

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



Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département des biotechnologies

**Projet de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme de Master en Science de la Nature et
de la Vie**

Filière des biotechnologies

Option : Biotechnologie et valorisation des plantes

Thème

**Étude de l'influence de la taille des particules sur le rendement, la
qualité et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la poudre
des écorces des fruits de l'oranger amer : *Citrus aurantium L.***

Présenté par : Nassima HANNANE

Soutenu le 24 juin 2018 devant le jury composé de :

M^r BENDALI A.	Maître de conférences	U.S.D.B	Président
M^r. EL HADI D.	Professeur	U.S.D.B	Promoteur
M^{me} BOUDJIT D.	Doctorante	U.S.D.B	Co-promotrice
M^{me} GHANAI R.	Maître assistante	U.S.D.B	Examinatrice

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Avant tout louange à Allah, Le Tout Puissant qui m'a donné la force et la patience de poursuivre ce travail jusqu'au bout et sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie mes très chers parents pour leur soutien et leur patience tout au long de mon parcours.

Je remercie également mon promoteur le Professeur EL HADI Djamel, pour son suivi et les précieux conseils qu'il m'a prodigué.

Je remercie également mon président de jury M' BENDALI Aziz pour sa disponibilité et ses encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi à ma co-promotrice M^{me} BOUDJIT Djamila pour sa collaboration tout au long de la campagne expérimentale.

Mes profonds remerciements s'adressent aussi mon examinatrice M^{me} GHANAI Rafika pour le temps qu'elle m'a accordé et pour ses précieux conseils tout au long de la campagne expérimentale.

Je remercie aussi M' BENZAID Ibrahim de m'avoir gracieusement fourni la matière végétale sur laquelle j'ai effectué ce travail.

Enfin mes remerciements vont également à toutes celles et ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans l'accomplissement de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail en signe de respect et de reconnaissance :

À mon très cher père qui m'a soutenue tout au long de ce projet

À ma très chère mère

À mon frère et à ma sœur

À toute ma grande famille

À tous mes amis.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير حجم جسيمات بودرة النارج على المردود والجودة والنشاط المضاد للميكروبات والزيوت الأساسية للبرتقال المر.

تم استخلاص الزيوت العطرية من مسحوق قشر البرتقال المر في قسم الكيمياء الصناعية في مختبر الكيمياء العضوية في جامعة البليدة 1. النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات س. أجريت في مختبر النظافة في مستشفى البليدة. تم إجراء تحليل HE بواسطة GC / MS في مختبر الشرطة العلمية في الجزائر العاصمة.

تم تجفيف اللحاء في مجفف اكسكاليبور عند 35 درجة مئوية لمدة 35 ساعة. بعد التجفيف، تم قطع اللحاء ثم سحقه و غربلته. الغريلة تعطي 7 عينات من مسحوق النارج حسب مختلف أحجام الجسيمات. العينة الثامنة تسمى الشاهد، محصول عليها من قطع اللحاء الطازج للنارج .

يتم استخلاص الزيوت الأساسية من هذه العينات الثمانية، في المخبر، عن طريق التقطير المائي بمساعدة الميكروويف (HDMO) (جهاز كليفنجر مركب على الميكروويف).

عندما يكون قطر الجسيمات أقل من 300µm يزداد مردود الزيت الأساسي للنارج بالتناسب مع حجم الجسيمات، من 5,04% إلى 21,84%. ما فوق 300µm يتناسب مردود الزيت الأساسي للنارج بشكل عكسي مع حجم الجسيمات، ويتراوح من 21,84% إلى 2,52%. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن قطريئات للنارج له تأثير ملحوظ على عائد الزيت الأساسي.

من ناحية أخرى، فإن النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق قياس الكثافة ومعامل الإنكسار للزيوت الأساسية للنارج، تبين أن حجم الجزيئات ليس له تأثير على جودة الزيوت الأساسية المستخرجة.

تظهر نتائج CG / MS أن التركيبة النوعية للزيوت الأساسية من البرتقال المر مكافئة عالميا مهما كان حجم الجسيمات. وأيضاً، يبدو النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية لا يتغير عندما يتغير حجم الجسيمات. السلالات الجرثومية المقاومة هي أبقار السالمونيلا والأسبرجيل براسلينسيس مع أقطار تثبيط أقل من 8 مم. تتمثل السلالات الميكروبية سريعة التأثير في: البكتيريا سالبة الجرام والإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية بقطر تثبيط يتراوح بين 9 مم و 10 مم. البكتيريا إيجابية الجرام ، العصوية الرقيقة العصوية والمكورات العنقودية الذهبية مع أقطار تثبيط ما بين 10 مم و 19 مم ؛ وخمائر المبيضات البيض مع أقطار تثبيط من 8.5 مم و 11 مم. يتم الحصول على أقصى قدر من الحساسية للزيت الأساسي لمسحوق قشر البرتقال المر لذرة العصوية الرقيقة بقطر تثبيط يبلغ 19 مم.

كلمات مفتاحية: الحمضيات، سيتروس أورنتيوم، الزيوت الأساسية ، التقطير المائي ، مقاس الجسيمات ، القوة المضادة للميكروبات.

Résumé

Le but de ce travail est d'étudier l'effet de la taille des particules de poudre d'écorces de bigarade sur, le rendement, la qualité et l'activité antimicrobienne, des huiles essentielles de bigarade.

L'extraction des huiles essentielles à partir de la poudre d'écorces d'oranges amères a été réalisée dans le département de chimie industrielle au laboratoire de chimie organique au

sein de l'Université Blida 1. L'activité antimicrobienne des extraits d'HE a été réalisée au laboratoire d'hygiène de l'hôpital Blida. L'analyse des HE par CG/SM a été faite au sein du laboratoire de la police scientifique de château-neuf à Alger.

Les écorces ont été séchées dans un déshydrateur type Excalibur à 35°C pendant 35h. Après séchage, les écorces sont découpées, broyées et tamisées. Le tamisage permet d'obtenir 7 échantillons de poudre de bigarade avec des granulométries différentes. Un 8^{ème} échantillon appelé témoin, est réalisé à partir de morceaux d'écorces fraîches de bigarade.

L'extraction d'huile essentielle à partir de ces 8 échantillons de bigarade, est réalisée par hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) (dispositif type Clevenger monté sur micro-onde).

Lorsque les particules ont une taille inférieure à 300 µm de diamètre, le rendement d'huile essentielle de bigarade augmente proportionnellement à la taille des particules en passant de 5,04 % à 21,84 %. Au-delà de 300 µm de diamètre, le rendement d'HE de bigarade est inversement proportionnel à la taille des particules et il passe de 21,84 % à 2,52 %. Les résultats obtenus montrent que le diamètre des particules de bigarade, a un effet remarquable sur le rendement en huile essentielle.

D'autre part, les résultats obtenus en mesurant la densité et l'indice de réfraction des huiles essentielles de bigarade, montrent que la taille des particules n'a pas d'influence sur la qualité des huiles essentielles extraites.

Les résultats de la CG/MS montrent que la composition qualitative des huiles essentielles de bigarade est globalement équivalente quelque que soit la taille des particules.

Et enfin, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la poudre des écorces d'orange amère semble inchangée lorsqu'on fait varier la taille des particules. Les souches microbiennes résistantes sont *Salmonella abony* et *Aspergillus brasiliensis* avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 8 mm. Les souches microbiennes sensibles sont représentées par : les bactéries gram négatives, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition compris entre 9 mm et 10 mm; les bactéries gram positives, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition compris entre 10 mm et 19mm; et les levures *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition compris entre 8,5 mm et 11 mm. La sensibilité maximale à l'huile essentielle de la poudre des écorces d'orange amère est obtenue pour la souche *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 19 mm.

Mots clés : Agrumes, *Citrus aurantium*, huile essentielle, hydrodistillation, granulométrie, pouvoir antimicrobien.

Abstract

The purpose of this work is to study the effect of particle size of bigarade powder on, yield, quality and antimicrobial activity of essential oils. The barks were dried in an Excalibur dehydrator at 35°C for 35 hours. After drying, the barks are cut, crushed and sieved. Sifting gives seven samples of bigarade powder with different particle sizes. An eighth sample called witness, is made from pieces of fresh bark of bigarade.

The extraction of essential oils from bitter orange peel powder was carried out in the department of industrial chemistry at the organic chemistry laboratory at Blida University 1. The antimicrobial activity of HE extracts was carried out at the hygiene laboratory of Blida Hospital. The analysis of HE by GC / MS was done in the laboratory of the scientific police in Algiers.

Extraction of essential oil from these eight samples of bigarade, is carried out in the laboratory, by microwave assisted hydrodistillation (HDMO) (device type Clevenger mounted on microwave).

When the particles are less than 300 µm in diameter, the yield of bitter orange essential oil increases proportionally to the size of the particles, from 5.04% to 21.84%. Beyond 300 µm in diameter, the yield of bigarade essential oil is inversely proportional to the particle size and it goes from 21.84% to 2.52%. The results obtained show that the diameter of the bigarade particles has a remarkable effect on the essential oil yield.

On the other hand, the results obtained by measuring the density and the refractive index of the essential oils of bigarade, show that the size of the particles has no influence on the quality of the extracted essential oils.

The results of the GC / MS show that the qualitative composition of the essential oils of bigarade is globally equivalent whatever the size of the particles.

And finally, the antimicrobial activity of essential oils seems unchanged when the particle size is varied. The resistant microbial strains are *Salmonella abony* and *Aspergillus brasiliensis* with inhibition diameters of less than 8 mm. The susceptible microbial strains are represented by: gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* with inhibition diameters of between 9 mm and 10 mm; gram positive bacteria, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* with inhibition diameters of between 10 mm and 19 mm; and

Candida albicans yeasts with inhibition diameters of between 8.5 mm and 11 mm. The maximum sensitivity to the essential oil of the bitter orange peel powder is obtained for the *Bacillus subtilis* strain with a 19 mm inhibition diameter.

Key words : Citrus, *Citrus aurantium*, essential oil, hydrodistillation, granulometry, antimicrobial potency.

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

PARTIE I - Synthèse bibliographique

Chapitre I - Les agrumes

1 Généralités sur les agrumes.....	3
1.1 Historique	3
1.2 Production mondiale	3
1.3 Description morphologique	4
1.4 Importance	6
2 Bigaradier ou Oranger amer (<i>Citrus aurantium L.</i>).....	6
2.1 Taxinomie	7
2.2 Description botanique	8
2.3 Composition biochimique	9
2.5 Différentes variétés	11

Chapitre II - Les huiles essentielles

1 Définition.....	12
2 Répartition dans le règne végétal.....	12
3 Localisation dans la plante	13
4 Rôle dans la plante	13
5 Propriétés physico-chimiques.....	14
5.1 Propriétés physiques.....	15
5.2 Propriétés chimiques	15
6 Composition chimique	16
6.1 Terpénoïdes	16
6.2 Composés aromatiques.....	16
6.3 Autres composés	16
7 Facteurs de variabilité de la composition chimique	17
7.1 Facteurs intrinsèques	17
7.2 Facteurs extrinsèques	17

8	Méthodes d'extraction	18
8.1	Entrainement à la vapeur d'eau	19
8.2	Hydrodistillation	20
8.3	Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).....	21
8.4	Expression	22
8.5	Extraction par solvant organique	23
9	Méthodes d'analyse	23
9.1	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)	23
10	Domaines d'utilisation	24
10.1	Aromathérapie	24
10.2	Pharmacie	24
10.3	Parfumerie et cosmétologie.....	25
10.4	Industrie agro-alimentaire.....	25
10.5	Désinfection des locaux	26
11	Activité antimicrobienne.....	26
12	Conservation	26
13	Toxicité	27

PARTIE II - Étude expérimentale

Chapitre I - Matériel et méthodes

1	Matériel	29
1.1	Matériel biologique.....	29
1.2	Matériel non biologique	30
2	Méthodes d'étude	30
2.1	Préparation de la poudre d'écorce de bigarade.....	31
2.2	Tamisage de la poudre d'écorces de bigarade	32
2.3	Détermination de la teneur en eau des écorces de bigarade	32
2.4	Évaluation de l'huile essentielle de bigarade	33
2.5	Analyse de l'huile essentielle de bigarade.....	35
2.6	Étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de bigarade	38

Chapitre II - Résultats et discussion	
1	Teneur en eau des écorces de bigarade 42
2	Rendement des huiles essentielles de bigarade 42
3	Analyse de l'huile essentielle de bigarade 46
3.1	Caractères physico-chimiques 46
3.2	Propriétés physiques..... 46
3.3	Détermination de la composition chimique par GC/MS..... 47
4	Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de bigarade 50
	Conclusion générale..... 52
	Références bibliographiques..... 54
	Annexes.....66

Liste des tableaux

Tableau 1 Les souches microbiennes	30
Tableau 2 Granulométrie des échantillons de poudre d'écorces de bigarades.....	32
Tableau 3 Conditions opératoires de l'analyse des huiles essentielles par GC/MS.....	38
Tableau 4 Volumes, masses et rendements des HE en fonction de la taille des particules de bigarades.....	43
Tableau 5 Propriétés physico-chimiques des HE de bigarade	46
Tableau 6 Principaux composés chimiques contenus dans les échantillons d'HE de bigarade (GC/MS).....	48
Tableau annexe III 1 Résultats de l'aromatogramme.....	72
Tableau annexe IV 1 Évolution de la masse volumique de l'eau en fonction de sa température.....	75

Liste des figures

Figure 1 Coupe transversale d'orange amère (PARALORAN, 1971).....	4
Figure 2 Structure schématique d'une poche sécrétrice schizolysigène (BESOMBES, 2008).	5
Figure 3 Photos originales de bigaradier (prises à El-Affroun en mars 2018).....	8
Figure 4 Planche botanique de Citrus aurantium L.	8
Figure 5 Schéma du dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau (LUCCHESI, 2005).....	20
Figure 6 Schéma du dispositif d'hydro-distillation (KHEBRI, 2011).....	21
Figure 7 Schéma du dispositif d'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) (CHEMAT, 2005)	22
Figure 8 Méthode de l'aromatogramme sur milieu solide (PIBIRI, 2006)	39
Figure 9 Évolution du rendement d'H.E. en fonction du diamètre des particules	43
Figure 10 Évolution des masses cumulées d'HE en fonction du diamètre des particules	45
Figure 11 Huile essentielle de bigarade (photo originale)	46
Figure annexe I 1 Bain thermostaté monté en série avec le Clevenger (circuit fermé).....	66
Figure annexe I 2 Les différentes étapes de préparation de la poudre d'écorces de bigarades.....	67
Figure annexe I 3 Tamiseur.....	68
Figure annexe I 4 Sept échantillons de poudre d'écorces de bigarades.....	68
Figure annexe I 5 Conditions opératoires de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).....	69
Figure annexe I 6 Réfractomètre ABBE.....	70
Figure annexe III 1 Profil chromatographique GC/MS des huiles essentielles de bigarade.....	71
Figure annexe III 2 Photos originales montrant l'effet de l'HE de bigarade sur des souches microbiennes.....	73

Liste des abréviations

AFNOR	Association Française de NOR malisation
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du M édicament et des produits de santé
AOAC	Association of O fficial A nalytical C hemist
ATCC	American T ype C ulture C ollection
D_M	D iamètre M oyen
FAO	Food and Agriculture Organization
GC/MS	Chromatographie en phase G azeuse associée à la S pectrométrie de M asse
HDMO	H ydro D istillation assistée par M icro- O ndes
HE	H uile E ssentielle
UNCTAD	Conférence des N ations u nies sur le commerce et le développement

Introduction

De nos jours, les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde. La production mondiale des agrumes se situe autour de 66,4 millions de tonnes en 2010 **(LOEILLET, 2010)**. L'Algérie disposait d'une superficie 63.323 ha d'agrumes en 2011. Actuellement, seuls 55.000 ha sont productifs sur les 63.323 ha. Le centre du pays compte 56% de cette surface d'agrumes, 30% se trouvent à l'est du pays, et 14% à l'Ouest. La wilaya de Blida fait parti des principales wilayas agrumicoles avec 15809 ha **(HOUAOURA, 2013)**.

Le bigaradier (oranger amer) est un arbre originaire d'Inde et de Chine, rapporté d'Orient par les Croisés. Il est cultivé dans de nombreuses autres régions chaudes du globe, essentiellement pour ses qualités ornementales. Le zeste de ses fruits est traditionnellement utilisé pour stimuler l'appétit et faciliter la prise de poids mais également employé pour ses propriétés tonifiantes et stimulantes des défenses naturelles de l'organisme. Il peut être pris par toute personne en état de déficience immunitaire, soit seul, soit en synergie avec les produits classiques (extraits ou médicaments). Il est aussi recommandé aux personnes souffrant de problèmes hépatiques. Enfin, les propriétés sédatives et adoucissantes du zeste font que celui-ci est parfois conseillé pour traiter les troubles du sommeil **(MARIN et al., 1994 ; GORDON et al., 1995; LAMBEV et al., 1980; YUTING et al., 1990; CALOMME et al., 1996)**.

L'huile essentielle de bigarade est recherchée en parfumerie comme en cosmétique (bains, crèmes, lait, ...), en particulier pour ses vertus tonifiantes et régénérantes de la peau. Elle est réputée pour sa douceur. Elle a aussi toute sa place dans les préparations pharmaceutiques et en aromathérapie, où elle est utilisée pour ses nombreuses propriétés, notamment sur les systèmes nerveux, circulatoire et digestif. Elle est antispasmodique, hypotensive, anxiolytique et eupeptique **(FESTY, 2007; ESCARTIN, 2011)**.

Nous avons choisis cette espèce, le bigaradier, car elle est disponible de façon abondante dans notre région, et parce que l'écorce de son fruit, est épaisse et facile à éplucher, ce qui évite les pertes en composés odorants contenus dans les poches schizolysigènes de l'écorce du fruit.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de la taille des particules de poudre d'écorces de bigarades sur le rendement, la qualité et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de bigarade.

Pour ce faire, le présent travail est divisé en deux grandes parties,

- Une première partie intitulée synthèse bibliographique, qui comporte deux chapitres :
Le chapitre I, traite des agrumes et plus particulièrement du bigaradier ou oranger amer (*Citrus aurantium L.*).

Le chapitre II, résume de manière générale des notions importantes concernant les huiles essentielles.

- Et une deuxième partie intitulée étude expérimentale, qui se compose de deux chapitres:

Le chapitre I, expose le matériel et les méthodes d'étude concernant la partie pratique de notre travail.

Dans le chapitre II, il sera question de l'analyse et de l'exploitation des résultats issus des expériences réalisées.

À la fin de notre mémoire, sera issue une conclusion générale résumant notre démarche ainsi que l'analyse des résultats de l'étude expérimentale.

PARTIE I
Synthèse bibliographique

Chapitre I - Les agrumes

1 Généralités sur les agrumes

1.1 Historique

Le terme d'agrumes provient du latin *acrumen qui* signifiait, dans l'antiquité, arbres à fruits acides. Les agrumes englobent plusieurs variétés (LADANIYA, 2008; KHAN et al., 2010). Les agrumes sont originaires des pays du sud-est asiatique où leur culture se confond avec l'histoire des civilisations anciennes de Chine. C'est avec le rayonnement des civilisations chinoises et hindoues qu'au cours du premier millénaire avant notre ère, la culture des agrumes commença à se propager à l'ensemble des pays du sud-est asiatique : sud Japon et archipel de Malaisie (LOUSSERT, 1989). Ce sont des arbres fruitiers d'importance majeure et qui ont voyagé au gré des invasions et des grandes conquêtes du monde (JEAN-MARIE, 2008).

Plus tard, les agrumes ont été développés au Maghreb et en Espagne par les Arabes qui, par leurs conquêtes, ont introduit le bigaradier dans l'empire des Almohades. L'oranger a été importé, quelques siècles après, par les Maures d'Andalousie. En Algérie, le bigaradier embellissait déjà, pendant la période Ottomane (du 16 au 18 siècle), les jardins des Beys (Casbah, Hauteurs d'Alger et Constantine) (HADJ SAHRAOUI, 2007). Au début de la colonisation en 1850, le Mandarinier fut introduit en Algérie par M. Hardy. Au dix-neuvième siècle, le père Clément de l'orphelinat agricole de Misserghin (W. d'Oran), effectuant un croisement de mandarinier avec l'oranger, découvrit la Clémentine qui s'est avérée une variété précoce parmi le groupe des mandarines. Cette variété a été lancée et développée en verger de production dont actuellement plusieurs variétés et clones sont issus et commercialisés à travers le monde (HADJ SAHRAOUI M, 2007). Les oranges représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes au monde (LI, 2009). Elles sont nommées « Naranja » en Espagne, « Laranja » au Portugal, « Arancia » en Italie, « Orange » en France, « Malta » en Inde, « Kan » au Japon, « Portucal » en Grèce et « Tchina » dans les pays du Maghreb (KIMBALL, 1999).

1.2 Production mondiale

Les agrumes sont les fruits les plus produits dans le Monde. Ils représentent le groupe de fruits le plus important du commerce international (LOUSSERT, 1989). Ils occupent la

première place des productions fruitières dans le monde avec 96 millions de tonnes produites en 2000 (FAO, 2001). La production mondiale d'agrumes s'est élevée à 123 millions de tonnes en 2010 avec une part majoritaire d'environ 55% pour les oranges. (UNCTAD, 2013).

Le bassin Méditerranéen produit des agrumes pour alimenter le marché international du fruit frais avec des exportations de l'ordre de 5.424100 tonnes pour la campagne de 1997 et 1998. Les agrumicoles du bassin Méditerranéen sont : L'Espagne, l'Italie, l'Egypte, le Maroc, la Grèce, l'Algérie et la Tunisie. L'Espagne étant le premier pays producteur avec 5578000 tonnes en 1999. (FAO, 2001).

1.3 Description morphologique

Péricarpe (écorce)

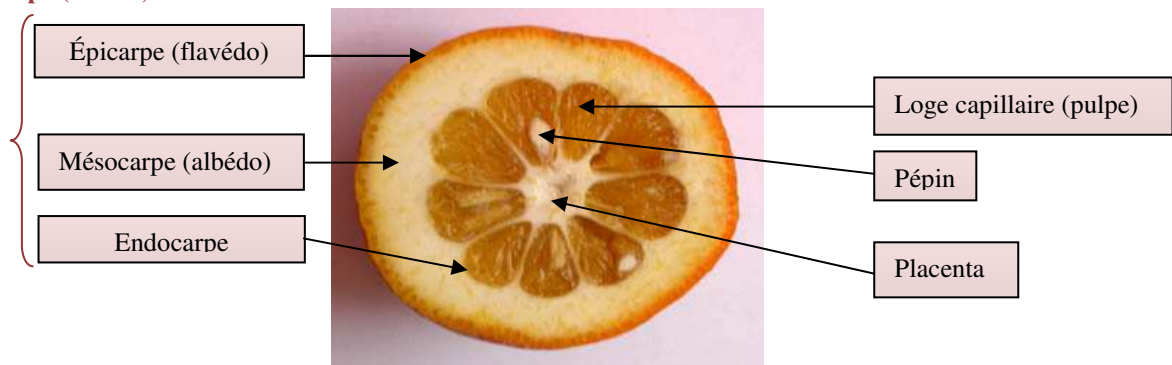


Figure 1 Coupe transversale d'orange amère (PARALORAN, 1971).

Les agrumes sont des arbres ou des arbustes, souvent épineux et atteignant 5 à 15 m de haut. Leur feuillage, généralement vert très foncé, est dense et persistant sauf pour quelques variétés hybrides dont les feuilles sont caduques ou semi-persistantes (PARALORAN, 1971). Les agrumes cultivés en orangerie, sont généralement composés de deux parties :

- une partie aérienne, essentiellement constituée par la variété (ou cultivar) de l'espèce (oranger, mandarinier, clémentinier, citronnier, pomélo, ...). C'est la partie productive de l'arbre, celle qui porte les fruits.
- une partie souterraine, formée par le porte-greffe (ou sujet). C'est la partie qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol, et son alimentation en eau et en sels minéraux.

La fleur des agrumes est composée :

- d'un calice en forme de coupe protectrice constitué de 3 à 5 sépales verts soudés,
- d'une corolle constituée de 4 à 8 pétales généralement blancs ou légèrement colorés en pourpres chez certaines espèces,

- de 20 à 30 étamines soudés à leurs bases par groupes de 3 à 4 (LOUSSERT, 1989).

Les fruits charnus des agrumes sont classés parmi les baies. Ils sont le plus souvent comestibles (BOCCAS et al., 1976). Ils sont revêtus d'une peau généralement lisse et sont divisés intérieurement en loges, dites quartiers. Ces loges contiennent les vésicules de jus et des pépins. La baie des agrumes est formée de l'épicarpe (ou flavédo) qui correspond à la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jaune orangé ou en rouge et, comprenant de nombreuses poches sécrétrices d'huile essentielles (TENSCHER et al., 2005). Le mésocarpe (ou albédo) est la couche intérieure de l'écorce blanche et spongieuse et riche en pectines (BOUROUKAA, 2012). La combinaison flavédo et albédo est appelée péricarpe, communément connu sous le nom d'écorce ou peau. (SALUNKHE et KADAM, 1995). Cette peau est aussi appelée zeste et, elle constitue la partie non comestible du fruit. Parfois elle constitue la majeure partie du fruit (pamplemousse, cédrats...) et, d'autre fois, elle reste peu développée (orange, mandarines,...). L'endocarpe (ou pulpe) représente la partie comestible du fruit, il est composé de segments, recouverts par une membrane mince, distribués autour d'un axe central (placenta) ayant la même composition que l'albédo. Les segments sont composés de cellules à jus recouvertes par des membranes plus fines. Pendant que le fruit mûrit, le jus s'accumule dans les vacuoles et occupe la majeure partie du volume des cellules mûres. (KIMBALL, 1999). Tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique, mais les éléments composant cette structure varient avec l'espèce et la variété (LOUSSERT, 1989). La figure 1 illustre bien la composition générale du fruit des agrumes.

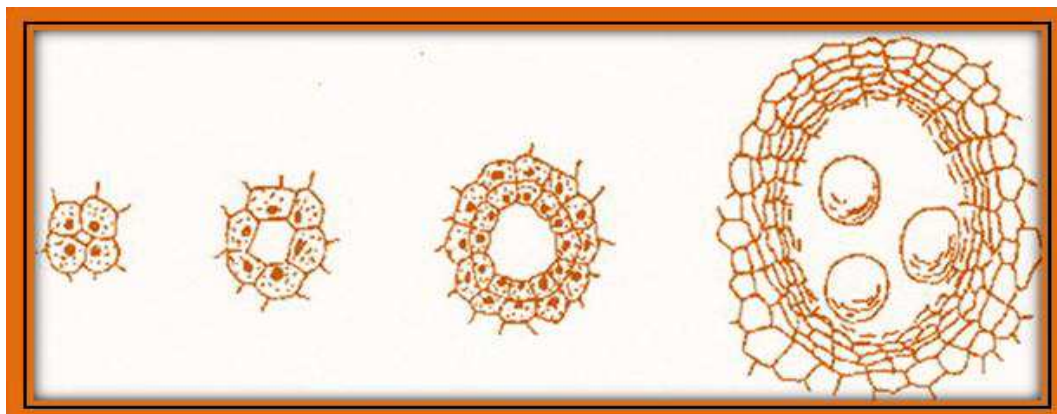


Figure 2 Structure schématique d'une poche sécrétrice schizolysigène (BESOMBES, 2008).

Les huiles essentielles sont des extraits volatils que les citrus élaborent et stockent dans des poches schizolysigènes (BRUNETON, 1993). Ces poches sécrétrices sont localisées dans tous les organes végétaux des citrus : l'écorce, les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits (le flavedo) et les graines. Les cellules, entourant la poche, se divisent et s'organisent pour

constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne (**Figure 2**) (**BESOMBES, 2008**).

Dans le cas du bigaradier, l'huile essentielle de son zeste est appelée « essence de d'orange amère ou de bigarade », celle prélevée des feuilles est dite « huile essentielle de petit grain de bigarade », alors que celle des fleurs est « l'huile essentielle de néroli bigarade » (**GUILHEM, 2007**).

1.4 Importance

1.4.1 Importance alimentaire

Les agrumes présentent une composition variable. Ils ont un apport énergétique modéré (environ de 25 à 45 calories pour 100 g). Ils contiennent très peu protéines et de lipides. Ils sont riches en fibres (notamment en pectine, une fibre soluble) qui facilitent le transit intestinal. Ils représentent aussi une bonne source de minéraux (calcium, potassium, magnésium...). Leur contenu exceptionnel en antioxydants puissants, est intéressant en prévention des maladies cardiovasculaire et dégénératives liées à l'âge. Ce sont les fruits vedettes de la saison hivernale en raison de leur teneur en vitamines C (environ 30 à 55 mg pour 100g) (**RACHEL, 2015**). Ils représentent une excellente source de vitamine C et ils renferment également des vitamines : A (rétinol), B3 (nicotinamide), B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine) et E (tocophérol) (**SOUSI et al., 1994**).

1.4.2 Importance économique

Les agrumes revêtent une grande importance économique. En effet, ils constituent une source de revenus, tant pour les producteurs individuels, que pour les pays producteurs. L'arboriculture fruitière soutien les gens qui la pratiquent, par la vente de leurs produits, pouvant facilement améliorer leurs conditions de vie tout en augmentant les niveaux de revenu qui sont les leurs (**BONKENA, 2001**).

2 Bigaradier ou Oranger amer (*Citrus aurantium L.*)

L'étymologie du mot bigaradier se décline comme suit :

- Nom scientifique : *Citrus aurantium L.*
- Nom arabe : la randj, الرنج (**BABA AÏSSA, 2011**).
- Nom vernaculaire (commun) : bigaradier, oranger amer ou oranger de Séville (**LUCIENNE, 2010**).

Le bigaradier est un agrume appartenant à la famille Rutaceae. Il n'est pas très différent, par ses feuilles persistantes et ses fleurs au parfum suave, de l'oranger doux (LUCIENNE, 2010). Son fruit (la bigarade ou l'orange amère) est connu pour son goût extrêmement amer et aigre (BOCCO et al., 1998). L'orange amère se distingue de l'orange douce, par sa peau plus épaisse, plus rugueuse et par sa pulpe acide et amère (LEROY, 1968). En raison de leur goût aigre et amer, les bigarades ne sont pas employées comme fruits comestibles, elles sont plutôt utilisées pour la fabrication de jus et de marmelades (confitures d'orange amère) (ERSUS et CAM, 2007).

2.1 Taxinomie

La position systématique du bigaradier est établie chronologiquement comme suit (KIMBALL, 1999; MANNER et al., 2006; LOUSSERT, 1989) :

- Règne : Végétal,
- Division : Embryophyta,
- Embranchement : Spermatophyta,
- Sous-embranchement : Angiospermes,
- Classe : Dicotyledoneae,
- Sous-classe : Archychalmydeae,
- Ordre : Géraniales,
- Famille : Rutaceae,
- Sous-famille : Aurantiodeae,
- Genre : Citrus,
- Espèce : *Citrus aurantium L.*

2.2 Description botanique



Figure 3 Photos originales de bigaradier (prises à El-Affroun en mars 2018).

Le bigaradier est un bel arbre fruitier de 5 à 10 mètres de hauteur à tronc très ramifié en branches épineuses. Il vit sous des climats tempérés, mais dispose d'une résistance au froid jusqu'à 2C°. Il est sauvage ou cultivé pour servir de porte greffe et pour la culture de la fleur d'oranger. Il est particulièrement fréquent dans la Mitidja.



Figure 4 Planche botanique de *Citrus aurantium* L.
(<https://fr.wikipedia.org/wiki/Bigaradier>)

Ses feuilles vertes brillantes ont une faible odeur et une saveur amère, elles sont ovales entières, subaiguës au sommet, à pétiole articulé et plus ou moins ailé, elles mesurent environ 8 cm de long sur 4 cm de large.

Les fleurs du bigaradier sont blanches et très odorantes et groupées à l'aisselle des feuilles. (ESCARTIN, 2011). Elles possèdent 4 à 5 pétales imbriqués, et sont souvent recourbées vers l'arrière (POLESE, 2008).

Le fruit appelé « bigarade » est ronds, parfois ovale ou aplati. Il tient longtemps sur l'arbre sans perdre son parfum. C'est une orange à jus très chargé d'acidité et d'amertume, avec au moins de 15 à 20 pépins par fruit. Sa peau est rugueuse, plus ou moins épaisse et piquetée (MESSAOUDI, 2005 ; MOYSE, 1981).

Les graines sont de couleur blanchâtre à verdâtre pâle, aplaties et angulaires. Elles sont poly-embryonnaires, ce qui signifie qu'elles ont plusieurs embryons qui peuvent germer. Les embryons sont soit zygotiques (dérivant de la pollinisation de l'ovaire par reproduction sexuée), soit Nucellaires (provenant entièrement à partir de la plante mère et présentant des caractéristiques très similaires à la plante mère) (POLESE, 2008).

2.3 Composition biochimique

2.3.1 Feuille

Les feuilles de bigaradier sont principalement composées de grandes molécules chimiques emprisonnant de nombreux éléments minéraux tels que calcium, potassium, sodium, magnésium, soufre et phosphore. Elles contiennent également de la chlorophylle, des nutriments (glucides, lipides et protéines, des acides aminés), des composés aromatiques complexes. Des acides gras, des alcools primaires, des esters et des hydrates de carbone ont été identifiés comme les principaux constituants des feuilles d'agrumes. (ANOOP, 2012).

Les feuilles fraîches contiennent 0,02 à 0,40 % d'essence dite de « petit grain bigarade » composée de carbures terpénique (limonène) et surtout d'alcools (linéale, néroli) et d'un peu d'anthranilate de méthyle et de bétaine, d'hétérosides flavoniques (notamment l'hespéridoside), des limonoïdes ou amaroides.

2.3.2 Fleur

Les fleurs fraîches contiennent 0,05 à 0,10% d'essence dite de « néroli ou fleur d'oranger », composée de limonène, linéale, néroli et leurs esters, d'anthranilate de méthyle (surtout responsable de l'odeur).

2.3.3 Fruit

L'écorce de bigarade est composée essentiellement de cellulose, d'hémicellulose, de substances pectiques, de pigments (flavonoïdes, anthocyanines et caroténoïdes) et d'huile essentielle dite d'«orange amère ou bigarade ». Elle contient également d'autres composés tels que, des minéraux, des glucides, des protéines et peu de lipides (LU et al., 2009).

2.4 Domaines d'utilisation

L'utilisation traditionnelle des citrus et due à leurs propriétés thérapeutiques, remonte au 4^{ème} - 5^{ème} siècle avant J.C. (ARIAS et RAMON-LACA, 2005).

Le zeste d'orange amère renferme de la synéphrine et de la N-méthyl tyramine, ce qui a entraîné la création par des médecins chinois d'un produit pharmaceutique aux propriétés adrénergiques (action stimulante similaire à celle de l'adrénaline), en concentrant ces deux substances grâce à un procédé d'hémi-synthèse, donnant un extrait qui est en fait un véritable médicament de la classe des sympathomimétique, employé contre les effets du choc anaphylactique. De plus, l'extrait d'orange amère est une substance thermogène, il augmente le métabolisme basal et la quantité de calories brûlées pendant la journée, en stimulant le système nerveux, de la même façon que l'adrénaline (DIONNE, 2002).

Les feuilles d'orange amère sont utilisées pour leur propriété antispasmodique, tonique et fébrifuge et dans le traitement de l'excitation nerveuse et les palpitations. La décoction des feuilles cause un goût très amer et désagréable à boire surtout pour les enfants, il est recommandé donc d'utiliser les feuilles incorporées dans la confiture pour corriger la saveur désagréable (ROCHEFORT, 1789).

En phytothérapie, on utilise le fruit pour faciliter la digestion et diminuer les flatulences. En infusion, il est censé dissiper les maux de tête et faire baisser la fièvre. Son jus stimule les défenses du système immunitaire. Les huiles essentielles peuvent être prescrites pour réguler le rythme cardiaque, calmer les palpitations, favoriser le sommeil. On peut aussi effectuer des massages relaxants avec l'essence de néroli diluée. Enfin, les huiles essentielles d'essence de néroli et de petit-grain sont employées en parfumerie (ESCARTIN, 2011).

L'essence d'orange amère issue du zeste du fruit est antispasmodique, hypotensive, anxiolytique et eupeptique (FESTY, 2007).

2.5 Différentes variétés

Il existe différentes variétés d'oranger amer : L'oranger amer commun, l'oranger Bittersweet du Paraguay (apepu), l'oranger amer Willow leaf, l'oranger amer à feuilles de myrte (chinotto), le bigaradier Gou Tou,...(**BOUSBIA, 2011**).

Chapitre II - Les huiles essentielles

1 Définition

L'essence est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes sécréteurs variables selon la partie de la plante considérée. Les normes **AFNOR (2000)** définissent les huiles essentielles comme des extraits odorants issus d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par expression du péricarpe frais des Citrus à l'aide de moyens mécaniques adaptés et sans chauffage.

Néanmoins, cette définition n'exclut pas de faire la distinction entre les termes d'huiles essentielles et d'essences. En effet, pour les premières, l'essence est transformée par la chaleur du procédé de distillation, pour les secondes, on peut considérer que leur composition chimique est identique à celle de l'essence naturelle contenue dans les poches oléifères de l'écorce du fruit. (**COCORIN et GUERIN, 2003**).

Généralement, riches en molécules aromatiques, les huiles essentielles sont qualifiées de substances odorantes. L'appellation « huile essentielle » vient d'huile : caractère visqueux et hydrophobe et essentielle ne signifie pas essentielle au sens de « indispensable » mais signifie plutôt la quintessence ou la fragrance qui représente le caractère principal de la plante : « Quinta essentia ». C'est le résultat d'une harmonie de différents senteurs qui s'épanouissent dans une création unique et originale.

C'est souvent la multiplicité des petits composants qui donne la tonalité thérapeutique et fait l'efficacité d'une huile essentielle. Si, dans bien des cas, les composants principaux sont à la source de l'effet recherché, leur utilisation en produit isolé ne donne pas satisfaction.

Selon la **Norme ISO 9235** concernant les matières premières d'origine végétale, une huile essentielle est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche ».

2 Répartition dans le règne végétal

Les espèces capables d'élaborer des constituants composant les huiles essentielles, sont spécifiques des spermatophytes, qui sont répartis dans un nombre limité de familles telles que les myrtacées, les lauracées, les rutacées, les lamiacées, les apiacées, les astéracées, les

cupressacées, les poacées, les zingibéracées, les pipéracées, les ombellifères, les labiacées, les géraniacées... (BALZ, 1986).

3 Localisation dans la plante

Les huiles essentielles peuvent être accumulées dans tous types d'organes végétaux tels que les fleurs (oranger, rose, lavande, bergamotier) mais aussi des feuilles (citronnelle, sauge, menthe eucalyptus, laurier noble), les écorces (cannelier), les bois (bois de rose, camphrier, santal), les racines souterraines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre, acore), les fruits secs (anis, badiane, persil), les graines (muscade), la peau des fruits (agrumes) et les bourgeons (cassis). Il n'est pas exclu que si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière (qualitative et quantitative) peut varier selon sa localisation dans la plante. (BRUNETON, 2009).

La biosynthèse et l'accumulation des composés volatils sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. (BRUNETON, 2009).

Ces structures peuvent être :

1. Des cellules sécrétrices d'huiles essentielles (lauracées).
2. Des organes sécréteurs :
 - Poils sécréteurs (labiées)
 - Poches sécrétrices schizogènes (myrtacées) ou schizolysigènes (rutacées)
 - Canaux sécréteurs (ombellifères, composées)

Signalons que plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe. (FAHN, 1988).

Les huiles essentielles sont stockées dans le cytoplasme de certaines cellules végétales sécrétrices qui se situent dans un ou plusieurs organes de la plante. (BRUNETON, 2009).

4 Rôle dans la plante

Bien que les produits du métabolisme des plantes soient souvent classés en métabolites primaires et secondaires, la distinction entre les deux n'est pas facile. Les premiers comme les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques constituent la machinerie métabolique de base de toute cellule. D'autres métabolites tels que la chlorophylle et la lignine sont nécessaires à la croissance et au développement de l'organisme. Au contraire,

les métabolites secondaires peuvent ne se rencontrer que dans des tissus spécifiques ou à des stades particuliers du développement ; ils ne jouent pas de rôle bien établi ni dans le développement ni dans la survie de l'organisme. (**HOPKINS, 2003**).

Il y a beaucoup de spéculations quant au rôle des huiles essentielles. Il semble qu'elles ont tout d'abord et vraisemblablement un rôle défensif et répulsif : contre les insectes (**ESPINOSA-GARCIA et al., 1993**), les animaux herbivores (**PENUELAS, 1993**) et les champignons (**ANDREWS et al., 1980**).

Par ailleurs, les spécialistes (**GERSHENZONG, 1994; LANGENHEIM, 1994; SEUFERT et al., 1995**) considèrent les huiles essentielles comme des sources de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou de réguler son environnement (rôle écologique) : attraction des insectes pollinisateurs (**BRUIN et al., 1992; TAKABAYASHI et al., 1994**), action répulsive sur les prédateurs (**LUSIÀ et al. 1996**), inhibition de la germination des graines (allélopathie) (**BROWN, 1967; ASPLUND, 1969; PEÑUELAS et al., 1995**) voire communication entre les végétaux (émission de signaux chimiques signalant la présence d'animaux herbivores) (**DICKE et al., 1990**). Les huiles essentielles jouent un rôle important dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales (**KNUDSON et al., 1993**) puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs.

Le rôle des huiles essentielles n'a pu être clairement démontré. En effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme (**BELAÏCHE, 1979**). Il est toute fois admis qu'ils ont un rôle écologique; pour certaines d'entre elles, le rôle a été établi expérimentalement dans le domaine d'interaction végétale comme agent allélopathique et notamment comme des inhibiteurs de germinations (**KHEBRI, 2011**). Certains auteurs pensent que la plante utilise son huile essentielle pour repousser les insectes, ou au contraire pour les attirer et favoriser la pollinisation (**BELAÏCHE, 1979**).

Les huiles essentielles sont majoritairement à la source d'odeurs jouant le rôle à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif pour la pollinisation, de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement (**SUTOUR, 2010**).

5 Propriétés physico-chimiques

La pharmacopée française énonce, pour les huiles essentielles qui y figurent, un certain nombre de contrôles à effectuer. Les examens pratiqués portent sur :

- Les caractères organoleptiques : aspect, odeur, couleur et goût.

- Les caractères physiques : densité, indice de réfraction, déviation polarimétrique, solubilité dans l'éthanol, point de congélation.
- Certaines caractéristiques chimiques : indice d'acide, indice d'ester, indice de carbonyle...

5.1 Propriétés physiques

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques et organoleptiques :

- Concernant leurs caractères organoleptiques, elles sont généralement liquides à température ambiante, incolores ou jaune pâles sauf l'huile essentielle d'azulène qui est de couleur bleue (**BARDEAU, 1976; LEGRAND, 1978; LEMBERG, 1982; BRUNETON, 1999; BEKHECHI et ABDELOUAHID, 2014**). Chaque huile essentielle a une odeur caractéristique selon sa richesse en composés oxygénés et aromatiques. Ce sont des parfums.
- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides ou légèrement visqueuses, voire résinoïdes, très odorantes et volatiles.
- Elles sont solubles dans les alcools, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, mais elles sont insolubles ou peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- Leur température d'ébullition très élevée, varie de 160°C à 240°C.
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99 (les huiles essentielles de saffran, de vétiver, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction généralement élevé.
- Elles ont un pouvoir rotatoire dû à la présence de carbones asymétriques. Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles sont de conservation limitée car très altérables et sensibles à l'oxydation et à la lumière, mais elles ne rancissent pas.

5.2 Propriétés chimiques

Les huiles essentielles peuvent être caractérisées des propriétés chimiques telles que les indices d'acide, d'esters et de saponification.

6 Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques. Les constituants des H.E. sont issus de multiples voies de biosynthèse qui opèrent dans des compartiments cellulaires différents. Toutes ces voies prennent ancrage à partir des intermédiaires métaboliques des principaux constituants cellulaires que sont les sucres, les lipides et les acides aminés (**FERNANDEZ et CHEMAT, 2012**).

Les huiles essentielles contiennent des composés volatils qui présentent des fonctions chimiques d'une très grande diversité leur conférant leur complexité (**GARNERO, 2003**).

Les constituants des huiles essentielles appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényl-propane, beaucoup moins fréquents, d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**BRUNETON, 1999**).

6.1 Terpénoïdes

Les terpènes sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. On rencontre dans les huiles essentielles principalement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone), plus rarement des di-terpènes (20 atomes de carbone), ainsi que leurs dérivés oxygénés.

6.2 Composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phényl-propane (composés oxygénés). Ils sont très odorants et issus de la voie métabolique secondaire des shikimates tel que l'eugénol (huile essentielle de girofle), l'anéthol (huile essentielle de Badiane) et l'aldéhyde (H.E. d'anis), ainsi que et le carvacrol (huile essentielle d'origan), l'acide et l'aldéhyde cinnamiques. L'eugénol, l'anéthol, le safrole, l'arsarone, la fenchone, la myristicine et l'apiol sont des exemples de composés en C₆-C₃, la vaniline composé en C₆-C₁. Ils sont moins fréquents que les terpènes mais leur présence est très importante car ils sont responsables des caractères organoleptiques des essences.

6.3 Autres composés

Les huiles essentielles peuvent contenir des composés aliphatiques plus ou moins fonctionnalisés (**BRUNETON, 1999**). Elles peuvent également renfermer d'autres

composés n'appartenant pas à ces deux groupes tels que les acides gras, les lactones ou des produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils tels que l'hydrolyse enzymatique des hétérosides (**BERBARD et al., 1988**).

7 Facteurs de variabilité de la composition chimique

7.1 Facteurs intrinsèques

7.1.1 Origine botanique

La composition chimique d'une huile essentielle varie selon l'espèce productrice (**PARDINI et LUCHRONI, 1996**).

7.1.2 Chémotype ou chimiotype ou race chimique

Il désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes présentent des variations de leurs métabolites secondaires en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement,...), bien que leur morphologie ainsi que leur génétique ne soient pas transformées, seul leur phénotype chimique est modifié. Le chémotype correspond à une classification désignant la molécule chimique majoritairement présente dans l'huile essentielle (**BRUNETON, 1999**).

7.1.3 Site producteur

Le rendement d'huile essentielle et son contenu dépend du nombre de glandes sécrétrices existantes et de leur localisation au niveau des différents organes de la plante. La teneur en huile essentielle est plus importante dans les fleurs que dans les feuilles (**EL ABED et KAMBOUCHE, 2003**).

7.1.4 Cycle biologique

La composition en huile essentielle d'une plante donnée varie avec son âge et les différents stades de son développement au cours des saisons (**BRUNETON, 1987**). Ce qui montre l'importance du choix de la date de récolte (**BRUNETON, 1999**).

7.2 Facteurs extrinsèques

7.2.1 Origine géographique

Les rendements des huiles essentielles et leur composition varient selon l'origine géographique de la plante (**EL ABED et KAMBOUCHE, 2003**).

7.2.2 Facteurs écologiques

Les caractéristiques écologiques exercent une influence directe sur la production et la quantité d'essence (**EL ABED et KAMBOUCHE, 2003**).

7.2.2.1 Facteurs climatiques

La durée d'exposition au soleil, les températures nocturnes et diurnes, l'humidité, le régime des vents, la pluviométrie,... sont des paramètres responsables de modification de la proportion en essence et de leur composition chimique (**EL ABED et KAMBOUCHE, 2003**).

7.2.2.2 Facteurs pédologiques

La nature du sol (calcaire, siliceux,...), les aspects culturels comme la densité de la culture, l'apport d'engrais, le nombre de récoltes par an et l'alimentation en eau affectent d'une manière déterminante la qualité des huiles essentielles et leur rendement (**EL ABED et KAMBOUCHE, 2003**).

7.2.3 Procédés d'extraction

Les procédés d'extraction des huiles essentielles peuvent être responsables de leur instabilité. Ainsi, l'hydrodistillation, par exemple, donnerait une huile essentielle avec quelques différences par rapport à l'essence présente initialement dans les organes accumulateurs du végétal. Car la température, l'eau, et l'acidité peuvent induire quelques modifications (hydrolyse, réarrangement, isomérisation, oxydation,...) (**BRUNETON, 1993**).

8 Méthodes d'extraction

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est des plus difficiles et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité (**LARDRY et HABERKORN, 2007**).

Idéalement une extraction d'huile essentielle doit permettre l'obtention d'un extrait dont les composés sont les plus proches et les plus représentatifs de ceux contenus dans la matrice végétale. Par ailleurs, cette méthode ne doit pas faire de discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire des réactions biochimiques ou des dégradations thermiques. Le procédé doit également éviter les réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner des pertes de composés volatils. Cependant, la réalité est tout autre car malgré des progrès techniques très significatifs réalisés ces dernières années, il n'existe pas un procédé universel permettant de conjuguer

qualité, rendement, cinétique rapide, écologie, automatisation et simplicité d'installation d'extraction à moindre coût à l'échelle industrielle.

Le choix d'une technique d'extraction est souvent orienté selon la nature de la matière première végétale à traiter et le produit final qu'on veut obtenir : une huile essentielle ou un extrait aromatique.

8.1 Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est le procédé le plus couramment employé (**BALZ, 1986**). Cette technique a l'avantage d'éviter le contact direct de la matière végétale, fraîche ou sèche, à traiter avec l'eau. La technique consiste à injecter de la vapeur d'eau, fournie par une chaudière, au bas de la charge végétale placée dans un alambic au dessus d'une grille.

Lors du passage de la vapeur d'eau à travers le végétal, les cellules oléifères éclatent et libèrent leur contenu d'huile essentielle. La vapeur d'eau chargée en composés volatils, récupérés au sommet de la matrice végétale, est ensuite condensée au niveau d'un serpentín qui sert de condenseur où circule de l'eau froide avant d'être acheminée vers un essencier ou un vase florentin. On obtient alors deux phases, l'une aqueuse (eau florale) et l'autre hydrophobe (organique) qui est l'huile essentielle. La séparation se fait par différence de densité après décantation du distillat refroidi. On appelle "eau aromatique " (à ne pas confondre avec eau aromatisée) ou " hydrolat " ou " eau distillée florale " le distillat aqueux qui subsiste après l'entraînement à la vapeur d'eau, une fois la séparation de l'huile essentielle a été effectuée.

Lors de cette extraction, le transfert de chaleur s'effectue par la condensation sur la charge végétale d'une partie de la vapeur d'eau, l'eau liquide condensée sur la charge cédant la chaleur latente nécessaire à l'évaporation de l'HE. Cette extraction peut être aisée ou lente suivant la localisation des cellules sécrétrices d'H.E.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale évite certains phénomènes pouvant induire l'hydrolyse des esters, des dégradations pouvant nuire à la qualité de l'huile, sans pour autant éliminer complètement les réactions d'isomérisation, de polymérisation et d'oxydations... (**CROUZET, 2004**).

Le temps de distillation varie au cas par cas selon la plante. Par exemple la distillation des fleurs de lavande et du romarin dure environ 30 minutes (**CASSEL et al., 2009**) tandis que celle du clou de girofle ou des fleurs d'ylang-ylang (**KRISTIAWAN et al., 2008**) peut

durer jusqu'à 24 heures ou même d'avantage en temps continu. Ce temps d'extraction prolongé entraîne une grande consommation d'énergie.

Le schéma du dispositif d'entrainement à la vapeur d'eau est présenté dans la **figure 4**.

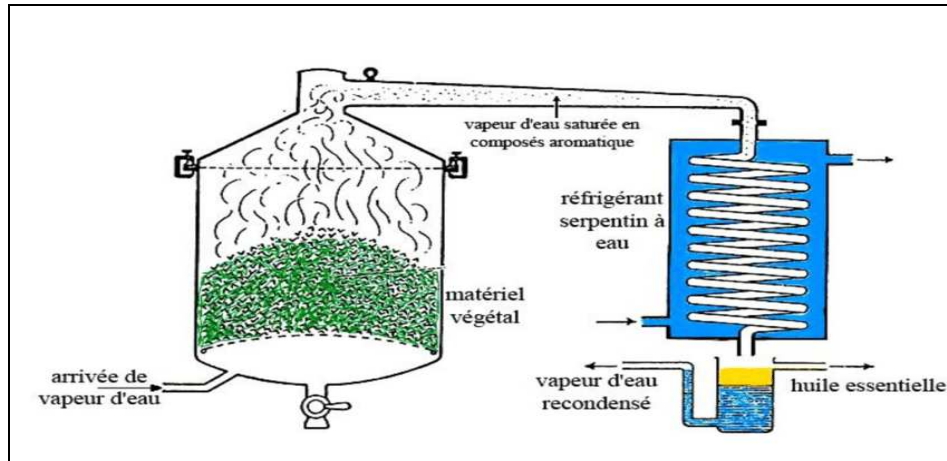


Figure 5 Schéma du dispositif d'entrainement à la vapeur d'eau (LUCCHESI, 2005)

8.2 Hydrodistillation

À la différence de la distillation à la vapeur d'eau, dans l'hydrodistillation, la matière première est en contact direct avec l'eau. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale, qui peut être fraîche ou sèche, dans un bain d'eau. En fonction de la densité du feuillage et de la quantité de matériel par charge, le végétal peut être immergé complètement ou flotter à la surface de l'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique, soit par chauffage direct à la base de l'alambic par des combustibles divers, soit par de la vapeur surchauffée injectée dans une double enveloppe conçue à cet effet, entourant l'alambic. Cette technique d'extraction est souvent utilisée dans le cas où la distillation à la vapeur de certains végétaux provoque un tassement et un agglutinement en formant une masse compacte bloquant tout passage à la vapeur (GUENTHER, 1948).

Le principe de l'entrainement des composés volatils de l'HE reste le même que celui de la distillation à la vapeur d'eau. Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Il consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Ces vapeurs sont condensées. L'huile essentielle est récupérée à la surface de l'eau aromatique (ou phase aqueuse) ainsi obtenue (MILLET, 2013). Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est-à-dire que la pression partielle de la vapeur

d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux (BRUNETON, 1999 ; CHOUITAH, 2011).

La **figure 5** représente un schéma simple du montage du dispositif d'hydrodistillation type Clevenger. Le montage Clevenger est désigné par le nom de son inventeur, Joseph Franklin Clevenger, qui l'a publié en 1928 (CLEVENGER, 1928).

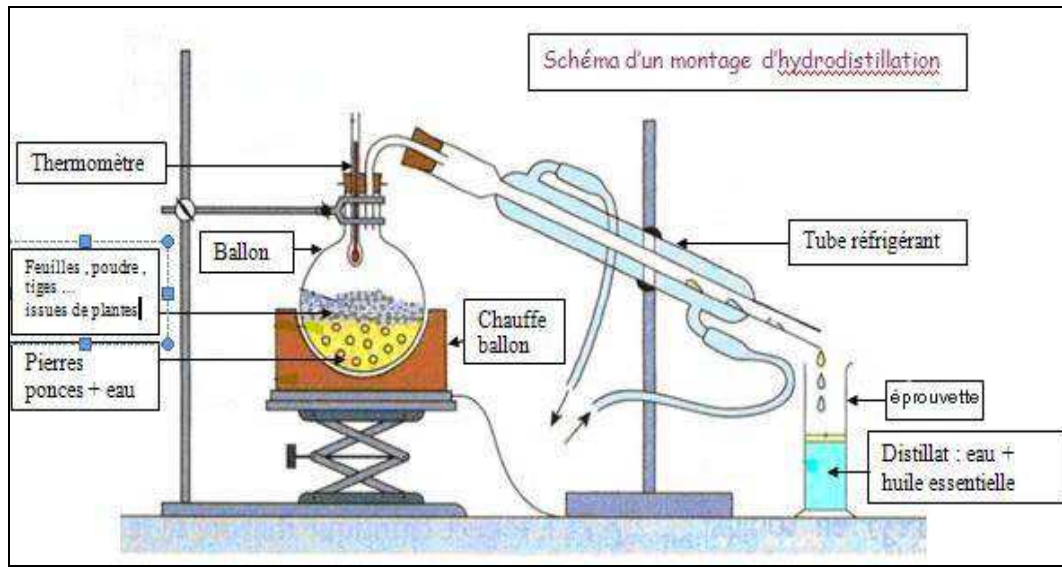


Figure 6 Schéma du dispositif d'hydro-distillation (KHEBRI, 2011)

8.3 Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO)

Le procédé d'hydrodistillation par micro-ondes est basé entièrement sur le principe de l'hydro-distillation classique. Il consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à microondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydro-distillation classique (STASHENKO et coll., 2004).

La **figure 6** représente un schéma simplifié du dispositif d'HDMO.

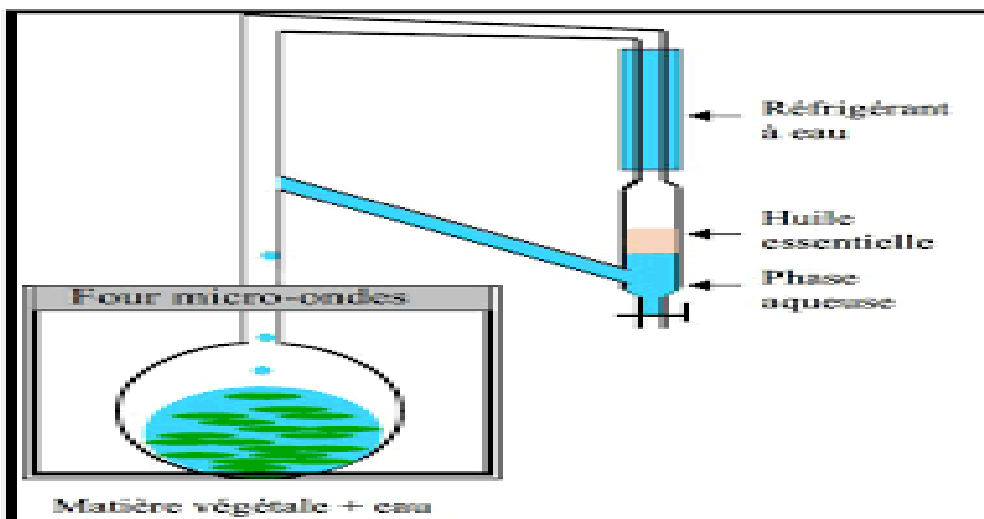


Figure 7 Schéma du dispositif d'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) (CHEMAT, 2005)

D'un point de vue quantitatif, l'hydrodistillation assistée par micro-ondes, dans son ensemble, apporte des résultats extrêmement intéressants par rapport aux méthodes classiques utilisées comme références (entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation).

Les rendements en huiles essentielles ou en extraits aromatiques obtenus par les techniques assistées par micro-ondes sont généralement du même ordre de grandeur ou supérieurs à ceux obtenus par des méthodes de références pour des temps d'extraction beaucoup plus faibles (10 s à 15 minutes). D'un point de vue qualitatif, les différences interviennent surtout au niveau des pourcentages de certains composés aromatiques. Le paramètre le plus valorisable est incontestablement le temps d'extraction. Alors que l'ordre de grandeur temporel des extractions classiques réalisées (entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation) est l'heure, celui des extractions assistées par micro-ondes est en général la seconde voire tout au plus la minute (CHEMAT, 2005).

8.4 Expression

Cette méthode d'extraction est utilisée dans environ 10% des cas. On l'emploie pour tous les hespérides (orange, limette, pamplemousse, mandarine, etc.). Elle consiste à enlever la pulpe du fruit et les écorces vidées sont mouillées et laissées au repos environ 10 heures. La pulpe sert à faire des jus de fruits alors que l'écorce permet d'extraire des huiles essentielles. Il faut donc presser le zeste à froid par l'intermédiaire d'énormes presses hydrauliques pour récolter l'huile essentielle (SALLÉ, 1991).

8.5 Extraction par solvant organique

Certaines huiles essentielles ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être utilisé. C'est pourquoi on utilise les solvants. C'est une méthode très peu employée, elle représente 3% des cas. On met à macérer les fleurs ou les sommités fleuries dans un solvant organique. On utilise, le plus souvent, le benzène. Puis, on centrifuge pour récolter l'huile essentielle (**SALLÉ, 1991**).

D'après **BENMERIE et BOURGUIG (1996)**, cette méthode peut être appliquée à toutes les matières végétales, car les molécules odorantes sont solubles dans la plupart des solvants usuels. Les molécules composant l'huile essentielle contenues dans la matière végétale, passent par diffusion, à travers les parois cellulaires. On centrifuge pour récolter les huiles essentielles.

9 Méthodes d'analyse

Malgré les innovations technologiques et le développement constant des méthodes de séparation, d'identification et de quantification, la connaissance exacte de la composition chimique des huiles essentielles reste toujours une étape cruciale et délicate vu le grand nombre et la complexité de ses constituants. (**GARNERO, 2003**).

9.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

9.1.1 Chromatographie en phase gazeuse (GC)

C'est une méthode d'analyse chimique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange de gaz ou de composés volatils à haute température, elle permet d'identifier des constituants même à l'état de traces. Ces constituants sont caractérisés par leur temps de rétention (**SKOOG et al., 2003**).

9.1.2 Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse permet l'identification et la quantification des analytes. Il existe de nombreux types de spectrométrie de masse (**SKOOG et al., 2003**).

9.1.3 Couplage GC/MS

Le couplage CPG/SM consiste à réunir la colonne de chromatographie et le spectre de masse, soit en introduisant directement l'extrémité de la colonne dans la chambre d'ionisation, par le relais d'un capillaire de transfert chauffé placé entre le chromatographe et le spectre de masse (**ROUESSAC et ROUESSAC, 1992**).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par un gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et de référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (**DESJOBERT et al., 1997 ; BRUNETON, 1999; BENZEGHIMI et OUAIL, 2015**).

10 Domaines d'utilisation

Depuis le moyen âge, les huiles essentielles sont largement répandues pour leurs propriétés bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires, insecticides, ainsi que pour leurs applications médicinales et cosmétiques (**GUIMARAES et al., 2010**). De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques comme antimicrobienne, anti inflammatoire, sédatif, analgésique, spasmolytique et anesthésique local. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (**PAULI, 2001**).

10.1 Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie. Elle utilise les propriétés odoriférantes des huiles essentielles que contiennent les plantes aromatiques (**TELPON, 2003**). L'aromathérapie est le terme donné par Monsieur Gatte fossé, de l'usage des H.E. à des fins médicinales (**SALLÉ, 1991**).

10.2 Pharmacie

L'importance des plantes aromatiques est indiscutable. Leur contenu en essence et la nature chimique des constituants de celle-ci, leur confèrent de grandes perspectives d'application. Ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médical et pharmaceutique (**VALNET, 1984**).

Les H.E. permettent également une rééquilibration d'un organe ou d'une fonction organique saturés de toxines, de lutter contre les microbes et virus, ainsi que de combattre le stress responsable d'une multitude de pathologie, véritable fléau des Temps modernes

(SALLÉ, 1991). En effet, les huiles essentielles ont un champ d'action très large, elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des levures et des moisissures. L'effet biologique a souvent été trouvé supérieur à celui de plusieurs fongicides du commerce **(SINGH et al., 1983)**.

Les huiles essentielles présentent des propriétés anti-oxydantes, anti-tumorales et antimicrobiennes. Les huiles essentielles de citrus sont employées comme désaltérant, possédant des propriétés, tonique, stimulante, stomachique, carminative, diurétique, entretien de la peau et soins, antirides, antiobésités, antispasmodique, fébrifuge, colique, états fiévreux, spasmes, vasodilatatrice, anti-anxieux (Bardeau, 2009).

10.3 Parfumerie et cosmétologie

Un nombre important d'huiles essentielles est utilisé dans l'industrie cosmétique (Parfums, crèmes) grâce à leur pouvoir antiseptique et antioxydant, tout en leur assurant leur odeur agréable **(MONTES-BELMONT et CARVAJAL, 1998)**. Leur emploi historique le plus notable a été dans l'eau de Cologne, sa composition s'appuyait sur plus de 70% d'essences d'agrumes et d'aromate, complétée par quelques extraits de fleurs **(FERNANDEZ et CHEMAT, 2012)**. Certains composés chimiques isolés à partir d'une huile essentielle constituent des matières premières pour la synthèse d'autres substances odorantes, à titre d'exemple : à partir de l'eugénol extrait de l'huile essentielle de girofle on aboutira à l'iso eugénol qui a une odeur d'œillet **MONTES-BELMONT et CARVAJAL, 1998)**.

10.4 Industrie agro-alimentaire

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps **(KURITA et KOÏKE, 1982)**. BUSTA et FOEGEDING en 1983, ont étudié la conservation alimentaire par les épices, les aromates et les huiles essentielles, qui sont rajoutés aux aliments pour rehausser le goût et qui ont aussi un effet antimicrobien empêchant les contaminants alimentaires de se développer **(BEKHECHI et ABDELOUAHID, 2014)**.

Les huiles essentielles de thym, de cannelle, et d'origan ont un effet inhibiteur sur la croissance de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires **(MONTES-BALMONT et CARVAJAL, 1988)**. Ainsi, les industriels, suites aux propositions faites par des chercheurs, ont recouru aux huiles essentielles en tant qu'antioxydants en alimentaire **(FERNANDEZ et CHEMAT, 2012)**.

L'industrie agroalimentaire exploite aussi les huiles essentielles pour l'emballage, la conservation et l'aromatisation des produits (GUIMARAES et al., 2010).

10.5 Désinfection des locaux

Il est à noter que, les huiles essentielles sont aussi utilisées dans le milieu hospitalier pour la désinfection des locaux (BEKHECHI et ABDELOUAHID, 2014). Grâce à leur pouvoir antiseptique, les huiles essentielles entrent dans la fabrication des « para-germes », solutions volatiles à base d'huile essentielle naturelle (citron, lilas), pour la désinfection de l'atmosphère des locaux (RHAYOUR, 2002).

11 Activité antimicrobienne

Les vertus antimicrobiennes des HE sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des H.E. des plantes aromatiques. (KAMBOUCHE, 2000). En effet, les huiles essentielles ont un champ d'action très large, elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des levures et des moisissures. L'effet biologique a souvent été trouvé supérieur à celui de plusieurs fongicides du commerce. (SINGH et al., 1983).

De plus, les HE sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques. (DUQUENOIS, 1968). Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs. En effet, certains chercheurs ont montré que la puissance d'action des huiles essentielles varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque H.E., qui est largement diversifié. (KAMBOUCHE, 2000). L'activité des huiles essentielles est liée à leurs compositions chimiques, à la configuration des éléments constitutifs et aux groupes fonctionnels portés par les constituants ainsi qu'à leurs interactions synergiques possibles. (PELCZAR et al., 1988).

12 Conservation

Les H.E. se présentent et se conservent dans des flacons de verre fumé, fermés par un bouchon bien hermétique, ce qui les préserve de la lumière et de l'air. En effet, il importe d'éviter leur oxydation (à l'air) et leur polymérisation (à la lumière). Elles se conservent à une chaleur ambiante, sauf les H.E. d'orange, de mandarine...qui se conservent à 4°C.

Elles se conservent entre 12 et 18 mois après leur fabrication. Avec le temps leurs propriétés diminuent et elles deviennent alors inactives. (SALLÉ, 1991).

13 Toxicité

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de molécules dont la structure et les propriétés chimiques permettent de dégager des caractéristiques communes, leur assurant une bonne diffusion dans l'organisme. Malgré le peu d'étude sur la toxicocinétique des huiles essentielles, il faut retenir leurs pouvoirs toxiques, notamment leurs hépatotoxicité, neurotoxicité et phototoxicité récemment élucidée pour quelques huiles essentielles. Elles possèdent, en général, une toxicité aiguë par voie orale faible (BRUNETON, 1999).

Les espèces du genre *citrus*, le plus souvent incriminées dans les cas de phototoxicité sont : le bigaradier, le bergamotier, le citronnier et le limettier. Les risques de phototoxicité après ingestion des huiles essentielles de citron et de l'orange amère sont cependant très limités, plus importants après contact sur la peau. Des cas de photosensibilisation ont été rapportés, essentiellement chez des personnes à peau claire (DAOVY, 2009). Pour des produits à usage non traditionnel à base de huiles essentielles d'écorce d'orange amère, pour son effet censé favoriser la perte de poids, des cas de toxicité ont été rapportés. Il s'agit de troubles cardiovasculaires (augmentation de la tension artérielle, accélération du rythme cardiaque, vasoconstriction), après une utilisation importante ou prolongée due à la caféine qui potentialise considérablement ces effets. Il a été démontré pour cette même huile essentielle et celle de citron, un pouvoir inhibiteur sur le cytochrome P450 3A4 responsable de la métabolisation de nombreux médicaments. (DAOVY, 2009 ; GONZALEZ-MOLINA et al., 2010).

Les huiles essentielles des écorces de citrus, principalement d'orange, de pamplemousse, de bergamote et de citron vert sont irritantes (brûlures, prurit et autres réactions cutanées fortes) sur la peau normale après un contact d'une heure. Un eczéma peut apparaître à cause de la présence des terpènes, limonènes, alpha- et bêta-pinènes, géraniol et citral. Ils sont à l'origine de dermatoses professionnelles chez les boulangers-pâtisseries, les barmen et les travailleurs de conserveries. Des dermatites et de paronychites ont été observées chez des éplucheurs de citrus, dont les ongles sont souvent érodés, spécialement à la base. Ces réactions irritatives de contact à la pelure de citron sont plus fréquentes que celles à la pelure d'orange (GÉRAUT et al., 2010; GONZALEZ-MOLINA et al., 2010).

Certaines essences peuvent présenter un risque de toxicité si elles sont utilisées en quantité élevée. Par quantité élevée, on entend 10 à 20 ml d'essence. Certaines essences, à un

dosage élevé, sont considérées comme légèrement toxiques pour des sujets sensibles : camphre, genièvre, encens, thym, eucalyptus, romarin. D'autre, bien que ne présentant pas de risque de toxicité, peuvent être irritantes, même si elles sont appliquées sur la peau : essence de basilic, de citron, de mélisse, de menthe et de fenouil (**PARDINI et LUCHERONI, 1996**).

PARTIE II
Étude expérimentale

Chapitre I - Matériel et méthodes

Notre travail porte sur une espèce d'agrumes du genre *Citrus* : *Citrus aurantium L.*, dont le nom commun est bigaradier ou oranger amer. Notre étude a été réalisée sur des échantillons de l'espèce provenant d'un verger agrumicole de la commune d'El-Affroun qui se trouve à 18 km à l'ouest de la ville de Blida (ville qui se situe au contact de l'Atlas blidéen et de la Mitidja). Cette étude a duré environ quatre mois du 1^{er} mars 2018 au 30 juin 2018.

L'extraction des huiles essentielles à partir des écorces d'orange amère a été réalisée dans le département de chimie industrielle au laboratoire de chimie organique au sein de l'Université Blida 1. L'activité antimicrobienne des extraits d'H.E. a été réalisée au laboratoire d'hygiène de l'hôpital Blida. L'analyse des HE par CG/SM a été faite au niveau du laboratoire de la police scientifique de château-neuf à Alger.

1 Matériel

1.1 Matériel biologique

1.1.1 Matériel végétal

Environ 30kg d'orange amère ont été récoltés à El-Affroun (W. Blida) chez un exploitant agrumicole, pendant le mois de mars 2018. Les fruits ont été lavés à l'eau puis séchés dans un déshydrateur type Excalibur à une température de 35°C pendant 35h. Après séchage, les écorces de bigarade ont été découpées puis broyées dans un broyeur à café.

1.1.2 Souches microbiennes

Les sept souches microbiennes utilisées (cinq bactéries et deux champignons) nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de SAIDAL Gué de Constantine. Ces souches sont représentées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 Les souches microbiennes

Espèce microbienne	Morphologie	Infections provoquées	Références bibliographiques
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Bacille, mobile. Gram -	Diarrhées, infections urinaires, méningites, septicémies.	(BURITS et BUCAR, 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Bacille fin, non capsulé, mobile, Gram -	Broncho-pneumopathies, infections respiratoires, infections cutanées, ulcères.	(CLAVE, 2011)
<i>Salmonella abony</i> ATCC 14028	Bactérie de forme allongée, flagellée, Gram -	Salmonelloses	https://www.cmc-cvc.com/sites/default/files/files/FactSheetonSalmonellaFR.pdf
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Gros bacille, droit, mobile (cils péritriches), capsulé, sporulé, Gram +	Infections nosocomiales, septicémies, pneumopathies, toxi-infections alimentaires.	(BOUHAIRI, 2017)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Cocci, immobile, disposé en amas ou en grappe, Gram +	Toxi-infections alimentaires, infections cutanées suppurées, infections nosocomiales.	(CLAVE, 2013)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Levure, diploïde, encapsulée, polymorphe.	Candidoses, infections fongiques.	(HAZEN et HOWELL, 2007)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Champignon, colonies blanches puis brun foncé à noir, conidies, phialides, pas de sclérotés.	Otomycoses, aspergillomes, aspergilloses invasives.	(VARGA et al., 2007)

1.2 Matériel non biologique

La verrerie, l'appareillage et les réactifs utilisés sont mentionnés dans l'**annexe 1**.

2 Méthodes d'étude

Les travaux que nous avons effectués ont été réalisés sur les écorces des fruits de *Citrus aurantium L.*, récoltés dans un verger agrumicole de la commune d'El-Affroun.

2.1 Préparation de la poudre d'écorce de bigarade

Environ 30 kg d'orange amère ont été récoltés dans un verger agrumicole d'El-Affroun. Les bigarades ont été lavées à l'eau puis épluchées à la main, afin de ne garder que l'écorce du fruit. Les écorces sont séchées dans un appareil déshydrateur type Excalibur, à une température de 35°C pendant 35h. Puis elles sont découpées en petits morceaux afin de les préparer au broyage. Le broyage a été réalisé à l'aide d'un broyeur à café, à la maison. On obtient environ 1 kg de poudre d'écorces séchées de bigarade. Les différentes étapes citées ci-dessus sont illustrées dans la **figure annexe I 2**.

Il est à noter que, le séchage à l'air libre, à l'abri de l'humidité et de la lumière, n'a pu être effectué, en raison de l'atmosphère fortement humide qui régnait durant les mois de mars et d'avril 2018, dans notre région. C'est pour cette raison que nous avons préféré utiliser un déshydrateur type Excalibur. En effet, cet appareil a permis, un séchage des écorces plus rapide (35h) qu'à l'air libre (15 jours environs voire plus), et à une température suffisamment basse (35°C) pour ne pas altérer la matière première végétale. De plus, cet appareil a permis de respecter les conditions de séchage à l'abri de la lumière et de l'humidité.

En attendant le broyage, la matière végétale sèche a été conservée dans des sacs en papier, à l'abri de la lumière.

Le séchage influe sur le rendement d'extraction. Il est recommandé avant l'étape d'extraction car il entraîne l'inhibition des enzymes et permet de conserver les poudres pendant une longue durée sans modification importante (**OWEN et JOHNS, 1999**).

La température du séchage doit être inférieure à 50°C afin de ramollir le tissu végétal, affaiblir l'intégrité des parois cellulaires sans altérer les molécules constitutives de l'huile essentielle (**CHAN et al., 2009**).

Selon **BERTON (2001)**, le séchage des plantes médicinales est, normalement, effectué juste après la récolte, il permet de réduire la teneur en eau afin de limiter les dégâts dus aux enzymes et autres agents biologiques tels que les moisissures et les microbes. Le séchage doit être rapide et dans un endroit bien aéré et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Il existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four (**Larousse des plantes médicinales, 2001**). Les plantes séchées sont coupées grossièrement et disposées dans des bocaux de verre ou dans des sacs en papier, à l'abri de l'air et de la lumière. Les boîtes en fer sont naturellement proscrites. Les plantes séchées peuvent être conservés pendant une année dans de bonnes conditions. Au-delà de cette période, leur pouvoir diminue sensiblement et l'action thérapeutique disparaît. C'est

pourquoi il faudra renouveler le stock de plantes chaque année (**BERTON, 2001**). De plus, le broyage des écorces séchées permet la réduction de la dimension des écorces et ainsi d'augmenter la surface de contact avec le solvant.

2.2 Tamisage de la poudre d'écorces de bigarade

La poudre obtenue est tamisée au laboratoire dans un appareil appelé tamiseur (**figure annexe I 3**). Cette opération utilise, pour la séparation, différents diamètres à partir d'une série de six tamis de diamètres différents [$\leq 100 \mu\text{m}$ - $800 \mu\text{m}$], pendant 10 min. On récupère dans chaque tamis la poudre d'écorces de bigarades.

Après tamisage, on obtient 7 échantillons de poudre d'écorces de bigarades, de granulométries différentes (**figure annexe I 4**).

Ces échantillons sont numérotés de 1 à 7, du plus petit diamètre au plus grand diamètre. Un 8^{ème} échantillon est réalisé à l'aide de morceaux d'écorces fraîches de bigarades, c'est le témoin. Le **tableau 2**, illustre les intervalles de granulométries respectifs de ces différents échantillons.

Tableau 2 Granulométrie des échantillons de poudre d'écorces de bigarades

Numéro de l'échantillon	Diamètre des particules (granulométrie) (μm)
Échantillon 1	≤ 100
Échantillon 2]100 , 200]
Échantillon 3]200 , 400]
Échantillon 4]400 , 500]
Échantillon 5]500 , 630]
Échantillon 6]630 , 800]
Échantillon 7	> 800
Échantillon 8 (témoin)	Petits morceaux écorce fraîche de bigarade

2.3 Détermination de la teneur en eau des écorces de bigarade

Pour déterminer la teneur en eau des écorces de bigarade, on utilise la méthode thermogravimétrique de référence de l'AOAC (**SALGHI, 2015**).

2.3.1 Principe

On pèse un échantillon d'écorces fraîches de bigarades (M_E). On élimine l'eau contenue dans les écorces, par chauffage, jusqu'à ce que la masse de l'échantillon demeure

constante. On pèse l'échantillon sec (M_{ST}), c'est-à-dire les solides totaux des écorces de bigarades. Ces derniers sont définis comme étant, le résidu des écorces de bigarades, restant après élimination de l'eau contenue dans ces écorces.

Le chauffage de l'échantillon se fait à l'étuve ventilée sous pression atmosphérique à 105°C. À l'exception des produits contenant des constituants volatils, la somme de la teneur en eau $H_2O(\%)$ et en solides totaux $ST(\%)$ représente la totalité du produit (**100%**).

Le pourcentage de matière sèche du produit est exprimé par la formule suivante :

$$ST(\%) = (M_{ST} / M_E) \times 100$$

$ST(\%)$: pourcentage de solides totaux ou de matière sèche.

M_{ST} : masse de l'échantillon sec (g).

M_E : masse de l'échantillon à l'état frais (g).

La teneur en eau des écorces est donnée par la formule suivante :

$$H_2O(\%) = 100 - ST(\%)$$

$H_2O(\%)$: teneur en eau.

2.3.2 Mode opératoire

Un échantillon d'écorces de bigarade de masse $M_E = 49,99$ g, est chauffé dans une étuve ventilée sous pression atmosphérique à 105°C pendant 24 heures.

Des pesées régulières de l'échantillon sont effectuées jusqu'à ce que sa masse demeure constante. Le chauffage des écorces de bigarades permet d'éliminer la totalité de l'eau qu'elles contiennent. Après séchage, l'échantillon est pesé afin de déterminer sa teneur en eau.

2.4 Évaluation de l'huile essentielle de bigarade

2.4.1 Extraction

2.4.1.1 Principe

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO). L'hydrodistillation consiste à immerger la plante aromatique dans un volume d'eau. Le mélange obtenu est porté à ébullition. Les vapeurs qui se dégagent sont condensées. L'huile essentielle est récupérée à la surface de l'eau aromatique (phase aqueuse) ainsi obtenue (MILLET, 2013). Le chauffage est réalisé à l'aide d'un micro-onde au lieu d'un chauffe-ballon comme dans l'hydrodistillation classique.

2.4.1.2 Mode opératoire

Dans un ballon de 500 ml, on met 30 g de poudre d'écorce de bigarade et 200 ml d'eau distillée. Cette préparation est portée à ébullition dans un four à micro-ondes réglé à la puissance de 100 watts, pendant 10 min. Les vapeurs chargées d'huiles traversent un réfrigérant, se condensent et chutent dans un bécher. En fin d'opération, on obtient deux phases non miscibles (eau et huile essentielle) qui se séparent par leur différence de densité (**Pharmacopée Européenne, 2002**).

Le four à micro-ondes permet de porter rapidement le mélange à ébullition, les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielle et de composés odorants passent dans le système Clevenger qui permet leur condensation dans le réfrigérant. On récupère deux phases non miscibles, l'une aqueuse en bas (la plus dense) appelée hydrolat et, l'autre huileuse au dessus (moins dense) appelée huile essentielle. L'hydrolat est récupéré dans un bécher et les huiles essentielles obtenues sont stockées dans des bouchons transparents hermétiquement fermés et recouverts de papier aluminium. Elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C.

L'hydrodistillation des écorces de *Citrus aurantium L.* est réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger monté sur un micro-onde. Le montage réalisé est présenté dans la **figure annexe I 5**.

2.4.2 Rendement

2.4.2.1 Définition

Le rendement de l'huile essentielle est le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale à traiter (**Pharmacopée européenne, 2000**).

2.4.2.2 Mode opératoire et calcul

Pour chaque échantillon, on prélève la même masse $M_V = 30\text{g}$ de matière végétale. Après chaque extraction par HDMO, on mesure le volume d'huile essentielle obtenu. Ce volume est converti en masse d'huile essentielle. Cette conversion est réalisée en utilisant la formule suivante :

$$m(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} = \rho(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} \times v(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$$

Le rendement de l'huile essentielle est défini par la formule suivante :

$$R = (M_{\text{HE}} / M_V) \times 100$$

R : rendement en huile essentielle (%).

M_{HE} : masse de l'huile essentielle (g).

M_V : masse de la matière végétale (g).

2.5 Analyse de l'huile essentielle de bigarade

2.5.1 Propriétés organoleptiques

L'huile essentielle extraite est soumise à des tests afin d'évaluer ses caractères organoleptiques, notamment l'aspect, la couleur et l'odeur.

- **L'aspect ou état** de l'huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Il peut paraître sous forme solide, liquide ou solide-liquide. Il est lié au pouvoir de dissolution de la matière végétale. Cette caractéristique est vérifiable à l'œil nu.
- **L'odeur** de l'huile essentielle fait intervenir le sens de l'odorat qui est un sens chimique très sensible. Une substance pour être sentie doit être volatile. À 3 gouttes d'huile sont ajoutés 5 ml d'alcool à 90% qui sont agités avec 10 g de saccharose pulvérisé. L'odeur est ainsi semblable à celle de la plante ou des parties composant la plante (**Pharmacopée Européenne, 2001**).
- **La couleur** de l'huile essentielle dépend des produits qui constituent l'extrait. Cette caractéristique est vérifiable à l'œil nu.

2.5.2 Propriétés physiques

2.5.2.1 Densité relative à 20°C

2.5.2.1.1 Définition

La densité relative à 20°C représente le rapport entre la masse d'un certain volume huile essentielle à 20°C, et la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Elle constitue un point de repère important. Sa valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'HE (**AFNOR, 2000**).

$$d(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} = \rho(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} / \rho(\text{eau})_{20^\circ\text{C}}$$

$d(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$: densité relative de l'huile essentielle à 20°C.

$\rho(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$: masse volumique de l'huile essentielle à 20°C.

$\rho(\text{eau})_{20^\circ\text{C}}$: masse volumique de l'eau à 20°C.

Avec :

$$\rho(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} = m(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} / v(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$$

$m(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$: masse d'huile essentielle à 20°C.

$v(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$: volume d'huile essentielle à 20°C.

Et selon le tableau présenté en **Annexe 3** :

$$\rho(\text{eau})_{20^{\circ}\text{C}} = 998,29 \text{ g/l}$$

2.5.2.1.2 Mode opératoire et calcul

La méthode de référence utilisée pour déterminer la densité relative à 20°C de l'huile essentielle de bigarade est donnée dans la norme **NF ISO 279 : 1999 ou NF T 75 – 111**.

Pour chaque HE extraite, nous avons prélevé un volume de 10 µl à l'aide d'une micropipette. Ensuite, ce volume a été pesé à l'aide d'une balance analytique de précision (0,0001) en prenant en considération le coefficient de température :

$$d_{20} = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] + 0.00073 \times (t - 20)$$

d₂₀ : densité relative à 20°C

m₀ : masse de la fiole vide (g).

m₁ : masse de la fiole remplie d'eau (g).

m₂ : masse de la fiole remplie d'huile essentielle (g).

t : température ambiante (° C).

2.5.2.2 Indice de réfraction à 20°C

2.5.2.2.1 Définition

C'est 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'huile essentielle maintenue à une température constante. On entend par indice de réfraction d'une substance le rapport de la vitesse d'une lumière de longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans la substance (**NF ISO 280 : 1999 ou NF T 75 – 112**).

L'appareil qui sert à mesurer l'indice de réfraction des liquides, est le réfractomètre **ABBE (figure annexe I 6)** dont l'usage est assez recommandé et qui permet la détermination d'indices de réfraction compris entre 1,300 et 1,700.

L'indice de réfraction dépend de la longueur d'onde λ de la lumière incidente et de la température à laquelle est effectuée la mesure. La longueur d'onde de référence est la raie D du sodium ($\lambda = 589 \text{ nm}$) et la température de référence est de 20°C.

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé, supérieur à celui de l'eau, ceci indique leur richesse en composants déviant la lumière polarisée (AFNOR, 2000). L'indice de réfraction renseigne sur la qualité de l'huile végétale (Koba et Sanda, 2003). Sa mesure permet d'identifier un liquide et de contrôler sa pureté. La présence d'impuretés modifie la valeur de l'indice de réfraction.

2.5.2.2.2 Mode opératoire et calcul

La méthode de référence utilisée pour déterminer l'indice de réfraction à 20°C de l'huile essentielle de bigarade est donnée dans la norme **NF ISO 280 : 1999** ou **NF T 75 – 112**. Un nettoyage préalable de l'appareil à l'éthanol est nécessaire avant de débiter toute mesure. Puis l'étalonnage du réfractomètre est vérifié en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à une température de 20°C.

Après ouverture du prisme secondaire, nous déposons 2 gouttes d'huile essentielle sur la partie centrale du prisme principal et nous fermons délicatement le prisme secondaire. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable. L'indice de réfraction est lu à 0,0001 en valeur absolue et la température du prisme de l'appareil est notée.

L'indice de réfraction de l'huile essentielle η_D^t à la température de référence t est donné par la formule suivante :

$$\eta_D^t = \eta_D^{t'} + 0,00045 (t' - t)$$

η_D^t : indice de réfraction de l'huile essentielle.

$\eta_D^{t'}$: valeur de la lecture obtenue à la température t' .

t' : température à laquelle a été effectuée la mesure.

t : température de référence $t = 20$ °C.

f : facteur égal à 0.00045 pour $t = 20$ °C.

2.5.3 Détermination de la composition chimique par GC/MS

La technique GC/MS est très utilisée dans l'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles.

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a été faite au niveau du laboratoire de la police scientifique de château-neuf à Alger. Nous y avons déposé les 4 échantillons pairs (E_2 , E_4 , E_6 , E_8) pour l'analyse GC/MS. Ces différents échantillons correspondent aux granulométries suivantes : E_2 :]100 , 200] μm ($D_{M2} = 150$ μm), E_4 :]400 ,

500] μm ($D_{M4} = 450 \mu\text{m}$), E_6 :]630 , 800] μm ($D_{M6} = 715 \mu\text{m}$) et E_8 : morceaux d'écorces fraîches de bigarades.

L'appareil GC/MS utilisé est de **modèle CLARUS 500** et de **marque Perkin-Elmer**. Les conditions opératoires sont illustrées dans le **tableau 3**. L'identification des constituants des huiles essentielles est basée sur la proposition de la bibliothèque Nist et le pourcentage de probabilité de présence du composé, fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.

Tableau 3 Conditions opératoires de l'analyse des huiles essentielles par GC/MS

Paramètres GC		Paramètres MS		
Volume injecté	1 μl	Mode de détection	Impact électronique	
Température injecteur	250°C	Énergie d'ionisation	70 eV	
C O L O N N E	Phase stationnaire	Elite série 5MS	Analyseur	Quadripôle
	Longueur	30 m	Température source	250 °C
	Diamètre interne	0,25 mm	Température ligne de transfert	250 °C
	Épaisseur	0,25 μm	Mode de balayage	20 à 250 daltons
Température initiale	70 °C pendant 4 mn	Délai de solvant	5,9 mn	
Rampe	4°C/mn jusqu'à 220°C pendant 15 mn			
Temps d'analyse	56,5 mn			

2.6 Étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de bigarade

2.6.1 Milieux de culture utilisés

Le milieu Muller Hinton a été utilisé pour les souches bactériennes et le milieu Sabouraud pour la souche fongique. La composition de ces milieux de culture gélosés est mentionnée en **annexe 2**.

2.6.2 Méthode de l'aromatogramme

Selon SALLÉ, 1991 : Cette méthode est une technique microbiologique permettant d'étudier la sensibilité des germes à différentes huiles essentielles, ce qui revient à évaluer leur pouvoir antibactérien et antifongique.

2.6.2.1 Principe

Cette technique est comparable à l'antibiogramme. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du produit à tester (avec une concentration connue) en milieu solide,

dans une boîte pétri préalablement ensemencée. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu, créant une zone claire d'inhibition de croissance du germe, autour du disque chargé d'agent antimicrobien (HADDOUCHI et BENMANSOUR, 2008 ; KHEBRI, 2011).

La lecture des résultats est effectuée en fonction de l'existence ou non des zones d'inhibition (SAÏHI, 2011). En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes (AMANA, 2007). Le principe de la méthode de l'aromatogramme est illustré dans la **figure annexe 1 7**.

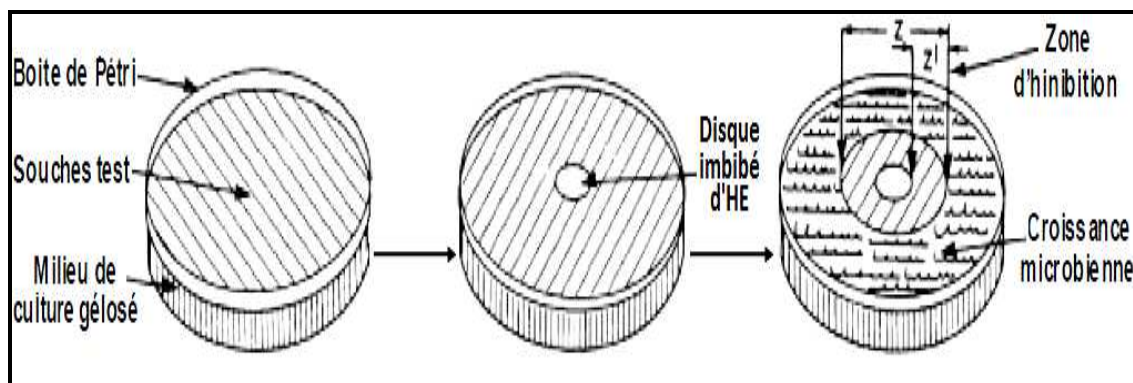


Figure 8 Méthode de l'aromatogramme sur milieu solide (PIBIRI, 2006)

2.6.2.2 Mode opératoire

Le protocole adopté est celui de la **Pharmacopée européenne (2002)**. Ce travail s'est effectué sous hotte à flux laminaire près d'un bec bunsen (pour stériliser les instruments). Tout le matériel utilisé est préalablement stérilisé. Le mode opératoire se déroule comme suit :

- **Préparation de l'inoculum**

Une suspension microbienne est préparée à partir de cultures de jeunes de bactéries (24h) ou de champignons (48h). Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant 5ml de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de 0,5 Mc Farland.

- **Préparation des milieux de culture**

Les milieux de cultures gélosés Mueller Hinton (Bactéries) et Sabouraud (champignons) sont liquéfiés dans un bain Marie. Puis, sous hotte à flux laminaire, ils sont versés aseptiquement sur des boîtes de pétri à raison de 20 ml par boîte. Les boîtes de pétri sont fermées et laissées à température ambiante pour que les milieux de culture refroidissent et se solidifient. La conservation est faite dans des conditions évitant toute contamination ou modification de la composition des milieux de culture.

- **Ensemencement**

Un écouvillon stérilisé est aseptiquement imbibé avec la suspension microbienne. Il est pressé fermement en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger du surplus de suspension. Une boîte de pétri est ensemencée aseptiquement en frottant délicatement l'écouvillon sur la surface de la gélose en stries serrées. L'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte à 60° de façon à croiser les stries. L'ensemencement est finalisé en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Préparation et dépôt des disques**

Des disques stériles de 6 mm de diamètre sont déposés dans une boîte de pétri. Une micropipette permet de mouiller les disques d'HE pure (6µl d'huile essentielle pour chaque disque). D'autres disques sont mouillés de l'extrait aqueux (6µl d'extrait aqueux pour chaque disque). À la surface de la gélose de chaque boîte pétri, deux disques ainsi mouillés sont déposés stérilement, l'un est imbibé d'huile essentielle et l'autre d'extrait aqueux. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les champignons.

2.6.2.3 Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle graduée mesurant le diamètre de la zone d'inhibition si elle existe. Il s'agit de mesurer in vitro le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de bigarade.

Une suspension bactérienne ou fongique est ensemencée sur un milieu gélosé. Des disques vierges calibrés de 6 mm de diamètre (D) sont imprégnés d'huiles essentielles de bigarade et déposés sur le milieu ensemencé et laissés incubés à l'étuve à 37°C pendant 24h ou 48h.

Autour des disques, une zone circulaire d'inhibition est observée en cas d'activité antibactérienne ou antifongique.

Les résultats correspondent à la mesure du diamètre D de la zone d'inhibition; ils sont exprimés par rapport à la sensibilité des bactéries ou champignons et symbolisés par des signes (+) et (-) selon les normes données par **MOREIRA et al., 2005** :

- Non sensible / résistante (-) : **D < 8 mm**
- Sensible (+) : **9 < D < 14 mm**
- Très sensible (++) : **15 < D < 19 mm**
- Extrêmement sensible (+++) : **D > 20 mm**

Les tests d'activités sont réalisés sur les 5 souches bactériennes et les 2 souches fongiques avec les huiles essentielles pures extraites des écorces de bigarade. Chaque disque est imprégné de 10 µl d'huile essentielle.

Chapitre II - Résultats et discussion

1 Teneur en eau des écorces de bigarade

Une masse $M_E = 49,99$ g d'écorces fraîches de bigarades a été placée dans une étuve ventilée sous pression atmosphérique à 105°C pendant 24h, afin d'éliminer et de calculer la quantité d'eau évaporée.

Après séchage, l'échantillon d'écorces de bigarade ne pèse plus que $M_{ST} = 12,68$ g. Le pourcentage de matière sèche est de $ST(\%) = 25,36$ %. Ce qui correspond à une teneur en eau de $H_2O(\%) = 74,63$ %.

Les écorces de bigarade sont très riches en eau car elles renferment environ **74.6%** d'eau. Ce résultat confirme le résultat obtenu dans une autre étude réalisée en 2013, sur les écorces de bigaradier avec une teneur en eau de 73,4% (**DRARENI, 2013**).

Les fruits du genre citrus sont classés parmi les fruits les plus désaltérants du fait de leur forte teneur en eau. (**SOUCI et al., 1995**).

La teneur importante en eau des écorces de bigarades justifie le fait de sécher les écorces pour faciliter leur broyage.

Après un séchage de 35 heures à 35°C dans un déshydrateur type Excalibur, l'eau contenue dans les écorces est éliminée. Les écorces fraîches de bigarades contiennent une forte proportion d'eau (environ 74,6%) d'où l'intérêt du séchage avant extraction des huiles essentielles.

2 Rendement des huiles essentielles de bigarade

Le **tableau 4** présente les différents résultats obtenus pour les rendements en huile essentielle de bigarade sachant que :

- Les volumes d'HE de bigarade sont directement mesurés sur le dispositif Clevenger et notés $v(HE)_{20^\circ C}$.
- Les masses d'HE de bigarade sont calculées à partir des volumes d'HE de bigarade à l'aide de la formule :

$$m(HE)_{20^\circ C} = \rho(HE)_{20^\circ C} \times v(HE)_{20^\circ C}$$

La masse volumique de l'HE de bigarade calculée est de $\rho(HE)_{20^\circ C} = 840$ g/l (voir paragraphe sur la densité relative à 20°C).

Tableau 4 Volumes, masses et rendements des HE en fonction de la taille des particules de bigarades

Diamètre des écorces (μm)		Volume HE (ml)	Masse HE (g)	Masse HE cumulée (g)	Rendement HE (%)
Intervalle	D_M				
E_1 : ≤ 100	100	1,8	1,512	1,512	5,04
E_2 : 100-200	150	4,6	3,864	5,376	12,68
E_3 : 200-400	300	7,8	6,552	11,928	21,84
E_4 : 400-500	450	2,8	2,352	14,28	7,84
E_5 : 500-630	565	1,8	1,512	15,792	5,04
E_6 : 630-800	715	1,5	1,260	17,052	4,2
E_7 : > 800	800	0,9	0,756	17,808	2,52
E_8 : Témoin		2,8	2,352	-	7,84

D_M : Diamètre moyen de poudre de bigarade, Témoin : écorces fraîches de bigarade découpées.

La figure 9 présente la courbe représentative de l'évolution du rendement d'HE de bigarade en fonction de la taille des particules de poudre de bigarade.

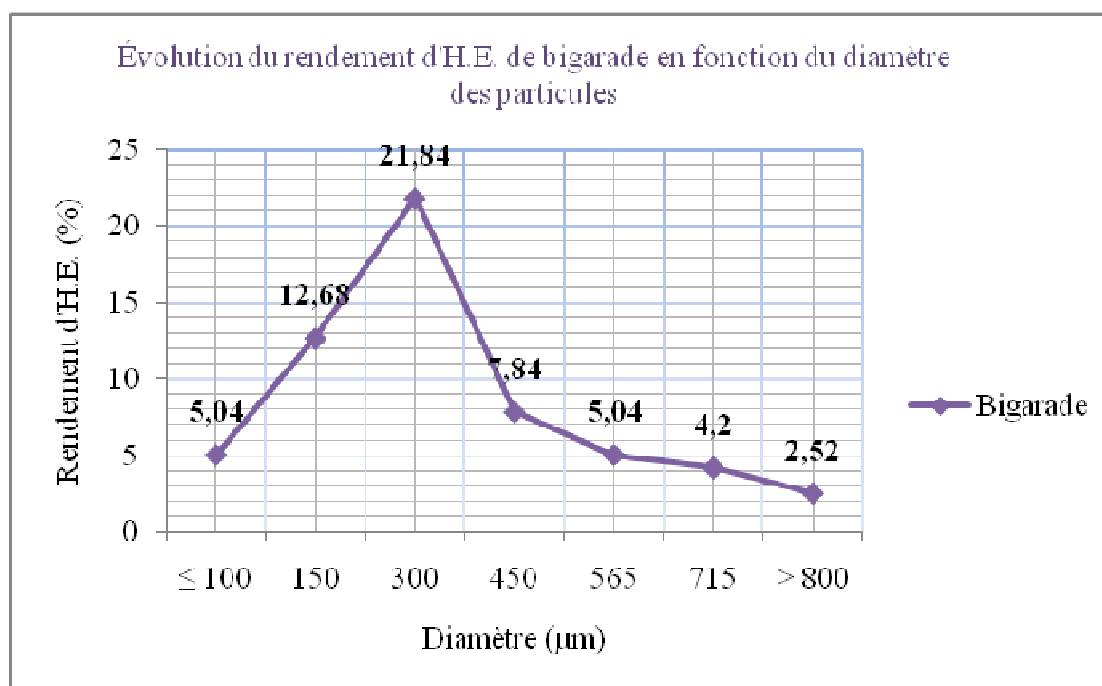


Figure 9 Évolution du rendement d'HE en fonction du diamètre des particules

Après l'extraction des huiles essentielles par HDMO, les rendements d'HE de bigarade obtenus sont : 5,04 %, 12,68%, 21,84%, 7,84%, 5,04%, 4,2%, 2,52%, respectivement pour des diamètres moyens de particules : 100 μm , 150 μm , 300 μm , 450 μm , 565 μm , 715 μm , 800 μm . Le rendement en huile essentielle du témoin (écorces fraîches de

bigarade) est de 7,84%. Ces résultats montrent que la granulométrie de l'organe utilisé (écorces), ont une influence remarquable sur le rendement en huile essentielle. Et que le rendement le plus élevé (21,84%) est obtenu pour un diamètre moyen de particules égal à 300 μm . De plus, les écorces fraîches de bigarade donnent un rendement inférieur (7,84%) au rendement maximal (21,84%) et équivalent à celui obtenu pour un diamètre moyen de particules égal à 450 μm . Ce qui montre que pour obtenir le meilleur rendement en huile essentielle de bigarade, il faut travailler avec des poudres de bigarade dont le diamètre moyen est de 300 μm .

L'influence de la taille des particules sur le rendement d'HE de bigarades se manifeste comme suit :

- Première phase [100 - 300[correspondant à un diamètre faible de particules, au cours de laquelle le rendement augmente de façon proportionnelle au diamètre des particules, cette augmentation est considérable et elle passe de 5,04 à 21,84%, au moment où le diamètre des écorces est fin.
- Deuxième phase [300 – 800[, où le diamètre des particules de bigarades est plus ou moins élevé, la productivité en huile essentielle est inversement proportionnel à la taille des particules de bigarades, il commence à diminuer lentement pour baisser à 2,52%.

Nous avons observé une augmentation du rendement de l'huile essentielle de bigarade en fonction de la taille des particules quand la poudre d'écorces est très fine ($\leq 300 \mu\text{m}$).

Ces résultats ont révélés l'existence d'une différence de rendement en huile essentielle d'un diamètre à un autre, ce qui implique que la taille des particules a un effet sur le rendement d'huile essentielle. Ce résultat confirme celui obtenu lors d'une étude similaire, faite sur des écorces d'agrumes (oranger doux ou *Citrus sinensis* et citron ou *Citrus limonum*) (**LALLOUTI et ZEROUALI, 2016**).

De plus, le rendement d'HE extraite à partir d'écorces fraîches de bigarades est le même que celui obtenu avec une poudre de 450 μm de diamètre. Si l'on souhaite avoir le meilleur rendement en HE de bigarade, il est donc préférable de travailler avec un diamètre moyen de particules égal à 300 μm . En revanche, si on travaille avec des diamètres de particules trop petits ($\leq 100 \mu\text{m}$) ou trop grands ($> 450 \mu\text{m}$), on obtient des rendements inférieurs aux rendements obtenus avec des écorces fraîches de bigarade.

Le rendement global d'extraction (**8,48%**) correspond au rendement moyen d'extraction (**8,45%**) et il est largement supérieur aux rendements obtenus par hydrodistillation classique. En effet, deux précédentes études, menées sur les écorces fraîches

ou sèches, de différentes variétés de bigarades, ont donné des rendements compris entre 0,4 et 0,64 % (DRARENI, 2013; MOKRETARI, 2017). Ce qui confirme que, en ce qui concerne les agrumes, l'extraction par HDMO donne de meilleurs rendements d'HE que l'hydrodistillation classique (CHEMAT, 2005).

Cette étude nous montre que le rendement d'HE de bigarade peut être optimisé en jouant simultanément sur différents facteurs, à savoir : le séchage, la technique d'extraction et la granulométrie des particules. Ainsi, le meilleur rendement en HE de bigarade est obtenu avec des écorces sèches, de granulométrie 300µm, à l'aide d'une extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes.

La **figure 10** représente les masses cumulées d'HE en fonction de la granulométrie des particules de bigarade.

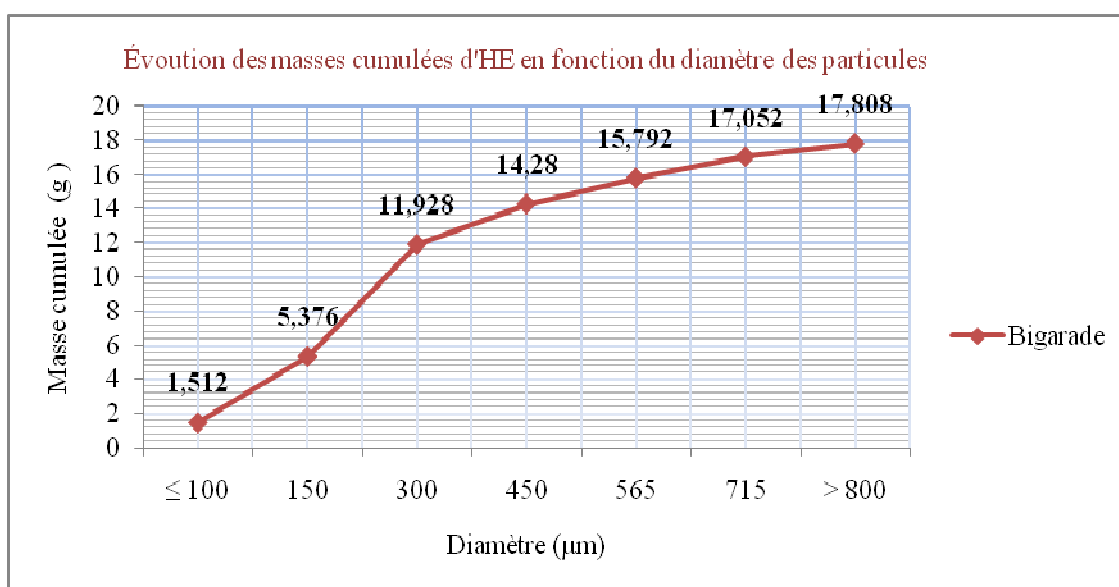


Figure 10 Évolution des masses cumulées d'HE en fonction du diamètre des particules

À partir des résultats de cette courbe, nous pouvons calculer le rendement global d'HE qui correspond au rapport entre la masse cumulée globale d'HE et la masse de matière végétale totale utilisée soit : $[17,808 / (30 \times 7)] \times 100 = 8,48 \%$. Ainsi, le rendement global d'extraction est de **8,48 %**. On remarque que ce rendement est équivalent à la moyenne des rendements d'HE ou rendement moyen d'extraction, à savoir : $(5,04 + 12,68 + 21,84 + 7,84 + 5,04 + 4,2 + 2,52) / 7 = 8,45 \%$.

De nombreux facteurs peuvent influencer le rendement, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique des huiles essentielles tels que les conditions environnementales, la technique d'extraction, le séchage, la période et le milieu de récolte, les pratiques culturales et l'âge du matériel végétal (ABERCHANE et al., 2010; BOURKHISS

et al., 2009; OKOH et al., 2007). Dans cette étude, nous nous intéressons particulièrement au facteur représenté par la granulométrie des particules de bigarades.

3 Analyse de l'huile essentielle de bigarade

3.1 Caractères physico-chimiques

Les caractères physico-chimiques des l'HE de bigarades récoltées à El-Affroun, obtenues par hydrodistillation sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 Propriétés physico-chimiques des HE de bigarade

Origine	Propriétés physico-chimiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
HE de bigarade	Liquide limpide	Jaune pâle transparent	Odeur forte amère et fraîche
Normes (GARNERO, 2003)	Liquide mobile limpide	Jaune pâle à brun-jaune	Odeur caractéristique du péricarpe du fruit frais



Figure 11 Huile essentielle de bigarade (photo originale)

3.2 Propriétés physiques

Les propriétés physiques tels que la densité relative et l'indice de réfraction constituent un moyen de vérification et de contrôle des huiles essentielles (ANSM, 2008). La température mesurée au laboratoire est de 20°C. Cette valeur correspond à la température de référence.

3.2.1 Densité relative à 20°C

Un même volume de **10 µl** a été prélevé à partir de chacun des 8 échantillons d'HE de bigarade. Ces volumes sont pesés chacun séparément, sur une balance analytique de précision (0,0001). La masse d'HE de bigarade est de **0,0084 g**, c'est la même pour les 8 échantillons. La masse volumique d'huile essentielle de bigarade à 20°C est de $\rho(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} = 840 \text{ g/l}$. Sachant que la masse volumique de l'eau à 20°C est de $\rho(\text{eau})_{20^\circ\text{C}} = 998,29 \text{ g/l}$ (Annexe 3), la densité relative de l'huile essentielle de bigarade à 20°C est de $d(\text{HE})_{20^\circ\text{C}} = 0,841$.

Selon les normes de **GARNERO (2003)**, la densité relative de l'huile essentielle de bigarade à 20°C $d(\text{HE})_{20^\circ\text{C}}$ est comprise entre **0,840 et 0,860**. La densité relative à 20°C de notre HE est conforme à ces normes. Par ailleurs, nous pouvons constater que, quelque soit la taille des particules de bigarade, la densité de l'HE reste inchangée. De ce fait nous pouvons conclure que la taille des particules de bigarade n'a aucune influence sur la densité de l'HE. Ce qui indique que les opérations de broyage-tamissage n'ont pas d'influence sur la qualité des HE de bigarades.

3.2.2 Indice de réfraction à 20°C

L'indice de réfraction renseigne sur la qualité de l'huile essentielle, il varie avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés de l'huile essentielle Une forte teneur en mono terpènes donnerait un indice élevé. (**KOBA et SANDA, 2003**).

L'indice de réfraction mesuré à 20°C est le même pour tous les échantillons d'HE d'orange amère. Sa valeur est de $n_D^{20^\circ\text{C}} = 1,473$. Ce résultat indique que, la modification de la granulométrie des particules n'influe pas sur la composition chimique en HE de bigarade.

En d'autres termes, lorsqu'on fait varier la taille des particules de bigarade, l'indice de réfraction de l'HE de bigarade reste inchangé. De ce fait, la qualité et la pureté de l'HE de bigarade est conservée. Ce résultat confirme celui d'une étude similaire faite sur des écorces d'agrumes (oranger doux ou *Citrus sinensis* et citronnier ou *Citrus limonum*) (**LALLOUTI et ZEROUALI, 2016**).

Selon les normes AFNOR, les valeurs de l'indice de réfraction à 20°C de l'HE de bigarade doivent être comprises entre **1,472 0 et 1,476 0** (**GARNERO, 2003**). Nous pouvons en déduire que nos échantillons d'HE de bigarade sont conformes à la norme AFNOR.

3.3 Détermination de la composition chimique par GC/MS

Selon les normes répertoriées par **GARNERO (2003)**, l'huile essentielle de bigarade est composée des molécules suivantes :

- **Hydrocarbures monoterpéniques** : α -thuyène, α et β -pinène, camphène, sabinène, myrcène, α -phellandrène, terpinolène, limonène (90 à 95 %), (*E*) β -ocimène, γ -terpinène ;
- **hydrocarbures sesquiterpéniques** : δ et β -élémente, α -humulène, β -caryophyllène, δ -cadinène, *cis* et *trans*-farnésène, germacrène *D*, valencène ;

- **alcools** : *n*-octanol, *n*-décanol, linalol, terpin-1-én-4-ol, nérol, géraniol, α -terpinéol, citronellol ;
- **aldéhydes** : *n*-octanal, *n*-nonanal, *n*-décanal, (*E,Z*) décadiénal, (*E,E*) décadiénal, undécanal, dodécanal, tridécanal, tétradécanal, myrténal, citronellal, néral, géranial, aldéhyde périllique, α et β -sinensal ;
- **carvone**,
- **nootkatone**,
- **oxyde** de *cis* et *trans*-limonène,
- **acétate** d'octyle, de décyle, de linalyle, de néryle, de géranyle, de *p*-mentha-1,8-diène-10-yle.

Les profils chromatographiques des différents échantillons sont exposés dans la **figure annexe III 1**. Les résultats obtenus après analyse par GC-MS de nos huiles essentielles de bigarade sont exposés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 Principaux composés chimiques contenus dans les échantillons d'HE de bigarade (GC/MS)

N°	Composé chimique	Temps de rétention (mn)				
		E ₂	E ₄	E ₆	E ₈	
1	D-limonene	C ₁₀ H ₁₆	9,855	10,370	7,929	9,840
2	beta-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	10,045	10,695	-	9,970
3	1-octanol	C ₈ H ₁₈ O	10,195	10,780	-	10,185
4	trans-linalol oxide (furanoid)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	10,280	10,845	-	
5	2-furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro-,alpha,alpha,5-trimethy	C ₁₀ H ₁₈ O ₂			-	
6	cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	C ₁₀ H ₁₆			-	10,555
7	(+)-2-carene	C ₁₀ H ₁₆	10,585	11,65	-	
8	1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl	C ₁₀ H ₁₈ O	10,975	11,410	-	10,880
9	4-méthyl-1,5-heptadiene	C ₈ H ₁₄	11,235		-	
10	beta-bisabolene	C ₁₅ H ₂₄		11,591	-	
11	limonene oxide, trans-	C ₁₀ H ₁₆ O		12,221	-	
12	limonene oxide, cis-	C ₁₀ H ₁₆ O			-	11,786
13	L-alpha-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	13,721	13,976	-	13,671
14	decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	14,116	14,317	-	14,041 7
15	acetic acid, octyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	14,227	14,402	-	
16	(-)-carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	15,422		-	15,442
17	1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-,2-aminobenzoate	C ₁₇ H ₂₃ O ₂ N			-	15,702

18	linalyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	15,777	15,987	-	
19	1-decanol	C ₁₀ H ₂₂ O			-	16,322
20	1-cyclohexene-1-carboxaldehyde,4-(1-methylethenyl)-	C ₁₀ H ₁₄ O	16,427		-	
21	cyclopropane, octyl	C ₁₁ H ₂₂		16,407	-	
22	cyclohexene, 4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethenyl)-1-(1-methyl)	C ₁₅ H ₂₄	18,333	18,423	-	
23	2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate (Z)-	C ₁₂ H ₂₀ O ₂		18,893	-	19,184
24	2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	19,228	20,119	-	19,849
25	lauryl acetate	C ₁₄ H ₂₈ O ₂			-	20,619
26	Acetic acid decyl ester	C ₁₂ H ₂₄ O ₂		20,789	-	
27	1-dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	20,674		-	
28	caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	21,054	21,129	-	20,979
29	P-mentha-1,8-dien-7-yl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	21,514	21,605	-	21,464
30	cis-,beta-farnesene	C ₁₅ H ₂₄			-	22,005
31	bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R*,4)]	C ₁₅ H ₂₄	22,055	22,105	-	
32	2-dodecenal	C ₁₂ H ₂₂ O			-	22,385
33	beta-copaene	C ₁₅ H ₂₄	22,950	23,010	-	22,865
34	naphthalene, 1,2,3,5,6,8A-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)	C ₁₅ H ₂₄			-	24,080
35	alpha-farnesene	C ₁₅ H ₂₄			25,26	
36	1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-,	C ₁₅ H ₂₆ O	25,436		-	
37	1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)	C ₁₅ H ₂₆ O		25,56	-	25,336
38	5-dodecen-1-ol,acetate, (Z)-	C ₁₄ H ₂₆ O ₂		26,021	-	
39	1H-cycloprop[E]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methyle	C ₁₅ H ₂₄ O			-	27,237
40	(-)-spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O		27,302	-	
41	globulol	C ₁₅ H ₂₆ O		28,137	-	
42	beta-vatirenene	C ₁₅ H ₂₂	27,257		-	
43	nootkatone	C ₁₅ H ₂₂ O	32,144	32,434	32,04	32,099
44	N-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	35,990	36,390	-	
45	9,12-octadecadienoic acid, ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	40,212	38,726	-	
46	9,15-octadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂		40,232	-	
47	octacosane	C ₂₈ H ₅₈			-	43,223
48	hexandioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	46,269	46,324	46,26	-

Les principaux composés chimiques contenus dans les échantillons d'HE de bigarade analysée par GC/MS sont représentés dans le **tableau 6** : D-limonène, β-ocimène, α-terpinéol, 1-octanol, decanal...

4 Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de bigarade

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles vis-à-vis de sept souches microbiennes potentiellement pathogènes pour l'Homme, a été mise en évidence par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques, à l'aide d'une règle graduée. Les quantités d'huile essentielles extraites étant minimales, aucune répétition des tests n'a pu avoir lieu et seul trois échantillons d'HE sur les 8 ont pu être testés. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 7** et la **figure 16**.

Selon les résultats de l'aromatogramme (**tableau annexe 3 2**), nous distinguons que :

- Les zones d'inhibition varient entre **8** et **19** mm.
- Les souches microbiennes *Salmonella abony* (bactérie Gram -) et *Aspergillus brasiliensis* (champignon) sont résistantes aux huiles essentielles de bigarade (**D < 8 mm**).
- Les souches microbiennes sensibles aux huiles essentielles de bigarade sont les suivantes :
 - Bactéries Gram - : *Escherichia coli* (D = 9 ou 9,5mm), *Pseudomonas aeruginosa* (D = 9 ou 9,5 ou 10mm).
 - Bactéries Gram + : *Bacillus subtilis* (D = 10 ou 19mm), *Staphylococcus aureus* (D = 10 ou 11 ou 13mm).
 - Levure (champignon) : *Candida albicans* (D = 8,5 ou 9 ou 11mm).

Certains de ces résultats confirment ceux obtenus lors d'une autre étude menée sur l'HE de bigarade avec les souches : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, qui apparaissent aussi, sensibles à l'HE de bigarade (**MOKRETARI, 2017**). Par ailleurs, lors d'une autre étude, l'activité antibactérienne de l'HE de *C. aurantium* a été déterminée contre les bactéries suivantes : *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. La zone maximale d'inhibition a été observée pour *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Alors que *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* se sont révélées résistantes à l'huile de *C. aurantium* (**SIDDIQUE et al., 2011**).

Les bactéries Gram + présentent des diamètres d'inhibition supérieurs à ceux des bactéries Gram - . Elles semblent donc, plus sensibles à notre huile essentielle, que les

bactéries Gram – . Ce résultat confirme les résultats des études réalisées par **JAY (1996)**. Les bactéries Gram – sont dotées d'une paroi constituée d'une couche de peptidoglycanes coincée entre la membrane plasmique et une assise externe de lipopolysaccharides et de protéines, cette structure peut empêcher la prise d'huile par la paroi bactérienne, ou protéger la couche de peptidoglycanes. Par contre, dans les bactéries Gram + la couche de peptidoglycanes est située à l'extérieur, ce qui permet à l'HE d'être directement en contact avec les molécules de peptidoglycanes et donc d'altérer plus facilement la paroi (**CHAO et al., 2000**). Mais **EULGAYER et al. (2001)** donnent un avis différent et notent qu'il est très difficile de faire de telles généralisations parce que chaque HE est unique dans sa composition et chaque bactérie diffère considérablement en structure, en fonctionnalité et en pouvoir pathogène.

L'HE de bigarade présente un pouvoir antifongique modérément inhibiteur contre *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition compris entre 8,5 et 11 mm. Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire en provoquant la fuite du contenu des cellules bactériennes et fongiques (**CRISTIANI et al., 2007**).

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalol (**ALMA, 2004**). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (**DEBA et al., 2008**). L'activité des huiles essentielles est liée à leurs compositions chimiques, à la configuration des éléments constitutifs et aux groupes fonctionnels portés par les constituants ainsi qu'à leurs interactions synergiques possibles. (**PELCZAR et al., 1988**).

Pour chaque microbe pris séparément, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les activités antimicrobiennes des différents échantillons d'huile essentielle de bigarade. Ce qui nous laisse penser que la granulométrie des particules ne semble pas influencer sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de bigarade. Par contre, les quantités d'huile essentielle extraites étaient trop faibles pour pouvoir effectuer des répétitions ou des dilutions. Les résultats obtenus doivent être confirmés par d'autres expériences avec des quantités suffisantes en huile essentielle pour mener à bien cette étude.

Conclusion

Ce travail entre dans le cadre d'une valorisation des ressources végétales disponibles. Cette étude nous a permis d'introduire le paramètre de la granulométrie et d'étudier l'effet de la taille (diamètre) des particules de poudre d'écorces de bigarade sur le rendement, la qualité et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de bigarade.

Les huiles essentielles de poudre de bigarade ont été extraites par HDMO. Les rendements en huiles essentielles et leurs caractères physico-chimiques ont été obtenus en prenant comme référence les méthodes décrites dans la pharmacopée européenne. Les propriétés physiques des huiles essentielles (densité, indice de réfraction) ont été calculées en s'appuyant sur les méthodes de l'AFNOR. L'analyse qualitative des huiles essentielles a été réalisée par GC/MS. L'activité anti-microbiennes des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de l'aromatogramme.

Les résultats de l'étude granulométrique nous ont permis de conclure que la taille des particules de bigarade influe sur le rendement des huiles essentielles de bigarade.

D'autre part, les paramètres physiques (densité relative à 20°C et d'indice de réfraction à 20°C) sont inchangé lorsqu'on fait varier le diamètre des particules. Ce qui signifie que la taille des particules n'a aucune influence sur la qualité des huiles essentielles extraites. De plus, l'analyse qualitative des huiles essentielles de bigarade par CG/MS révèle une composition qualitative inchangée par rapport aux différentes tailles de particules.

Les souches microbiennes résistantes à l'huile essentielle de bigarade sont *Salmonella abony* et *Aspergillus brasiliensis* avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 8 mm. Les souches microbiennes sensibles sont représentées par : les bactéries gram négatives, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition compris entre 9 mm et 10 mm; les bactéries gram positives, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition compris entre 10 mm et 19mm; et les levures *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition compris entre 8,5 mm et 11 mm. La sensibilité maximale à l'huile essentielle de la poudre des écorces d'orange amère est obtenue pour la souche *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 19 mm. Néanmoins, nous ne pouvons pas établir de lien réel entre la taille des particules et l'activité antimicrobienne de l'HE de bigarade car la faible quantité d'HE extraite ne nous a pas permis de réaliser des tests sur la totalité des échantillons et aucune répétition n'a pu être réalisée.

Au cours de cette étude, nous avons pu caractériser l'huile essentielle de bigarade en terme de rendement, de caractères physico-chimiques et d'activité antimicrobienne. En perspective, il serait intéressant de réaliser les points suivants :

- Élargir cette étude pour une gamme plus importante de diamètre dans le but de compléter les résultats obtenus.
- Appliquer cette technique à d'autres variétés.
- Réaliser des études spécifiques avec une gamme plus large d'agents microbiens et des quantités supérieures en huiles essentielles, afin de confirmer les résultats obtenus.

Références bibliographiques

A

- **ABERCHANE M. , FECHTAL M. , CHAOUCH A., BOUAYOUNE T., 2010.** Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica manetti*). Annales de la recherche forestière au Maroc Issn 0483-8009 Coden Afrma, vol.34, pp : 110- 118.
- **ALMA M. H., NITZ S., KOLLMANNBERGER H., DIGRAK M., EFE F. T., YILMAZ N., 2004.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52(12), pp : 3911–3914.
- **AMANA E. K., 2007.** Les anacardiaceae du Togo : Etudes botaniques, écologiques et propriétés antifongiques. Thèse de Doctorat, Université de Lome, Togo, pp : 98 - 99.
- **AMES G.R. and MATTHEWS W.S.A., 1968.** The distillation of essential oils. Tropical Science, vol.10, pp : 136 -148.
- **ANDREWS R. E., PARKS L. W. and SPENCE L. D., 1980.** Some effects of Douglas for terpènes on certain micro-organisms. Appl. Environ. Microsc., vol. 40, pp : 301-304.
- **ANOOP K.S., 2012.** Advances in citrus nutrition. Soil science. National research center for citrus. India, pp : 203 - 206.
- **ARIAS B.T. et RAMON-LACA L., 2005.** Propriétés pharmacologiques d'agrumes et de leurs anciennes et utilisation médiévale dans la région méditerranéenne. Journal d'Ethnopharmacologie, vol 97, pp : 89 - 95.
- **ASPLUND R.O., 1969.** Some qualitative aspects of the phytotoxicity of monoterpènes. Weed Sci., vol. 17, pp : 454 - 455.

B

- **BABA AÏSSA F., 2011.** Encyclopédie des plantes utiles 1. Éd. Production Alger, p : 72.
- **BALZ R., 1986.** Les huiles essentielles. Éd. Crest, p : 80.
- **BARDEAU F., 1976.** La médecine par les fleurs, Éd. Robert Laffont, p : 92.

- **BARDEAU F., 2009.** Les huiles essentielles, découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edition Lanore, p : 315.
- **BEKHECHI C. et ABDELOUAHID D., 2014.** Les huiles essentielles. Éd. Office des publications Universitaires, pp : 75 – 77.
- **BELAÏCHE P., 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Éd. Maloine S.A., Tome 1, p : 78.
- **BENMERIEN L. et BOURGUIG C., 1996.** Extraction des essences par hydro distillation et par solvant volatils des feuilles de la Saugé officinale. Thèse de Doctorat en chimie industrielle, Blida, p : 84.
- **BENZEGHIMI Z. et OUAIL I., 2015.** Contribution à l'évaluation de quelques activités biologiques des huiles essentielles de l'armoise blanche, *Artemisia herba alba Asso*, provenant de deux régions d'Algérie. Mémoire de Master, Blida, Algérie, pp : 55 – 58.
- **BERBARD T., PERINAU F., BRAV O., DELMAS M., GASET A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. Information chimie, vol. 298, pp : 179-184.
- **BERTON H., 2001.** Sorcellerie en Auvergne : Sorciers, guérisseurs, médecine magiques et traditionnelles. Editions De Borée, Clermont-Ferrand, France p : 288.
- **BESOMBES C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de Doctorat, Université de la Rochelle, p : 282.
- **BOCCAS B., 1976.** Les maladie phytophthora des agrumes, Éd. IRFA, Grande Bretagne, p : 162.
- **BOCCO A., CUVELIER M. E., RICHARD H. et BERSET C., 1998.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(6), pp : 2123-2129.
- **BONKENA B., 2001.** Analyse et perspectives d'intégration des marchés des oranges (*Citrus sinensis*) dans la ville de Kinshasa (Cas des marchés de Matete et de Rond point Ngaba). Mémoire, Faculté des Sciences Agronomiques, Unikin, pp : 78 – 80.
- **BOUHAIRI S., 2017.** *Bacillus subtilis* : caractères et applications. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Rabat, pp : 65 – 66.
- **BOURKHISS M., HNACH M., BOURKHISS B., OUHSSINE M., CHAOUCH A., SATRANI B., 2009.** Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl). Masters, agrosolutions, vol.20(1), p : 44.

- **BOUROUKAA A., 2012.** Étude biochimique de l'adultération du jus de fruits. Université de Carthage, p : 60.
- **BOUSBIA N., 2011.** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de Doctorat en co-tutelles, École Nationale Supérieure Agronomique et Université d'Avignon, p : 70.
- **BROWN D. G., 1967.** Influence of Naturally Occuring Compounds on Germination and Growth of jack pine. Ecology, vol. 48, pp : 542-546.
- **BRUIN J., DICKE M. and SABELIS M. W., 1992.** Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics, Experientia, vol. 48, pp : 525-529.
- **BRUNETON J., 1987.** Éléments de Phytochimie et de pharmacologie. Technique et documentation, Éd. Lavoisier, Paris, p : 585.
- **BRUNETON J., 1993** Essential oils in Pharmacognosic Phytochimie. Plantes médicinales, 2^{ème} Éd. Lavoisier, Paris, p : 150.
- **BRUNETON J., 1999.** Huiles essentielles, Pharmacognosie, Phytochimie plantes médicinales, 3^{ème} Éd. Doc. Et Tec. Lavoisier, p : 120.
- **BRUNETON J., 2009.** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 4^{ème} Éd. Lavoisier, Tec et Doc, Paris, p : 200.
- **BURITS M. et BUCAR F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, vol.14, pp : 323-328.

C

- **CALOMME M., PIETERS , VLIETINCK A. and VANDEN BERGHE D., 1996.** Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. Planta Med, vol. 62 (3), p : 222.
- **CASSEL E., VARGAS R. M. F., MARTINEZ N., LORENZO D. and DELLACASSA E., 2009.** Steam distillation modeling for essential oil extraction process. Ind. Crop. Prod., vol. 29, pp : 171-176.
- **CHAN S. W., LEE C. Y., YAP C. F., AIDA W. W. et HO C. W., 2009.** Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, vol. 16(2), pp : 203-213.
- **CHAO S.C., YOUNG D.G., OBERG G.J., 2000.** Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., vol.12, pp : 639-649.

- **CHEMAT F., LUCCHESI M. E., 2005.** Extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des extraits aromatiques. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments. Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, p : 87, 94.
- **CHOUITAH O., 2011.** Composition chimique et activité antibacterienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de Doctorat, Université d'Oran, p : 78.
- **CLAVE D., 2011,** Fiche technique : *Pseudomonas aeruginosa*, Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie. , (online), [http://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques/Pseudomonas%20aeruginosa%20\(Edition%202011\).pdf](http://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques/Pseudomonas%20aeruginosa%20(Edition%202011).pdf)
- **CLAVE D., 2013,** Fiche technique : *Staphylococcus aureus*, Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie, (online) [http://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques/Staphylococcus%20aureus%20\(Edition%202013\).pdf](http://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques/Staphylococcus%20aureus%20(Edition%202013).pdf)
- **CLEVENGER J.F., 1928.** Apparatus for the determination of volatile oil. J. Amer. Pharm. Assoc., vol. 17, pp : 336-341.
- **COCORIN N., GUERIN C., 2003.** Valorisation chimique du végétal : les agrumes, pp : 88 – 89.
- **CROUZET J., 2004.** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, F 4100, pp : 1-16.

D

- **DAOVY A., 2009.** L'oranger amer ou bigaradier .actualités pharmaceutique. Vol. 48, pp : 47- 49.
- **DEBA F., XUAN T.D., YASUDA M. and TAWATA S., 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. Food Control. 19, pp: 346–352.
- **DESJOBERT J-M., BIANCHINI A., TOMMY P., COSTA J. et BERNARDINI A.F., 1997.** Etude des huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. Analysis, vol.6, p : 25.
- **DESOUBEAUX G., CHANDENIER J., 2010.** Aspergillus et maladies aspergillaires. Feuillet de Biologie, vol. LI N° 293, p : 2.

- **DICKE M., SABELIS M. W., TAKABAYASHI J., BRUIN J. and POSTHUMUS M. A. 1990.** Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals, prospects for application in pest control. *J. Chem. Ecol.*, vol. 16, pp : 3091-3118.
- **DIONNE J.Y., 2002.** Les carotenoides. Québec Pharmacie, vol 48, pp : 800-804.
- **DRARENI S., 2013.** Caractérisations physico-chimiques des huiles essentielles de fruit du *Citrus aurantium* et son action sur la bruche de la fève *Bruchus rufimanus* (Coléoptère-Bruchidae). Mémoire de Master, Université Saad Dahlab, Blida, p : 80.
- **DUQUENOIS P.L., 1968.** Plantes Médicinales et Phytothérapie, vol. 4, pp : 255-268.

E

- **EL ABED D. et KAMBOUCHE N., 2003.** Les huiles essentielles. Éd. Dar elgharb, Oran, p : 100.
- **EULGAYER M., DRAUGHON F.A. GOLDEN D.A et MOUNT J.R., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food protects*, vol.64, pp : 1019-1024.
- **ERSUS S. et CAM M., 2007.** Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxydant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 43 (5), pp : 607-609.
- **ESCARTIN I., 2011.** Guide des agrumes. Éd. Institut klorane (Lavaur), p : 20.
- **ESPINOSA-GARCIA F.J., SALDIVAAR-GARCIA P. and LANGENHEIM J.H., 1993.** Dose-dependent effects in vitro of essential oils on growth of two endophytic fungi in coastal redwood leaves. *Biochem, Syst. Ecol.*, vol. 21, pp : 185-194.

F

- **FAHN A., 1979.** Secretory tissues in plants. London New York San Francisco, Academic Press, p : 90.
- **FAHN A., 1988.** Secretory tissues in vascular plants. *N. Phytol.*, vol. 108, pp : 229-257.
- **FERNANDEZ X. et CHEMAT F., 2012.** La chimie des huiles essentielles, Tradition et innovation. Éd. Vuibert, p : 80.
- **FESTY D., 2007.** Livre Ma bible des huiles essentielles. Éd. Leduc, p : 90.

G

- **GARNERO J., 2003.** Huiles essentielles. Les techniques de l'ingénieur, K. 345, p : 1-39.
- **GÉRAUT C., CLEENEWERK M.B., JELEN G., GÉRAUT L., TRIPODI D., 2010.** Dermatites eczématiformes et métiers de bouche. Revue Française d'allergologie, vol. 50, pp : 109-123.
- **GERSHENZON J., 1994.** Metabolic cost of terpenoid accumulation in higher plants. J. Chem. Ecol., vol. 20, pp : 1281-1328.
- **GONZALEZ-MOLINA E., DOMINGUEZ-PERLES R., MORENO D.A., GARCIA-VIGUERA C., 2010.** Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. Journal of pharmaceutical end biomedical, vol. 51, pp : 327-345.
- **GORDON P.B., HOLEN I., and SEGLEN P.O., 1995.** Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid, Journal of Biological Chemistry, vol. 270 (11), p : 5830-8.
- **GUENTHER E., 1948.** The essential oils, Volume I, History-Origin in plants production-Analysis. Litton Educational Publishing, INC, p : 45.
- **GUILHEM J., 2007.** Un 5 à 7 de détente en Aromathérapie. Conférence du Samedi 24 Mars 2007. Pharmagora 24,25,26 Mars. Paris expo, porte de versailles.
- **GUIMARAES R., JOAO SOUSA M., 2010.** Contribution of Essential Oils and Phenolics to the Antioxidant Properties of Aromatic Plants. CIMO/ Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, *Campus* de Santa, Apolónia, Apartado Bragança, Portugal, pp : 67 – 68.

H

- **HADDOUCHI F., BENMANSOUR A., 2008.** Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire, vol. 8, pp : 20-27.
- **HADJ SAHRAOUI M.K., 2007.** Mesures de développement des agrumes. Agriculture et développement rural durable, p : 46.
- **HAZEN K.C., HOWELL S. A., 2007,** *Candida, Cryptococcus,* and Other Yeasts of medical importance. In P. R. Murray Éd., *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Éd., Washington D.C. ASM Press, pp : 1762-1788.
- **HOPKINS W.G., 2003.** Physiologie végétale. Éd.De Boeck, p : 79.

J

- **JAY J.M., 1996.** Microorganisms in fresh ground meat: the relative safety of product with low versus high numbers. *Meat sci*, 43 : S59-S66.
- **JEAN-MARIE P., 2008.** La culture des agrumes. Éd ARTEMIS, pp : 19 – 20.

K

- **KAMBOUCHE N., 2000.** Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran - mise en évidence son activité biologique. Mémoire de Magister en Chimie Organique. Université d'Oran Es-Sénia, p : 72.
- **KHAN I., SHAN Z.A., SAEED M. et SHAN H.U., 2010.** Physicochemical analysis of *citrus sinensis*, *citrus Reticulate* and *citrus paradise*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, vol.32(6), pp : 774-780.
- **KHEBRI S., 2011.** Étude chimique et biologique des huiles essentielles de trois Artemisia, mémoire de Magister, Batna, Algérie, p : 70.
- **KIMBALL D.A., 1999.** Citrus processing, a complete guide. Second edition. Kimball D.A., Ed. Gaithersburg, an Aspen publication, p : 80.
- **KNUDSON J. T., TOLLSTEN L. and BERGSTRÖM G., 1993.** Floral scent, a checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry*, vol. 33, pp : 253-280.
- **KOBA K., SANDA K., RAYNAUD C. MANDIN D., MILLET J., CHAUMONT J.P., 2003.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbogon citratus L. naradus L* et *C. schoenanthus*. *Journal de Mycologie médicale*, Vol 13, N°4, pp : 175-180.
- **KRISTIAWAN M., SOBOLIK V., AL-HADDAD M., ALLAF K. 2008.** Effect of pressure drop rate on the isolation of cananga oil using instantaneous controlled pressure-drop process. *Chem. Eng. Process.*, vol. 47, pp : 66-75.
- **KURITA N. et KOÏKE S., 1982.** Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric. Biol. Chem*, p : 67.

L

- **LADANIYA M. S., 2008.** Citrus fruit : biology, technology and evaluation. San Diego Academic, p : 198.

- **LAMBEV I., BELCHEVA A., ZHELYAZKOV D., 1980.** Flavonoïds with antioxidant action and the release of mastocytic and nonmastocytic histamine. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.*, vol. 6(2), p : 70.
- **LANGENHEIM J. H., 1994.** Higher plant terpenoids : a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, vol. 20, pp :1223-1280.
- **LARDRY J. M. and HABERKORN V., 2007.** Les huiles essentielles, principes d'utilisation. *Kinésither. Rev.*, vol. 7, pp : 205 - 208.
- **LAROUSSE., 2009.** Dictionnaire le petit Larousse illustré, vol 1782, p : 207.
- **LEGRAND G., 1978.** Manuel préparatoire en pharmacie. 8^{ème} Éd. Masson, p 90.
- **LEMBERG S., 1982.** Armoise *Artemisia herba alba*. *Perfumer flavorist*, vol. 7, p : 58-63.
- **LEROY J.F., 1968.** Les agrumes : les fruit tropicaux et subtropicaux. Éd. presses Universitaires de France, p : 100.
- **LESLYE B., 2005.** Plantes aromatiques et médicinales 1. Production Paris, vol 306 p : 46.
- **LI Y., WANG X., LI H., LI P. et WANG H. 2009.** Polyphenolic compounds and antioxydantproperties of selected China wines. *Food Chemistry*, vol. 112 (2), pp : 454-460.
- **LOUSSERT R., 1989.** Les agrumes 2. Production Lavoisier, Paris, p : 157.
- **LOUSSERT R., 1989.** Les agrumes, Tome 1. Arboriculture. Éd. Lavoisier, Beyrouth, p : 113.
- **LU D., CAO Q., LI X., CAO X., LUO F., et SHAO W. 2009.** Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, vol. 95(1), pp : 145-152.
- **LUCCHESI M. E., 2005.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Université de la Réunion, p : 100.
- **LUCIENNE A.D., 2010.** Les Plantes Médicinales d'Algérie 2^{ème} édition, vol. 239, p : 56.
- **LUSIÀ J., ESTIARTE M. and PEÑUELAS J., 1996.** Terpenoids and Plant Communication. *Butll. Inst. Cat. Hist. Nat.*, vol. 64, pp : 125-133.

M

- **MANNER H.I., BUKER R.S., EASTON SMITH V., WARD D. et ELEVITCH C.R., 2006.** *Citrus* (citrus) *Fortunella* (kumquat). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, vol. 2, p : 1-35.
- **MARIN M.J., MARHUENDA E., PEREZ-GUERRERO C. and FRANCO J.M. 1994,** Antiulcer effect of naringin on gastric lésions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*, vol. 49(3), pp : 144-50.
- **MESSAOUDI S., 2005.** Les plantes médicinales. Edition Dar et Maarifa, p : 40.
- **MILLET F., 2013.** Le grand guide des huiles essentielles. Éd. Marabout (Hachette Livre), p : 56.
- **MOKRETARI O., 2017.** Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de deux variétés d'orange amer *Citrus aurantium* de la région de la Mitidja et évaluation de quelques activités biologiques. Mémoire de Master, Université Saad Dahlab, Blida, p : 65.
- **MONTES-BELMONT R., CARVAJAL M., 1998.** *Journal of food Prot*, p : 42.
- **MOREIRA M.R., PONCE A.G., DE VALLE C.E., ROURA S.I., 2005.** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *Lebensmittel Wissenschaft und -Technologie-LWT*, vol.38, pp : 565–570.
- **MOYSE H., 1981.** Matière médicale. 2^{ème} édition, Paris, p : 297.

O

- **OKOH O.O., SADIMENKO A., AN A.J., 2007.** The Effects of Age on the Yield and Composition of the Essential Oils of *Calendula officinalis*. *J. Applied Sci.* Vol. 7, pp : 3806-3810.
- **OWEN P.L. et JOHNS T., 1999.** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern northamérican plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 64 (2), pp : 149-160.

P

- **PARLORAN J.C., 1971.** Les agrumes. Éd. Maison neuve et Larose, Paris, p : 565.
- **PARDINI F., LUCHERONI M.T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles. Éd. de Vecchi, p : 348.
- **PARLORAN J.C., 1971.** Les agrumes. Éd. Maison neuve et Larose, Paris, p : 565.

- **PAULI A., 2001.** Antimicrobial properties of essential oil constituents. Int. Journal Aromather, Vol. 11, pp : 126-133.
- **PELCZAR et al., 1988.** The importance of the antimicrobial activity of alkylated phenols in relation to phenol has been previously reported, p : 56.
- **PEÑUELAS J., 1993.** El aire de la vida. Ariel, Barcelona, p : 50.
- **PEÑUELAS J., RIBAS-CARBO M. & GILES L. b., 1995.** Allelochemical effects of plant respiration and on oxygen discrimination by alternative oxidase. J. Chem. Ecol., vol. 22, pp : 801-805.
- **PIBIRI M. C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, EPFL Lausanne, Suisse, p : 161.
- **POLESE J.M. 2008.** Culture d'agrumes. Édition artémis, p : 67.

R

- **RACHEL F., 2015.** Les agrumes saveurs et vertus. Éd. Grancher, p : 127.
- **RHAYOUR K., 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat, Université de Mohamed Ben Abdallah, Fés, Maroc, p : 90.
- **ROCHEFORT D., 1793.** Cours Élémentaire de Matière Médicale suivi d'un précis de l'Art et Formuler. Méquignon, Paris, vol. 386, pp : 84-87.
- **ROUESSAC F. et ROUESSAC A., 1992.** Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, Éd. Masson. Paris, p : 58.

S

- **SAÏHI R., 2011.** Étude phytochimique, extraction des produits actifs de la plante *Artemisia campestris* de la région de Djelfa. Mémoire de Magister en Chimie, Université d'Oran, Algérie, p : 66.
- **SALGHI R., 2015.** Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires. filière Génie des Procédés, Énergie et Environnement (GPEE), 1^{ère} année. ENSA Agadir, Maroc, p : 11.
- **SALLÉ J-L., 1991.** Les huiles essentielles Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Éd. Frison-Roche, Paris, p : 100.

- **SALUNKHE D.K. et KADAM S.S., 1995.** Botany. In : Handbook of Fruit Science and Technology : Production, Composition, Storage, and Processing. Ed. CRC Press, pp : 41-42.
- **SEUFERT G., KOTZIAS D., SPART C. and VERSINO B., 1995.** Volatile organics in mediterranean shrubs and their potencial role in a changing environment. In:Anticipated effects of a Changing Global Environment on Mediterranean Type Ecosystems. W. C. Oechel and J. M. Moreno. Ed., Springer-Verlag, New York, pp : 343-470.
- **SIDDIQUE S., SHAFIQUE M., PARVEEN Z., KHAN S. J et KHANUM R., 2011.** Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus aurantium var. bitter orange peel oil*. Pharmacologyonline, vol.2, pp : 499-507.
- **SINGH A.K., DIKSHIT A., DIXIT S.M., 1983.** Fungitoxic properties of essential oil of *Mentha arvensis varpepiraxens*. Perfumer and flavorist, p : 54.
- **SKOOG D., HOLLER G., NIEMAN F., 2003.** Principe d'analyse instrumentale. 5^{ème} édition, Éd. Bocker University, Maroc, vol.5., p : 956.
- **SOUCI S.W., FACHMANN W. et KRAUT H., 1995.** Food composition and nutrition tables. 6th ed. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.p : 352-354.
- **STASHENKO E.E., JARAMILLO B. E., MARTINEZ J.R., 2004.** Analysis ofvolatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. Journal of Chromatography A, vol. 1025, pp : 105-113.
- **STASHENKO E.E., JARAMILLO B. E., MARTINEZ J.R., 2004.** Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. Journal of chromatography A, vol. 1025, pp : 93-103.
- **SUTOUR S., 2010.** Étude de la composition chimique des huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. Thèse de doctorat en chimie organique et analytique, Université de Corse Pascal Paoli, p : 1-213

T

- **TAKABAYASHI J., DICKE M. and POSTHUMUS M. A., 1994.** Volatile Herbivore-induced Terpenoids in Plant-mite Intractions ; Variation caused by biotic and abiotic factors. J. Chem. Ecol., vol. 20, pp : 1329-1353.
- **TENSCHER E., ANTON R. et LOBSTEIN A. 2005.** Agrumes. In : Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, p : 77.

- **TELPON T., 2003.** Auteur de l'ABC des huiles essentielles. Éd. Grancher, p : 78.

V

- **VALNET J., 1984.** Aromathérapie traitement des maladies par les essences de plantes. 10^{ème} édition, Maloine S.A. Paris, p : 544.
- **VARGA J., KOCSUBE S., TOTH B. et al., 2007.** *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 57, pp : 1925-1932.

Y

- **YUTING C., RONGLIAND Z., ZHONGJIAN J. and YONG J., 1990.** Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants, free radical. Biology and Medicine, vol.9 n°1, pp : 19-22.

Annexe I

Matériel non biologique

- Anse à ensemercer
- Ballon de 500 ml
- Bain Marie
- Bec bunsen
- Boîtes de pétrie
- Béchers
- Crayon marqueur
- Disques vierges de papier Wattman 6mm
- Ecouvillons
- Entonnoir
- Ependorfs
- Etuve à stérilisation
- Erlenmeyers
- Gants
- Hotte à flux laminaire
- Hydro-distillateur type Clevenger
- Micro-onde
- Incubateur
- Papier aluminium
- Papier filtre
- Règle graduée
- Pince
- Pipette pasteur
- Portoir
- Seringue
- Spatule
- Spectrophotomètre
- Tubes à essai

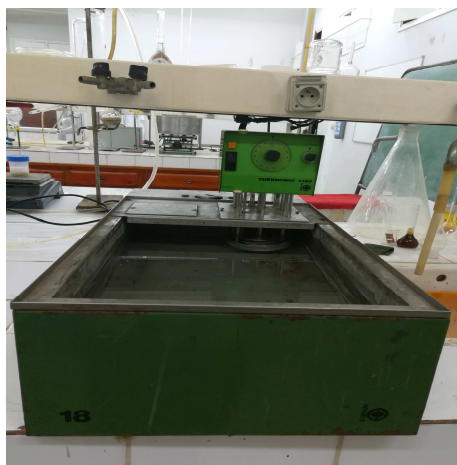


Figure annexe I 1 Bain thermostaté monté en série avec le Clevenger (circuit fermé)



1- Bigarades récoltées lavées



2- Écorces de bigarades épluchées



3-Séchage des écorces de bigarades au déshydrateur Excalibur



4-Écorces de bigarades sèches découpées



5-Poudre d'écorces de bigarade

Figure annexe I 2 Les différentes étapes de préparation de la poudre d'écorces de bigarades



Figure annexe I 3 Tamiseur



Figure annexe I 4 Sept échantillons de poudre d'écorces de bigarades

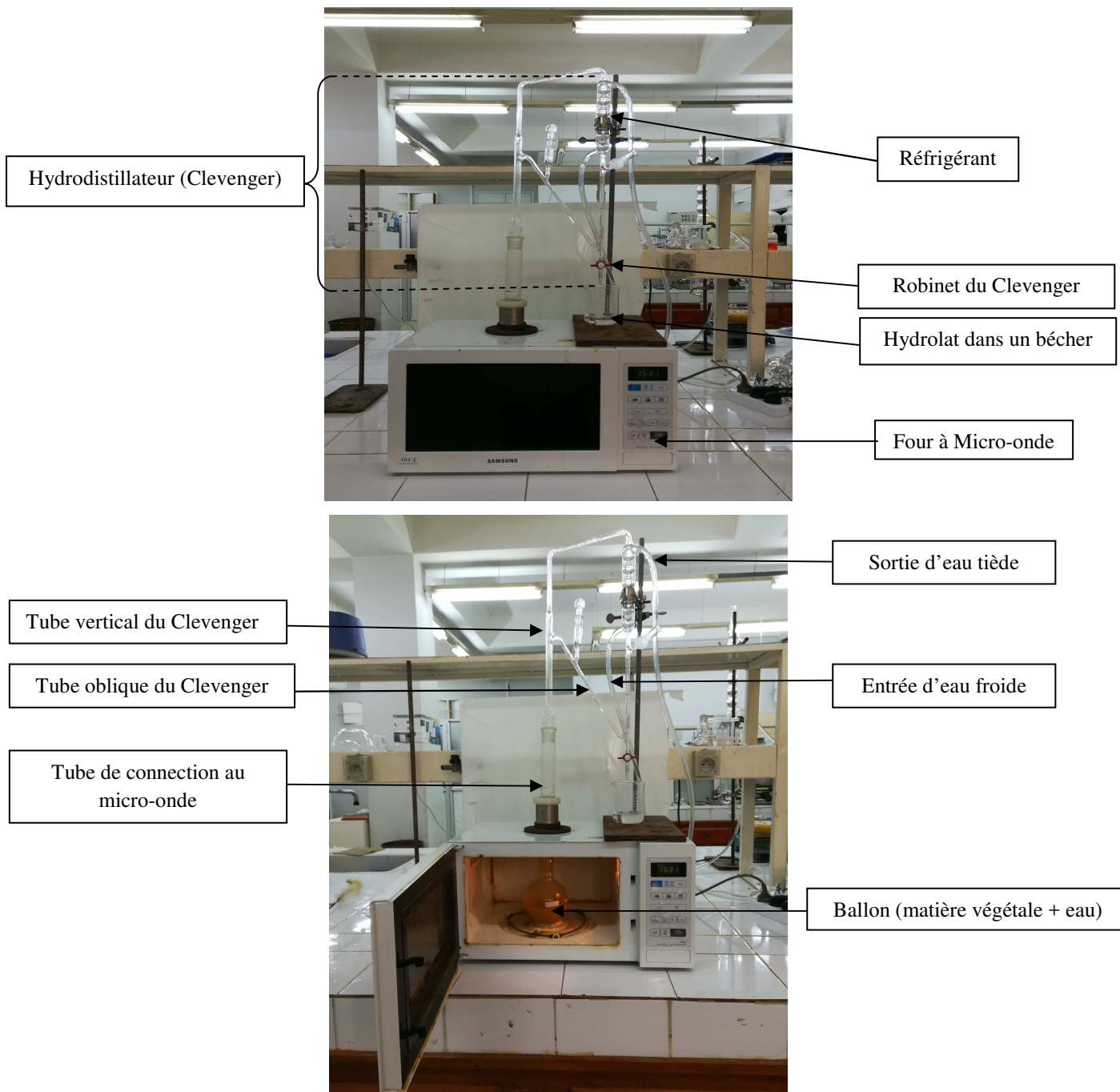


Figure annexe I 5 Conditions opératoires de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO)



Figure annexe I 6 Réfractomètre ABBE

Annexe II Milieux de culture

Milieu Muller Hinton pour les cultures bactériennes :

Composition :

Extrait de viande de bœuf.....	300g
Infusion de viande de bœuf.....	17.5g
Hydrolysate de caséine.....	1.5g
Gélose.....	10g

PH : 7.4

Gélose sabouraud :

Composition :

Peptone.....	10g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

PH : 6.3

Annexe III Résultats

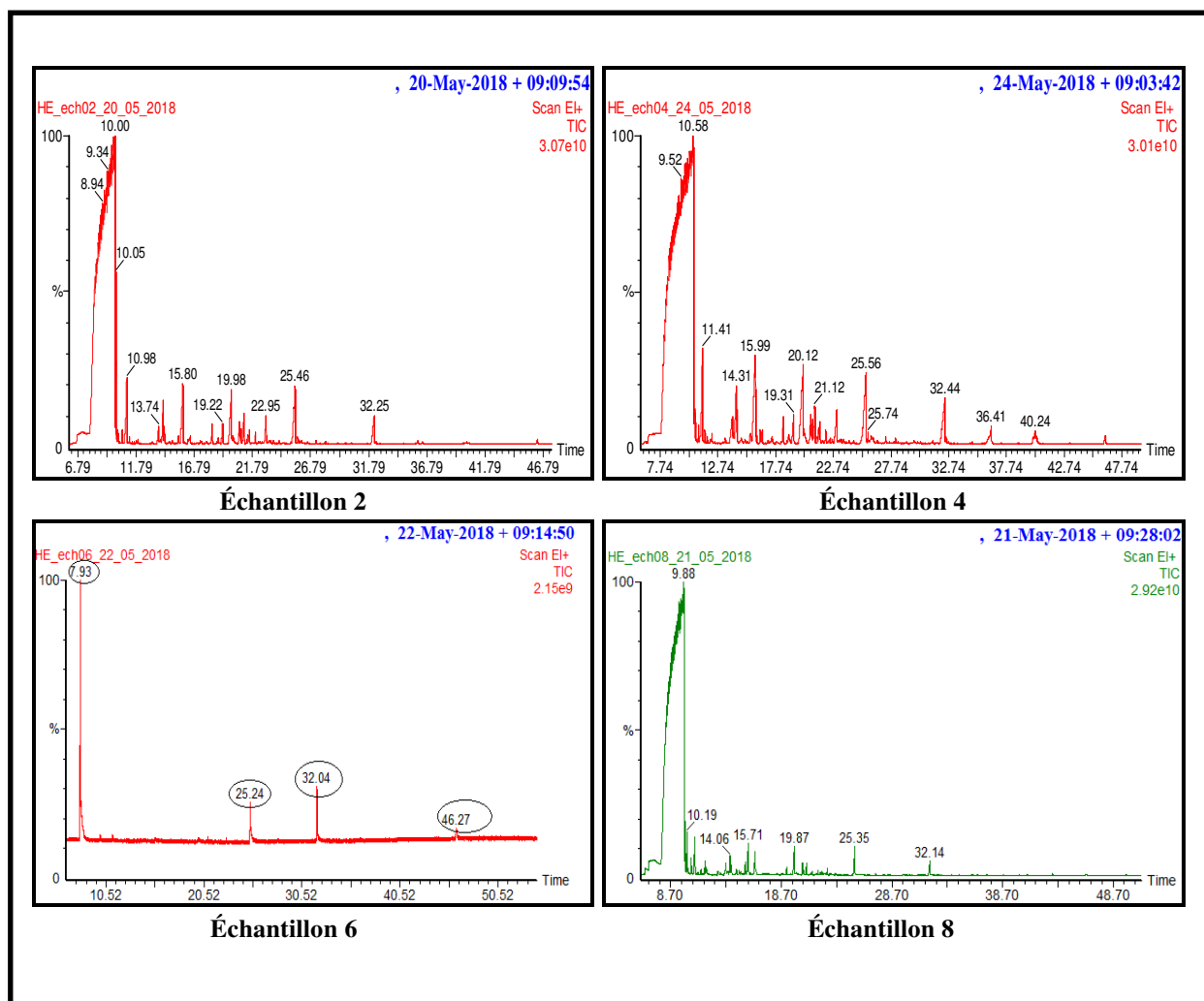


Figure annexe III 1 Profil chromatographique GC/MS des huiles essentielles de bigarade

Tableau annexe III 1 Résultats de l'aromatogramme

Huile essentielle d'écorce de bigarade			
Souches microbiennes	Échantillons	Diamètre (D) de la zone d'inhibition (mm)	Interprétation des résultats
<i>Escherichia coli</i> G -	E ₂	9,5	+
	E ₃	9	+
	E ₈	9	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> G -	E ₂	10	+
	E ₃	9,5	+
	E ₈	9	+
<i>Salmonella abony</i> G -	E ₂	< 8	-
	E ₃	< 8	-
	E ₈	< 8	-
<i>Bacillus subtilis</i> G+	E ₂	10	+
	E ₃	10	+
	E ₈	19	++
<i>Staphylococcus aureus</i> G+	E ₂	13	+
	E ₃	10	+
	E ₈	11	+
<i>Candida albicans</i>	E ₂	9	+
	E ₃	8,5	+
	E ₈	11	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	E ₂	< 8	-
	E ₃	< 8	-
	E ₈	< 8	-

E₂ : D_M = 150µm, E₃ : D_M = 300 µm, E₈ : témoin composé d'écorces fraîches de bigarade découpées

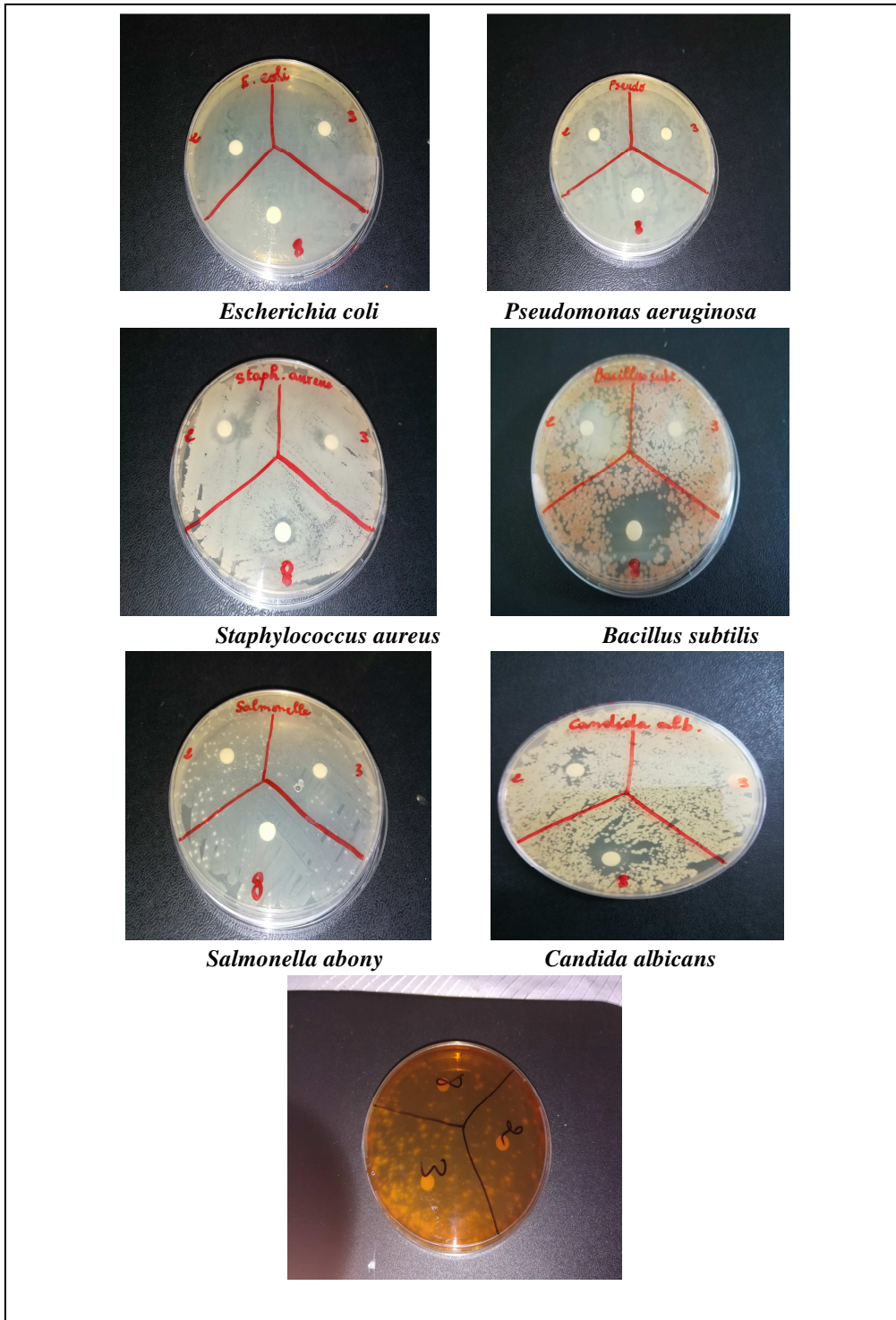


Figure annexe III 2 Photos originales montrant l'effet de l'HE de bigarade sur des souches microbiennes.

Annexe IV

Évolution de la masse volumique de l'eau en fonction de sa température

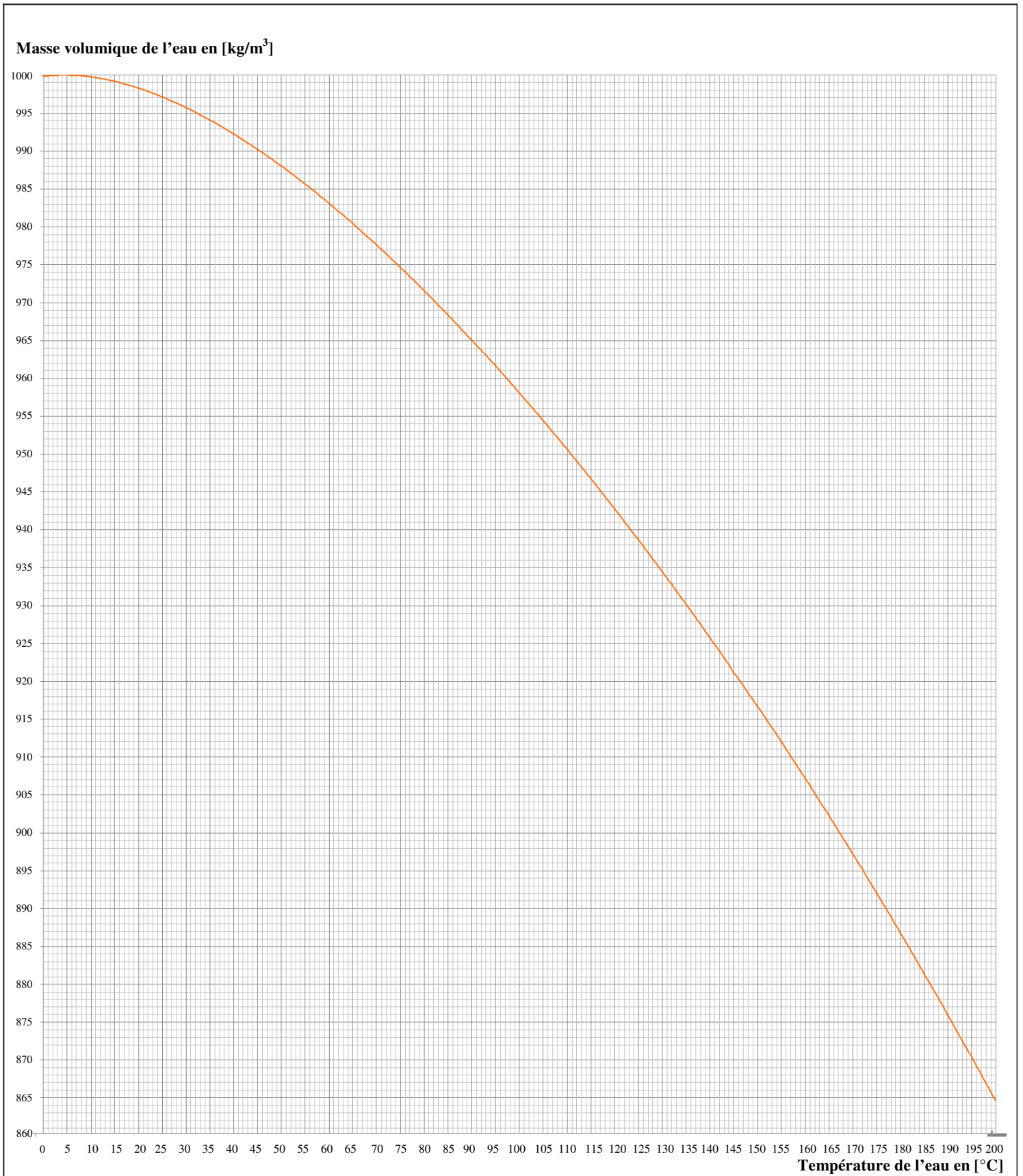


Tableau annexe IV 1 Évolution de la masse volumique de l'eau en fonction de sa température

0	999,82	38	993	76	974,08	114	947,53	152	914,82	190	875,94
1	999,89	39	992,63	77	973,46	115	946,74	153	913,88	191	874,83
2	999,94	40	992,25	78	972,85	116	945,95	154	912,93	192	873,71
3	999,98	41	991,86	79	972,23	117	945,16	155	911,98	193	872,59
4	1000	42	991,46	80	971,6	118	944,37	156	911,03	194	871,46
5	999,99	43	991,05	81	970,97	119	943,57	157	910,07	195	870,32
6	999,98	44	990,64	82	970,33	120	942,76	158	909,1	196	869,19
7	999,96	45	990,22	83	969,69	121	941,95	159	908,14	197	868,04
8	999,91	46	989,8	84	969,04	122	941,14	160	907,16	198	866,89
9	999,85	47	989,36	85	968,39	123	940,32	161	906,19	199	865,74
10	999,77	48	988,92	85	967,73	124	939,5	162	905,21	200	864,58
11	999,68	49	988,47	87	967,07	125	938,67	163	904,22	T E M P É R A T U R E E A U (°C)	M A S S E V O L U M I Q U E E A U (Kg / m ³)
12	999,58	50	988,02	88	966,41	126	937,84	164	903,24		
13	999,46	51	987,56	89	965,74	127	937,01	165	902,24		
14	999,33	52	987,09	90	965,06	128	936,17	166	901,24		
15	999,19	53	986,62	91	964,38	129	935,33	167	900,24		
16	999,03	54	986,14	92	963,7	130	934,48	168	899,24		
17	998,86	55	985,65	93	963,01	131	933,63	169	898,22		
18	998,68	56	985,16	94	962,31	132	932,78	170	897,21		
19	998,49	57	984,66	95	961,62	133	931,92	171	896,19		
20	998,29	58	984,16	96	960,91	134	931,06	172	895,17		
21	998,08	59	983,64	97	960,2	135	930,19	173	894,14		
22	997,86	60	983,13	98	959,49	136	929,32	174	893,1		
23	997,62	61	982,6	99	958,78	137	928,44	175	892,07		
24	997,38	62	982,07	100	958,05	138	927,56	176	891,02		
25	997,13	63	981,54	101	957,33	139	926,68	177	889,98		
26	996,86	64	981	102	956,6	140	925,79	178	888,92		
27	996,59	65	980,45	103	955,87	141	924,9	179	887,87		
28	996,31	66	979,9	104	955,13	142	924,01	180	886,81		
29	996,02	67	979,34	105	954,39	143	923,11	181	885,74		
30	995,71	68	978,78	106	953,65	144	922,2	182	884,67		
31	995,41	69	978,21	107	952,9	145	921,19	183	883,6		
32	995,09	70	977,63	108	952,14	146	920,38	184	882,52		
33	994,76	71	977,05	109	951,38	147	919,46	185	881,43		
34	994,43	72	976,47	110	950,62	148	918,54	186	880,34		
35	994,08	73	975,88	111	949,85	149	917,62	187	879,25		
35	993,73	74	975,28	112	949,08	150	916,69	188	878,15		
37	993,37	75	974,68	113	948,31	151	915,76	189	877,05		

