



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة غرداية

Université de Ghardaïa

N° d'enregistrement

كلية العلوم والتكنولوجيا

/...../...../...../...../.....

Faculté des Sciences et de la Technologie

قسم هندسة الطرائق

Département de Génie des Procédés

**Master**

**Domaine** : sciences et technologie

**Filière** : Génie des procédés

**Spécialité** : Génie chimique

**Thème**

**ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES D'UNE PLANTE  
AROMATIQUE MEDICINALE**

**Présenté par :**

**BAHMAN KHADIJA**

**DJBRIT RIM**

**Devant le jury composé de :**

**BABA ARBI Ilias**

**MAA**

**Univ. Ghardaïa**

**Examineur**

**BENARIMA Zine El Abidine**

**MCB**

**Univ. Ghardaïa**

**Examineur**

**BENCHEIKH Salah Eddine**

**MCB**

**Univ. Ghardaïa**

**Encadreur**

**Année universitaire 2021/2022**

# *Dédicace*

A mon cher **père** et ma défunte **mère**, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A femme de mon père **Nanna**, je te souhaite bonheur, réussite et prospérité,

A mes chères sœurs **Saida**, **Fatima** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A me cher frère **Ahmad**, pour leur appui et leur encouragement,

A mon le fils de ma sœur **Abd Almouqsit** Que Dieu le Tout Puissant vous garde,

A toutes **mes amis**, particulièrement à **Nour Elhouda**,

A toute **ma famille** Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur,

A mon binôme **Rim** , une amie qui a partagé beaucoup de choses avec moi et qui m'a toujours soutenu ce de travail merci beaucoup ,

Et à tous ceux que j'ai connus durant mon cycle d'étude,

*Khadija ...*

# *Dédicace*

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

Je dédie ce modeste travail ;

À

Mon très cher **père**, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, rien de ce que je dirai ne suffira pour lui exprimer ma gratitude alors Merci beaucoup papa.

À

Ma très chère **mère**, qui m'a permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, à la lumière de mes jours qui me guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, à la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, Je t'adore  
maman.

À

Mes chères frères, **Wassil Khalil, Ali, Youssef, Younes** vous êtes la parure de ma vie et mon soutien dans ce monde Je vous souhaite un bonheur permanent Que Dieu vous protège de tout mal.

À la mémoire de ma **grande mère**

À

Mon binôme **Khadija** Qui a une place spéciale dans mon cœur, une amie qui a partagé beaucoup de choses avec moi et qui m'a toujours soutenu.

À

Tous les membres de **ma grande famille**, et à tous mes fidèles amies  
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

*Rim ...*

# Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la santé, la force et la patience, le courage ainsi que la volonté pour achever ce travail

Je tiens à remercier **Dr. Bencheikh Salah Eddine**, pour avoir encadrée ce travail. Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos conseils, votre objectivité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail.

Je remercie également **Ben Saleh Bachir** ingénieure du laboratoire biochimie de la Faculté des sciences de la nature de la vie l'Université de Ghardaia , et le **Dr. Yacine** le médecin de laboratoire d'analyse médical ESSALAM

Mes plus vifs remerciements à toutes mes amies de la promotion pour leur soutien moral tout au long de ces années mémorables.

Nos derniers remerciements, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## ملخص

هذا العمل جزء من دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ومضادات الأكسدة للنباتات العطرية والطبية الجزائرية. أجرينا دراسة على نبات يستخدم على نطاق واسع من قبل السكان المحليين، وهو الليمون. وهو نبات عطري من منطقة غرداية. يتم استخلاص الزيوت الأساسية من نبات الليمون (القشور والأوراق) باستخدام تقنية التقطير المائي. بلغت نسبة مردود الاستخلاص 1.12% للقشور و 0.71% للأوراق.

تم التحليل الزيوت الأساسية بواسطة GC / MS حيث حدد 35 مكوناً للزيوت الأساسية للأوراق مع 19.41% *L-Limonene* و 14.87% *Nerol acetate* و 25 مكوناً للزيوت الأساسية للقشور مع 45.62% من *L-Limonene* و 8.3% من *Carene*-مركبات رئيسية .

يتم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت الأساسية بثلاث طرق؛ يتم إجراء الأول عن طريق اختبار مسح الجذور الحرة DPPH للقشور الذي تم الحصول عليه من  $IC_{50}$  : 135.678 ملليغرام /مل أعلى من الزيت العطري للأوراق  $IC_{50}$  : 34.238 ملليغرام /مل. الطريقة الثانية إرجاع فيري سيانيد البوتاسيوم FRAP ، الزيوت الأساسية للأوراق لها نشاط مضاد للأكسدة  $EC_{50}$  : 63.3773 ملليغرام / مل والقشور  $EC_{50}$  : 200.875 ملليغرام /مل. الطريقة الثالثة لفوسفوموليبيدات الأمونيوم والتي تعتمد على إرجاع موليبيدات TAC إلى نشاط الأوراق والقشور المضادة للأكسدة على التوالي  $EC_{50}$  : 1.5722 ملليغرام / مل،  $EC_{50}$  : 1.9604 ملليغرام / مل.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا مقابل ست سلالات بكتيرية مرجعية *Klebsiella pneumoniae* : هي الأكثر حساسية للزيتين الأساسيين بقطر تثبيط يبلغ 48 ملم لـ HE للأوراق و 40 ملم لـ HE من القشور. وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها، يبدو أن للزيوت الأساسية نشاطاً ممتازاً (مضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا).  
**الكلمات المفتاحية:** زيوت الأساسية؛ *Citrus limon*؛ نشاط مضاد للجراثيم؛ نشاط مضادات الأكسدة؛ GC / MS .

## Abstract

This task is part of the study of antibacterial activity and antioxidants Algerian aromatic medicinal plants. We conducted a study on a plant used widely by local people, which is *Citrus lemon*, it is an aromatic plant from Ghardaïa.

The essential oils are extracted from *citrus lemon* (the peels and leaves) using water distillation technology. The extraction rate reached 1.12% for the peels and 0.71% of the leaves.

The oils were analyzed by GC/MS. 35 components were identified for the essential oils of leaves with 19.41% *L-Limonene* and 14.87% of *Nerol acetate*, and 25 components of the essential oils of the peels with 45.62% of *L-Limonene* and 8.3% of *3-carene* as the main compounds.

The antioxidant activity of essential oils is evaluated in three ways. The first method is performed by a DPPH free radical scavenging test of peels obtained from  $IC_{50}$  : 135,678 mg/ml higher than aromatic oil of leaves  $IC_{50}$  : 34.238 mg/ml. The second way to reduce potassium ferricyanide FRAP, the essential oils of the leaves have antioxidant activity  $EC_{50}$ : 63.3773 mg/ml and peels  $EC_{50}$  : 200.875 mg/ml. The third method of ammonium phosphomolipids depends on the reduction of TAC molybdate to the antioxidant activity of leaves and peels, respectively  $EC_{50}$  : 1.5722 mg/ml,  $EC_{50}$  : 1.9604 mg/ml.

The antibacterial activity was evaluated facing six reference bacterial strains of *Klebsiella pneumoniae*, which is the most sensitive to the two essential oils with a flanking diameter of 48 mm for HE of leaves and 40 mm for HE of peels.

According to the results obtained, the essential oils seem to have excellent activity (antioxidant and anti-bacterial).

**Keywords:** essential oils, *Citrus limon*, antibacterial activity, antioxidant activity; GC/MS

## Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante de plante aromatique et médicinale algériennes. Nous avons entrepris une étude sur plante très utilisées par la population locale, *Citrus limon*. La plante aromatique provenant de la région Ghardaïa.

On fait l'extraction des huiles essentielles de *citrus limon* (zeste et feuilles) par la technique d'hydrodistillation. Le rendement d'extraction obtenu est de 1.12 % pour le zeste et 0.71 % pour les feuilles.

Le criblage par la GC/MS a permis d'identifier 35 constituants pour les huiles essentielles des feuilles avec 19,41 % de *L-Limonene* et 14,87 % de *Nerol acetate* et 25 constituants pour les huiles essentielles du zeste avec 45,62 % de *L-Limonene* et 8,3 % de *3-Carene* comme composés majoritaires.

L'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée par trois méthodes ; la première est faite par le test du piégeage du radical libre *DPPH* pour le zeste obtenu de  $IC_{50} = 135,678 \text{ mg/ml}$  est supérieur à celle de l'huile essentielles des feuilles  $IC_{50}$  de  $34,238 \text{ mg/ml}$ . La deuxième méthode de réduction du ferricyanure de potassium *FRAP*, les huiles essentielles des feuilles à une activité antioxydante de  $EC_{50} = 63,3773 \text{ mg/ml}$  et le zeste de  $EC_{50} = 200,875 \text{ mg/ml}$ . Et la troisième méthode phosphomolybdate d'ammonium qui basée sur la réduction du molybdate *TAC* à une activité antioxydante de feuille et zeste respectivement  $EC_{50} = 1,5722 \text{ mg/ml}$  ;  $EC_{50} = 1,9604 \text{ mg/ml}$ .

L'activité antibactérienne, a été dosée contre six souches bactériennes référencées la *Klebsiella pneumoniae* est la plus sensible pour les deux huiles essentielles avec un diamètre d'inhibition de 48 mm pour HE des feuilles et 40 mm pour les HE du zeste.

D'après les résultats obtenus, Les huiles essentielles semble avoir une excellente activité (antioxydante, antibactérienne).

**Mots clés :** Huiles essentielles ; *Citrus limon* ; Activité antibactérienne ; Activité antioxydante ; GC/SM.

## Liste des figures

Figure I.1 : Exemples de structures de mono- et sesquiterpènes .....	4
Figure I.2 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane.....	5
Figure I.3 : Des médicaments à base d'HE .....	7
Figure I.4 : Utilisation d'HE dans la cosmétique.....	7
Figure I.5 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur d'eau .....	9
Figure I.6 : Schéma Extraction par solvant organique.....	10
Figure I.7 : Schéma d'un appareil de Soxhlet.....	10
Figure I.8 : L'extraction au $CO_2$ supercritique .....	11
Figure I.9 : Schéma d'une installation de distillation sèche.....	11
Figure I.10 : Dispositif de l'extraction par expression à froid.....	12
Figure I.11 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes .....	12
Figure I.12 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huiles essentielles .....	13
Figure I.13 : Extraction par les ultrasons .....	13
Figure II.1 : Origine et dispersion des agrumes à travers le monde .....	16
Figure II.2 : la répartition des zones productives des citrus en Algérie.....	17
Figure II.3 : Citrus .....	18
Figure II.4 : Feuilles de citronnier .....	19
Figure II.5 : Fruits de citronnier.....	19
Figure III.1 : Plan générale de la partie Pratique .....	24
Figure III.2 : La plante de <i>Citrus limon</i> .....	25
Figure III.3 : Géographie de la zone de récolte de la plante .....	26
Figure III.4 : Protocole d'extraction des huiles essentielles de citron .....	27
Figure III.5 : Refractomètre .....	29
Figure III.6 : Montage d'indice d'acidité.....	30
Figure III.7 : Densimètre .....	31
Figure III.8 : Chromatographe en phase gazeuse adopté couplé à un spectromètre de masse GC/MS.....	32
Figure III.9 : Forme libre et réduite du DPPH .....	33
Figure III.10 : Protocole de la méthode de DPPH .....	34
Figure III.11 : Réduction du complexe ferric-tripyridyltriazine $Fe^{3+}$ (TPTZ) en $Fe^{2+}$ ferrous-tripyridyltriazine (TPTZ) .....	35
Figure III.12 : Protocole d'étude de pouvoir réducteur FRAP.....	36
Figure III.13 : Protocole d'étude de méthode TAC.....	38
Figure III.14 : Illustration de la méthode d'aromatogramme .....	39
Figure III.15 : Les souches bactéries .....	40
Figure III.16 : Zone stérile.....	41
Figure III.17 : Réchauffer le contenu de flacon de Mueller Hinton. ....	41
Figure III.18 : Couler des boîtes pétries par gélose .....	41
Figure III.19 : Ensemencement des souches.....	42
Figure III.20: Protocole du test de l'activité antimicrobienne .....	43

Figure III.21 : Huile essentielle à différentes dilutions par DMSO.....	44
Figure IV.1 : Profil chromatographique de L'H.E des feuilles analysée par CG/SM. ....	46
Figure IV.2 : Profil chromatographique de L'H.E de zeste analysée par CG/SM. ....	47
Figure IV.3 : Les composés majoritaires de L'H.E des feuilles .....	47
Figure IV.4 : Les composés majoritaires de L'H.E de zeste .....	48
Figure IV.5 : Réaction entre un antioxydante et un radical libre (DPPH•) .....	49
Figure IV.6 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP .....	50
Figure IV.7 : l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> .....	56

## Listes des tableaux

Tableau II.1: Composition des huiles essentielles de citrus selon la situation géographique ..	21
Tableau IV.1 : les caractéristiques organoleptiques des HE extraites .....	45
Tableau IV.2: Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> ....	45
Tableau IV.3 : les activités antioxydantes de l'HE de citrus limon .....	49
Tableau IV.4: Activité antibactérienne d'HE zestes.....	52
Tableau IV.5: Activité antibactérienne d'HE feuilles .....	53
Tableau IV.6: Les résultats de zone d'inhibition d'HE de <i>Citrus limon</i> .....	54

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association française de normalisation .

**ATCC** : American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes) .

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice .

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil .

**EC<sub>50</sub>** : Concentration efficace qui réduit le Fer dans une absorbance de 0,5 .

**FRAP** : Ferrique reducing antioxidant power .

**GC/MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse .

**°C** : Degrés Celsius .

**HE** : Huile essentielle .

**I** : Inhibition .

**IA** : Indice acide .

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50% .

**IR** : Indice de rétention .

**ISO** : Organisation internationale de normalisation .

**TAC** : Capacité Antioxydant totale (molybdate).

# Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
ملخص	
Abstract	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale .....	1
Parti I : partie théorique	
Chapitre I : Les huiles essentielles	
I.1 Histoire et origine des huiles essentielles .....	2
I.2 Définition.....	2
I.3 Localisation .....	3
I.4 L'aromathérapie .....	3
I.5 Composition chimique.....	3
I. 5.1 Terpènes .....	3
I.5.2 Composés aromatiques .....	4
I.5.3 Composés d'origine variée .....	5
I.6 Propriétés physico-chimiques.....	5
I.7 Les vertus des huiles essentielles .....	6
I.8 Domaines d'utilisation des huiles essentielles .....	6
I.8.1 Dans les industries agro-alimentation : .....	6
I.8.2 La médecine et l'industrie pharmaceutique : .....	6
I.8.3 L'industrie de la parfumerie et de la cosmétique .....	7
I.8.4 Dans diverses industries : .....	7
I.9 Conservation.....	8
I.10 Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	8
I.10.1 Entraînement à la vapeur d'eau .....	8
I.10.2 Extraction par solvant organique [36] .....	9
I.10.3 Extraction au gaz <b>CO2</b> supercritique .....	10
I.10.4 La distillation sèche .....	11

I.10.5 L'expression à froid.....	11
I.10.6 L'extraction sans solvant assistée par micro-onde .....	12
I.10.7 Hydrodistillation.....	12
I.10.8 Extraction par les ultrasons : .....	13
I.10.9 Extraction par enfleurage .....	13
I.11 Activités biologiques [35] .....	14
I.11.1 Activité antioxydante.....	14
I.11.2 Activité antibactérienne.....	14
I.11.3 Activité antifongique .....	14
1.12 Les méthodes d'analyse des huiles essentielles .....	15
I.12.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) .....	15
II.1 Généralité sur le citron ( <i>Citrus limon</i> ) .....	16
II.2 Description Géographique .....	16
II.2.1 Dans le monde.....	16
II.2.2 Dans Algérie.....	16
II.3 Position systématique.....	17
II.4 La famille des <i>Rutacées</i> .....	17
II.5 L'espèce <i>Citrus limon</i> ( <i>citron</i> ) .....	18
II.6 Description botanique .....	18
II.7 Usages des <i>citrus</i> .....	20
II.8 Composition des huiles essentielles de <i>citrus</i> .....	20
II.9 Activité biologique des huiles essentielles de citrus .....	21
II.9.1 Activité antioxydant .....	21
II.9.2 Activité antibactérien .....	21
II.9.3 Activité antifongique.....	22
III.1 Objectif du travail .....	23
III.2 Matériel végétal .....	25
III.3 Extraction des huiles essentielles.....	26
III.4 Analyses des huiles essentielles.....	28
III.4.1 Analyse physico-chimique.....	28
III.4.1.1 Le rendement .....	28
III.4.1.2 Indice de réfraction .....	28
III.4.1.3 Indice d'acide .....	29

III.4.1.4 la Densité .....	30
III.4.2 Identification de la composition chimique des huiles essentielles .....	31
III.4.2.1 Identification de la composition chimique des huiles essentielles par GC/MS .....	31
III.5 Activités biologique.....	32
III.5.1 Activité antioxydant.....	32
III.5.1.1 Méthode de <i>DPPH</i> .....	32
III.5.1.2 Méthode de FRAP .....	35
III.5.1.3 Méthode de TAC (104).....	37
III.5.2 Activité antibactérienne .....	39
III.5.2.1 Souches bactériennes .....	40
III.5.2.2 Mode Opérateur .....	40
III.5.2.3 Détermination de CMI.....	44
IV.1 Description les huiles essentielles obtenues .....	45
IV.2 Analyses des huiles essentielles .....	45
IV.2.1 Analyse physico-chimique .....	45
IV.2.1.1 Le rendement .....	45
IV.2.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	46
IV.3 Activités biologique.....	49
IV.3.1 Activité antioxydante.....	49
IV.3.1.1 Méthode de <i>DPPH</i> .....	49
IV.3.1.2 Méthode de FRAP .....	50
IV.3.1.3 Méthode de TAC .....	51
IV.3.2 Activité antibactérienne .....	51
Références.....	60

# **Introduction générale**

Les plantes médicinales gagnent en importance de nos jours car il peut être utilisé comme médicament pour le traitement de différents troubles de santé chez tous les individus et communautés [1].

Les huiles essentielles sont naturelles, liquides volatiles, complexes composés caractérisés par une forte odeur, rarement colorée, soluble dans les lipides et les solvants organiques. Il pourrait être synthétisé par tous les organes de la plante, c'est-à-dire les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les rameaux, graines, fruits, racines, bois ou écorce [2].

Dans l'ensemble, les fruits citronnés, riches en flavonoïdes, sont une partie très importante d'un équilibre alimentation, notamment pour leur rôle dans la prévention des maladies [3], tels que l'obésité, le diabète, hypolipédémiant, maladies cardiovasculaires et certains types du cancer [4].

Citron « *Citrus limon* (L.) » contient de nombreux composants chimiques naturels importants, notamment l'acide citrique, l'acide ascorbique, des minéraux et des flavonoïdes. Bien que ses propriétés liées à la santé aient toujours été associées à sa teneur en vitamine C, il a récemment été démontré que les flavonoïdes jouent également un rôle à cet égard. Certains auteurs suggèrent que les flavonoïdes ont différentes fonctions biologiques, notamment antioxydants, anti-inflammatoires, antiallergiques, antivirales, antiprolifératives, antimutagènes, et des activités anticancéreuses [5][6].

L'objectif principal de notre étude était d'obtenir plus informations sur l'huile essentielle de *citrus limon* de la région de Mansoura, wilaya de Ghardaïa. Nous avons étudié les huiles essentielles de deux organes de citrus limon sont les feuilles et zeste et comparé la composition chimique et leur activités biologiques et antioxydants des deux huiles de zeste et huiles de feuilles.

Ce travail se compose de deux parties, théorique et pratique :

Dans la partie théorique nous avons commencé avec une généralité sur les huiles essentielles.

Deuxièmement, on a parlé des présentations de la systématique botanique de la plante étudiée.

Dans la partie expérimentale on a extrait les huiles essentielles de *Citrus limon* ensuite on a établi les analyses physico-chimiques, identification des composés par GC/MS, Activités biologiques (activité anti bactérienne et activité antioxydant).

Enfin, les résultats sont présentés et discutés.

**Partie I**  
**Partie théorique**

# **Chapitre I**

## **Les huiles essentielles**

**I.1 Histoire et origine des huiles essentielles**

La fabrication et l'utilisation des huiles essentielles est vieille de plusieurs milliers d'années, elle date de l'an 3000 avant J.C[7].

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et avec l'ère de la civilisation arabe, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale [8].

En effet, la technique de distillation a été reprise par les musulmans qui l'adaptèrent à des fins médicales. Ibn Sina dit Avicenne, le « troisième maître », fait un large usage des huiles essentielles au cours des X<sup>ème</sup> et XI<sup>ème</sup> siècles, et il contribue à répandre cette thérapeutique grâce à l'un de ses plus fameux ouvrages, le Canon de médecine [9] . Il a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les techniques d'obtention des HE et l'analyse de leur composition chimique ont beaucoup évolué avec les avancées scientifiques. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie. Les résultats de ses nombreux travaux seront à l'origine de nombreuses autres recherches [8].

**I.2 Définition**

Les huiles essentielles sont des substances visqueuses, volatiles, d'odeurs et de saveurs généralement fortes. Elles sont extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques. Leur composition généralement assez complexe renferme des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [10].

La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » [11].

Pour augmenter le rendement de leur production, de nouvelles techniques ont été développées comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression [12] ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes [13].

### I.3 Localisation

Les huiles essentielles sont synthétisées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein de certaines structures spécialisées où elles se rassemblent sous forme de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles [14].

Ces structures spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, peuvent être des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae*), des poils sécréteurs

(*laminaceaes*), des poches sécrétrices (*Myrtaceaes*, *Rutaceaes*, *Laminaceaes*) et des canaux sécréteurs qui existent dans de nombreuses familles. Il est intéressant de citer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon leur localisation dans la plante [15].

### I.4 L'aromathérapie

Du grec aroma, « odeur » et thérapie, « soins », l'aromathérapie (terme utilisé la première fois par René-Maurice Gattefossé en 1928[16]) renvoie à l'utilisation des huiles essentielles, essences et hydrolats obtenus à partir des plantes aromatiques pour un usage médical afin de soigner ou prévenir certaines pathologies.

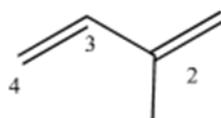
L'aromathérapie associe donc les actes de se soigner et de se faire plaisir grâce aux propriétés thérapeutiques et odorantes des huiles essentielles et des hydrolats [17].

### I.5 Composition chimique

La composition chimique des essences est complexe. Elle varie selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturelles et le mode d'extraction [18]. Chaque huile essentielle est un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés : terpéniques, aromatiques et variés.

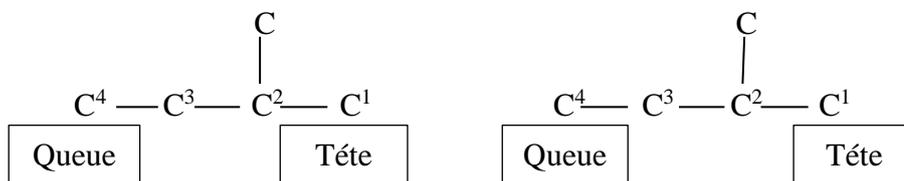
#### I. 5.1 Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. Ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute  $(C_5H_8)_n$ .



Isoprène (2méthylbuta-1,3-diène)

Selon le nombre d'unités associées, on distingue : les mono- en (C<sub>10</sub>) ; les sesqui- en (C<sub>15</sub>) ; les di- en (C<sub>20</sub>) ; les tri- en (C<sub>30</sub>) ; les tétraterpènes en (C<sub>40</sub>) et les polyterpènes.



Ces unités peuvent se lier entre elles par des liaisons dites irrégulières de type artémésyl, santolinyl, lavandulyl et chrysanthémyle [19].

Les huiles essentielles contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu souvent de diterpènes [20].

Les terpènes sont de structures très diverses (acycliques, monocycliques, bicycliques ...) et contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques. A titre indicatif, quelques structures de monoterpènes et de sesquiterpènes sont représentées sur la figure I.1.

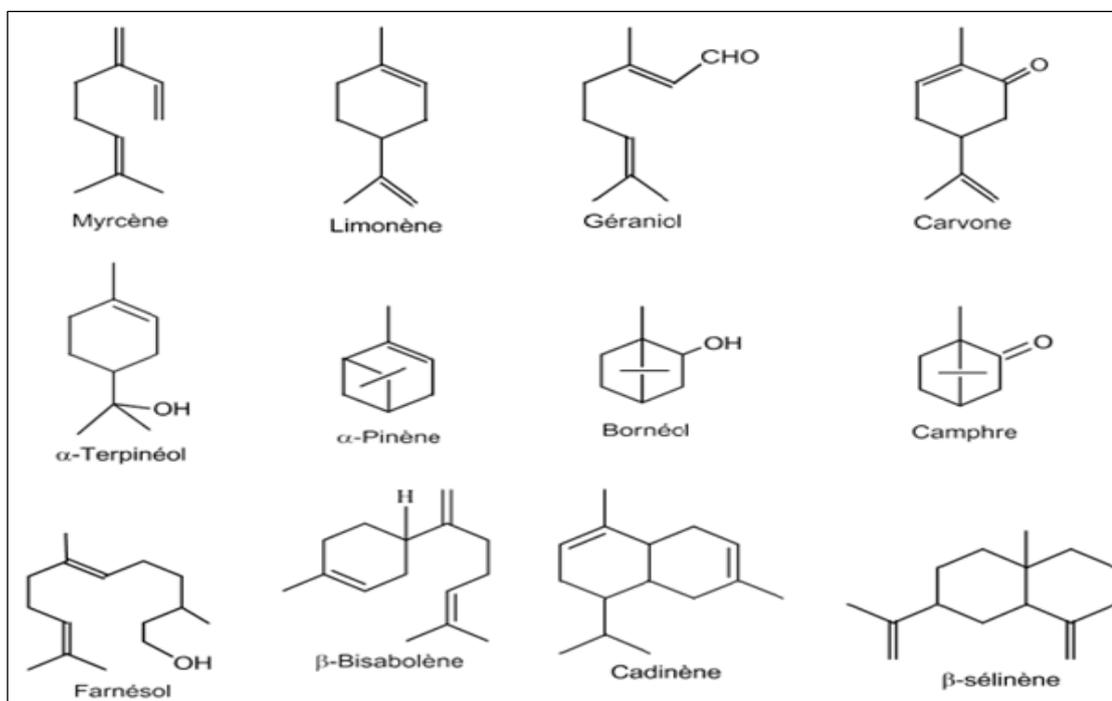


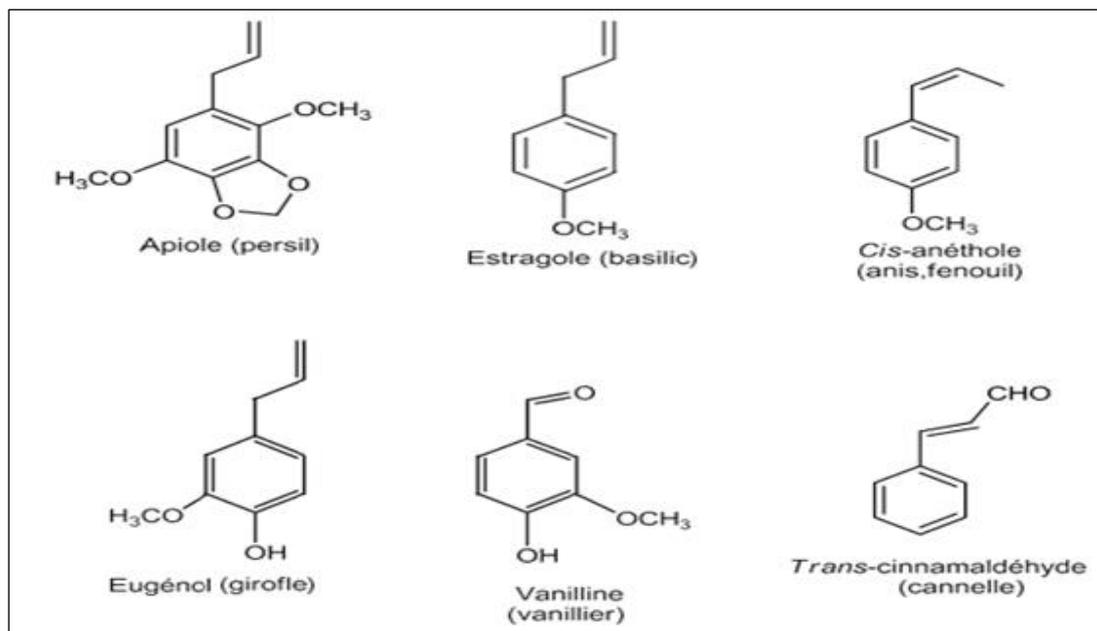
Figure I.1 : Exemples de structures de mono- et sesquiterpènes

### I.5.2 Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline,

l'eugénol, l'anéthol, l'estragol ... (**Figure I.2**). Ils sont fréquemment rencontrés dans les huiles essentielles d'*Apiacées* (anis, fenouil, persil, etc...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic, du clou de girofle, ... [21] [22]. Ils se distinguent entre eux par :

- Le nombre et la position des groupements hydroxyle et méthoxy .
- La position de la double liaison de la chaîne latérale, allylique ou propénylique.
- Le degré d'oxydation de la chaîne aliphatique (alcool, aldéhyde, cétone ou acide).



**Figure I.2 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane**

### I.5.3 Composés d'origine variée

Certains composés aliphatiques de faible poids moléculaire sont entraînés lors de l'hydrodistillation des HE à savoir les carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters [23].

### I.6 Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène [24]. Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées [25].
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.

- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau [23].

- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux.

### **I.7 Les vertus des huiles essentielles**

Les huiles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums [26] :

- Vertus antiseptiques pour les poumons (Eucalyptus) [27].
- Vertus dépuratives ou cicatrisantes (Lavande) [27].
- Vertus analgésique (Origan, Thym) [28].
- Vertus antibactérienne et antifongique [28].

### **I.8 Domaines d'utilisation des huiles essentielles**

#### **I.8.1 Dans les industries agro-alimentation :**

Les huiles essentielles sont utilisées comme condiments, aromates ou épices. C'est le cas des essences de gingembre, de girofle, de vanille, de basilic, de poivre, de citrus. Les HE extraites de citrus, par exemple, trouvent leur utilisation dans la confiserie, les sirops, les biscuiteries. On note leur intégration aussi dans les boissons, les produits laitiers, les soupes, les sauces, les snacks, les boulangeries ainsi que dans la nutrition animale [23].

#### **I.8.2 La médecine et l'industrie pharmaceutique :**

- Les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles leur confèrent un pouvoir antiseptique contre les bactéries, champignons et levures, en plus des propriétés bactériostatiques, bactéricides, vermicide, fongicides, antiseptiques et insecticides comme les HE de thym, girofle, lavande et eucalyptus.

- Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym est 20 fois plus antiseptique que le phénol [23] [29].

- L'huile essentielle de *Melaleuca* a prouvé cliniquement son action antiseptique, antimicrobienne et antioxydante.

- Des propriétés spasmolytiques et sédatives : Certaines drogues à HE (menthe, verveine) sont réputées efficaces pour diminuer les spasmes gastro-intestinaux.



Figure I.3 : Des médicaments à base d'HE [30]

### I.8.3 L'industrie de la parfumerie et de la cosmétique

Utilisant fréquemment les huiles essentielles, la cosmétique est le secteur des produits hygiéniques naturels et synthétiques pour les consommateurs. Les HE sont intégrées dans des analgésiques pour la peau et les produits solaires [31]. On les retrouve aussi dans les préparations pour bains. Incorporer aux huiles de massage, leur teneur ne doit pas dépasser 3 à 4%. Le menthol par exemple, trouve une utilisation variée dans les produits tels que les dentifrices, mousses nettoyantes, aliments, cigarettes et des préparations pharmaceutiques orales. L'huile de menthe poivrée est la troisième saveur mondiale, derrière les saveurs vanille et citron [30] [24].



Figure I.4 : Utilisation d'HE dans la cosmétique

### I.8.4 Dans diverses industries :

Ce sont surtout les industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des HE) comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux de vitamines, de substances odorantes, etc.... [32].

**I.9 Conservation**

Des précautions particulières sont recommandées lors de la conservation des HE du fait que les molécules les constituant sont très sensibles à la chaleur, à l'air ainsi qu'à la lumière, La dégradation de ces molécules entraîne de nombreuses conséquences telle-que la photo isomérisation, l'hydrolyse, la coupure oxydative, la peroxydation, la décomposition en cétones et alcool... Ces conséquences peuvent altérer et /ou mettre en cause l'innocuité de l'HE [33].

- L'utilisation de flacons en verre coloré et foncé (brun ou ambré), en aluminium ou en acier inoxydable, de faible volume évite la détérioration de l'HE par l'oxygène et la lumière.

- Le flacon doit être doté d'un bouchon vissé et bien scellé pour éviter l'évaporation.

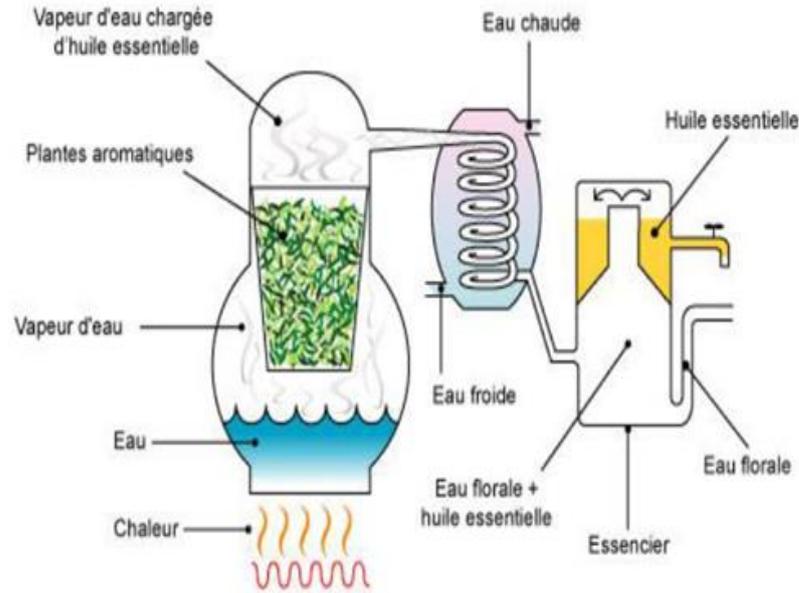
- L'ajout de petites billes en verre à la surface de l'HE réduit l'action oxydante de l'air.

- L'entreposage doit se faire dans un endroit sec (à l'abri de toute trace d'humidité), frais (loin des sources de chaleur), dépourvu de la lumière même artificielle et à l'abri du froid.

- La durée de conservation d'une HE, si on respecte les bonnes conditions de stockage, est environ de trois ans. Les essences d'agrumes font exception, ils ne peuvent se conserver que pendant six mois [34].

**I.10 Les procédés d'extraction des huiles essentielles****I.10.1 Entraînement à la vapeur d'eau**

Ce procédé consiste à récupérer l'HE des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau. Ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation [35].



**Figure I.5 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur d'eau**

### **I.10.2 Extraction par solvant organique [36]**

La technique d'extraction par solvant organique consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

Les solvants les plus utilisés sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la lumière, la chaleur ou l'oxygène ; sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet.

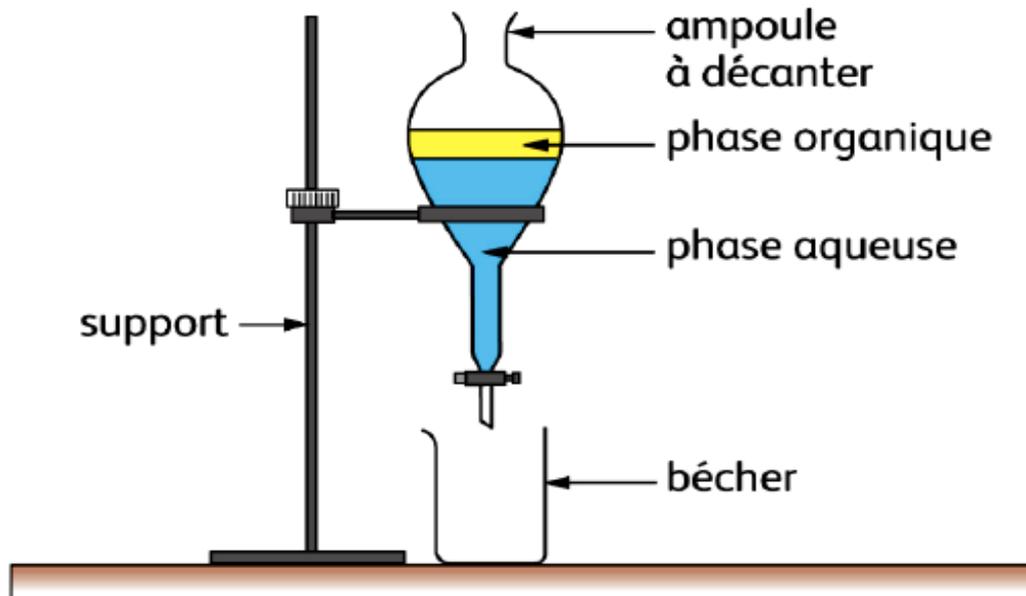


Figure I.6 : Schéma Extraction par solvant organique

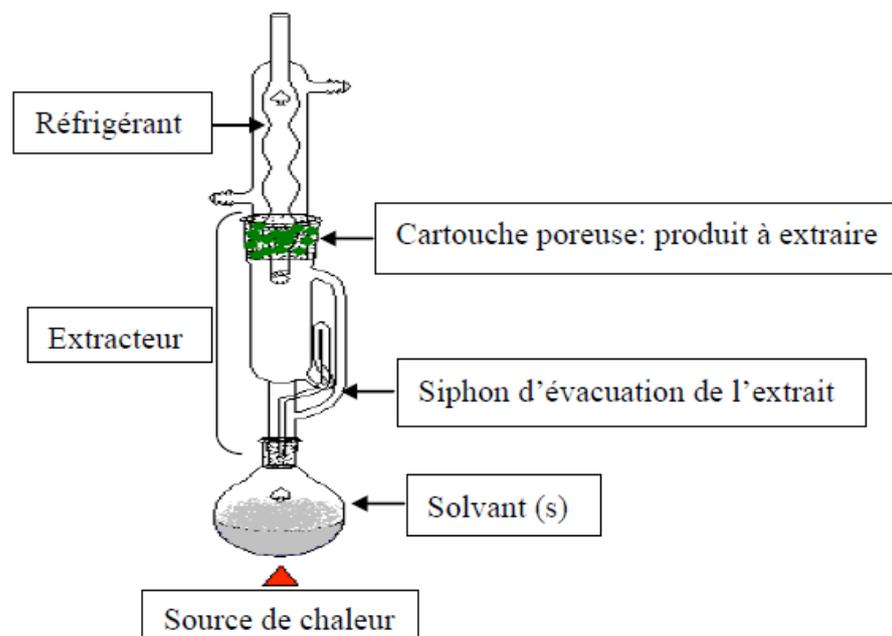


Figure I.7 : Schéma d'un appareil de Soxhlet

### I.10.3 Extraction au gaz $CO_2$ supercritique

Cette technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant[36].

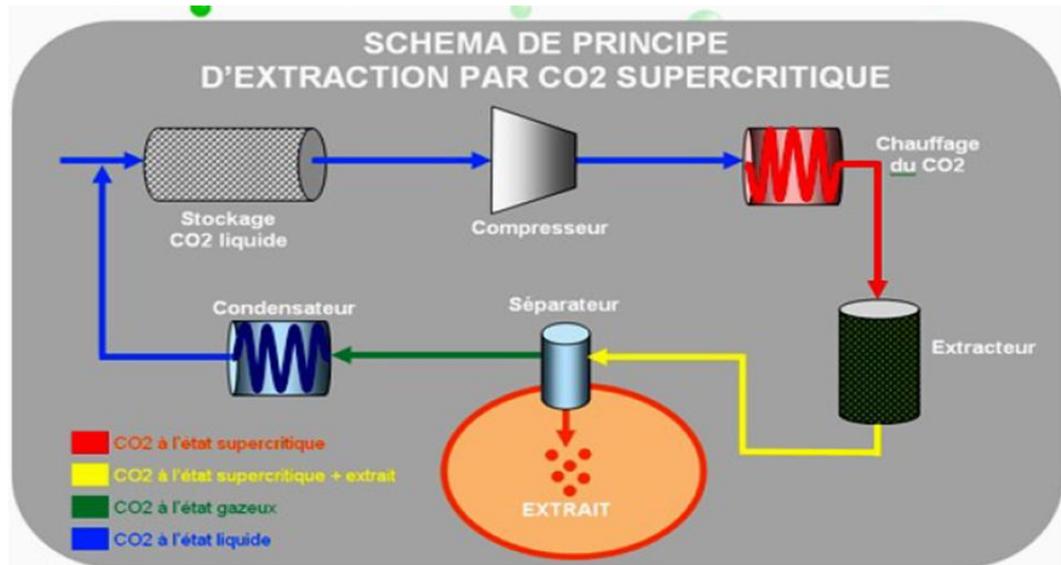


Figure I.8 : L'extraction au  $CO_2$  supercritique

#### I.10.4 La distillation sèche

Dans cette technique, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique et à 100 °C, température d'ébullition d'eau.

Son avantage est que les altérations des huiles essentielles sont minimisées [36].

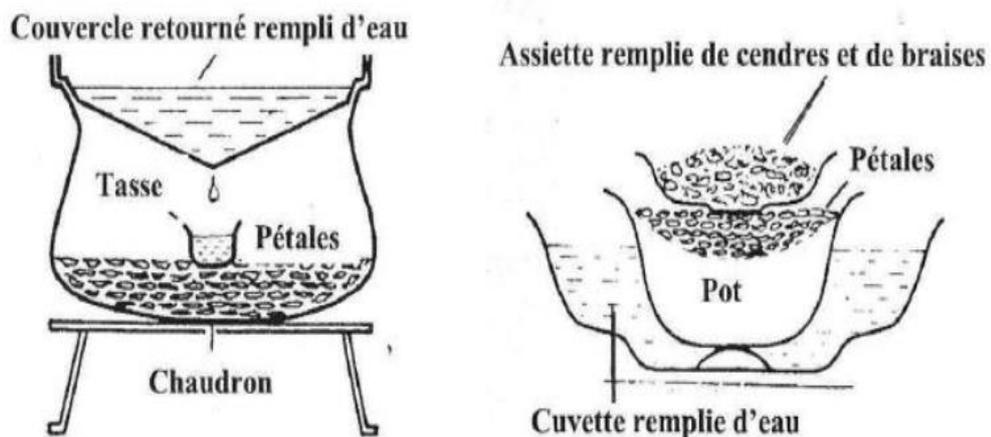


Figure I.9 : Schéma d'une installation de distillation sèche

#### I.10.5 L'expression à froid

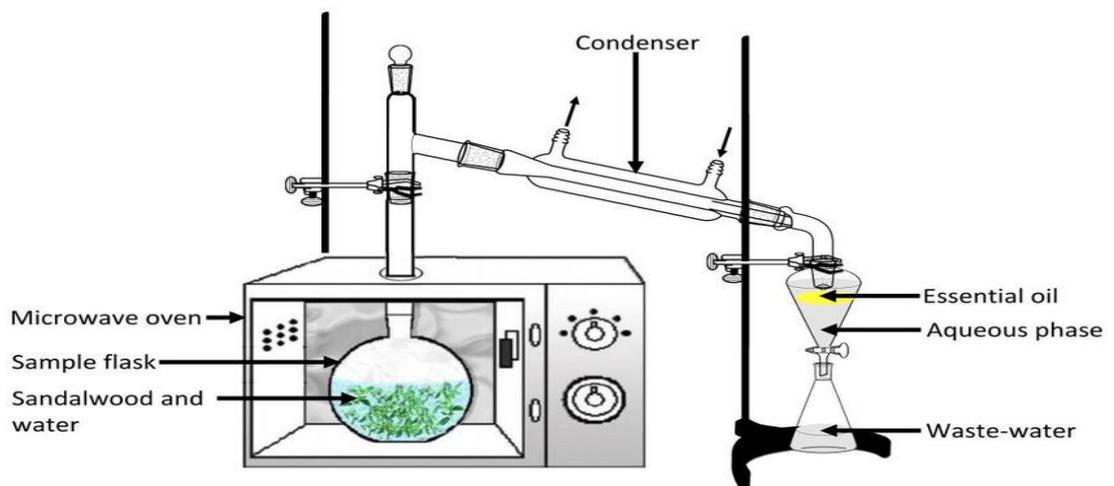
L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme l'orange, le citron, la mandarine, etc. Son principe consiste à briser mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par centrifugation ou décantation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent immédiatement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau[35].



**Figure I.10 : Dispositif de l'extraction par expression à froid**

### I.10.6 L'extraction sans solvant assistée par micro-onde

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajout de solvant organique ou d'eau. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la séparation des glandes renfermant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'huile essentielle et d'eau, par la suite facilement séparable par simple décantation [37].



**Figure I.11 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes**

### I.10.7 Hydrodistillation

L'extraction des HE par hydrodistillation est réalisée à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Il comprend un ballon de capacité de deux litres contenant de l'eau bouillonnante en contact direct avec la matière végétale. Ce ballon est connecté à un réfrigérant qui sert à

condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite. Le distillat est récupéré dans un ballon ou erlenmeyer [38].

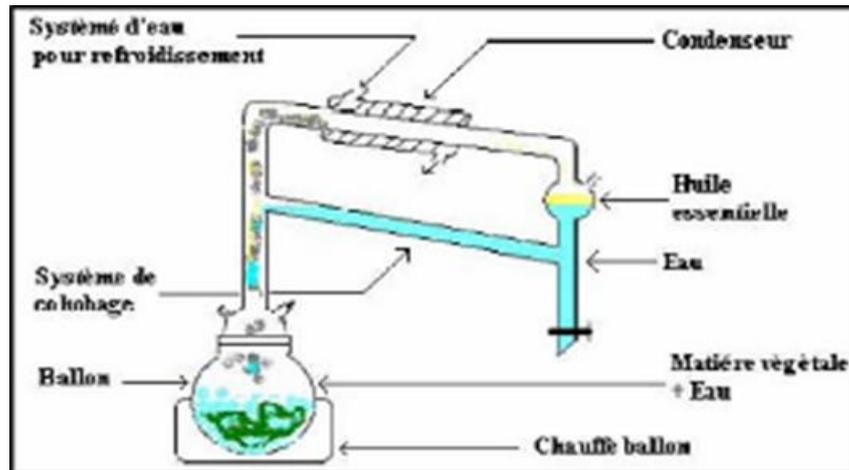


Figure I.12 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huiles essentielles

**I.10.8 Extraction par les ultrasons :**

Lorsque les ultrasons se répandent, les oscillations liquides des molécules provoquent la formation de zones raréfaction, où les cycles de raréfaction augmentent, le liquide de cohésion des forces articulaires est vaincu et les bulles se cassent. Ces bulles se formeront à la surface de la plante, provoquant la rupture des membranes cellulaires et la libération du contenu [39]. Étant donné que les glandes contenant des HE sont généralement situées à la surface des plantes aromatiques, l'extraction détruit les glandes qui libèrent de l'huile dans le milieu environnant [40].

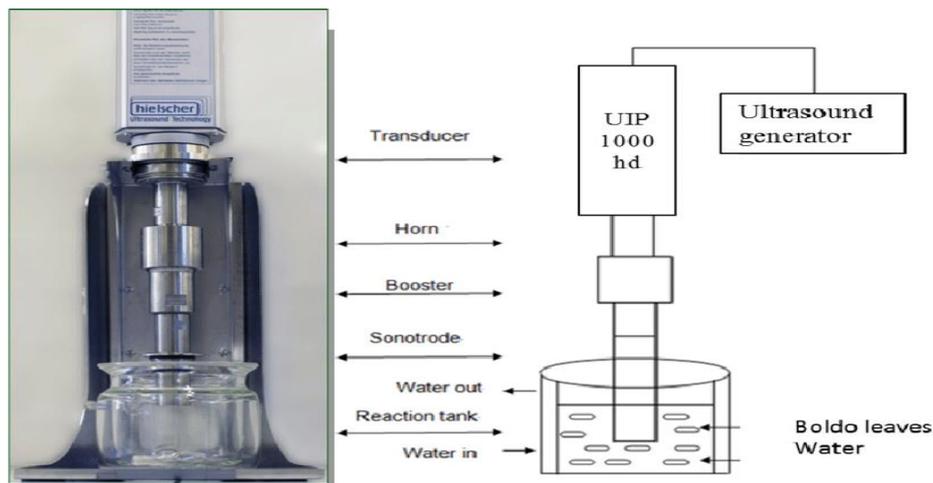


Figure I.13 : Extraction par les ultrasons

**I.10.9 Extraction par enfleurage**

L'enfleurage est une technique originaire de l'Égypte ancienne. Il consiste en le dépôt de plantes, en particulier les organes délicats (fleurs d'oranger, plantes à fleurs) de la couche de

graisse animale qui devient à essence entiers. Le corps gras est ensuite imbibé d'alcool qui restaure l'odeur puis s'évapore [41] [42].

Cette technique difficile, qui demande une grande activité, est de moins en moins utilisée au profit de l'extraction liquide, du fait de son faible rendement et du volume élevé de main-d'oeuvre nécessaire [42].

### **I.11 Activités biologiques [35]**

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités fongicide, insecticide, herbicide, bactéricide, etc.

Les huiles essentielles sont connues pour être dotées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses.

L'activité biologique d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ces composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires.

#### **I.11.1 Activité antioxydante**

L'activité antioxydante des huiles essentielles est attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques tels que le linalool, le 1,8-cinéol, le géraniol, le néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes comme l' $\alpha$ -terpinène et le  $\beta$ -terpinène [43].

#### **I.11.2 Activité antibactérienne**

Les HE fonctionnent à la fois avec les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives. Cependant, les bactéries Gram-négatives semblent être sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire [44]. Les propriétés des huiles essentielles sont attribuées aux terpénoïdes et aux phénylpropanoïdes. L'activité des molécules bioactive dépend du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du type hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les composés oxygénés sont généralement plus actifs que les composés hydrocarbonés [45]. Les huiles de ces plantes ont des caractéristiques générales, elles sont riches en composés phénoliques, tels que : l'eugénol, le thymol et le carvacrol, à activité antibactérienne [46].

#### **I.11.3 Activité antifongique**

Les champignons, organismes saprophytes et omniprésents, se répartissent généralement

en deux catégories : les levures et les petits champignons. Les infections fongiques chez l'homme sont appelées infections à levure. Ceux-ci peuvent être de plusieurs types : peau, cheveux, ongles, sous-cutanée ou systémique [47] [48].

Certaines huiles essentielles modifient la circulation cellulaire en incorporant des chaînes de graisse acétyle contenant des bicouches lipidiques et en empêchant la synthèse de l'ergostérol, qui à son tour perturbe les muqueuses. Le plasma entraîne des changements et des défauts dans l'adhérence des membranes cellulaires fongiques, réduisant ainsi leur dispersion et leur transmission [49].

### **1.12 Les méthodes d'analyse des huiles essentielles**

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différentes méthodes. Parmi celles-ci la chromatographie qui est fréquemment utilisée pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différentes affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [50].

#### **I.12.1 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM après séparation chromatographique est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique [51]. Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse, au niveau duquel ils vont être fragmentés en ions de masse variable dont la séparation sera en fonction de leur masse [52] [53] L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [54].

# **Chapitre II**

## **Etude botanique**

## II.1 Généralité sur le citron (Citrus limon)

On sait peu de choses sur l'origine des citrons. Certains prétendent que ce fruit est né d'un croisement entre le pamplemousse, le cédrat et la lime (citron vert). Le citron est le fruit du citronnier. Parmi les raisons pour lesquelles les citrons ont acquis une importance économique à l'échelle internationale figurent ses bienfaits pour la santé, qui sont attribués à la présence de composés bioactifs tels que les composés phénoliques [55], la vitamine C [56] et les caroténoïdes [57].

Bien que le fruit soit une source de composés aromatiques [58] [59], plusieurs auteurs ont rapporté des propriétés antioxydantes attribuées aux huiles essentielles extraites de sa peau [60].

## II.2 Description Géographique

### II.2.1 Dans le monde

La diffusion des *agrumes* à travers le monde s'est faite très lentement et bien que l'aire moderne de culture des agrumes soit très vaste, mais leur production provient principalement des régions méditerranéennes et tropicales, dernièrement les agrumes implantés dans toutes les zones du monde où leur production est possible (Figure II.1). La localisation précise des pays producteurs forme une ceinture terrestre entre le 40ème parallèle nord et sud [61].

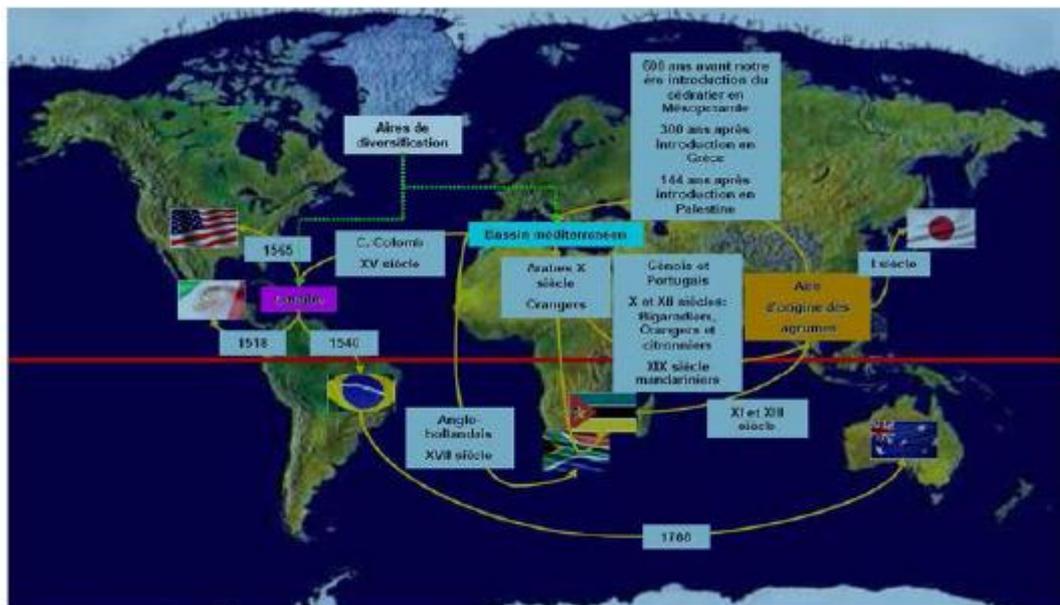


Figure II.1 : Origine et dispersion des agrumes à travers le monde [62]

### II.2.2 Dans Algérie

En Algérie, *l'agrumiculture* représente un segment stratégique. Selon les dernières

données [63].

En 2006, l'Algérie a acquis une collection de 277 variétés d'agrumes. Ces espèces sont localisées dans les périmètres irrigués de la partie Nord du pays et où elle trouve la température clémente, et la qualité requise de l'eau et du sol se retrouve précisément dans la plaine de la Mitidja, zone de potentiel agrumicole en augmentation. Superficie de 36 219 hectares [61].

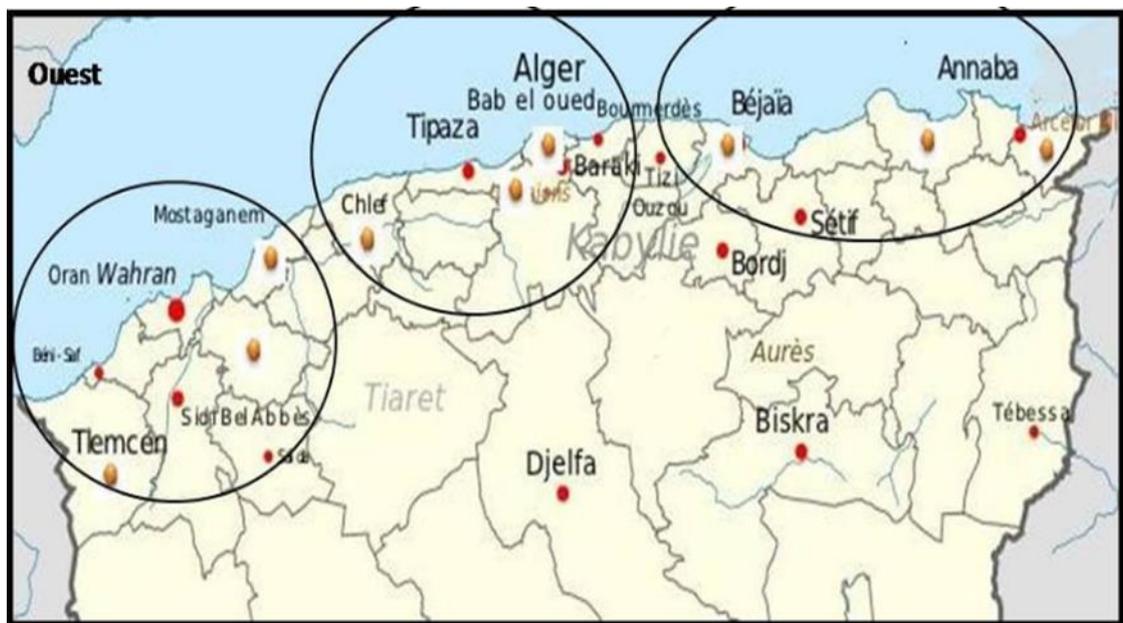


Figure II.2 : la répartition des zones productives des citrus en Algérie.

### II.3 Position systématique

Selon [64], la Position systématique de citron est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Eudicotylédones

Ordre : Sapindales

Famille : Rutacées

Genre : Citrus

Espèce : Citrus limon

### II.4 La famille des *Rutacées*

Les *Rutacées* ou bien (Les *Rutaceae*) une famille des plantes d'origine de la Chine, Inde et Indonésie. Cette famille comprend environ 160 genres et 1900 espèces de plantes. Les agrumes appartiennent à cette famille ce sont des angiospermes dicotylédones appartenant à

l'ordre des *Sapindales* sous-famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae*, sous-tribu des *Citrinae*. Le nom (Agrume) est donné aux arbres appartenant à la famille des Rutacées en plus précise au genre botanique *Citrus.*, donc cette appellation d'origine italienne, désigne les fruits comestibles et par extension les arbres qui les portent. A cette catégorie d'arbre appartiennent les citronniers, les pamplemousses, les orangers, les mandariniers et les cédratiers [61] [65].

### II.5 L'espèce *Citrus limon* (citron)

L'espèce *Citrus limon*, son nom commun est citron. Cette dernière appartient à la famille des agrumes et des rutacées, mais est désigné par divers noms communs tels que Limone en italien, Lemon en anglais, zitrone en allemand, et Lymon et Limon en arabe [66].

### II.6 Description botanique

*Citrus limon* est parmi les plus importantes espèces d'agrumes après le *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*, originaire du sud-est asiatique et d'inde. Le citronnier fut introduit en Méditerranée par les Arabes. C'est à l'époque des croisades que l'Europe découvre le « Citrus ». Il est cultivé depuis le XIVe siècle en Sicile, qui est actuellement le plus gros producteur de citron. La Corse produit des citrons d'excellente qualité et de très belle grosseur [67]. Sa culture s'étend aujourd'hui sur le littoral de la Méditerranée et aux régions du globe à climat semi-tropical du monde entier [68] [69].

Le citronnier est désigné sous le nom de *Citrus limon* (L.) Burm. Il peut être cité sous le synonyme de *Citrus limonum* Risso [66] [70] ; c'est un arbrisseau méditerranéen vigoureux aux branches robustes et épineuses atteignant 2 à 4 m de hauteur [70] [71].



Figure II.3 : Citrus

Les feuilles du citronnier sont permanentes, feuilles vertes alternées, vert foncé et luisantes, plus pâles sur leur revers, une forme en fusiformes odorantes, longues de 6 à 11 cm, à pétioles parfois ailés. Les feuilles sont très parfumées car en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent visibles à l'œil nu [72].



Figure II.4 : Feuilles de citronnier

Les fruits sont juteux, acides, très parfumés et formes ovales, avec des mamelons plus ou moins évidents aux extrémités. L'écorce mince (écorce) est d'épaisseur variable et devient jaune ou verte à mesure que le fruit mûrit. Elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe est généralement riche en acide citrique et juteuse avec quelques pépins, ce qu'il lui donne sa saveur acide [73].

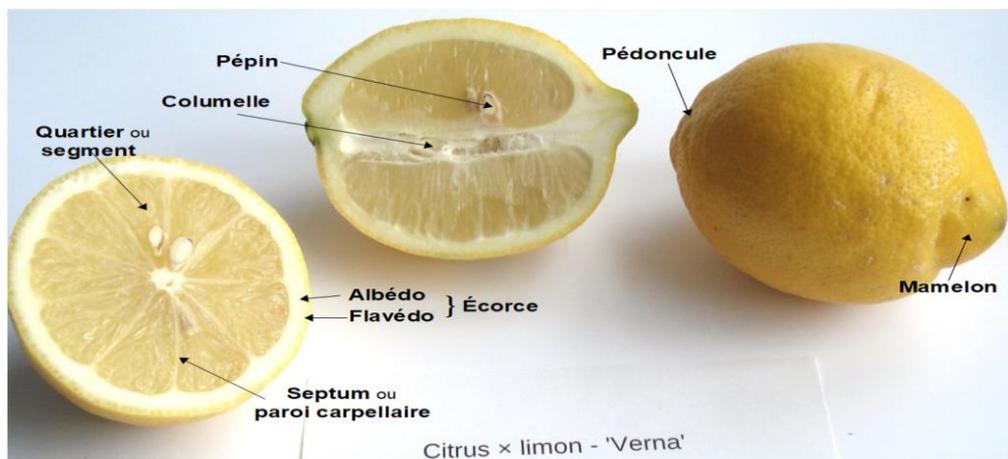


Figure II.5 : Fruits de citronnier

### II.7 Usages des *citrus*

Les espèces de genre *Citrus* limon ont été utilisées en médecine traditionnelle en raison de leurs propriétés biologiques comme sédatifs, analgésiques, agents anti-arythmiques, stomacaux, anti-inflammatoires et anti-rhumatismaux. Les huiles essentielles de citron citron sont utilisées dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments et auraient des propriétés antibactériennes, antioxydantes, antifongiques, antidépressives et anticancéreuses [74].

Les huiles essentielles d'agrumes sont utilisées dans la préparation de parfums, de déodorants et de savons. Les huiles essentielles de citron sont couramment utilisées pour leurs propriétés blanchissantes et purifiantes et sont des conservateurs à large spectre. Il possède également des propriétés anti-rides, d'entretien et de soin de la peau, ainsi qu'une activité lipolytique qui peut être utilisée pour soigner les peaux grasses ou à tendance acnéique [75].

### II.8 Composition des huiles essentielles de *citrus*

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90 % d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est essentiellement à l'acide citrique, accompagné de faibles quantités d'acides malique, ascorbique, caféique et férulique [76]. Le fruit du a une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables des flavonoïdes, des polyphénols, des caroténoïdes, et les huiles essentielles [77]. Il est riche en sels minéraux, Potassium, en acides organiques, en sélénium, en fibres, et il renferme du calcium à un taux relativement élevé 25mg/ 100g) [76].

Le Tableau II.1 présente les principaux composés majoritaires des huiles essentielles continues dans le citron selon différents pays.

**Tableau II.1: Composition des huiles essentielles de citrus selon la situation géographique**

Pays	Compositions majoritaires	Référence
Brazil	Limonène (25.95 %) Geranial (24.80 %) Neral (20.48 %)	Richardson (2000)
Algérie : • Constantine	Limonène (51.40 %) $\beta$ -Pinene (17.04 %) $\gamma$ -Terpinene (13.46 %)	D'après Dejnane (2015)
• Telemcen	Limonène (65.7 %) Myrcène (10.8 %) Geranial (6.3 %)	Hamdani Sarra (2018)
France	Limonène (39 %) Geranial (20.4 %) Neral (15.6 %)	Flamini et al. (2019)
China	Decanoic anhydride (12.631 %) 4-Cyanocinnoline (8.55 %) Limonène (4.24%)	Huang Chun Yun, Jiang Su et al. (2010)
Japan	Limonène (59.8%) $\beta$ -Pinene (15.3%) $\gamma$ -Terpinene (8.4%)	Shinjiro Ogita, Tomoyuk, Yoshino et al. (2021)
Corsica	Limonène (29.49%) Geranial (18%) Neral (13.77%)	Marsh (2000)

## II.9 Activité biologique des huiles essentielles de citrus

### II.9.1 Activité antioxydant

Etude de Himed L en 2011 : est montré que les HE de *Citrus limon* ont un pouvoir antioxydant très grand [78].

Etude Kehal F en 2013 : a montré que l'HE de *Citrus limon* a une plus grande capacité à éliminer les radicaux DPPH [79].

### II.9.2 Activité antibactérien

Etude de Atrous F et Manzrze Y en 2015 : le résultat de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de feuilles de *Citrus limon* sur deux types de bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) a montré une activité bactérienne plus importante contre les bactéries à

Gram positif que celle contre les bactéries à Gram négatif. En effet, cet extrait a donné une forte inhibition pour la bactérie *Staphylococcus aureus* [80].

Etude Boukabaache M et Boudjefdjouf F en 2016 : les résultats de l'huile essentielle de citron sur les souches bactériennes testées sont tels que suit. La bactérie Gram positif *Listeria monocytogenes* est la bactérie la plus sensible par rapport aux bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*) [81].

Etude de Saadoun Z et Meguenni F en 2016 : les résultats ont montré que l'huile essentielle de citrus a été très efficace pour inhiber la croissance de toutes les bactéries testées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) pour les deux méthodes qualitatives qui ont été utilisées (Aromatogramme et Micro-atmosphère) avec des valeurs CMI dans la méthode Aromatogramme ; tandis que la souche bactérienne Gram + *Bacillus cereus* est la seule qui a donné la valeur en méthode Micro-atmosphère [82].

Etude de HIMED L ép. MERNIZ en 2018 : les résultats de l'huile essentielle de citrus de eurêka et lisbon d'activité antibactérienne contre les 9 bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*) ont montré que les bactéries Gram négatives testées semblent plus sensibles que les bactéries Gram positives avec les CMI des huiles de la variété Eurêka et sont moins intéressantes que celles de la variété Lisbon [83].

### II.9.3 Activité antifongique

Etude de Saadoun Z et Meguenni F en 2016 ; les résultats ont montré que l'huile essentielle de citrus avait une forte activité antifongique contre toutes les espèces fongiques testées (*Candida albicans* ; *Aspergillus flavus* et *Sacchar*) pour les deux méthodes (Aromatogramme et Micro-atmosphère) [82].

Etude de HIMED L ép. MERNIZ en 2018 ; les résultats ont montré que l'huile essentielle de citrus de eurêka et lisbon pour les souches fongiques testées sont sensibles (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum*) [83].

# **Partie II**

## **Partie expérimentale**

# **Chapitre III**

## **Matériel et Méthodes**

**III.1 Objectif du travail**

Ce chapitre est consacré à la description des différents matériels et méthodes expérimentales utilisés dans ce travail.

Notre travail consiste initialement à collecter plante (*citron*) afin de l'extraire de l'huile essentielle. En appliquant le procédé de la méthode d'hydrodistillation afin de conserver les différents principes actifs présents dans l'huile.

Enfin étudier les propriétés physico-chimiques et les activités biologiques des huiles essentielles de citron.

La partie expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire pédagogique de GP 4 du Département de génie des procédés de la Faculté des Sciences et Technologies université de Ghardaïa, au niveau du laboratoire de pédagogique microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ghardaïa, au laboratoire d'analyses médicales ESSALAM, Ghardaïa et le laboratoire de L.G.P (Laboratoire de Génie des Procédés) de l'Université Kasdi Merbah Ouargla.

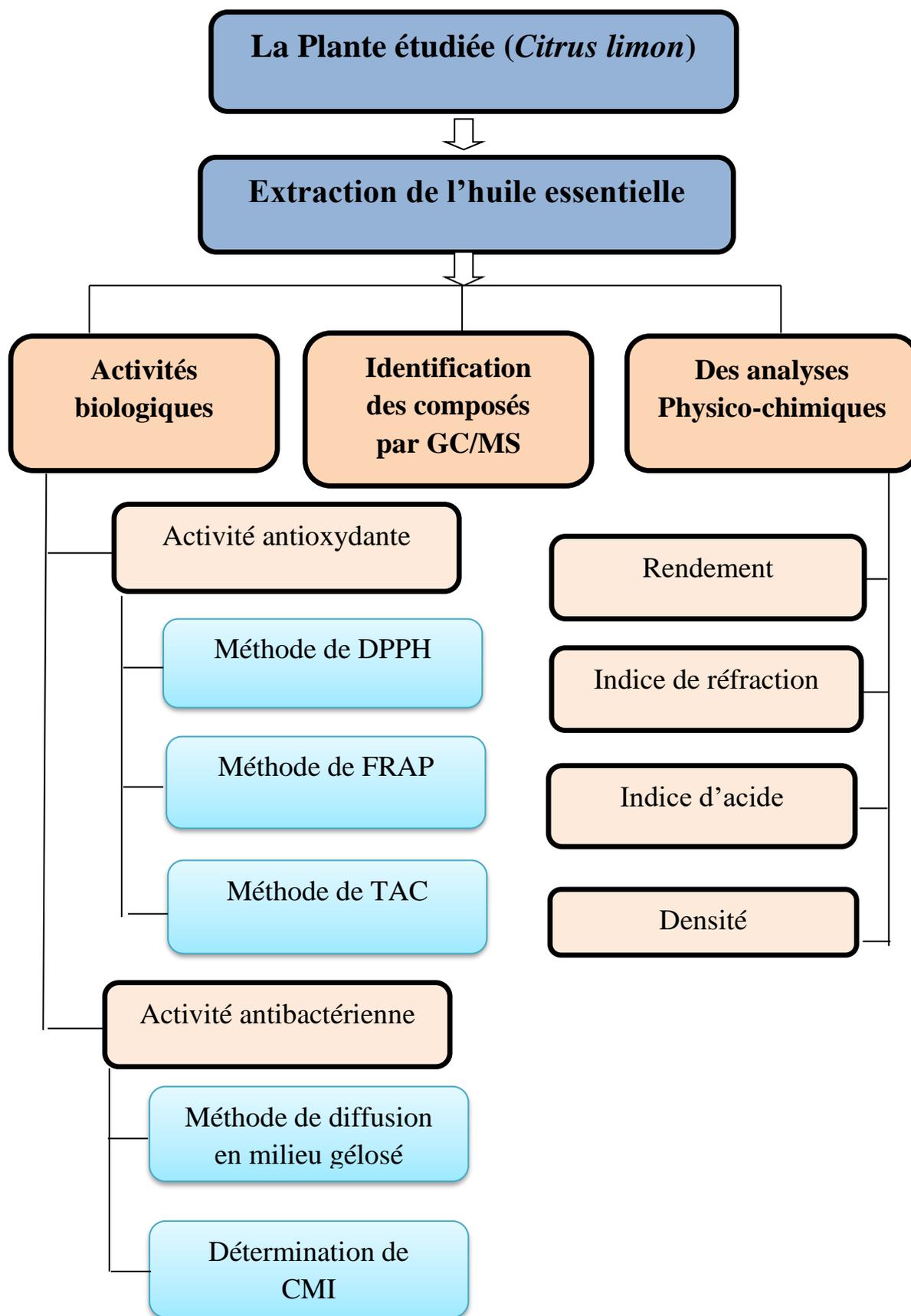


Figure III.1 : Plan générale de la partie Pratique

### III.2 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est zeste et feuilles de *citron* (*Citrus limon*), La plante a été Récoltée au de la région de Mansoura, wilaya de Ghardaïa. La récolte a été faite manuellement et au hasard sur le même arbre, la plante entière (feuilles + zestes) a été séchée pendant une semaine

L'écorce (zeste) du *Citrus limon*, connus pour être riches en huiles essentielles par rapport aux autres parties du fruit [84].



Figure III.2 : La plante de *Citrus limon*

La carte géographique suivante montre le site de récolte



Figure III.3 : Géographie de la zone de récolte de la plante [85]

### III.3 Extraction des huiles essentielles

Selon Peyron [86], les huiles essentielles des *Citrus limon* raites par distillation à la vapeur en raison de leur volatilité. Ce procédé classé parmi les principales opérations industrielles d'extraction.

L'huile essentielle de citron a été obtenue par hydrodistillation au sein du laboratoire pédagogique de GP4.

#### Mode opératoire

Une quantité de 100 g de la matière végétale a été versé dans un ballon de 2L et on ajoute l'eau d'environ 2/3 du volume du ballon, exposée à la vapeur d'eau, celle-ci va se charger en molécules volatiles dans les (feuilles + zeste) séchées, qui seront finalement condensées à l'aide d'un réfrigérateur, on obtient ainsi (après de 3 h) une solution biphasique dans une ampoule à décantation La phase organique est celle qui contient les huiles essentielles, et cette dernier va être traité avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau. Conservé à -4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à les analysés [87].

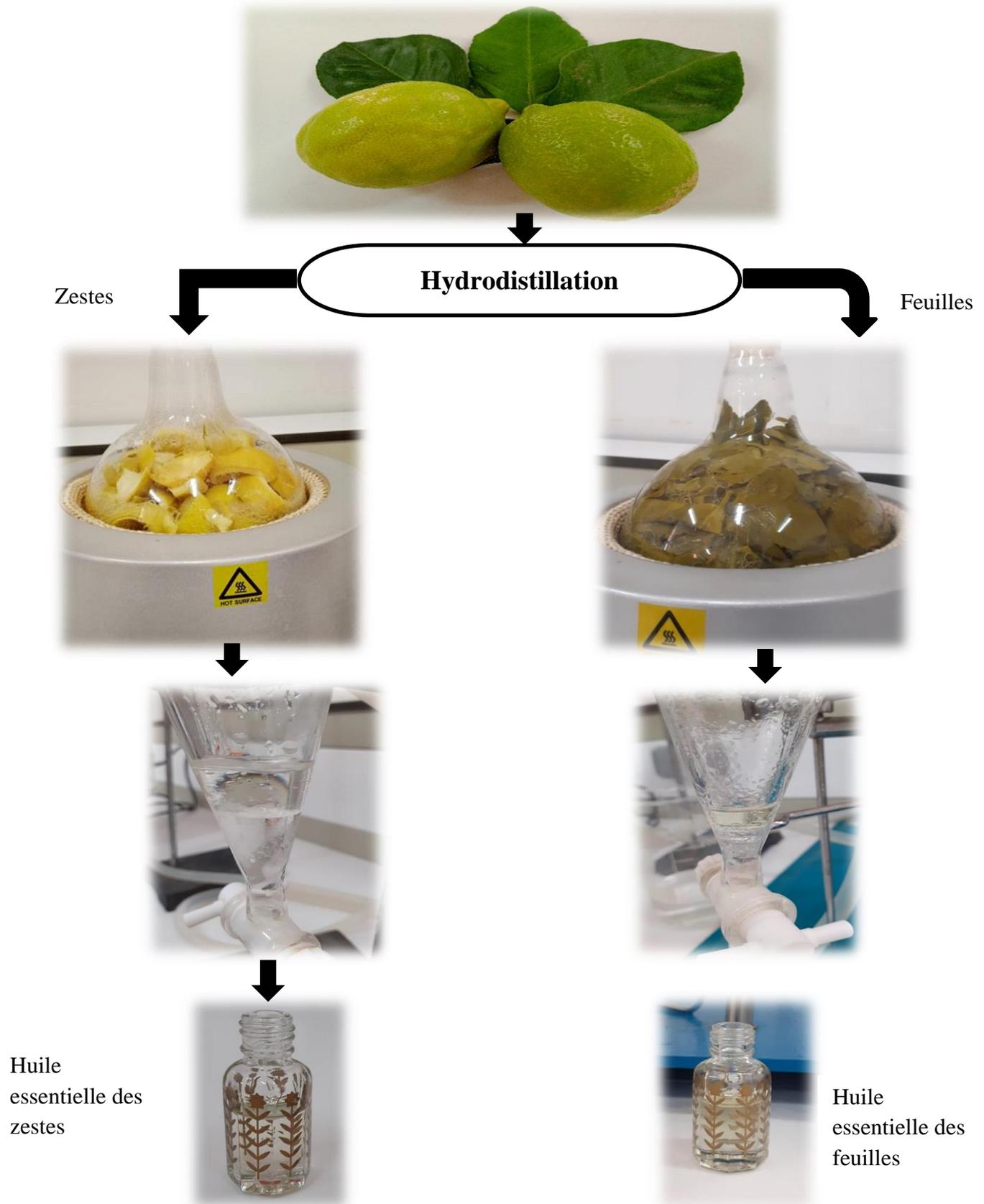


Figure III.4 : Protocole d'extraction des huiles essentielles de citron

### III.4 Analyses des huiles essentielles

#### III.4.1 Analyse physico-chimique

##### III.4.1.1 Le rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle récupérée et la masse de la matière végétale. On a l'équation suivante [88] :

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

R : rendement en %

$m_{HE}$  : la masse de l'huile essentielle récupérée en gramme

$m_V$  : la masse de la matière végétale en gramme

##### III.4.1.2 Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une HE 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'HE maintenue à une température constante [89].

À l'aide d'un réfractomètre permettant de lire directement les indices de réfraction entre 1.300 et 1.700, le dispositif est réglé pour donner, à la température de 20°C [90].

#### Mode opératoire

Ajuster le réfractomètre d'Abbe en mesurant l'index de réfraction de l'eau distillée égal à 1.3333;

- après avoir ouvert le prisme secondaire, poser 2 gouttes d'huile essentielle sur la partie centrale du prisme principal ;

- fermer en douceur le prisme secondaire et lire le résultat.

Pour calculer l'indice de réfraction on utilise la formule suivante :

$$N_{20} = N_t + 0.00045 (T - 20^\circ C)$$

$N_{20}$  : Indice à 20°C

$N_t$  : indice à la température ambiante ou de mesure

T : température ambiante ou de mesure

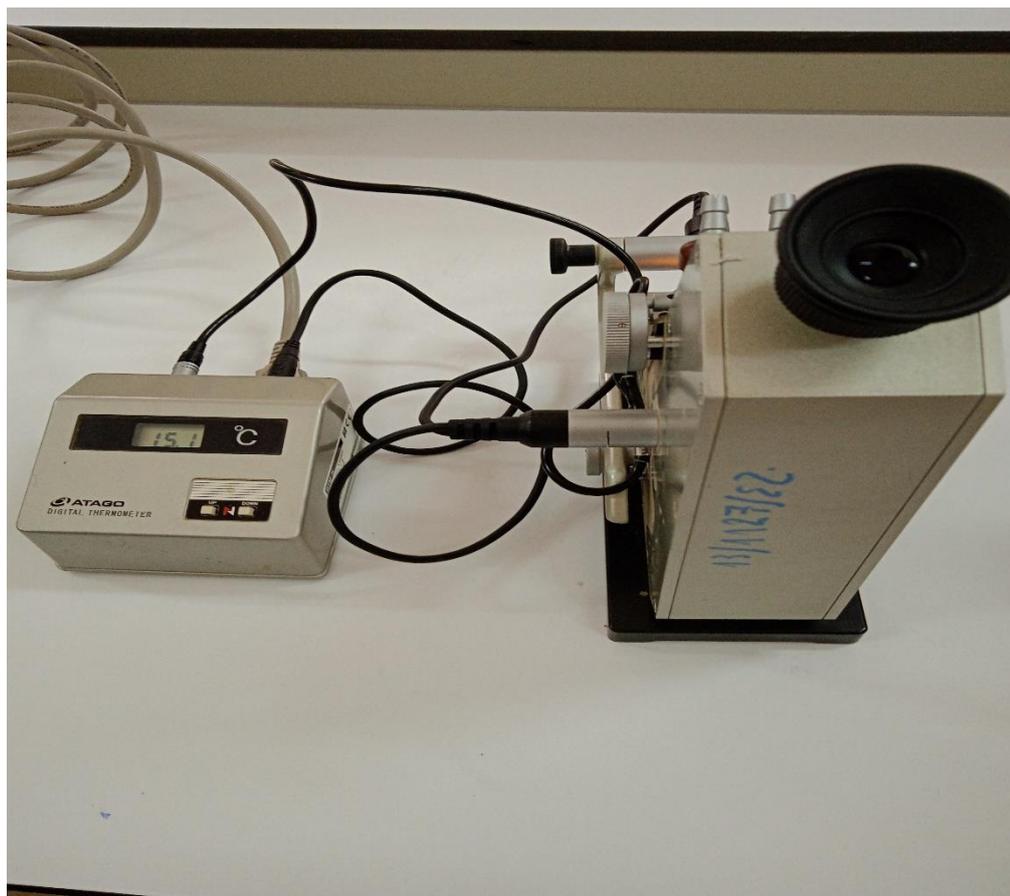


Figure III.5 : Refractomètre (ATAGO)

#### III.4.1.3 Indice d'acide

L'indice d'acide permet de vérifier la qualité des H.E, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant le stockage.

C'est le nombre de milligrammes de potasse nécessaires pour neutraliser l'acide libre contenu dans 1 g d'HE.

Ce test consiste à neutraliser une solution d'HE dissoute dans l'éthanol, à l'aide d'une solution d'éthane d'hydroxyde de potassium, et d'utiliser la phénolphtaléine comme indicateur colorant [91].

#### Mode opératoire

Un échantillon d'essai de 1 g d'huile est dissous dans un erlenmeyer contenant à l'avance 10 ml d'éthanol. Le titrage des acides gras libres en solution est effectué avec une solution à 0,1N d'hydroxyde de potassium (*KOH*) dans de l'éthanol, 95° en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur coloré et cela sous agitation jusqu'au virage au rose. Noter le volume de la solution d'hydroxyde de potassium employée [92].

Il est exprimé en mg de *KOH* par gramme d'huile.

L'indice d'acide est donc donné par la formule :

$$I_a = (N_{KOH} \times V \times 56.1) / m$$

$N_{KOH}$  = normalité d'hydroxyde de potassium

$m$  = masse d'HE prélevée en g

$V$  = volume de solution d'hydroxyde de potassium versée en ml

56,11g / mol = masse moléculaire du  $KOH$  [93].



**Figure III.6 : Montage d'indice d'acidité**

#### III.4.1.4 la Densité

La densité est le rapport de la densité du liquide à la densité de l'eau, mais les mesures des densités de ces huiles ont été faites en utilisant un densimètre.

Elle est mesurée au moyen d'un hydromètre [94].

(AFNOR, 2000) à la température ambiante puis ramenée à 20°C par la formule :

$$D_{20} = D_t + 0.00068 (T - 20^\circ C)$$

$D_{20}$  : densité à 20°C.

$D_t$  : densité à la température ambiante ou de mesure.

$T$  : température ambiante ou de mesure.

**Mode Opérateur**

- Nettoyer soigneusement le densimètre rincé successivement au moyen d'éthanol ;
- Remplir le densimètre avec de l'huile essentielle ;
- lire le résultat.



Figure III.7 : Densimètre (*DMA 35<sub>N</sub>*).

**III.4.2 Identification de la composition chimique des huiles essentielles**

On a fait des analyses en laboratoire de L.G.P (Laboratoire de Génie des Procédés) de l'Université Kasdi Merbah Ouargla.

**III.4.2.1 Identification de la composition chimique des huiles essentielles par GC/MS**

L'analyse des huiles essentielles des plantes étudiées a été réalisée au L.G.P (Laboratoire de Génie des Procédés) de l'Université Kasdi Merbah Ouargla. Le chromatographe en phase gazeuse adopté est un *Bruker SCION 436 GC*, couplé à un spectromètre de masse à tension d'ionisation quadripolaire de 70 *ev*. La colonne utilisée est une HP-5MS ; 5% de phényl méthyl siloxane d'une longueur de 30 *m* et d'un diamètre intérieur de 0,25 *mm*. L'épaisseur du fil est de 0,25 *mm*.

Les conditions opératoires sont :

- La température de l'injecteur (mode split 1 :50) : 250 °C ;
- Programmation température : de 50 °C à 280 °C à une vitesse de 5 °C / min ;
- Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1,2 *ml / min*.
- Les températures de la source quadripolaire sont fixées respectivement à 250 °C et 280 °C.
- Les indices de rétention linéaire (RI) pour tous les composés ont été déterminés en utilisant des n-alcanes comme étalons.

- L'identification des composés individuels a été réalisée en faisant correspondre leurs modèles de fragmentation spectrale de masse avec les données correspondantes disponibles (bibliothèque Wiley 275 (6<sup>ème</sup> édition)).



**Figure III.8 : Chromatographe en phase gazeuse adopté couplé à un spectromètre de masse GC/MS.**

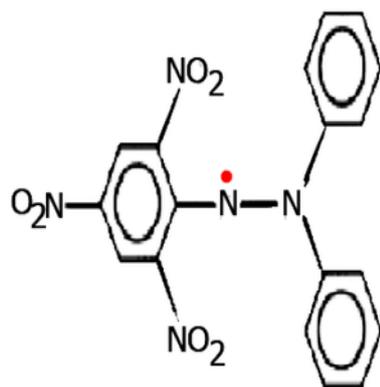
### **III.5 Activités biologique**

#### **III.5.1 Activité antioxydant**

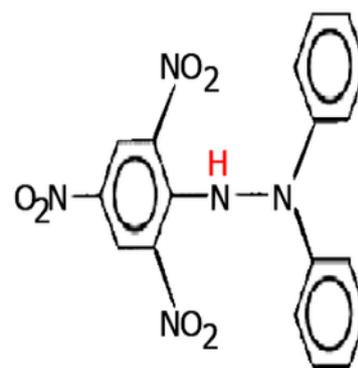
De nombreux tests permettent d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait. La plupart de ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration des réactifs dans le milieu réactionnel. Les tests les plus fréquemment utilisés sont DPPH, FRAP et TAC [95].

##### **III.5.1.1 Méthode de DPPH**

L'effet antiradicalaire ou « scavenger » sur le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est une méthode indirecte qui sert initialement à identifier les donneurs de protons dans les composés naturels [96].



DiPhenyle1PicrylHydrazyle  
(radical libre)



DiPhenyle1PicrylHydrazyle  
(radical réduit)

Figure III.914 : Forme libre et réduite du DPPH [97]

### Mode opératoire

Le DPPH• (2,2-phényl-1-picryl hydrazyl) est un radical libre il est de couleur violet qui est réduit en DPPH jaune lorsque des donneurs de protons sont présents. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire. Ce test est réalisé selon le protocole décrit. Un volume de 1 mL de la solution de DPPH• 0.1 mM est ajouté à 1 mL de l'échantillon à différentes concentrations, le mélange est vigoureusement agité puis laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc (contenant 1 mL du méthanol et 1 mL de la solution DPPH•) [98]. Les essais sont réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés selon la relation qui suit :

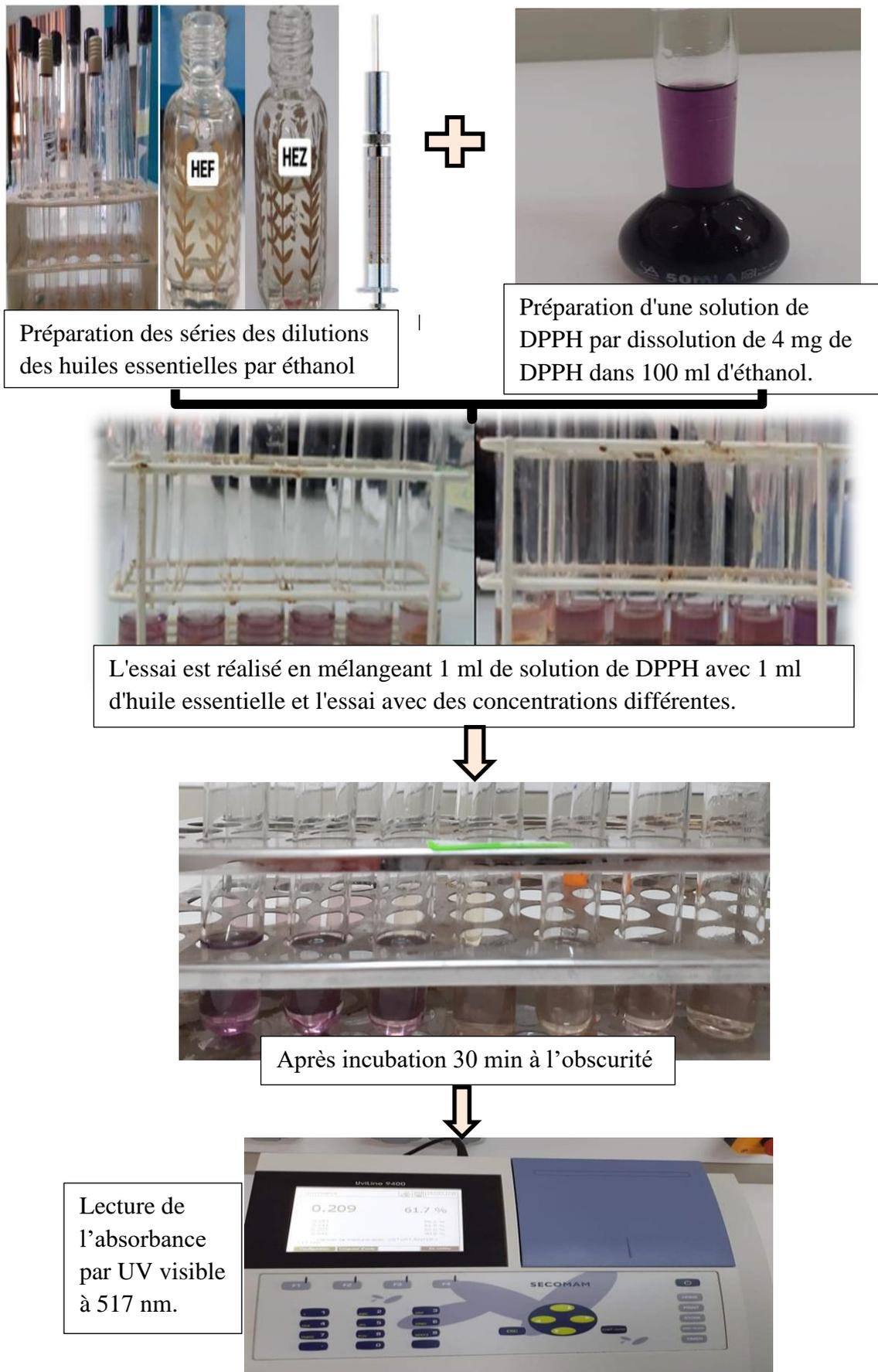
$$I(\%) = \frac{(A_c - A_t)}{A_c} \times 100$$

I : Pourcentage d'inhibition exprimé en %.

$A_c$ : Absorbance de la solution du DPPH (contrôle négatif).

$A_t$  : Absorbance de la solution du DPPH en présence de l'échantillon.

$IC_{50}$  : Ce paramètre est défini comme la concentration antioxydante nécessaire à la diminution de la concentration initiale de 50 %, elle est inversement liée à la capacité antioxydante [99].



Préparation des séries des dilutions des huiles essentielles par éthanol

Préparation d'une solution de DPPH par dissolution de 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol.

L'essai est réalisé en mélangeant 1 ml de solution de DPPH avec 1 ml d'huile essentielle et l'essai avec des concentrations différentes.

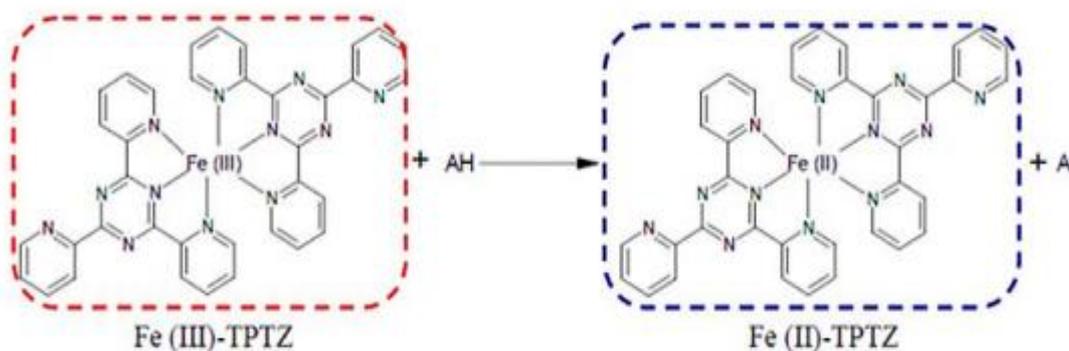
Après incubation 30 min à l'obscurité

Lecture de l'absorbance par UV visible à 517 nm.

Figure III.10 : Protocole de la méthode de DPPH

### III.5.1.2 Méthode de FRAP

Le pouvoir réducteur d'un extrait a un rapport avec son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits de test à réduire le ferrique ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en ferreux ( $Fe^{2+}$ ). En effet, ( $Fe^{3+}$ ) est impliquée dans la formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. L'absorbance de la substance à réaction est mesurée à 700 nm [100].



**Figure III.11 : Réduction du complexe ferric-tripyridyltriazine  $Fe^{3+}$ (TPTZ) en  $Fe^{2+}$  ferrous-tripyridyltriazine (TPTZ) [101]**

#### Mode opératoire

Mélanger 1 ml d'extraits de différentes concentrations avec 2,5 ml de tampon phosphate 0,2 M ( $pH = 6,6$ ) et 2,5 ml de solution de Ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50° C pendant 20 minutes. Ajouter ensuite 2,5 ml d'acide trichloracétique 10% ( $C_2HCl_3O_2$ ) pour stopper la réaction. Centrifuger le tube à 3000 rpm pendant 10 minutes. L'aliquote de supernatant (2,5 ml) est mélangée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de solution aqueuse à 0,1 % de  $FeCl_3$  (chlorure ferrique). L'absorbance du milieu de réaction est mesurée à 700 nm pour un blanc préparé de la même façon. Les contrôles positifs sont présentés par des étalons antioxydants [102].

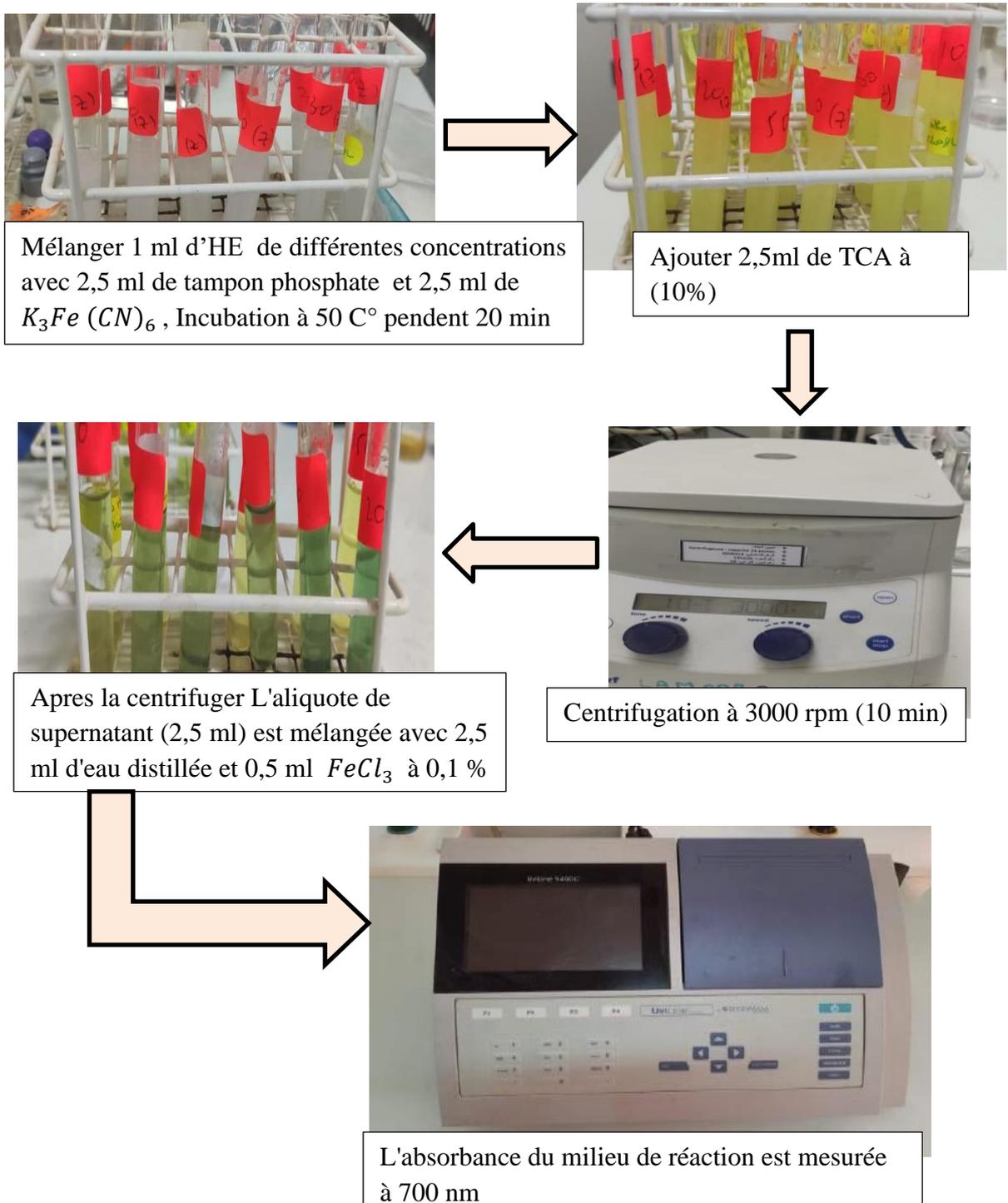


Figure III.12 : Protocole d'étude de pouvoir réducteur FRAP.

**III.5.1.3 Méthode de TAC [103]**

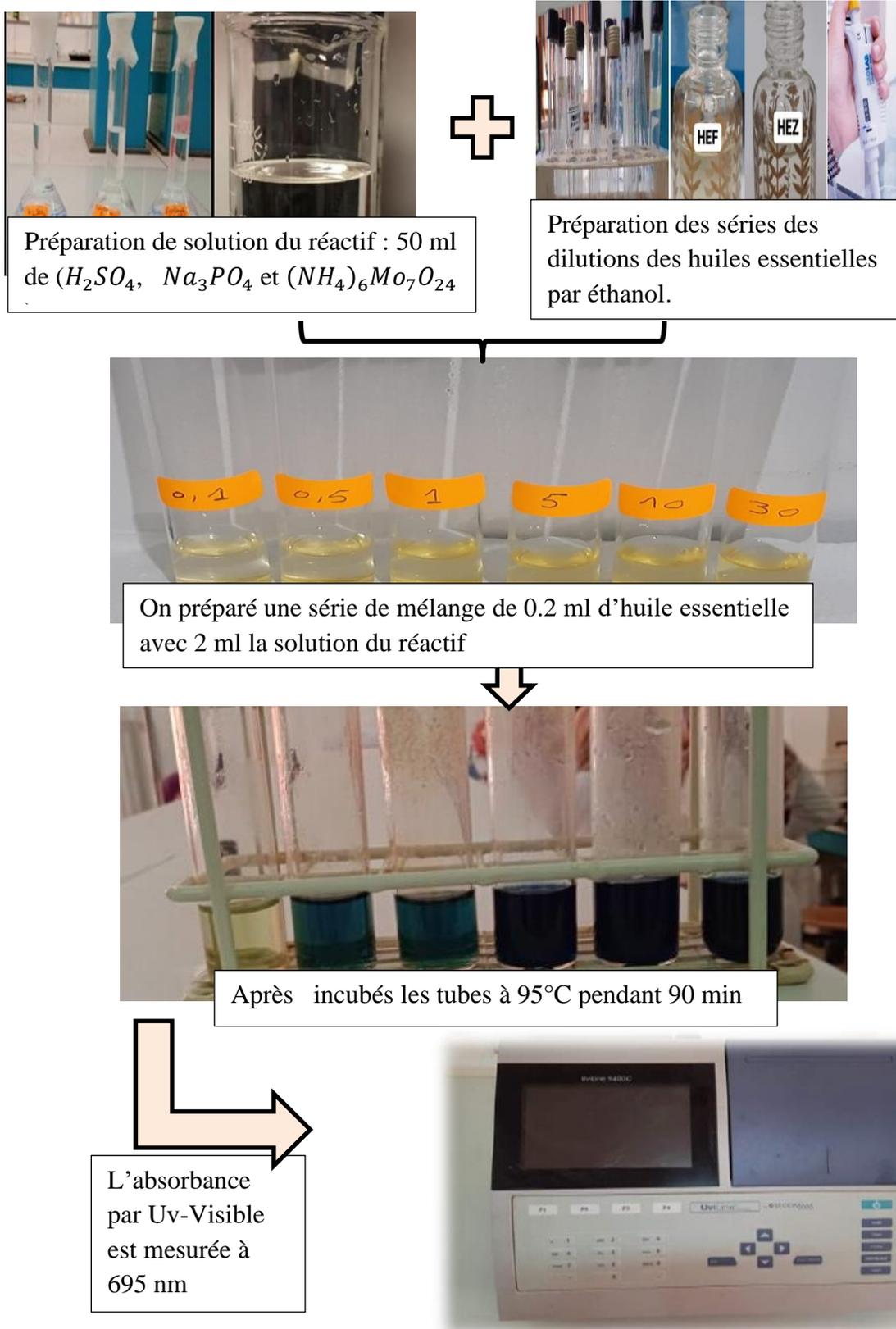
La capacité antioxydante totale (TAC) ou l'activité réductrice du molybdate des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdate proposée avec de légères modifications.

Cette technique est basée sur la réduction de molybdène *Mo* (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $MoO_4^{2-}$  à molybdène *Mo* (V)  $MoO^{2+}$  en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.

**Mode opératoire**

Un volume de 0.2 ml de chaque extrait méthanoïque est mélangé avec 2 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique  $H_2SO_4$ , 28 mM phosphate de sodium  $Na_3PO_4$  et 4 mM molybdate d'ammonium  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ ). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 2 ml de la solution du réactif et 0.2 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La capacité Antioxydante totale est exprimée en milligramme par millilitre (mg / ml).



**Figure III.13 : Protocole d'étude de méthode TAC [104]**

**Remarque :** A titre d'indication, l'acide ascorbique comme standard connu pour son effet antioxydant a été testé en parallèle dans chaque méthode.

### III.5.2 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *citrus limon* est réalisée d'abord par la méthode de *diffusion des disques*, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont estimées par la méthode de dilution d'agar. Un total de six souches microbiennes a été utilisé (4 bactéries à Gram négative et 2 à Gram positive).

Il existe plusieurs Méthodes pour cette activité mais on suit la méthode la plus utilisée :

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes [105].

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'extrait des plantes recensé, en présence des germes tests. Des disques absorbants stériles, imprégnés d'une quantité d'extrait et disposés sur une gélose inoculée avec les souches. La diffusion de l'extrait dans la gélose permet de suivre l'inhibition et la croissance des germes qui se traduira par une zone claire autour de disque dite zone d'inhibition.

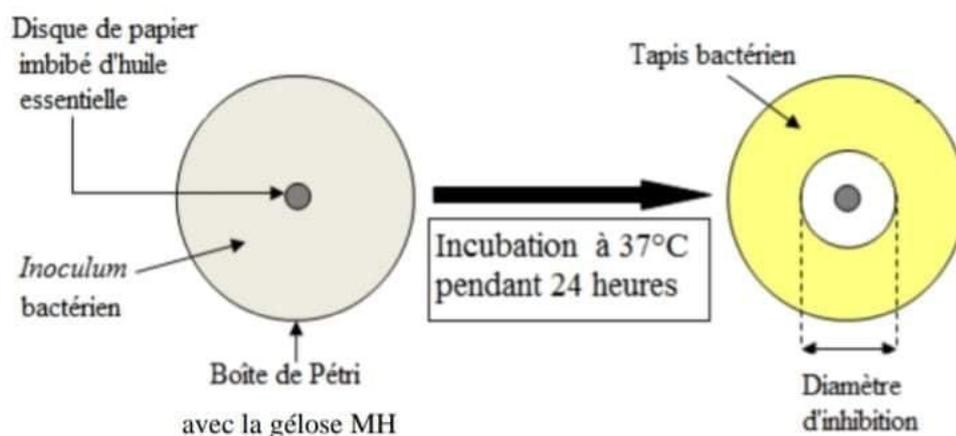


Figure III.14 : Illustration de la méthode d'aromatogramme [106]

### III.5.2.1 Souches bactériennes

Les souches utilisées sont des souches de référence d'Institut Pasteur d'Algérie type culture collection (ATCC), Elles proviennent du laboratoire d'analyse médicale ESSALAM, Ghardaïa. Où ces bactéries sont classées en deux groupes :

**Les bactéries à Gram négative :** *Escherichia coli* ATCC 7893, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Acinetobacter baumannii* ATCC 1906.

**Les bactéries à Gram positive :** *Enterococcus faecium* ATCC 35667, *Staphylococcus aureus* (1) ATCC 25923.



Figure III.15 : Les souches bactéries

### III.5.2.2 Mode Opératoire

#### a. Préparation des boîtes de gélose

Les souches bactériennes ont été réactivées pour produire progressivement de jeunes cultures à une croissance exponentielle. Ils ont été placés dans un bouillon nourrissant et incubés à 37 °C pendant 18 à 24 h. Une ou plusieurs gouttes de chaque culture pure ont été prélevées et suspendues dans 10 mL d'eau physiologique stérile [107].

Nous avons pris ces étapes :

➤ **Préparation zone stérile :** Tout d'abord avant de commencer les travaux, il faut nettoyer soigneusement la zone de travail avec de l'eau de Javel et utiliser un bec élastique pour créer une zone stérile.

Nous préparons des disques de 6 mm à partir de papier Whatman 3 et les mettons dans un étuve pour les stériliser à 120°C pendant 20 minutes.

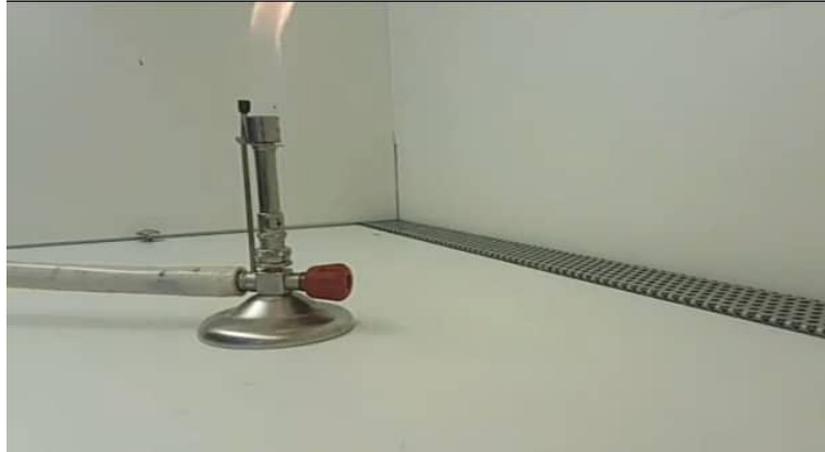


Figure III.16 : Zone stérile

➤ Fusion de la gélose :



Figure III.17 : Réchauffer le contenu de flacon de Mueller Hinton.

➤ Couler la gélose dans les boîtes : Ce travail est réalisé dans la zone stérile d'au plus 15 cm sur le bec verseur Bunsen. On verse l'agar dans les boîtes pétries au rythme d'environ 20 ml par boîte. On laisse refroidir jusqu'à ce que ça se solidifie et soit prêt.



Figure III.18 : Couler des boîtes pétries par gélose

Prélevée petite colonie des souches bactéries pures à chaque culture et mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Ensuite, On utilise micropipette place un certain volume de la solution dans des boîtes pétries.



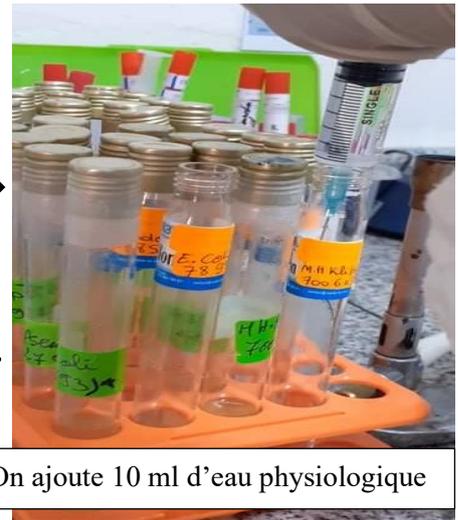
**Figure III.19 : Ensemencement des souches**

**b. Dépôt de disques**

On utilisait une pince stérile, nous prélevons les disques imbibés de chaque huile essentielle (zeste et feuilles) jusqu'à ce que le comprimé soit complètement imprégné. Le disque traité est pressé et déposé à la surface d'un milieu gélosé Mueller-Hinton ensemencé à l'aide d'une pince à épiler stérile, étalé puis incubé pour les bactéries à 37°C pendant 24 h dans un étuve.



Avec micropipette, on prélève 50µl de bactéries.



On ajoute 10 ml d'eau physiologique



Avec micropipette, on prélève 100 µl de la solution bactérienne à la surface de la gélose.



Nous trempions les disques en papier dans les HE à l'aide d'un collier



On laissait les boîtes dans un étuve d'incubation pendant 24 h à 37C° après nous mesurons les diamètres d'inhibition.



Les déposer à la surface de la gélose couverte de bactéries

Figure III.2015: Protocole du test de l'activité antimicrobienne

### III.5.2.3 Détermination de CMI

Cette technique consiste à inoculer à l'aide d'un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes en HE. Après incubation, l'observation de la plage permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la concentration la plus basse de H. E capable d'inhiber la croissance bactérienne. On a déterminé la CMI des HE étudiés en utilisant la technique de macro-dilution liquide [108].

Les huiles essentielles à différentes dilutions par DMSO :

- 75 $\mu$ L d'huile + 25 $\mu$ L de DMSO.
- 50 $\mu$ L d'huile + 50 $\mu$ L de DMSO.
- 25 $\mu$ L d'huile + 75 $\mu$ L de DMSO.

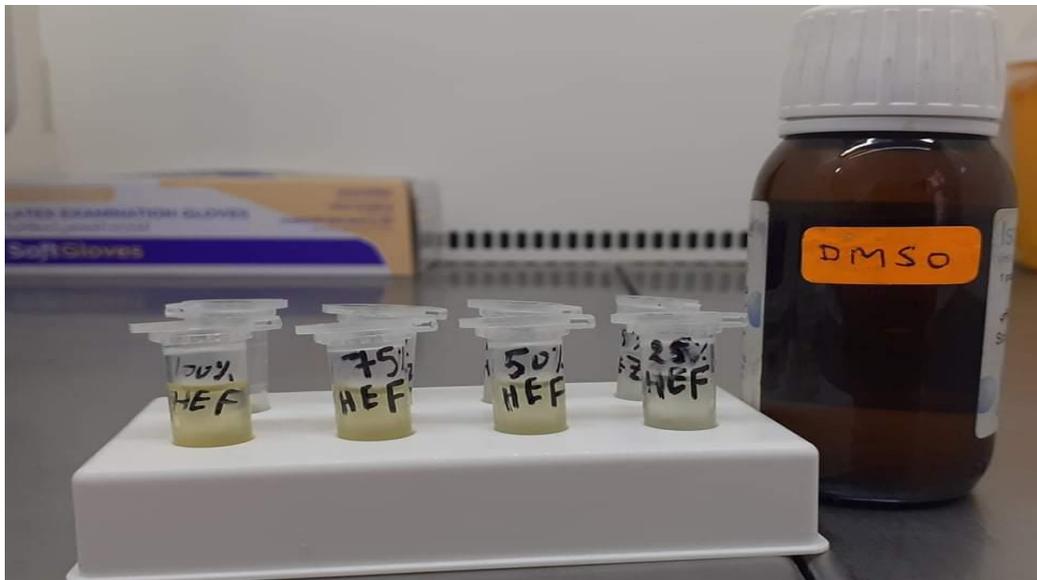


Figure III.21 : Huile essentielle à différentes dilutions par DMSO

# Chapitre IV

## Résultats et discussions

### IV.1 Description les huiles essentielles obtenues

Les huiles essentielles obtenues à partir des zestes et feuilles de citrus limon sont extraites par la technique d'hydrodistillation.

Le Tableau 2 nous montre les caractères organoleptiques des deux huiles essentielles.

**Tableau IV.1 : les caractéristiques organoleptiques des HE extraites**

Les huiles essentielles / Les Caractéristiques Organoleptiques	HE Zeste	HE Feuilles	ISO 855 :2003
<b>Aspect</b>	Liquide	Liquide	Liquide clair et mobile
<b>Couleur</b>	Blanc	Fraîche, très fort et épicée	Jaune pâle
<b>Odeur</b>	Jaune clair	Fraîche, épicée	Caractéristique du péricarpe de citron frais

### IV.2 Analyses des huiles essentielles

#### IV.2.1 Analyse physico-chimique

**Tableau IV.2: Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles de *Citrus limon***

Les huiles essentielles / Les Caractéristiques Physico-chimiques	HE Zeste	HE Feuilles	AFNOR-NF T75006
<b>Rendement</b>	1.12 %	0.71 %	0.5 – 2.00 %
<b>Indice de réfraction</b>	1.4751	1.4795	1.470 -1.478
<b>Indice d'acide</b>	3.366	1.122	0.84-3.74
<b>La Densité</b>	0.8766	0.9031	≤ 0.921

D'après les résultats d'analyse physico-chimique obtenues, notre étude des valeurs de densité, d'indice de réfraction et d'indice d'acide des feuilles et des zestes de la *citrus limon* était dans était conformes aux normes internationales (AFNOR- NF T75006).

##### IV.2.1.1 Le rendement

D'après les résultats obtenus, on observe que Le rendement le plus élevé est celui de zeste (1.12 %) par rapport des feuilles (0.71%).

Ces résultats sont considérés comme ayant un rendement inférieur par rapport à certaines études obtenues par [109] avec une valeur de 1.02% pour les feuilles. Et obtenue par [110] [78] avec les valeurs 1.30%, 2.18% respectivement.

D'autre part, ce rendement comme supérieure par rapport des autres résultats obtenus à partir de [111] [79] [112] que sont des valeurs estimées 0.70 %, 0.89% et 0.91 % pour zeste. Et [113] [114] rendement 0.31% et 0.41% pour feuilles.

Alors On peut déduire que le rendement en huile essentielle de *citrus limon* peut varier en fonction d'un ensemble de paramètres comme l'origine géographique, la méthode d'extraction, la période d'extraction, la maturité de fruit mais également aux conditions d'expérimentation [111].

#### IV.2.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

Les résultats de l'analyse de la composition des huiles essentielles sont obtenus par l'analyse chromatographique GC/MS et montrés dans les figures et tableau.

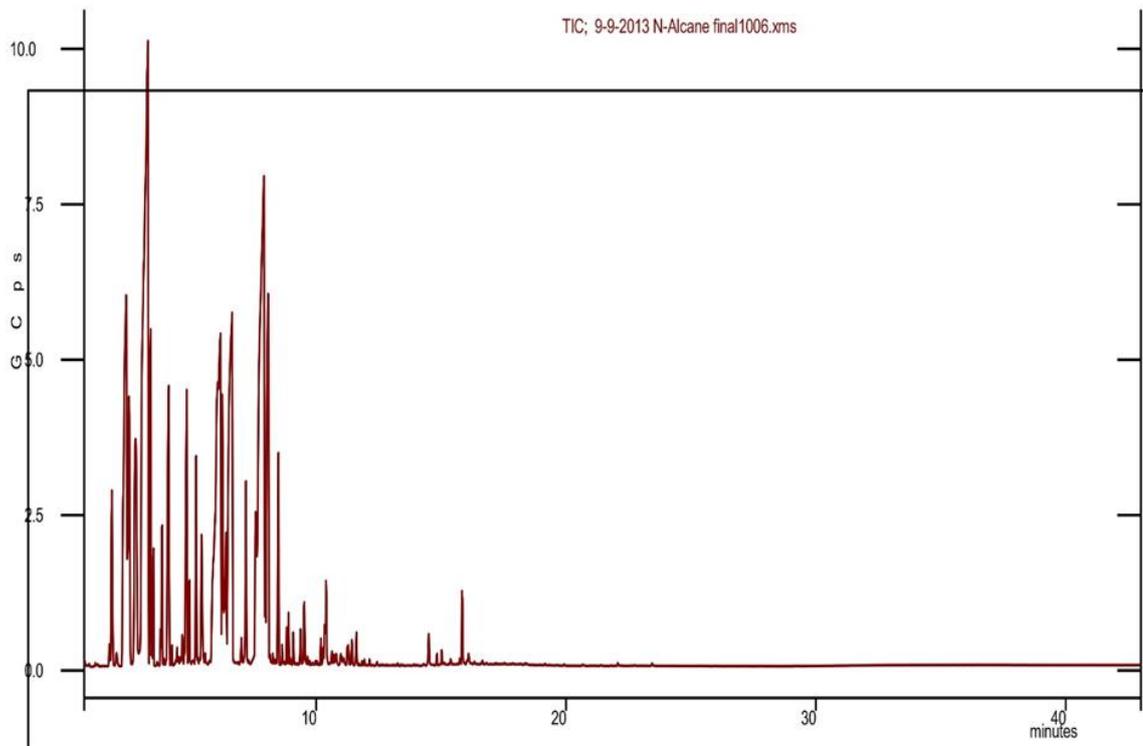
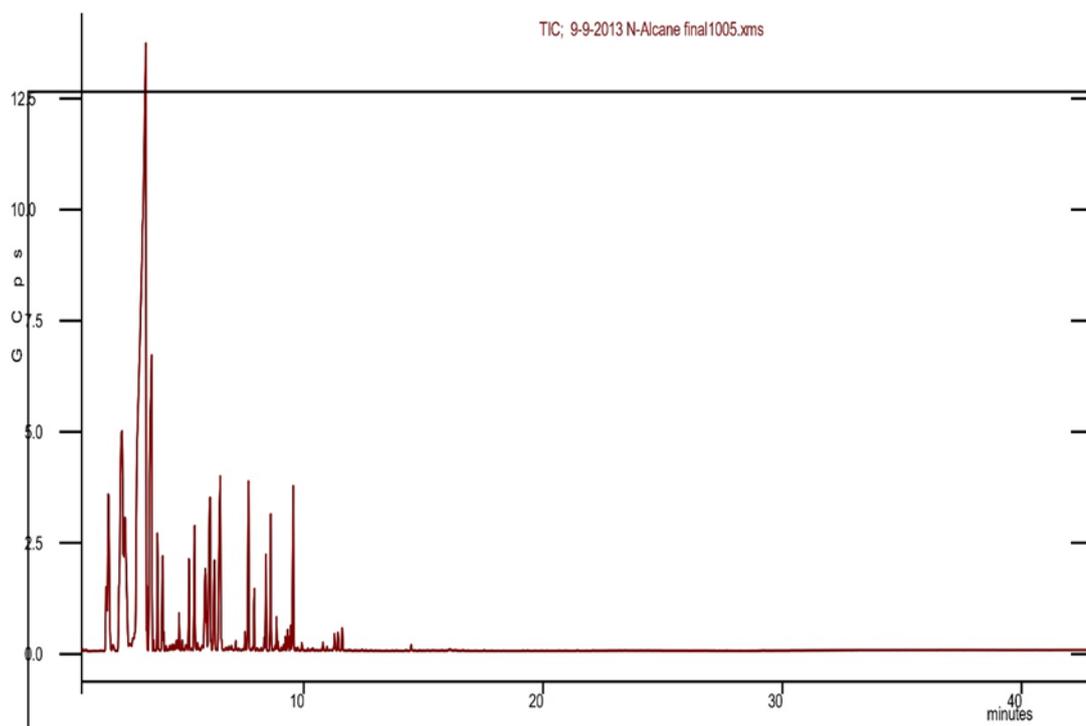
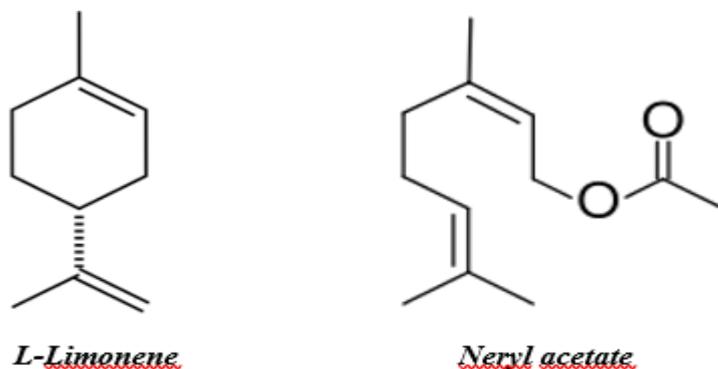


Figure IV.1 : Profil chromatographique de L'H.E des Feuilles analysée par CG/SM.



**Figure IV.2 : Profil chromatographique de L'H.E de Zeste analysée par CG/SM.**

Les résultats obtenus d'analyse des composés chimiques par CG/SM a permis d'identifier 35 constituants pour les huiles essentielles des feuilles avec 19,41 % de *L-Limonene* et 14,87 % de *Nerol acetate* et 25 constituants pour les huiles essentielles du zeste avec 45,62 % de *L-Limonene* et 8,3 % de *3-Carene* comme composés majoritaires.



**Figure IV.3 : Les composés majoritaires de L'H.E des Feuilles**

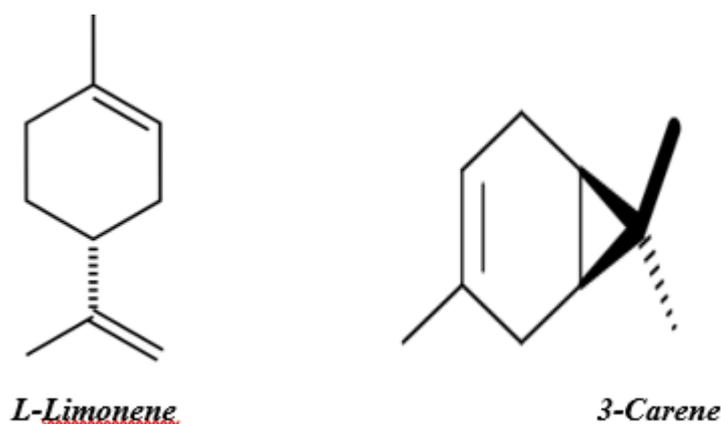


Figure IV.4 : Les composés majoritaires de L’H.E de Zeste

Les études obtenues par [115] ont prouvé notre résultat de sorte que la plupart des composés sont est *Limonene* et *Neryl acétate* 61.68 %, 21.66 % et le *Limonene* 59.8% ,39% et 29.49% [116] [117] [118].

En étudiant la composant chimique par [119][111][120] ont confirmé que ces majoritaire pour le HE de zeste est de *Limonene* 64.19%, 51.40% et 51.39% respectivement.

Par contre, nos résultats le HE des feuilles obtenues par [81] ont prouvé *Limonene* 68.63% sont est les composés majoritaires mais par rapport à notre résultat le composé minoritaire est la *Neryl acétate* 0.76%, et différent de ceux obtenus par [114] que sont le composé majoritaire 30.62 de *linalool* et les compose minoritaires tel que *Neryl acétate* (4.2%) et *Limonène* (1.13 %).

### IV.3 Activités biologique

#### IV.3.1 Activité antioxydante

Nous avons évalué l'activité antioxydante d'huile essentielle la matière végétale de *citrus limon* par trois méthodes.

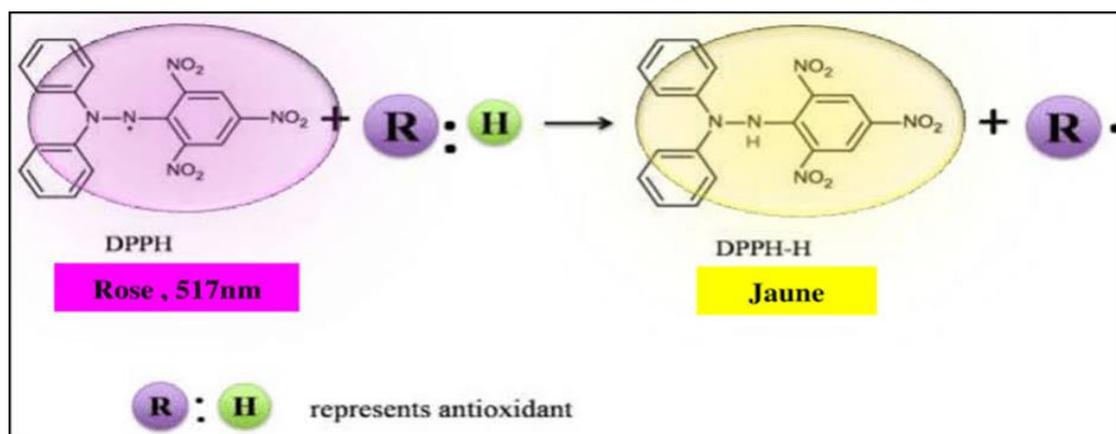
Les trois méthodes et les résultats obtenus est exprimé par le tableau IV.3 suivant :

**Tableau IV.3 : les activités antioxydantes de l'HE de citrus limon**

Pouvoir antioxydant (mg/ml)	HE des feuilles	HE de zeste
Effet piégeur du DPPH $IC_{50}$	34,238±0,7207	135,678±0,2345
Pouvoir réducteur ferrique $EC_{50}$	63,3773±0,5628	200,875±0.6519
Capacité antioxydante totale (TAC) $EC_{50}$	1,5722±0,4631	1,9604 ±0,2846

##### IV.3.1.1 Méthode de DPPH

Il est bien connu que lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec des substances contenant des antioxydants, elle passera du violet foncé à la couleur en raison de la conversion des radicaux libres indépendants DPPH en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine, elle est mesurée à 517 nm.



**Figure IV.5 : Réaction entre un antioxydante et un radical libre (DPPH•)**

L'évaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de feuille est plus forte que l'activité antioxydante de zeste, respectivement ( $IC_{50} = 34.238 \text{ mg/ml}$  ;  $IC_{50} = 135.678363$

*mg/ml*) ; et le standard ( Acide Ascorbique) utilisé est donne une valeur d'IC<sub>50</sub> de 6.4584  $\mu\text{g/ml}$  .

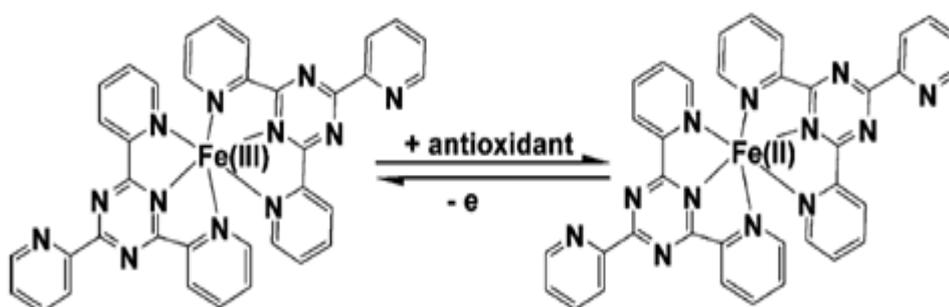
La valeur IC<sub>50</sub> de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de zeste obtenu est comparée avec l'étude de [121] qui trouve une activité inhibitrice de IC<sub>50</sub> = 26.660 *mg/ml* ; une autre étude [122] à trouvé une valeur IC<sub>50</sub> =44.060 *mg/ml* , ces deux résultats est inférieur à nos résultats avec une activité plus forte.

Des études antérieures de [123] trouve une résultate pour le zeste de IC<sub>50</sub> = 90 *mg/ml* . [119] à obtenu de IC<sub>50</sub> = 120 *mg/ml* , les deux derniers résultats est inférieur à nos résultats avec une activité plus forte.

D'après l'étude de [124] à montré leur résultat de IC<sub>50</sub>=8310 *mg/ml* une faible activité anti radicalaire à la comparaison avec nos résultats obtenus de zeste de plus forte activité.

#### IV.3.1.2 Méthode de FRAP

Dans cette partie, nous avons testé par la méthode de FRAP les huiles essentielles de la matière végétale.



**Figure IV.6 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP**

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles de la matière végétale , déterminés selon la méthode de réduction du ferricyanure de potassium, a augmenté avec des concentrations croissantes. On trouve une résultat pour les feuilles de EC<sub>50</sub> =63.3773 *mg/ml* avec une activité plus forte par rapport a l'huile de zeste . L'acide ascorbique utilisé à une EC<sub>50</sub> de 65,48  $\mu\text{g/ml}$  .

Dans une autre étude de [125], ils ont trouvé un pouvoir réducteur exprimé en fonction d'absorbance de 0,65 et 0,5 à une concentration de 0.015 *mg/ml* de zeste est inférieur et loin à nos résultats.

D'autre étude , le pouvoir réducteur de l'huile essentielle a été mesuré en pourcentage, il a montré un résultat de 78% pour une concentration de 1 *mg/ml* est inférieur par rapport à nos résultats avec une forte activité, selon [126].

D'après les études de [83] montre que l'activité antioxydant par la méthode de FRAP de zeste a une valeur étude  $EC_{50} = 0.420 \text{ mg/ml}$  est inférieure à notre résultat obtenu.

Et il y a une autre étude de [124] qui trouve une faible activité antioxydante de FRAP de  $EC_{50} = 49939 \text{ mg/ml}$  par rapport aux résultats que nous avons trouvés, qui expriment un pouvoir réducteur plus forte.

#### IV.3.1.3 Méthode de TAC

Dans cette méthode du phosphomolybdate d'ammonium est basée sur la réduction du molybdate  $MO^{6+}$  en  $MO^{5+}$  par les antioxydants de l'extrait de *citrus limon*.

Dans ce travail, nous avons comparé la réduction de molybdate de l'extrait, exprimé en concentration inhibitrice à 50% ( $EC_{50}$ ) entre (feuilles et zestes) on trouve des résultats proches entre eux respectivement ( $EC_{50} = 1.5772 \text{ mg/ml}$ ;  $EC_{50} = 1.9604 \text{ mg/ml}$ ).

L'acide ascorbique utilisé de  $EC_{50} = 84.33 \mu\text{g/ml}$ .

Des études menées par [127][128][129] sur l'activité réductrice du molybdate des extraits ont montré les résultats suivants  $EC_{50} = 0.04317 \text{ mg/ml}$ ,  $0.01020 \text{ mg/ml}$  et  $0.09645 \text{ mg/ml}$  respectivement.

Ces résultats sont considérés inférieurs à nos résultats avec une forte activité réductrice.

#### Remarque

Dans les deux méthodes de l'activité antioxydant de *DPPH* et *FRAP*, les résultats que nous avons trouvés sont bien meilleurs que les études [124] cela est dû aux composés chimiques majoritaires qu'ils ont trouvés, tel que  $\beta$ -pinène (14.74%), linalool (6.23%) par contre nos composés majoritaires sont : 45,62 % de *L-Limonene* et 8,3 % de *3-Carene*

Dans la dernière méthode de TAC les résultats des autres études sont inférieures à nos résultats, à cause de leurs composants chimiques majoritaires tel que  $l'$  $\alpha$ -pinène (43.9%), sabinene (27.9%) et  $\beta$ -pinène (16.0%).

#### IV.3.2 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des HE de zeste et de feuilles de *citrus limon* a été étudiée par la méthode de diffusion de HE sur un milieu gélosé (Mueller-Hinton).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été estimée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition. Le but était d'évaluer les propriétés antibactériennes par la présence ou l'absence de zones de culture d'inhibition et la différence de concentration.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau et la figure suivants.

Tableau IV.4: Activité antibactérienne d'HE zestes

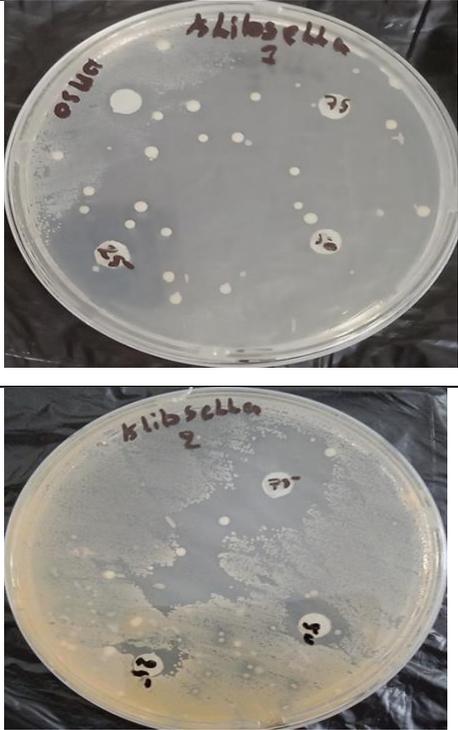
Les souches		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
		100%	75%	50%	25%	12.5%
Gram négatives	<i>Escherichia coli</i> ATCC 7893	31	13	12	11	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	40	35	16	15	11
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	17	13	12	
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 1906	18	13	11	09	
Gram positives	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667	16	13	12	09	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (1) ATCC 25923	16	14	11	09	

Tableau IV.5: Activité antibactérienne d'HE feuilles

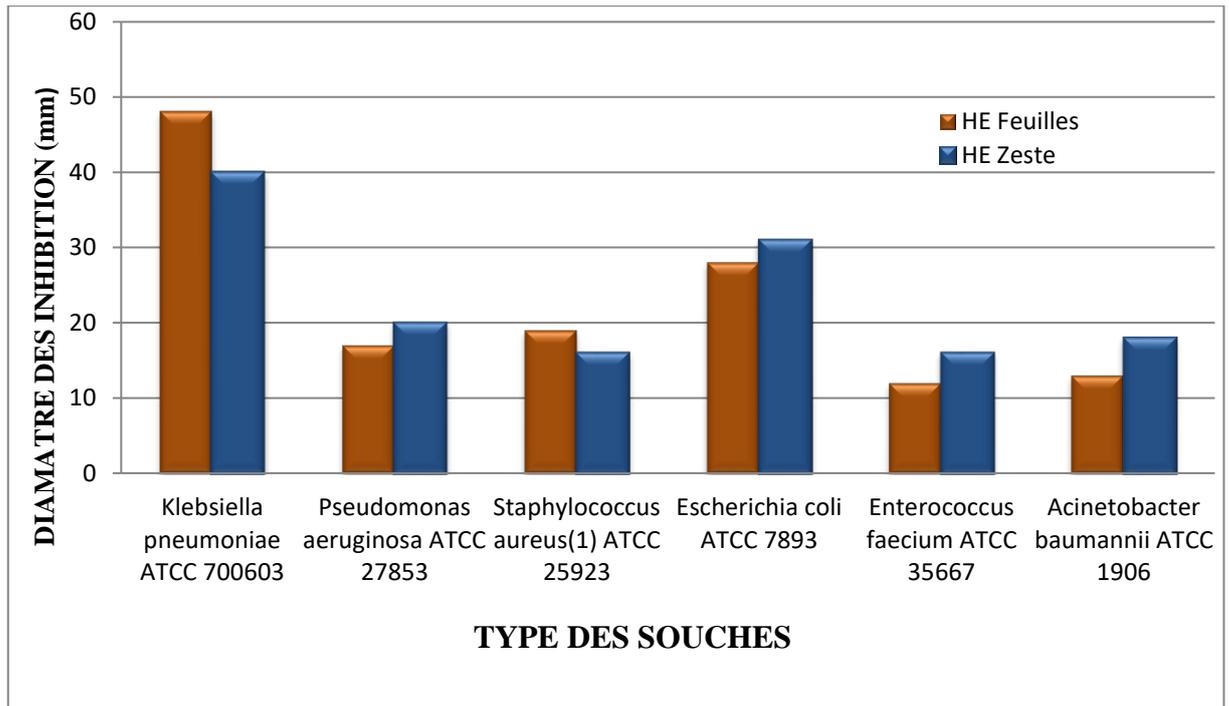
Les souches		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)						
		100%	75%	50%	25%	12.5%	6.25%	3.125%
<b>Gram négatives</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 7893	28	23	18	16	10		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	48	44	38	32	25	18	13
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	17	15	10	09			
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 1906	13						
<b>Gram positives</b>	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667	12						
	<i>Staphylococcus aureus</i> (1) ATCC 25923	19	18	16	13			

Le tableau IV.4 et le tableau IV.5 montre le diamètre d'inhibition pour différentes concentrations d'huiles essentielles des zestes et des feuilles de *citrus limon*.

Tableau IV.6: Les résultats de Zone d'inhibition d'HE de Citrus limon

Les souches	Diamètres d'inhibition (mm) 100%	CMI
<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 7893</p>		
<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</p>		
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>		

<p><i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 1906</p>		
<p><i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667</p>		
<p><i>Staphylococcus aureus</i> (1) ATCC 25923</p>		



**Figure IV.7 : l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *citrus limon***

Des études ont montré différentes sensibilités aux huiles essentielles testées. Et le diamètre de la zone d'inhibition les deux huiles essentielles.

D'après les résultats obtenus sur la figure 47, la peau montre une meilleure activité bactérienne contre les souches *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603* et *Staphylococcus aureus (1) ATCC 25923*.

Cependant, les feuilles ont également montré plus d'activité antibactérienne que les pelures contre quatre souches, à savoir *Acinetobacter Baumannii ATCC 1906*, *Enterococcus faecium ATCC 35667*, *Escherichia coli ATCC 7893* et *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*.

Les résultats obtenus pour les feuilles ont montré que [80] était activité contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ils y avaient une faible activité de 12,5 mm et 14,5 mm. Contrairement à nos résultats, il était actif contre *Escherichia coli* (28 mm), *Staphylococcus aureus* (19 mm) très sensible.

En ce qui concerne l'étude [81] [113] sur les bactéries, il a été constaté que l'activité contre *E. coli* (11.2 mm , 15 mm) était considérée comme inférieure à celle obtenue dans les feuilles (28 mm) , *Klebsiella pneumoniae* (8 mm , 12 mm) était insensible et *Pseudomonas aeruginosa* était inactivité (6 mm , 9 mm ), contre nos résultats nous avons 48mm pour *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* était activité 17 mm mais [113] montrent que *Staphylococcus aureus* (21 mm) est une souche extrêmement sensible.

En revanche, [83] Il a été prouvé qu'il existe une activité contre les bactéries pour le HE de zeste *Staphylococcus aureus* (16mm) est très sensible, et *Escherichia coli* (9,5mm), *Klebsiella pneumoniae* (10,3mm) et *Enterococcus faecium* (10,7mm) sensibles. *Pseudomonas aeruginosa* (8,8 mm) n'est pas sensible, mais cette activité est considérée comme faible par rapport à ce que nous avons obtenu d'*Staphylococcus aureus* (19-16 m m), *Escherichia coli* (31 m m) et *Klebsiella pneumoniae* (48 mm), *Enterococcus faecium* (18 mm) est très sensible et *Pseudomonas aeruginosa* (20 mm).

Par contre pour le zeste,[120][111] était extrêmement sensible à *Staphylococcus aureus* de 30.3 mm, mais dans notre étude avons une meilleure activité sur *Klebsiella pneumoniae* avec un diamètre de 48 mm et à été une activité *Staphylococcus aureus* 16 mm.

# **Conclusion générale**

Les agrumes occupent aujourd'hui une place importante dans le commerce mondial des produits végétaux comme le citron (*Citrus limon*), riche en divers métabolites secondaires. Parmi elles, les huiles essentielles, qui sont des substances aromatiques, ont des compositions chimiques complexes, et se caractérisent par des propriétés biologiques importantes, sont utilisées dans plusieurs domaines tels que l'industrie pharmaceutique, la cosmétique et l'industrie alimentaire.

Ce travail s'est concentré sur la valorisation de l'huile essentielle de zeste et des feuilles de *Citrus limon*. Son extraction par hydrodistillation a donné des rendements de 1,12 % et 0,71 %, respectivement.

D'après les résultats d'autres auteurs, la détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice d'acide, indice de réfraction) des huiles essentielles ont permis de souligner la qualité de ces huiles. La plupart de ces résultats sont conformes à la norme AFNOR.

L'analyse par chromatographie GC/MS des HEs *Citrus limon* a révélé ce qui suit :

- Les composés majorités par du *L-limonène* (19,41%) et *Neryl acétate* (19,41%) pour le H. E de feuilles.
- Le H.E de zeste est caractérisée par la présence de composés comme de *L-Limonene* (45,62%) et de *3-Carene* (8,3%).

Les études menées par notre étude ont permis de mettre en évidence l'activité antioxydante et antibactérienne contre les 6 souches bactériennes (souches 2 gram positives et 4 gram négatives) d'HE de *citrus limon* étudiées.

Les résultats obtenus par certains auteurs montrent que l'huiles essentielles de *citron limon* a un pouvoir antioxydant, et après avoir comparé l' $IC_{50}$  du DPPH, l'antioxydant de l'huile essentielle de zeste ( $IC_{50} = 135,6789 \text{ mg/ml}$ ), nous avons remarqué que l'activité est supérieure à celle de l'huile essentielle de feuilles ( $IC_{50} = 34,2381 \text{ mg/ml}$ ). En revanche, ces valeurs sont bien supérieures à la valeur de *l'acide ascorbique* avec une  $IC_{50}$  de  $6,4584 \text{ mg/ml}$ .

Aussi, en comparant l' $EC_{50}$  du FRAP et du TAC, l'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles ( $EC_{50} = 63,3773 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ,  $EC_{50} = 1,5722 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) est inférieure à celle de l'huile essentielle de zeste ( $EC_{50} = 200.875 \text{ mg/ml}$ ,  $EC_{50} = 1.9604 \text{ mg/ml}$ ) respectivement, ces valeurs sont largement inférieures à celle de *l'acide ascorbique* avec un  $EC_{50}$  de  $84.33 \text{ mg/ml}$  pour TAC et entre à celle de l'acide ascorbique avec un  $EC_{50}$  de  $65.48 \text{ mg/ml}$  pour FRAP.

De plus, l'HE des feuilles présente une activité antibactérienne proche à l'HE de zeste à l'encontre de certaines souches microbiennes testées. Cependant, *Acinetobacter baumannii* et *Enterococcus faecium* qui ont montré moins de résistance pour l'HE des feuilles, et *Klebsiella pneumoniae* qui ont montré extrêmement sensible pour le deux HE.

Cette étude peut être considérée comme une source d'information importante sur les propriétés phytochimiques, antibactériennes et antioxydantes des huiles de *citrus limon* cette plante locale est une source potentielle en divers composés doués des activités biologiques, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en alimentation et en médecine traditionnelle comme traitement à plusieurs pathologies.

Cependant, malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur cette plante s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, il sera intéressant à l'avenir :

- D'étudier d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antifongique, antivirales et autres.
- De tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques in vivo.
- De vérifier l'absence d'effets toxiques de ces composés.

# **Références bibliographiques**

### Références

- [1] Ewansiha J.U., Garba S.A., Galadima M., Daniyan S.Y. and Busari M.B., (2016). Therapeutic potency of Citrus Limon (L) Burm. F. (Lemon) peel extract against some disease causing microorganisms. *Int. J. Res. Studies Bios.* 4: 30-39.
- [2] Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G., (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54(5): 1822-1828.
- [3] Miyake Y, Yamamoto K, Morimitsu Y, Osawa T., (1998). Characteristics of antioxidative flavonoid glycosides in lemon fruit. *Food Sci Technol Int* 4 :48–53.
- [4] Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, Lo Curto RB., (1995). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (note II): Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmacologia* 50 :595–599.
- [5] Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio JA., (1997). Use and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 45 :4505–4515.
- [6] Elangovan V, Sekar N, Govindasamy S., (1994). Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett* 87 :107–113.
- [7] Baser K.H.C. and Buchbauer G. (2010). *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
- [8] Besombes C., (2008). *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées*. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289p.
- [9] LANGERMANN Y. T (2010): *Avicenna and his legacy. A golden age of science and philosophy*. Éditions Brepols.
- [10] bilal, G.m., 2015-2016. *Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques*. Thèse de doctorat. université de Ouargla.
- [11]. AFNOR NF T-75- 111, 112 & 202 : (Association Française de Normalisation, Norme). « Huiles essentielles ». Paris, France.
- [12] Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F.J., & Reglero G., (2005). Chemical composition activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*. 68: 790-795.

- [13] Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S., Polissiou M.G., (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Alliumsativum*). *Sonochem.* 13: 54-60.
- [14] GONZELEZ-TRUJANO M.E. et al, (2007). Evaluation of antinociceptive effect of *Romarin officinalis* L.using three différent experimental models in modents .*J theopharmacol.* 111 :476-482.
- [15]. Degryse A., Delpla I., Voinier M., (2008). Risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ingénieure du Génie Sanitaire, atelier santé environnement.
- [16] Pachioni I. (2010). *Aromathérapie : 150 vrai/faux sur les huiles essentielles*, Editions du Rocher.
- [17] Millet D. F., (2015). *Le grand guide des huiles essentielles*, Marabout.
- [18] Guignard J. L., (2000). « *Biochimie végétale* », Masson, Paris, 166.
- [19] Dale Poulter, C., Marscle, L., Hughers, J.M. et Argyle, J.C. *J. Am. Soc.* (1977). 99, 3823.
- [20] Finar I.L., (1994). « *Organic chemistry* », Ed. Longman Scientific et Technical, Vol. II, 354.
- [21] Bruneton J., (1999). « *Pharmacognosie* », *Plantes médicinales*, Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris, 405.
- [22] De Cruz-Cabral L., Fernandez-Pinto, V., Patriarca A., (2013). *Int J Food Microbiol*, 166, 1-14.
- [23] Chaker El Kalamounni, Thèse sur : *Caractérisations chimiques et biologiques*.
- [24] a). Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., (1988). *Extraction des huiles Essentielles. Chimie et technologie. Information chimie*.
- b). Bruneton J., (1993). *Pharmacognosie et phytochimie, plantes medicinales. 2eme Eddition : Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 915p.de Skikda. Présentation pour l'obtention du Diplôme de Magister en entomologie (option ; application agronomique et médicale). 191 p.tpellier(France)*.
- [25] *Conception et application à l'extraction des huiles essentielles*, (1948), Faculté des Sciences de Rabat, université d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, l'Institut National Espèces *Salivia, Lavandula et Mentha* du Maroc, espèces. T.
- [26] SMALLFIELD B., (2001). *Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45,4p.*
- [27] CAILLARD J., (2003). *Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6p.*

- [28] SCHWÄMMLE B., WINKELHAUSEN E., KUZMANOVA S., et STEINER W., (2001). Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. *Biotechnol.* 39 (4), 341-345.
- [29] ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'ESPÈCES VÉGÉTALES DE LA FLORE LAURENTIENNE, (aout 2008) p 19-20.
- [30] Alessandra Moro Buronzo, grande guide des huiles essentielles santé beauté Marocaine : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires.
- [31] Madhavi D.L., Deshpande S.S, Salunkhe D.K., (1996). *Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives.* Marcel Dekker, Inc. New York. P : 65.
- [32] AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- [33] Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles [En. ligne], (Mai 2008) ; Consulté le 12 Déc 2016. Disponible sur le site : <http://www.afssaps.sante.fr> .
- [34] HESSAS Th. & SIMOUD S., (2018). Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thymus sp, mémoire de doctorat en pharmacie, Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou.
- [35] Lahlou M., (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6): p. 435-448.
- [36] Sacchetti G., et al., (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Journal of Food chemistry*, 91(4): p. 621-632.
- [37] De Souza E.L., et al., (2006). Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm*, 87(1) : p. 22-25.
- [38] Guinoiseau E., (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action., Thèse de doctorat. Université de Corse.
- [39] DOLATOWSKI Z. J., STADNIK J., et STASIAK D., (2007). Applications of ultrasound in food technology. *ACTA Scientiarum Polonorum*. 63(6) : 89–99.
- [40] VEILLET S., TOMAO V. et CHEMAT F. (2010). Ultrasounds assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*. Volume 123. Issue 3, pp : 563-958.
- [41] France-Ida J., (1996). Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*; 3: 5-6.

- [42] Abou Zaid E. N., (1998). Aromatic and medicinal plants—their agricultural and medicinal products. El-Dar El-Arabia for Publishing, Cairo.
- [43] Edris A.E., Shalaby A. et Fadel H., (2003). Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata*) growing in Siwa Oasis, Egypt. *Eur. Food Technol.* 218: 74-78.
- [44] Burt S., (2004). *Int. J Food Microbiol*, 94: 223-253.
- [45] Guinoiseau E., (2010). Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.
- [46] FABIAN D., SABOL M., DOMARACKA K., et BUJNAKOVA D., (2006). Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *20(8):1435-45.*
- [47] Hay R.J., (2006). Fungal infections. *Clinics in Dermatology* 24, 201–212.
- [48] Lupi O., Tying S.K., McGinnis M.R., (2005). Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 931–951.
- [49] Kaloustian J., Hadji-Minaglo F., (2012). La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Edition Springer. Paris.
- [50] Schwedt G., (1993). Atlas de Poche des Méthodes d'Analyse. Ed. Flammarion Medecine-Sciences, Paris, 234 p.
- [51] De Maack F., et Sablier M., (1994). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. Référence : P2614.
- [52] Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [53] Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis* 1997 ; 25 (6) : 13-16.
- [54] Paolini J., (2005). Caractérisation des huiles essentielles par cpg/ir, cpg/sm-(ie et ic) et rmn du carbone-13 de *cistus albidus* et de deux *asteraceae* endémiques de corse : *eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *doronicum corsicum*. Thèse de doctorat.
- [55] Marchand L., (2002): Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomed.Pharmacother.COTTIN*, R, 2002. *Citrus of the World. A Citrus Directory.* SRA INRA-CIRAD (éd), France. Vol. 56, pp: 296–301.
- [56] Halliwell B., (1996): Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, Vol. 16, pp: 33–50.

- [57] Rao A.V. et Rao L.G., (2007): Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* Vol. 55, pp: 207 – 216.
- [58] Minh Tu N.T., Thanh L.X., Une A., Ukeda H. et Sawamura M., 2002: Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour Fragrance J.* Vol. 17, pp: 169 – 174.
- [59] Chutia M., Bhuyan D.P., Pathak M.G., Sarma T.C. et Boruah P., 2009: Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT* Vol. 42, pp : 777–780.
- [60] Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. et Radice M., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632.
- [61] Meziane M., (2013). Assainissement et Régénération des Plantes d'Agrumes par l'Embryogenèse Somatique à partir de la culture de Stigmate et Style. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, El-Harrach, Alger.
- [62] Kamiri M., (2011, Février 22). Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes. UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI.
- [63]. OMS, Organisation mondiale de la Santé, 2006.
- [64] Padrini F., Lucheroni M. T., (1996). Le grand livre des huiles essentielles – guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi, Paris, pp.11, 15, 61. et 111.
- [65] Kehal F., (2013). « Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche ». Thèse de magister en sciences alimentaires, Constantine, UNIVERSITE CONSTANTINE 1, Algerie, 124p.
- [66] Kasraoui M.F., (2006). Le citronnier.
- [67] Millet F., (2014). Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). *Phytothérapie*, 12(2) : p. 89-97.
- [68] Débuigine G., et Couplan F., (2008). *Petit Larousse des plantes qui guérissent.* (Larousse, Paris.) : p. 895.
- [69] *Les arbres fruitiers.* (2006). (Rustica, Paris.) : p. 91.
- [70] Faucon M., (2015). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription* (Édition sang de la terre, Paris) : p. 39-455.

- [71] Bousbia N., (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Université d'Avignon ; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie). p. 128.
- [72] Gollouin F., Tonelli N., (2013). De fruits et de graines comestibles du monde entier. Edition Brigitte Peyrot Poos, Paris, La voisier SAS.PP. 186-195.
- [73] BLANCKE R., (2001). Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
- [74] Springer-verlag France. (2014). Citrus limon(L) Burm. F(Rutacées) citronniers. Enseignement de phytothérapie. Paris-9017 Bobigny ce de x : 01.
- [75] BARDEAU F., (2009). Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editions Lenore, 315.
- [76] Bousbia N : Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires, Autre. Université d'Avignon, 2011. Français. NNT : 2011AVIG0243.
- [77] VALNET J., (2001). La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. France, 411.
- [78] Himed, L. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon.
- [79] Kehal, F. (2013). Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche.
- [80] Atrous F, et Manzrze Y., (2015). Contribution à l'étude phytochimique et biologique des flavonoïdes chez l'espèce Citrus limon et évaluation de leur pouvoir anti bactérien, Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine.
- [81] Boukabaache M., et Boudjefdjouf F.Z., (2016). Extraction, identification de l'huile essentielle par CPG-SM l'espèce Citrus limon et mise en evidence de son activité antibactérienne (Fabrication du parfum). Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- [82] Saadoune Z., et Meguenni F., (2016). Impact de la composition des huiles essentielles de Citrus sinensis (Orange) et Citrus limonum (Citron) sur l'activité microbiologique. Mémoire de Master, Université des Blida 1.
- [83] Himed Merniz, L., & Barkat, M. Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (Citrus limon) (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).
- [84] Robert A. et Lobstein A., (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- [85] Google map, 2020.

- [86] Peyron L. et Richard H., 1992. Extraction des épices et herbes aromatiques et différents types d'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris. 108p.
- [87] Bourgou, S., Rahali, F., Ourghemmi, I., & Saidani Tounsi, M. (2012). Modifications de la composition en huile essentielle de zeste de quatre agrumes tunisiens au cours de la maturation des fruits. *Scientific World Journal*.
- [88] Chanthaphon, S., S. C. (2008). Original Article Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin J. Sci.*, 125-131.
- [89] AFNOR NF ISO280 (T75-112). (1999). Huiles essentielles-. Détermination de l'indice de réfraction (homologuée le 5 septembre 1994). Journal officiel du 23 février 199, Num. 147 : Avis relatifs à l'homologation et à l'annulation de normes. NOR : ECOI9910009V.
- [90] ATTOU Amina, (2017). Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent) Etude de Leurs Activités Antioxydante et Antimicrobienne, thèse de Doctorat en Biologie, Université Abou Bekr Bellkaid Tlemcen.
- [91] Yahyaoui (2005). Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de Menthe Spicata L sur *Rhyzoperludominicu* (F.) (Coleoptera, Bostrychidae) et *Tribolium confusum* (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae). Thèse de Magister en science. Agronomiques, option Ecologie. INA. (El-Harrach).
- [92] AFNOR. (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles ». Vol. Tome 2, paris.
- [93] Jean-Pierre Noudogbessi<sup>1</sup>, Dansou Kossou<sup>2</sup>, Dominique C. K. Sohounhloué<sup>1</sup>. (2008). Composition Chimique et Propriétés Physico-Chimiques des Huiles Essentielles de *Pimenta racemosa* (Miller) et de *Chromolaena odorata* (L. Robinson) Acclimatées au Bénin.
- [94] Ben Cheikh Salah Eddine, (2017), Etude de L'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium Polium*ssp *Aurasianum* Labiatae. Thèse De Doctorat, Université Kasbi Merbah (Ouargla).
- [95] Saidi I., (2019). Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des Fabaceae: *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès: extraction des substances bioactives. Thèse de doctorat en Science biologique, Option Enzyme, Microorganismes. et Bio-industries. Université Djillali Liabès – Sid Bel Abbés. pp 4-29.
- [96] BAALI F, (2021). Etude phytochimique et détermination in vitro et in vivo des activités biologiques des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de *Lavandula stoechas* L. et

*Mentha pulegium* L. thèse Doctorat. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arréridj.

[97] Molyneux P., (2004). The use of the stable free radical of Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) for restination antioxidant activity. *songklankarin J.sec technol.* Page 211-219.

[98] Li, H. Y., Hao, Z. B., Wang, X. L., Huang, L., & Li, J. P. (2009). Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource technology*, 100(2), 970-974.

[99] harififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18 : 800–805.

[100] Hubert, (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, École doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, 174p.

[101] Prior R.L., Wu X., Schaich K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302.

[102] Singleton V.L., Rossi J.A.J., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. 16 :144-58.

[103] Prieto P., Pineda M., Aguel A., (1999). Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical biochemistry* 296: 337-341.

[104] Prieto P., Pineda M., et Aguilar M.M., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Anal Biochem.* 269. 337-34.

[105] Pibiri M.C., (2005). « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles ». Thèse de doctorat ès sciences, école polytechnique fédérale de Lausanne. pp : 19-55.

[106] Zaika L.L., (1988). Spices and Herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J of Food Safety.* 9, 97-117.

[107] Aycan M., Yildiz M., Darcin S., Tunc K., Hos A., & Dundar E., (2015). Antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. from Turkey. *American Journal of Life Sciences*, 3(6), 383-386.

- [108] GUINOISEAU E. (2010). Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat à l'université de corse.
- [109] Hamdani F. Z., & Allem R., (2017). Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. *Phytothérapie*, 15(5), 263-266.
- [110] Bourgou S., Rahali F. Z., Ourghemmi I., & Saïdani Tounsi M., (2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*.
- [111] Djenane D., (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4(2), 208-228.
- [112] ZERBANI G., (2020). Caractéristiques physico-chimiques et antimicrobiennes d'un savon additionné à l'huile essentielle du citron (*Citrus limon*) (Doctoral dissertation, جامعة غرداية).
- [113] Kaibi F.Z., Timizar A., (2016). Etude de quelques activités biologiques Antimicrobienne, antioxydant et cicatrisante de deux agrumes « *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* ». Diplôme de Master dissertation, Université Saad Dahlab Blida).
- [114] Hojjati M., & Barzegar H., (2017). Chemical composition and biological activities of lemon (*Citrus limon*) leaf essential oil. *Nutrition and Food Sciences Research*, 4(4), 15-24.
- [115] Ammad F., Moumen O., Gasem A., Othmane S., Hisashi K. N., Zebib B., & Merah O., (2018). The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. *Comptes Rendus Biologies*, 341(2), 97-101.
- [116] Azkiyah L., Yamamoto Y., Ogita S., & Yoshino T., (2021). Chemical composition, anticancer, and antioxidant activities of essential oil obtained from lemon (*Citrus limon*) by-product.
- [117] Flamini G., Pistelli L., Nardoni S., Ebanì V.V., Zinnai A., Mancianti F., Ascricchi R., (2019). Essential oil composition and biological activity of "Pompia", a Sardinian citrus ecotype. *Molecules* 24, 908.
- [118] Luro F., Garcia Neves C., Costantino G., da Silva Gesteira A., Paoli M., Ollitrault P., ... & Gibernau M., (2020). Effect of environmental conditions on the yield of peel and composition of essential oils from citrus cultivated in Bahia (Brazil). and Corsica (France). *Agronomy*, 10(9), 1256.
- [109] Himed, L., Merniz, S., & Barkat, M. (2016). Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation, *Algerian J. Nat. Products*, 4(1), 252-260.

- [120] Hellal Z., (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [121] Hamdan D., Ashour M.L., Mulyaningsih S., El-Shazly A. et Wink M., (2013). Chemical composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus x limon* L. Burm. f.) and their anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Z. Naturforsch*, 68 c: 275 – 284.
- [122] Golmakani M. T., & Moayyedi M., (2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from Citrus limon (Lisbon variety) peel. *Food science & nutrition*, 3(6), 506-518.
- [123] HIMED L., MERNIZ L., BARKAT M., (2016). chemical composition of citrus limon (Eureka variety) essential oil and évaluation of its antioxidant and antibacterial activités extraite par hydrodistillation, *Algerian J. Nat. Products*, 4:1 252-260.
- [124] Hamidi F., Limam F., (2018). Etude phytochimique eT pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron, Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- [125] Wu Z., Li H., Yang Y., Zhan Y. et Tu, D. (2013). Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Ind. Crop Prod*, 46 : 311– 316.
- [126] Ou M-C., Liu Y-H., Sun Y-W. et Chan C-F., (2015). The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9 pages.
- [127] Latrech S., Saadi N., (2013), Activité anti-oxydante et effet sur la peroxydase de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* (pamplemousse), Master, Université Abderrahman MIRA de Bedjaia.
- [128] Haidari, F., Mohammadshahi, M., Zarei, M., & Fathi, M. (2019). Protective effect of citrus lemon on inflammation and adipokine levels in acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55.
- [129] Mohammadian M. A., Mobrami Z., & Sajedi R. H., (2011). Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(3), 203-208.