bonne qualité des huiles essentielles selon les normes **AFNOR**.

Les résultats chromatographie sur couche mince (**CCM**) de huile essentielle montre des composés non identifiés sont présents parmi ces composées le limonène en tant qu'il est la molécule majoritaire de cette huile essentielle obtenues par Clevenger. Ce résultat est confirmé avec ceux obtenus par L'analyse par **UV-Visible**.

L'analyse infrarouge a permis d'identifier certains groupements fonctionnels présente dans l'huile essentielle extraite par hydro distillation, tels que l'alcool, alcane, Alcènes, Aldéhyde et les composants Aromatique.

## Conclusion générale

---

Enfin, les résultats d'étude de l'activité antifongique de notre huile vis-à-vis la souche fongique de *Botrytis cinerea* in vitro, par la méthode de dilution en milieu liquide, ont montré que l'huile essentielle de *Citrus sinensis* possède une activité très satisfaisante contre l'espèce fongique étudiée pour tous les concentrations test et ce même avec l'hydrolat.

A partir de ces résultats, d'autres études peut compléter et approfondir cette recherche, en perspective notamment :

- L'utilisation d'autres méthodes d'extraction et comparer son rendement avec ceux obtenus dans cette étude.
- Utiliser des analyses physico-chimiques plus précises pour identifier les composants d'huile essentielle comme la Chromatographie en phase gazeuse (**CPG**), chromatographie en phase liquide (**HPLC**) et la résonance magnétique nucléaire (**RMN**).
- Réalise une étude toxicologique pour l'identification d'éventuels effets toxiques de ces composés sur la santé humaine.
- Étude de l'effet de cette huile sur d'autres champignons et identifier leur pouvoir antimicrobienne, ou même insecticide.

# Références bibliographiques

## Références Bibliographiques

---

- [1]: Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., & Tonini, D. (2017). Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resources, Conservation and Recycling*. 127(June), 148-158.
- [2]: MHIRI N., 2015 Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité anti-oxydante des extraits des écorces « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone, univ, Carthage Tunisie P 01-02-03-10-11.
- [3]: BOUKROUFA M. 2016, Extraction de Substances à Haute Valeur Ajoutée à Partir de Rejets de l'Industrie Agro-Alimentaire, Doct. Ecole Nationale Polytechnique , Alger, p15.
- [4]: Anonyme, 2007 , Les agrumes au Maroc institut de la recherche agronomique Rebat.
- [5]: BENEDISTE A. et BACHES M., 2002 – Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96 p
- [6]: Kara Mohamed. (2018). Les agrumes. Cour en ligne
- [7]: BOUSBIA N., 2011. Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduit agroalimentaire, Univ, d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger, P31.
- [8]: Kara Mohamed. (2018). Les agrumes. Cour en ligne
- [9]: Samson J A. (1980). Tropical Fruits. Longman, London. 250p.
- [10]: Davies F.S., Albrigo L.G. (1994). Citrus. Crop production science in horticulture. CAB International, Wallingford (UK). 254p
- [11]: Vannière H. (2002). Agriculture spéciale. Les plantes comestibles. Les espèces fruitières : les agrumes, In : Mémento de l'agronome. CIRAD, Montpellier. p929-940.
- [12]: Imbert E., Loeillet D., Vannière H., Bertin Y., Vernière C., Quilici S., Didier C., Bourgeois P. (2006). Pomelo. FruiTrop (h.s. FOCUS). CIRAD, Montpellier. 108 p.
- [13]: Duportal M., Jorda E., Sanchez C., Imbert E., Loeillet D., Vannière H. (2013). Citron. FruiTrop (h.s. FOCUS). CIRAD, Montpellier. 141p
- [14]: <https://shop12.factoryoutlets2023.com>
- [15]: BOUNAB D. et CHABBI Y., 2018. Etude de la variabilité morphologique au sein d'une collection d'agrumes cultivée à l'Est Algérien, W. Skikda, Univ, Constantine, P05-09.
- [16]: TORQUATO, L. D., PACHIEGA, R., CRESPI, M. S., NESPECA, M. G., de OLIVEIRA, J. E., & MAINTINGUER, S. I. Potential of biohydrogen production from

## Références Bibliographiques

---

- effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. Waste management, (2017); 59, 181-193.
- [17]: USDA, National Agricultural Statistics Service, 2016. In: <https://www.nass.usda.gov/>.
- [18]: BOUNAB D. et CHABBI Y., 2018. Etude de la variabilité morphologique au sein d'une collection d'agrumes cultivée à l'Est Algérien, W. Skikda, Univ, Constantine, P05-09.
- [19]: I.T.A.F, 2002 Relevés climatologiques. Manuscrit I.T.A.F., Boufarik, 18 p.
- [20]: Kerboua, M. (2002). L'agrumiculture en Algérie. In: D'Onghia A.M. (ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N. (ed.). Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Bari: CHIEAM, pp: 21-26. Repéré à : <https://om.ciheam.org/om/pdf/b43/00800063.pdf>.
- [21]: Bensadok A. (2018). La production des agrumes en hausse, le soir d'Algérie. Repéré à : <https://www.lesoirdalgerie.com/regions/la-production-des-agrumes-en-hausse11053>.
- [22]: LAKHDARA N., 2014, les sous-produits de l'agriculture en Algérie, UNIV, Constantine, P50- 51.
- [23]: Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Ed. Tec et Doc-Lavoisier, Paris. 544 Pages.
- [24]: **Milind P et Dev c, 2012.** orange : range of benefits. *Int J Pharm*, p59-63.
- [25]: GUIMARAES R., BARROS L., BARREIRA J.C.M., SOUSA M. J., CARVALHO A.M. et FERREIRA I.C.F.R., 2010 : Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 48, pp : 99 – 106.
- [26]: HENDRIX C.M. et REDD J.B., 1995 : Chemistry and Technology of Citrus Juices and ByProducts. In : Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.
- [27]: BOUSBIA N., 2011. Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduit agroalimentaire, Univ, d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger, P35.
- [28]: <https://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-aliments/orange/composition>

## Références Bibliographiques

---

- [29]: (KIMBALL, 1999). Kimball D.A. (1999). Citrus processing, à complete guide, second edition. Kimball D.A., Ed. Gaithersburg : An Aspen publication.
- [30]: LOUSSERT R ,1987 : les agrumes, arboriculture, édition scientifique universitaire, la voisier, paris. p 1896-205
- [31]: <https://maisondesagrumes.com/2013/07/02/choix-des-especes-et-varietes-dagrumes/>
- [32]: <https://www.mangeonsbien.com/savoir-plus/le-saviez-vous/exclusif-33-varietes-dagrumes-cu ltivees-tunisie/>
- [33]: BOUKROUFA M, 2016. Extraction de Substances à Haute Valeur Ajoutée à Partir de Rejets de l'Industrie Agro-Alimentaire, Ecole Nationale Polytechnique, Alger, P28.
- [34]: Etiévant, M., Ollivier, H., Quicke, J., & Sautet, J. (1962). Oranges et jus d'oranges d'Algérie sur le marché marseillais. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 4(3), 220-238.
- [35]: Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*. October 2017), 153–167.
- [36]: CHEN C.S., SHAW P.E., PARISH M.E. (1993). Orange and tangerine juices. In *Fruit Juice Processing Technology*, Nagy S., Chen C.S., Shaw P.Z., Eds. Auburndale, Florida, USA: Agscience Inc. 119-124.
- [37]: Mamma, D., & Christakopoulos, P. (2014). Biotransformation of citrus by-products into value added products. *Waste and Biomass Valorization*, 5(4), 529-549.
- [38]: El Mannoubi, I., Skanji, T., Barrek, S., & Zarrouk, H. (2010). CARACTÉRISATION DE L'HUILE DES GRAINES DE L'ORANGE MALTAISE (CITRUS SINENSIS) POUSSANT EN TUNISIE. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12, 31-36.
- [39]: Siles, J. A., Vargas, F., Gutiérrez, M. C., Chica, A. F., & Martín, M. A. (2016). Integral valorisation of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting technologies. *Bioresource technology*, 211, 173-182.
- [40]: TEH S-S., BEKHIT A.E. et BIRCH J. (2014). Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants*. 3: 67-80.
- [41]: RAFIQ S., KAUL R, SOFI S.A., BASHIR N., NAZIR F. et NAIK G.A. (2016). Citrus peel as a source of functional ingredient. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 30 : 1-8.

## Références Bibliographiques

---

- [42]: OULDYEROU K., IBRI K., BOUHADI D., HARIRI A., MEDDAH B. et TIRTOUIL A. (2016). Effect of orange *Citrus sinensis* peel from Algeria in food. *Banat's Journal of Biotechnology*. 3(14): 97-100.
- [43]: BOUSBIA N., 2011. Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduit agroalimentaire, Univ, d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger, P43.
- [44]: R. SCHWOB et R. HUET Institut Français de Recherches Fruitières Outre Mer(I. F. A. C.) .
- [45]: OMOBA O.S., OBAFAYE R.O., SALAWU S.O., BOLIGNON A.A. et ATHAYDE M.L. (2015). HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*. 4: 498-512
- [46]: WANG, X., CHEN, Q., & LU, X., 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*. 38, 129-137
- [47]: LOHRRASBI, M., POURBAFRANI, M., NIKLASSON, C., TAHERZADEH, M.J., 2010. Process design and economic analysis of a citru
- [48]: Wang, Y.C., Chuang, Y.C. and Hsu, H.W., (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chemistry*. [106](#), [277-284](#).
- [49]: Ghorraf, S., & Boumenad, H. (2016). Contribution à l'étude de confisage des fruits pour deux catégories différentes" Ecorces d'Oranges et Abricots"(Doctoral dissertation).
- [50]: MHIRI N., 2015 Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité anti-oxydante des extraits des écorces « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone, univ, Carthage Tunisie P 01-02-03-10-11.
- [51]: Chidankumar C.S., Mythily R. and Chandraju S., (2011). Extraction of Carbohydrate from Sweet Orange Peels (*Citrus sinensis* L.) and their Identification via LC /MS & Thin Layer Chromatographic Analysis. *Biosciences, Biotechnology, Research. Asia*, 8(2), [709-715](#)
- [52]: Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales Technique et documentation. Lavoisier, 3éme Ed., Paris.

## Références Bibliographiques

---

- [53]: Edris A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile [constituents](#). *PhytotherapyResearch*, 42(4), 308–323.
- [54]: Padrini, F., Lucheroni M. T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles – guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Edition De Vecchi, Paris. 11, 15, 61 et 111. de fin d'études ISTOM 2013 – Julie NICOLAS – Promotion 99 15P.
- [55]: PIERRON C., 1989, Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gérontologie et soins palliatives, Th. Doct., Univ. Lorraine, France, p.253.
- [56]: BESOMBES C. 2008, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques, Th. Doct. Univ. de la Rochelle, France, p289.
- [57]: <https://www.compagnie-des-sens.fr/huile-essentielle-orange-douce/>
- [58]: Yahyaoui N. (2005) - Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata* (L.) sur *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera, Bostrychidae) et *Tribolium confusum* (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae). Thèse de Magister en sciences. agronomiques, option Ecologie, INA, El-Harrach.
- [59]: Teuscher E., Anton R., and Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condimentes et huiles essentielles. Edition TEC & DOC Lavoisier. P 6, 77.
- [60]: DURAFFOURD C. et LAPRAZ J.C. (2002). Traité de Phytothérapie clinique. Endobiogénie et Médecine. Edition Masson, Paris.
- [61]: Bruneton J. (1999). Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales 3<sup>eme</sup> éd, Tec et Doc, Paris, pp 484-540.
- [62]: AFNOR, "association française de normalisation française : huile essentielle, Ed, Afnor", Paris, (2000).
- [63]: BOUSBIA N., 2011. Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduit agroalimentaire, Univ, d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger, P43.
- [64]: Samate Aboul D. (2001) : composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : Valorisation, thèse de doctoret, Univ de Ouagadougou, Burkina Faso.
- [65]: OUIS N., 2015. étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, UNIV, Oran, P07-18-19-20.



## Références Bibliographiques

---

- [66]: El haib A., [2011](#). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique. Thèse de doctorat en chimie organique et catalyse. Université de Toulouse III- Paul Sabatier. [195](#) p.
- [67]: ZERAIB A, 2010. Monographie du genre *Moricandia* DC., de l'Est algérien, Mag., Univ. FERHAT ABBAS, SETIF. P 30
- [68]: Hammer K.A. Carson C.F. (2011). Antibacterial and antifungal activities of essential oils in thymol. *Lipids and Essential oils as antimicrobial agents*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. pp. 255-295.
- [69]: Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013). Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 26-30
- [70]: Muther, L. (2015). Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant (Doctoral dissertation, Thèse]: pharmacie: Université d'Auvergne)
- [71]: Chavanne P., (2011). 200 remèdes au citron. Editions First – Grund, Paris, p. 255.
- [72]: ANTON R. and LOBSTEIN A., [2005](#). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments
- [73]: BENKADDOUR S, ATTAR K. (2020). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits brutes et de l'huile essentielle du *Citrus aurantium*, Univ de Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent, p.39.
- [74]: Békro Y.A, Janat a, békro M, Boua B. B, trabi F.H and Éhilé E. (2007) Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *caesalpinia benthamiana* (baill.) herend et *zarucchi* (caesalpinaceae). *Sciences & nature*. vol 4 n° 2: 217 – 225
- [75]: Bouquet A., Fouret A. (1975) Recherches chimiques préliminaires sur les plantes médicinales du Congo-Brazzaville. *FITOTERAPIA*. 46(4)
- [76]: Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyuugbuaja V.O. (2004). Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.SCI*, 4(3): 179-182.
- [77]: Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1-9.
- [78]: Justin, J. S., Milton, A., & Natesan, G. (2014). Phytochemical evaluation of peel of *Citrus reticulata* Blanco using various solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business Management*, pg. 26-35 ISSN: 2310-6913.
- [79]: Wagner H., (1983). *Drogen analyse, Dünnschicht chromatographische Analyse von Arzneidrogen*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 522 pp.

## Références Bibliographiques

---

- [80]: El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R. (2018). Screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha spicata* L. American Journal of Innovative Research and Applied Sciences, ISSN 2429-5396.
- [81]: Djerridane A., Yousfi M., Nedjmi B., Boutassouna D., Stoccker P., Vidal N., (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. Vol: 97. 654 -660.
- [82]: <https://fr.slideshare.net/faridtoulouse1/biomaster-238968294>
- [83]: Fiume F, Fiume G. Biological control of *Botrytis gray* mould on tomato cultivated in greenhouse. Commun Agric. Appl. Biol. Sci., 2006, 71 (3), 897-908.
- [84]: Elmer P A G, Reglinski T. Bio-suppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology., 2006, 55,155-177.
- [85]: Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Int. J. of Foods Sci. Tech. 8: 121-137.
- [86]: BENKADDOUR Sarra et ATTAR Kamila (2020), Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits brutes et de l'huile essentielle du *Citrus aurantium*. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent
- [87]: Meziani Lamia et Saidoune Sabrina (2017), Activités antioxydantes et, antimicrobiennes des différentes parties de la bigarade. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université A. MIRA – Bejaia.
- [88]: Ghalem, M., Merghache, S. & Belarbi, M. (2014). Study on the antioxidant activities of root extracts of *Zizyphus lotus* from the western region of Algeria. Pharmacognosy Journal, 6, 32-42.
- [89]: . Muanda. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. 2010. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine-Metz, 55-86.
- [90]: Arora, M., & Kaur, P. (2013). Phytochemical screening of orange peel and pulp. International Journal of Research in Engineering and Technology, 2(12), 517-520.
- [91]: Sun, C., Chen, K., Chen, Y. & Chen, Q. (2005). Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. Food Chemistry, 93, 599-605.

## Références Bibliographiques

---

- [92]: Huang, R., Xia, R., Hu, L., Lu, Y. & Wang, M. 2007. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae*, 113, 166172.
- [93]: SAADOUNE Zineb et MEGUENNI Fadhila, (2016). [Impact](#) de la composition des huiles essentielles de *Citrus sinensis* (Orange) et *Citrus limonum* (Citron) sur l'activité microbiologique. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université blida 1 .
- [94]: ALIOUANE Fatiha (2015), ÉTUDE DE L'EXTRACTION DU LIMONÈNE À PARTIR DES ÉCORCES D'ORANGE. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université TIZI-OUZOU.
- [95]: DIDI AICHA OUMEIMA et YAKOUBI SOFIA INES. (2021). Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citron (*Citrus limon*) et déchets d'orange (*Citrus sinensis*), en vue de leurs valorisation. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université LES FRERES MENTOURI DE CONSTANTINE.
- [96]: SIMONE S., CONIDI C., URSINO C., CASSANO et FIGOLI A. (2016). Clarification of orange press liquors by PVDF hollow fiber membranes. *Membranes*. 6(1): 1-15
- [97]: AFNOR.(2000) « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 661-663.
- [98]: Chang S.T., Wang S.Y., Wu C.L., Su Y.C. et Kuo Y.H. 1999.- Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung*. vol : (53) .487-490.
- [99]: Teneva, D., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z., & Kostov, G. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 74(5-6), 105-111.
- [100]: <https://www.researchgate.net/publication/271516531>
- [101]: KHALFA Raounek et HAMROUCHE Nour El Imen. (2021) . Etude des résidus d'orange (écorce) par la combinaison de deux approches, chimique et biologique. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université LES FRERES MENTOURI DE CONSTANTINE.
- [102]: Teneva, D., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z., & Kostov, G. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 74(5-6), 105-111.
- [103]: Četković G.S., Čanadanović-Brunet J., Djilas S.M., Tumbas V.T., Markov S.L., et Cetković D.D. (2007) Atioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja Montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*. 8(10), 1013-1027.

