

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

Faculté des Sciences et Technologies
Département des Génie des Procédés

N d'ordre:

N de série :

Mémoire la fin d'étude vue de l'obtention du diplôme
de

Master

Domaine: Sciences et technologie

Filière: Génie des Procédés

Spécialité: Génie chimie

Par: OUGUELMANE Amel HOUICHITI Rania

Thème

*Etude des activités biologiques d'une plante
aromatique médicinale locale
"Citrus aurantium"*

Soutenu publiquement le : 28/09/2020

Devant le jury:

Yasmina KHANE	MCB	Examinatrice
Kerroumia MOULAI	MAA	Examinatrice
Khaled MANSOURI	MCB	Président
Salah Eddine BENCHEIKH	MCB	Encadreur

Année universitaire: 2019/2020



Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes très **chers** **parents**, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade, mes chères vous été mes source d'inspiration dans ma vie.*

A ma mère qui m'a encouragé durant toute mon étude, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu.

Quelle trouve ici mon amour et mon affection.

A mon père, qui est toujours disponible pour nous et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

*A mes chères frère **Mohammed, Boubaker et Abdou**, et ma sœur **Ikram**, et ma défunte sœur **Aïcha**, mes frères vous été la source de joie et de bonheur que j'adore et je leur Souhaite la réussite dans leur vie.*

*A ma grand-mère **Mesouda**, la source d'espoir de vie motivation.*

A mon fiancé Redouane.

A toute ma famille.

*A Mr. **BENCHEIKH-Salah-Eddine***

A toutes mes amis de ma promotion, particulièrement à Rania, chère amie avant d'être binôme.

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

Amel



Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes très **chers parents**, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade, mes chères vous été mes source d'inspiration dans ma vie.*

A ma mère qui m'a encouragé durant toute mon étude, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu.

Quelle trouve ici mon amour et mon affection.

A mon père, qui est toujours disponible pour nous et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

*A mes chères frère **Aymen et Souhaib**, à ma sœur **Feriel**, mes frères vous été la source de joie et de bonheur que j'adore et je leur Souhaite la réussite dans leur vie.*

*A ma grand-mère **Yamina**, la source d'espoir de vie motivation.*

A toute ma famille.

A mon fiancé Kaçem.

*A Mr. **BENCHÉIKH-Salah-Eddine***

A toutes mes amis de ma promotion, particulièrement à Amel, chère amie avant d'être binôme.

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

Rania

Remerciements

D'abord nous remercions «Allah»

*De nous avoir donné le courage, la patience et la volonté
pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre plus grande reconnaissance à nos
parents qui ont pu nous transmettre des valeurs
éducatives et familiales dénuées de tout jugement et qui
font ce qui nous sommes devenu aujourd'hui.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier très
chaleureusement notre encadreur Dr. **BENCHAIKA**
Salah Eddine, pour l'honneur qu'il nous a fait en nous
encadrant. Pour son accueil, son attention et sa
gentillesse, son aide durant toute la période de travail.*

*On tient à remercier chaleureusement Mr. Aouf.J et
Mm. Imane les responsables de laboratoire de génie des
procédés.*

*A travers ce modeste travail, on tient à remercier
l'ensemble des enseignants qui ont contribué de près ou
de loin à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces
lignes l'expression de notre grande reconnaissance.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les
personnes qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.*

ملخص:

هذا العمل هو جزء من تتمين الحمضيات في الجزائر والمعروفة بخصائصها العلاجية، نحن نهتم بدراسة جزأين من البرتقال المر (*Citrus aurantium*) هما الثمار والأوراق.

ويكسر هذا العمل من ناحيتين أولاً، استخراج الزيوت العطرية، بهدف دراسة الأنشطة البيولوجية بما في ذلك النشاط المضاد للبكتيريا والنشاط المضاد للأكسدة للزيوت العطرية للنبات الطبية (*Citrus aurantium*) ، ومن الناحية الأخرى لإبراز أنشطتها.

تم استخراج الزيوت الأساسية للنبات بواسطة تقنية التقطير بالبخار. مردود الاستخراج الناتج 3.41% بالنسبة للثمار و0.70% بالنسبة للأوراق في 100 غرام للنبات المدروس. الأنشطة البيولوجية تمت ضد خمسة أنواع من البكتيريا *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *streptococque*,

Pseudomonas, *Klebsiella pneumonia* هي أكثر حساسية لتثبيط بمساحة قطرها 19 مم و 18 مم للأوراق ، من ناحية أخرى فان أفضل نشاط لوحظ في مستخلص الثمار ضد *Pseudomonas* ، بمساحة قطرها 12مم و 10 مم للأوراق ، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيت العطري باستخدام

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) و النتائج كالآتي $IC_{50} = 0.353 \pm 67.1147$: ميكروغرام / مل للثمار $IC_{50} = 0.029 \pm 2.0589$ ميكروغرام / مل للأوراق.

الكلمات المفتاحية:

البرتقال المر ، الزيوت الأساسية ، *Citrus aurantium* ، الفعالية ضد البكتيريا ، الفعالية ضد الأكسدة ، التقطير بالبخار.

Abstract :

This work is part of the evaluation of citrus fruits found in Algeria and the knowledge of their therapeutic properties. We are interested in studying two parts of the bitter orange (*Citrus aurantium*) which are: the fruit and the leaves.

The present work is devoted, on the one hand, to the extraction of essential oils, in order to study the biological activities including the antibacterial activity and the antioxidant activity of the essential oils of the medicinal plant *Citrus aurantium*, and on the other hand to highlight these activities.

We proceeded to extract the essential oils by the technique of hydro-distillation, which gives a good result of yield (3.41%) for the fruits and (0.70%) for the leaves in 100g of plant studied. The antibacterial activity, was tested against five bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Streptococcus*.

Pseudomonas, *Klebsiella pneumoniae* is the most sensitive of 19 mm and 18 mm diameter of inhibition for the leaves on the other hand the best activity marked by the fruit extract against *Pseudomonas*, *Staphylococcus* of diameter of inhibition 12 mm and 10 mm. The antioxidant activity of the essential oil was evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) the results give: IC_{50} of 67.1147 ± 0.353 $\mu\text{g/ml}$ for peel and IC_{50} of 2.0589 ± 0.029 $\mu\text{g/ml}$ for leaves.

Key Words:

Bitter orange, *Citrus aurantium*, Essential oil, Antibacterial activity, Antioxidant activity, Hydro-distillation.

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation des agrumes trouvées en Algérie et de la connaissance de leurs propriétés thérapeutiques. Nous sommes intéressés à étudier deux parties de l'orange amer (*Citrus aurantium*) qui sont : les fruits et les feuilles.

Le présent travail est consacré d'une part, l'extraction des huiles essentielles, afin d'étudier les activités biologiques dont l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante des huiles essentielles de la plante médicinale *citrus aurantium*, et de l'autre part de mettre en évidence ces activités.

Nous avons procédé l'extraction des huiles essentielles par la technique d'hydro-distillation qui donnée un bon résultat de rendement (3.41%) pour les fruits et (0.70%) pour les feuilles dans 100g de plante étudiée. L'activité antibactérienne, a été dosée contre cinq bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *streptocoque*.

Pseudomonas, *Klebsiella pneumonia* est le plus sensible de 19 mm et 18 mm de diamètre d'inhibition pour les feuilles par contre la meilleure activité marquée par l'extrait de fruit contre *Pseudomonas*, *staphylococcus* de diamètre d'inhibition 12 mm et 10 mm. L'activité antioxydante de l'huile essentielle a été évaluée en utilisant 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) les résultats donnent : IC₅₀ de 67.1147±0.353 µg/ml pour les fruits et IC₅₀ de 2.0589±0.029 µg/ml pour les feuilles.

Mots Clé :

Orange amer, *Citrus aurantium*, Huile essentielle, Activité antibactérienne, Activité antioxydante, Hydro-distillation.

Liste des figures :

Figures	Titres	Pages
Figure I.1	Modes d'extraction des huiles essentielles	10
Figure I.2	L'hydro-distillation	11
Figure II.3	Photo du bigaradier (orange amère)	17
Figure II.4	L'orange amer	18
Figure II.5	Coupe transversale d'une orange	19
Figure II.6	La feuille du bigaradier	20
Figure II.7	Répartition géographique de l'oranger amer et l'oranger doux	24
Figure III.8	Organigramme général de la partie expérimental	29
Figure III.9	les feuilles et les zestes d'orange amer	30
Figure III.10	L'opération d'hydro-distillation	32
Figure III.11	Un réfractomètre	34
Figure III.12	Matériels utilisée pour l'indice d'acide	36
Figure III.13	Densimètre	37
Figure III.14	pH-mètre	38
Figure III.15	L'activité antibactérienne des HE	40
Figure III.16	L'eau physiologie	42
Figure III.17	Les bactéries <i>pseudomonas</i> et <i>streptocoque</i>	42
Figure III.18	La suspension des bactéries	42
Figure III.19	L'application des disques	43
Figure III.20	L'appareil d'agitation	44
Figure III.21	L'appareil d'UV	44
Figure IV.22	Rendement d'extraction des feuilles, fruits du bigaradier	47
Figure IV.23	aspect et couleur de <i>Citrus aurantium</i>	48
Figure IV.24	l'activé anti-oxydante d'huile essentielle des fruits du bigaradier.	51

Figure IV.25	l'activité anti-oxydante d'huile essentielle des feuilles du bigaradier.	52
Figure IV.26	l'activité antibactérienne des huiles essentielles.	53

Liste des tableaux :

Tableaux	Titres	Pages
Tableau II.1	Description de <i>citrus aurantium</i>	20
Tableau II.2	Position systématique du bigaradier	22
Tableau IV.3	Les paramètres organoleptiques d'huile essentielle du bigaradier	48
Tableau IV.4	Analyses physico-chimiques d'HE de <i>citrus aurantium</i> .	49
Tableau IV.5	Activité antioxydant par la méthode de DPPH	50
Tableau IV.6	Activité antibactérienne des huiles essentielles d'orange amer.	53
Tableau IV.7	Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.	53

Abréviations :

HE :	Huile essentielle.
JC :	Avant Jésus-Christ
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
AFNOR/ISO :	Association Française de la Normalisation/ International Organization for Standardization
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
ERN :	Espèces Réactives de l'Azote
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
UV :	Ultra-violet
IC50 :	Concentration donnant 50% d'inhibition

Sommaire :

I .Liste des tableaux	I
II .Liste des figures	II
III .Liste des abréviations	III

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

Partie bibliographique

Chapitre I : les huiles essentielles

Préambule	3
I.Historique	3
I.1.Définition des huiles essentielles	4
I.2. Propriété des huiles essentielles	5
I.3. Localisation des huiles essentielles	6
I.4. Répartition et localisation des huiles essentielles	7
I.5.Composition chimique	7
I.5.1. Les Terpénoïdes : $(C_5H_8)_n$	8
I.5.2.Les composés aromatiques	8
I.5.3.Les composés d'origine diverses	9
I.6.Technique d'extraction des huiles essentielles	9
I.6.1.hydrodistillation	10
I.6.2.La distillation à la vapeur saturée	11
I.6.3Extraction par les solvants organiques	12
I.6.4. Extraction au gaz CO ₂ supercritique	12
I.6.5.Extraction assisté par micro-ondes ou ultrasons	12
I.6.6.L'extraction sans solvant assisté par micro-onde	13
I.6.7.Extraction par ultrasons	13
I.6.8.Extraction par incision	13
I.6.9.Extraction en enfleurage	13
I.6.10.Extraction par expression	14
I.7. Activité biologique des huiles essentielles	14
I.7.1.Activité antioxydante	14
I.7.1.1.Les radicaux libres	14

I.7.2. Activité antibactérienne	15
I.7.3. Activité antifongique	15

Chapitre II : Étude botanique sur l'espèce végétale

Préambule	16
II.1. Généralité sur le bigaradier	16
II.2. Description botanique	17
II.2.1. Présentation de la famille des <i>Rutacées</i>	17
II.2.2. L'orange amer (<i>Citrus aurantium</i>)	18
a) Le fruit	18
b) La feuille	19
II.3. Morphologie	21
II.3.1. Épicarpe ou flavédo	21
II.3.2. Mésocarpe ou albédo	21
II.3.3. Endocarpe ou pulpe	21
II.4. Classification botanique	22
II.5. Distribution géographique	22
II.6. Les domaines d'utilisations de l'orange amer	24
II.6.1. Le domaine pharmaceutique	24
II.6.2. Les domaines de la parfumerie et de la cosmétique	25
II.6.3. Le domaine agro-alimentaire	25
a) Utilisation en confiserie-pâtisserie	25
b) Utilisation comme aromatisant	25
II.7. Les propriétés biologiques de l'orange amer	26
a) Activité veinotonique – vasculoprotectrice	26
b) Activité antimicrobienne	27

Chapitre III : matériels et les méthodes

III.1. L'objectif	28
III.2. Matériel	30
III.2.1. Matière végétale	30
III.2.2. Matériel biologique	30
III.3. Extraction de l'huile essentielle	31
III.3.1. Matériels et les produits	31

III.3.2. Protocole d'expérience	31
III.4-Caractérisation des huiles essentielles	33
III.4.1-Analyse physico chimique	33
III.4.1.1-le rendement	33
III.4.1.2. Indice de réfraction	33
III.4.1.3. Matériels et les produits	33
III.4.1.3. L'indice d'acide	35
III.4.1.3.1. Définition	35
III.4.1.3.2. Principe :	35
III.4.1.3.3. Matériels et les produits	35
III.4.1.3.4. Protocole d'expérience	36
III.4.1.4. Variation de la densité	37
III.4.1.4.1. Matériels et les produits	37
III.4.1.5. Potentiel d'hydrogène (pH)	38
III.5. Activités biologiques	39
III.5.1. Activité antibactérienne	39
III.5.2. Matériel et les produits	39
III.5.1.1. Souches bactériennes	40
III.5.1.2. Tests d'activités antimicrobiennes	40
a-Préparation zone stérile	40
b-Préparation des disques	41
c-Réalisation d'une suspension	41
d-Ensemencement	42
e-Application des disques	43
III.6. L'activité antioxydante	43
III.6.2. Matériels et les produits	43
III.6.2. Le protocole d'expérience	44
a-Préparation DPPH	45
b-Détermination du pourcentage d'inhibition du DPPH	45
Chapitre IV : Résultats et discussions	
IV.1. Rendement d'extraction	46
IV.2. Paramètres physico-chimique et organoleptiques	47

IV.2.1. Caractéristiques organoleptiques	47
IV.2.2. Caractéristiques physico-chimique	49
IV.3. Activités biologiques	50
IV.3.1. Activité antioxydant	50
IV.3.1.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	50
IV.3.2. Activité antibactérienne	53
Conclusion	56

Introduction générale

Introduction générale

L'Algérie détient une collection variétale composée de 256 variétés d'agrumes, ce qui représente un patrimoine génétique inestimable. [1] Parmi ces agrumes se trouve l'orange amère, qui possède de nombreuses propriétés et utilisations dans différents domaines.

Depuis des milliers d'années, l'oranger amer est utilisé comme un aliment et comme une plante médicinale.

Le bigaradier est appartenant à la famille de *Rutacées*, vive dans des régions tropicales d'Asie cet arbre cultivé dans toutes les zones tropicales et subtropicales. Le bigaradier (*Citrus aurantium*) est l'une des espèces des agrumes qui sont considérés comme les fruits les plus importants dans le monde ; ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus. La consommation des agrumes est associée à la réduction de l'apparition de plusieurs maladies. Les effets bénéfiques de ces fruits sont souvent attribués à la présence des composés bioactifs (la vitamine C, les composés phénoliques,...) qui préviennent l'oxydation des molécules biologiques, par inhibition des radicaux libres. [2]

En ce moment le monde recour à la recherche des plantes naturelles à utiliser dans divers domaines pour bénéficier de leurs bienfaits médicaux. Nous avons constaté, après les recherches et études menées sur l'orange amère, qu'elle présente de nombreux avantages car elle a été utilisée dans de nombreux domaines tels que la médecine, l'alimentation, la cosmétique, etc. Parce qu'il contient plus de vitamine C, de vitamine B, de vitamine B que de glycosides flavoniques.

Cette étude est une tentative d'explorer le pouvoir des huiles essentielles des différentes parties de l'orange amère (feuilles, fruits), comme une source naturelle d'antioxydants. Et d'estimer également leur activité antimicrobienne, vis-à-vis de certains germes pathogènes tels qu'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, ...

Introduction générale

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

- ❖ Le premier chapitre passe en revue en généraliste sur les huiles essentielles et les différentes techniques d'extraction ;
- ❖ Le deuxième chapitre explique la description botanique de l'espèce étudiée (bigaradier) ;
- ❖ Le troisième chapitre s'articule à la méthode et matériel utilisée, tel que :
 - L'extraction de l'huile essentielle d'espèce végétale étudiée l'oranger amer ;
 - L'analyse physico-chimique ;
 - L'analyse physico-chimiques et l'activité biologique (tests antibactériennes, test anti-oxydantes par la méthode de DPPH) ;
- ❖ Le quatrième chapitre présente les résultats et discussion (interprétation scientifique de résultat) ;

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

Chapitre I : Huiles essentielles

Préambule :

L'huile essentielle converge sur le fait que les huiles essentielles, communément appelées «essences», sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes odorants volatils contenus dans les végétaux. Elles diffèrent des huiles fixes « huile d'olive,... » et des graisses végétales par leur caractères volatil ainsi que leur composition chimique. [3]

Ces essences végétales sont largement distribuée dans le règne végétal et n'existant que chez les végétaux supérieurs. En effet, elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 3000 espèces réparties en 60 familles botaniques comme par exemple chez les lamiacées (lavande, basilic, menthe,...), les myrtacées (eucalyptus,...), les lauracées (cannelle et sassafras),...et les apiacées (coriandre, cumin, fenouil, persil,...). [4]

Les huiles essentielles se trouvent dans tous les organes de la plante : racines, fruits, grains, fleurs, feuilles, écorces, bois, etc..., elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent regroupées en canaux ou en poches sécréteurs et elles sont ensuite transportées dans les différentes parties de la plante, lors de la croissance de cette dernière.

Ces huiles sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, très odorantes, volatiles, souvent colorées. [5]

I.Historique :

De tous temps, en tous lieux, notamment dans les pays tropicaux, les plantes aromatiques ont joué des rôles primordiaux.

D'abord utilisées à l'état brut, puis infusées, digérées, sous forme d'onguent, de parfum, d'extraits alcooliques, elles ont toujours eu une place prépondérante dans la culture de nombreux peuples à travers les âges, que ce soit sur le plan religieux, ou médical.

Il y a plus de 7000 ans en Inde, les « eaux aromatiques » étaient déjà largement employées dans le traitement des troubles de la santé. Le sous-continent indien est le berceau de bien des

plantes aromatiques, dont le basilic, qui était sacré (*Ocimum sanctum*), et elles occupaient une large place au cours des sacrifices religieux, autant que pour soigner le corps et l'esprit. [5]

Reconnues pour leur puissantes propriétés thérapeutique et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (Khella, pin, fenouil...) en Egypte, en Grèce, en Amérique (Azèques, Mayas, Incas : bois de Ho, sassafras) et en Afrique (encens, myrrhe, ravensare), les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age.

A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque. [3]

Les premières traces d'utilisation des HE en tant que telles nous viennent d'Egypte, entre 3000 et 2000 ans avant JC [6]. En effet, à cette période il semble qu'une forme rudimentaire de distillation soit employée pour extraire la substance des plantes aromatiques.

Vers 1700 avant JC, le papyrus Edwin Smith, attribué à Imhotep, indique des recettes se rapprochant de l'aromathérapie moderne. [7]

Ce sont les Perses qui sont considérés comme les inventeurs de la distillation, technique qui a été perfectionnée par les Arabes, qui l'employaient plutôt à des fins de parfumerie que thérapeutiques. [5]

I.1 . Définition des huiles essentielles :

Le terme « huile essentielle » est défini à la fois par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) pour les usages pharmaceutiques et cosmétiques et par l'AFNOR/ISO pour les usages aromatiques et alimentaires. [8]

L'AFNOR (Association française de la normalisation) définit l'huile essentielle comme : produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécanique, l'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physique. [10],[9]

Selon la Commission de la Pharmacopée européenne (2008) définit l'huile essentielle comme : Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une

matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage.

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. [8]

Les huiles essentielles HE aussi appelées huiles volatiles, sont des métabolites secondaires produits par les plantes aromatiques pour combattre les infections et les parasites, elles sont synthétisées en réponse à des conditions de stress. [11]

I.2. Propriétés des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des composés volatiles, liquides à température ambiante, limpides et rarement colorées, elles sont douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques, elles sont peu miscibles à l'eau. Elles sont généralement assez solubles dans les solvants organiques (éther, alcools, hexane, pentane,...) très légèrement dans l'eau. Elles sont dissolvant les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels. [13 -12]

Leur densité est en grande majorité inférieure à celle de l'eau. Pour autant quelques HE font exception cette règle. C'est le cas du sassafras, du girofle et de la cannelle. Elles sont incolores ou faiblement colorées en jaune pâle. Mais, il existe des colorées : cannelle (orange) absinthe (vert) et camomille (bleu). [14-15]

Elles sont huileuses, mais non grasses et s'évaporent facilement. Chaque HE est unique et se caractérise par une odeur, une couleur, une viscosité et des propriétés spécifiques. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. On leur différentes indices chimiques (indice d'acide, d'ester, de carbonyle,...). [16-15]

I.3. Localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées, être stockées dans tous les organes végétaux : [8]

➤ les **feuilles** : eucalyptus, citronnelle, laurier noble...

- les **fleurs** : camomille, lavande...
- les **zestes** : citron, orange, bergamote...

- le **bois** : bois de rose, santal...
- l'**écorce** : cannelle...
- la **racine** : vétiver...
- les **fruits** : anis, badiane...
- les **rhizomes** : curcuma, gingembre...
- les **graines** : muscade...

Si tous les organes d'une même espèce renferment une huile essentielle, la composition de celle-ci peut varier selon sa localisation. [17]

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiquement spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. On retrouve par exemple :

- les cellules à huiles essentielles : chez *les Lauracées* et *les Zingiberacées* ;
- les poils sécréteurs : chez *les Lamiacées* ;
- les poches sécrétrices : chez *les Myrtacées* et *les Rutacées* ;
- les canaux sécréteurs : chez *les Apiacées* et *les Astéracées*. [8]

Ainsi, dans le cas de l'oranger amer, le principe frais du fruit (Zeste) fournit l'huile essentielle d'orange amer ; la fleur fournit l'essence de néroli et l'hydrodistillation de la feuille des ramilles et des petits fruits conduit à l'essence de petit grain bigaradier la composition de ces trois huiles essentielles est différente. [17]

I.4. Répartition et la fonction des huiles essentielles dans la plante : [14,18]

L'existence des HE dans les végétaux même si leur fonction n'est pas toujours précisément connue, répondrait aux besoins d'une protection spécifique des espèces en fonction de leur environnement.

- Les plantes étant immobiles, elles auraient développé les HE pour constituer une défense chimique contre les micro-organismes. Elles repoussent les parasites et protègent la plante de certaines maladies grâce à leurs propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes ou insectifuges ;

- Elles se défendent également contre les autres plantes. Par exemple, *Erica cinerea*, la bruyère cendrée diffuse des substances téléttoxiques afin d'éviter la pousse d'autres végétaux à proximité. (Une lande de bruyère ne comporte aucune autre végétation).

- Elles attirent au contraire les insectes pollinisateurs (fleurs parfumées, fécondées par certains insectes butineurs) et permettent ainsi à la plante d'assurer sa reproduction ;

- Elles aideraient à guérir blessures et attaques diverses auxquelles sont soumises les plantes ;

- Elles remplissent une action de protection contre les brûlures solaires ;

- Elles pourraient permettre aux plantes de communiquer entre elles. Par exemple, une plante attaquée par un herbivore pourrait envoyer des signaux d'alerte (substances volatiles comme hexénal ou l'ocimène) aux autres plantes du secteur, pour lesquelles déclenchent des mécanismes de défense ;

- Elles représentent une réserve d'énergie mobilisable (ex. : en cas de conditions climatiques défavorables).

I.5. Composition chimique :

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction. [12]

Selon Bruneton, les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables, des constituants qui appartiennent de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : [17,19]

- Composés terpéniques ;
- Composés aromatiques ;
- Les composés d'origine diverses.

I.5.1. Les Terpénoïdes : (C₅H₈)_n

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (ex : l'essence de Térébenthine) dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés. Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces composés oxygénés, on note d'alcools (géraniol, linalol), d'esters (acétate de linalyle), d'aldéhydes (menthone, camphre, thuyone), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes. [20-21]

Les huiles essentielles sont constituées des terpènes les plus volatils : [19]

- Monoterpènes à C10 : ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent + 90% des HE, Plusieurs variations structurales existent telle que : alcools, aldéhydes, cétones, phénols...
- Sesquiterpènes à C15 : Les plus répons sont les carbures, les alcools et les cétones.

I.5.2. Composés aromatiques :

Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes, ils sont classés selon la nature des fonctions qu'ils portent (acides, aldéhydes, phénols...).

La plus part des constituants sont d'origine terpénique ; seul un petit nombre HE sont constituées majoritairement de composés aromatiques (HE de cannelle et de girofle).

Parmi les constituants très nombreux des huiles essentielles l'un domine généralement : HE de badiane et d'anis renferment 95% d'anéthol. [19]

I.5.3. Les composés d'origine diverses : [23-22]

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînable lors de l'hydro-distillation, on peut citer :

- Les carbures linéaires et ramifiés, saturés ou non ;

- Les acides de C3 à C10 : ce sont les composés les plus anti-inflammatoires du règne végétal ; ils sont hypothermisants, hypotenseurs ;
- Les alcools ;
- Les aldéhydes ;
- Les esters acycliques ;
- Les lactones : elles agissent avec effet hypo-thermisants, et ont une action fongicide plus puissante que celle des cétones ;

Dans les concrètes, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante, non entraînés à la vapeur d'eau, tels que :

- Les homologues des phényles propanes ;
- Les diterpènes ;
- Les coumarines : neuro-sédatives, anticoagulantes.

I.6. Technique d'extraction des huiles essentielles :

Le choix d'une technique d'extraction doit être adapté aux composés spécifiquement recherchés ; en principe cela ne dépend pas du type d'organe utilisé : feuille, fleur, bois, graine ou fruit, racine ou rhizome, à l'état frais ou à l'état sec, car ils peuvent être traités par différents modes d'extraction tels que distillation, expression, enfleurage ou incision ou plus récents : extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons.

La méthode dépend du type de produit souhaité, ou de la nature chimique des molécules recherchées.

La distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre. La figure 1 regroupe les différentes voies d'extraction des huiles essentielles. [24]

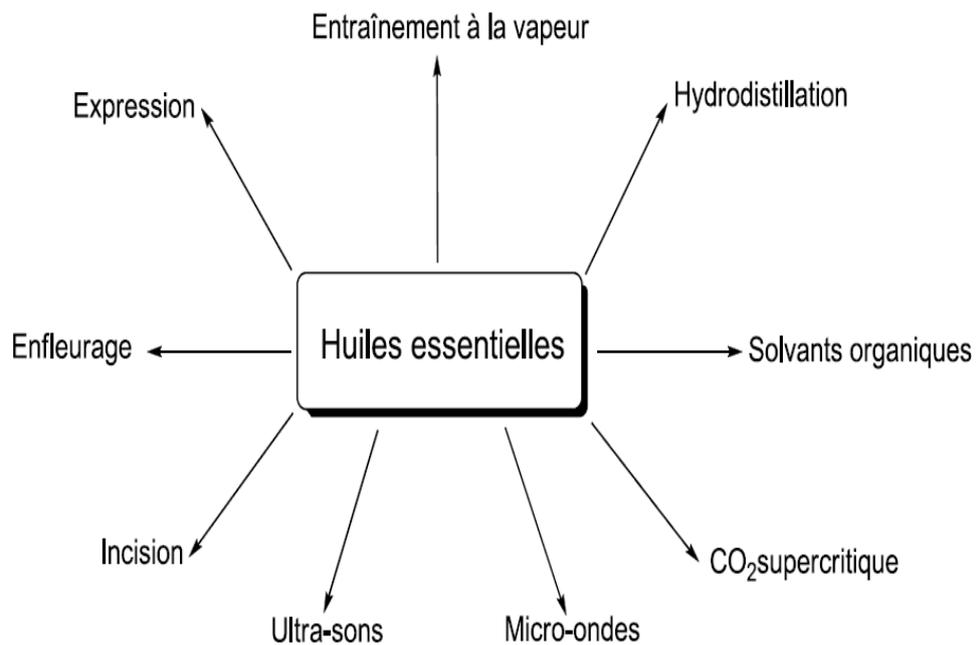


Figure I.1 : Modes d'extraction des huiles essentielles. [4]

I.6.1. Hydrodistillation :

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation est réalisée par 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 un bécher. [25]

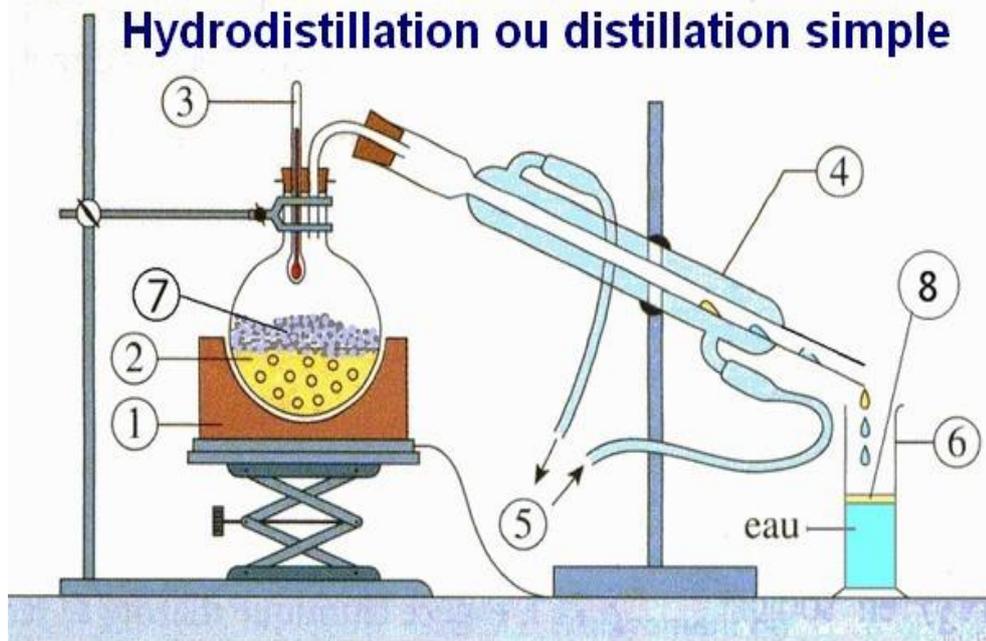


Figure I.2 : L'hydrodistillation

- 1 : Chauffe-ballon, 2 : Eau bouillante, 3 : Thermomètre, 4 : Réfrigérant a eau
5 : Arrivée d'eau froide et Sortie d'eau tiédie
6 : Essencier, 7 : Végétal, 8 : Huile Essentielle. [5]

I.6.2.La distillation à la vapeur saturée :

Distillation à la vapeur saturée : «vapo-hydrodistillation» : c'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques. [26]

Dans cette variante, 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. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées. [27]

I.6.3.Extraction par les solvants organiques :

C'est un procédé industriel et plus complexe que le précédent. Il permet une extraction sélective des huiles essentielles. Le produit final sera moins raffiné (extraction à contact simple) et contiendra parfois des traces de solvant. [15]

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. [28]

I.6.4.Extraction au gaz CO₂ supercritique :

La 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. [29]

À l'état supercritique (plus de 74 bar et de 31°C) le CO₂ possède des propriétés très particulières : une grande diffusivité, comme celle d'un gaz, et une densité élevée, permettant une capacité d'extraction et de transport importante. [30]

I.6.5.Distillation assistée par micro-ondes ou ultrasons :

Ces techniques récentes offrent plusieurs avantages significatifs par rapport aux techniques classiques. En effet, elles nécessitent un volume moindre de solvant et un temps de

chauffage réduit ce qui évite la perte et la dégradation des composés volatils et thermosensibles. Ainsi, elles conduisent à des rendements plus élevés. [4]

I.6.6.L'extraction sans solvant assisté 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. [31]

I.6.7.Extraction par ultrasons :

Le matériel végétal mis en contact avec le solvant (eau ou solvant organique) est immergé dans un bain à sonication maintenu à une agitation constante. [32]

I.6.8.Extraction par incision :

Ce procédé est utilisé très rarement. Il suffit de fendre l'écorce des arbres pour en recueillir le suc comme par exemple le caoutchouc de l'arbre hévéa. [33]

I.6.9.Extraction par enfleurage :

L'enfleurage est une technique assez difficile. Elle date de l'antiquité égyptienne et est basée sur la forte affinité des molécules odorantes pour les graisses. Elle est réservée principalement aux organes fragiles que sont les fleurs (violette, tubéreuse, jasmin...). Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques de verre enduites de graisse qui va absorber les substances volatiles. Ces graisses sont ensuite épuisées à l'alcool. Ce procédé a tendance à disparaître car il nécessite beaucoup de main-d'œuvre. [34]

I.6.10.Extraction par expression :

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]

I.7. Activité biologique des huiles essentielles :**I.7.1. Activité antioxydante :**

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif. [36]

On distingue trois types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques, les enzymes de réparation, et les antioxydants non enzymatiques. Les substances naturelles dont les huiles essentielles sont classées entant qu'antioxydants non enzymatiques.

L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte), cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène. [37]

Par contre, les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs. [38]

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques. [39]

I.7.1.1. Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent, leur durée de vie est

généralement très courte, de l'ordre de 10⁻⁴ secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. [40-41]

L'oxygène (O₂) est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde (O₂^{°-}), puis en peroxyde d'hydrogène (H₂ O₂). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées. [42-43]

Cette appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive, elle inclut les espèces réactives de l'oxygène (ERO), proprement dit, mais aussi certains dérivés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le (H₂ O₂), et les espèces réactives de l'azote (ERN) à savoir le peroxyde d'azote (ONOO⁻). [44-45]

I.7.2. Activité antibactérienne :

C'est l'activité la mieux étudiée par les scientifiques, même s'il est difficile de comparer les résultats publiés du fait de la grande variabilité des HE (Les chémotypes) et de l'absence de protocole de normalisation pour l'évaluation in vitro de leur pouvoir bactéricide.

Pour évaluer le pouvoir anti-infectieux d'une HE, on procède à un aromagramme. Cet examen a été créé en 1971 par le Docteur Girault en reprenant le principe de l'antibiogramme.

C'est un moyen de mesurer in vitro le pouvoir antibactérien des HE. [8]

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs.

I.7.3. Activité antifongique :

Les infections fongiques sont très fréquentes dans notre société. Cette extension est largement favorisée par la prescription de manière abusive des antibiotiques, issus en premier lieu de champignons microscopiques. Les groupes de molécules aromatiques citées comme antibactériens sont également actifs sur les champignons. [8]

Chapitre II : Étude botanique sur l'espèce végétale

Préambule :

L'orange amer, *Citrus aurantium*, cette plante n'est pas utilisée couramment dans l'alimentation et de ce fait moins bien connu. Cependant, il se retrouve dans d'autres domaines tels que l'industrie pharmaceutique. [46]

Le bigaradier (*Citrus aurantium*) est l'une des espèces des agrumes qui sont considérés comme les fruits les plus importants dans le monde, ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus. La consommation des agrumes est associée à la réduction de l'apparition de plusieurs maladies. Les effets bénéfiques de ces fruits sont souvent attribués à la présence des composés bioactifs (la vitamine C, les composés phénoliques, les caroténoïdes...) qui préviennent l'oxydation des molécules biologiques, par inhibition des radicaux libres. [47]

II.1. Généralité sur le bigaradier :

Citrus aurantium (**le bigaradier, l'orange amère ou l'orange de Séville**) est l'un des agrumes appartenant à la famille *Rutacée*, est connue pour son goût extrêmement amer et aigre [48]. Elle se distingue des oranges douces par leurs fruits à peau plus épaisse plus rugueuse et à pulpe acide et amer [49]. En raison de leur goût aigre et amer, les oranges amères ne sont pas employées comme fruits comestibles, elles sont plutôt utilisées pour la fabrication de jus et des marmelades (confitures d'orange). [50]



Figure II.3 : Photo du bigaradier (orange amère). [51]

II.2. Description botanique :

II.2.1. Présentation de la famille des *Rutacées* :

Appartenant à l'ordre des *sapindales*, la famille des *Rutaceae* compte environ 900 espèces réparties en 150 genres. Les espèces sont distribuées et répandues sur presque tous les continents excepté l'Antarctique [52]. Selon Guillaumin (1948), les *Rutaceae* sont des arbres ou arbustes. Les feuilles sont généralement opposées, sans stipule. Les fleurs sont hermaphrodites et les fruits sont des capsules formant une drupe ou une baie. Selon Scora (1988), le nord de l'Inde, les régions proches de la Birmanie et de la Chine, auraient abrité l'existence et l'apparition de *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis*. Le Vietnam, le sud de la Chine et le Japon seraient la zone de diversification de *Citrus reticulata*. [53] La diffusion des *Rutaceae* en particulier les Agrumes à travers le monde s'est fait très lentement. Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduites.

Dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. Leur introduction en Afrique a été faite par les arabes et hindous vers le XIVe siècle. [54]

II.2.2. L'orange amer (*Citrus aurantium*) :

Le bigaradier est un arbrisseau épineux très décoratif de 4 à 5 m de hauteur, qui produit l'orange amère. Il est largement implante. Région méditerranéenne. Son tronc est ramifié et ses feuilles sont vertes brillantes. Ses fleurs blanches sont pourprées et odorantes. Le fruit, plus petit que l'orange, est ovoïde et jaune foncé. [55]



Figure II.4 : l'orange amer.

a) Le fruit : [57-60]

[56]

Le fruit de l'orange amer est une baie globuleuse cloisonnée à peau chagrinée appelée hespéridé ou agrume. Elle peut également prendre le nom de bigaradier.

Cette baie est rouge orangé à maturité, 7 à 8 cm de diamètre, fort aromatique de saveur amère et acide, ce qui la rend impropre à la consommation.

Le fruit est formé de trois parties constituant le péricarpe :

- Épicarpe = épiderme externe

Il est coriace et comporte de nombreuses poches sécrétrices schizolysigènes contenant l'huile essentielle.

Ces poches sont bien visibles à l'œil nu, colorées en jaune par des caroténoïdes. D'une taille variant de 0.4 à 0.6 mm, elles sont réparties de manière irrégulière.

- Mésocarpe = tissu médian

Il forme une couche spongieuse, blanche, mucilagineuse.

Il renferme de grandes schizolysigènes à essence. Il est constitué de cellules parenchymateuses polyédriques dans lesquelles sont présents des cristaux d'oxalate de calcium.

- Endocarpe = épiderme interne.

Il est formé par les carpelles (quartiers du fruit). Il constitue la pulpe du fruit par émission, lorsque le fruit est encore jeune, de poils intra carpellaires renflés, charnus, vésiculeux .

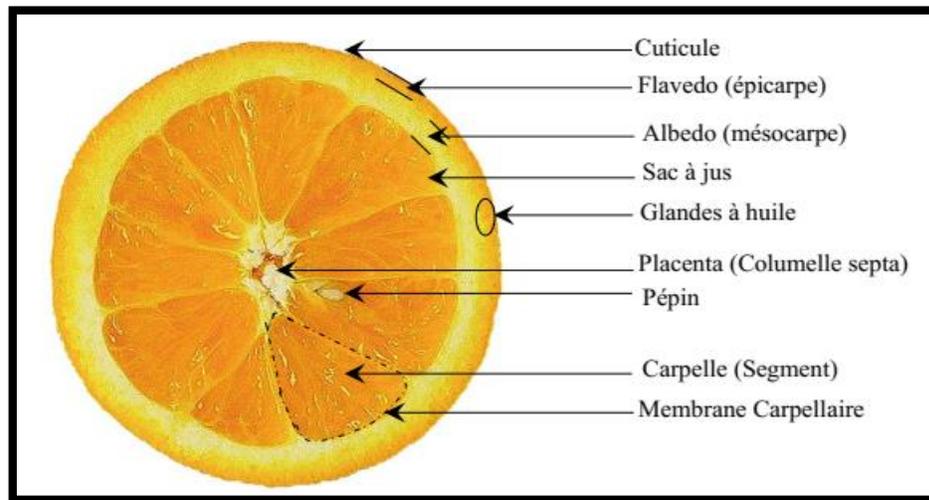


Figure II.5 : Coupe transversale d'une orange. [61]

b) La feuille : [57,58,60]

La feuille du bigaradier est vert brillant, coriace, persistante, simple, à disposition alterne (une feuille par nœud).

Elle est constituée, d'une manière générale d'un limbe (de limbus = coin, rebord) et d'un pétiole (de petiolus = petit pied).

❖ Ces cellules néoformées vont alors se disjoindre et délimiter un méat qui va recevoir les sécrétions aromatiques des cellules qui le bordent. Les cellules du bord externe de la proche vont

se diviser activement tandis que les cellules les plus internes vont se rompre, libérant leur contenu dans le méat. La cavité va donc augmenter de volume et s'enrichir en sécrétion. Ainsi se forme une poche de type schizolysigène (du grec schizein = fendre).

❖ Le pétiole permet l'articulation du limbe à sa base sur la tige. Il mesure 10 à 12 mm de long pour une largeur de 6 à 7 mm due à sa forme ailée-cordiforme (en forme de cœur).

La présence d'un appareil sécréteur rend la feuille fortement odorante après froissement. Elle est de saveur aromatique et amère.

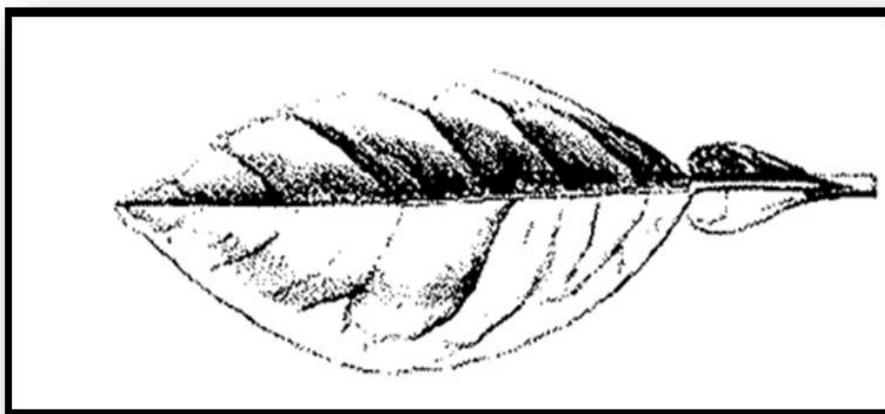


Figure II.6 : la feuille du bigaradier. [57-58,60]

Tableau II.1 : Description de *citrus aurantium*. [62]

Espèce	<i>Citrus aurantium</i>
Non commun	Bigaradier (orange amère)
Taille de l'arbre	5 à 10 m
Couleur de fruit	Rouge, orange
Forme de fruit	Taille moyenne à peau rugueuse, rond ou ovale
La pulpe	Acide et amère
Épines	À court épines

Feuilles	Bien vertes, pointues, fortement ailées
Fleurs	Blanches et très parfumées

II.3. Morphologie :

Les agrumes présentent la même structure anatomique qui comprend trois parties :

II.3.1. Épicarpe ou flavédo :

Est la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jaune orangé ou en rouge. Elle comprend de nombreuses poches sécrétrices d'huile essentielles. [63]

II.3.2. Mésocarpe ou albédo :

Est la couche intérieure blanche et spongieuse et riche en pectines [64]. La combinaison flavédo et albédo est appelée péricarpe, communément connu sous le nom d'écorce ou peau. [65]

II.3.3. Endocarpe ou pulpe :

C'est la partie comestible du fruit, il est composé de segments, recouverts par une membrane mince, distribués autour d'un axe central ayant la même composition que l'albédo. Les segments sont composés de vésicules de jus recouvertes par les membranes plus fines et contiennent les cellules de jus. Pendant que le fruit mûrit, le jus s'accumule dans les vacuoles et occupe la majeure partie du volume des cellules mûres. [66]

II.4. Classification botanique :

D'après la position systématique du bigaradier est comme suite : [66-67]

Tableau II.2 : Position systématique du bigaradier.

Règne	Végétal
Division	Embryophyta
Sous-division	Angiospermes
Classe	Dicotyledoneae
Sous-classe	Archychalmydeae
Ordre	Géraniale
Sous-ordre	Géraniineae
Famille	Rutaceae
Sous-famille	Aurantiodeae
Tribus	Citreae
Sous-tribus	Citrinae
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus aurantium</i>

II.5. Distribution géographique :

C'est le plus résistant des citrus. il sert donc de porte greffe à tous les autres. Les principes pays producteurs sont :

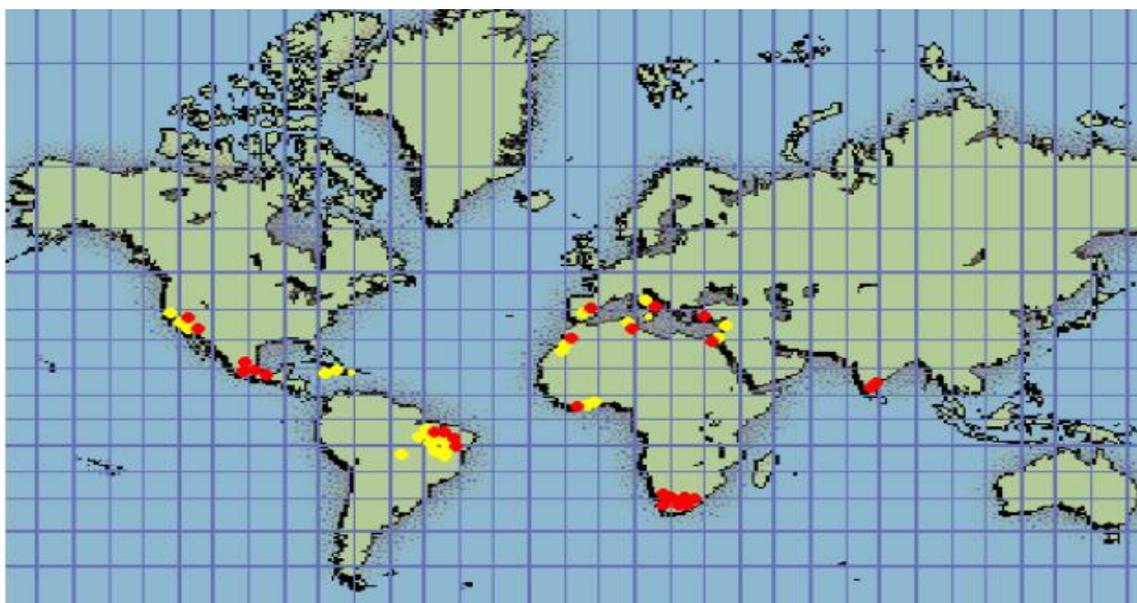
- Italie (en Calabre dans la province de Reggio) ;
- Sicile (provinces de Palerme, Messine, Syracuse) ;
- Espagne (plus particulièrement en Andalousie) ;
- Afrique du Nord (le Maroc, la Tunisie, la cote d'ivoire) ;
- Proche orient (en Israël, au Liban) ;

- La Californie aux États-Unis ;
- Brésil ;
- Les grandes Antilles (la Jamaïque, porte Rico et Haïti) ;
- Paraguay. [68,69]

En France, le bigaradier est cultivé en grand sur le littoral méditerranéen, aux environs de Cannes (Vallauris, le Cannet, golfe Juan), jusqu'à 350-400 mètres d'altitude au pied des contreforts alpins (Vence, Saint-Paul de Vence, Cagnes); dans les régions de Hyères, Toulon et Ollioules; sur le littoral corse, dans la région du Roussillon (de Perpignan jusqu'à Port Vendres). [68]

Les principaux pays exportateurs sont : l'Espagne, le Portugal, l'Israël, la Grèce (Crète) l'ouest de l'Inde. [70] Il se reproduit toujours par semis. [69]

Ainsi, l'oranger amer se cultive en terrasses dans un climat tempéré aux températures douces l'hiver (minimum de -3°C) et chaudes l'été. En effet, il demande un apport relativement faible en eau (2 à 3 arrosages par mois) car son principal facteur de croissance est le soleil. Malgré les conditions de température et d'ensoleillement, le bigaradier n'exige pas un sol particulier, seulement qu'il ne soit pas trop siliceux. [71]



● principaux pays producteur l'oranger amer

● principaux pays producteur l'oranger doux

Figure II.7 : Répartition géographique de l'oranger amer et l'oranger doux. [72]

II.6. Les domaines d'utilisations de l'orange amer :

II.6.1. Le domaine pharmaceutique :

L'oranger amer est inscrit sur la liste des 147 plantes pouvant bénéficier d'une autorisation de mise sur le marché (allégée) pour les médicaments à base des plantes (avis aux fabricants n°90/22bis de 1990) [57] Il fait partie des 34 plantes médicinales qui peuvent être vendues librement ailleurs qu'en pharmacie.

L'utilisation de l'oranger amer dans le domaine pharmaceutique se situe à plusieurs niveaux :

- ✓ Dans certaines préparations officinales (gérée employées de nos jours) en usages traditionnel,
- ✓ En allopathie avec la fabrication de spécialité pharmaceutique,
- ✓ En usage traditionnel également mais dans le domaine de la phytothérapie,
- ✓ Enfin en aromathérapie, discipline à part ou, pour certains, faisant partie de la phytothérapie.

II.6.2. Les domaines de la parfumerie et de la cosmétique :

Dans ces domaines, il s'agit principalement des trois HE du bigaradier et de l'eau de fleur d'oranger. Les HE sont surtout utilisés pour les propriétés olfactives qu'elles confèrent aux parfums et pour leur pouvoir de fixation des molécules odoriférantes.

Notes hespéridé, fraîche, senteurs florale, citronnée, arômes suave, sucré, âpre, léger : la variété des odeurs offre ainsi un vaste choix aux parfumeurs. [73]

II.6.3. Le domaine agro-alimentaire :

a) Utilisation en confiserie-pâtisserie :

L'orange amère peut être utilisée à différents stades de maturité :

- ✓ L'oranger amère mure est utilisée pour confectionner la célèbre confiture d'oranger amère très prisée au Royaume-Uni ou elle porte le nom de marmelade. D'ailleurs, au XIX^{ème} siècle les Écossais importaient la moitié de la production des oranges amères de la côte d'Azur pour la fabrication de leur confiture. [74]

b) Utilisation comme aromatisant :

- ✓ L'écorce d'orange amère est utilisée comme aromatisant dans les pâtisseries sous forme de zestes murs, séchés, moulus dans divers desserts (gâteaux, crèmes, beignets, crêpes). [75]
- ✓ L'eau distillée de fleur d'oranger est aussi utilisée pour aromatiser les desserts. [75]

✓ Les HE extraites du bigaradier sont rarement utilisées dans le domaine alimentaire en raison d'un prix de revient élevé. Cependant, l'HE de *néroli* sert à la fabrication de 2 arômes artificiels :

-arômes artificiel de fraise 10% d'HE de *néroli*.

-arômes artificiel de miel 5% d'HE de *néroli*. [73] [76]

II.7. Les propriétés biologiques de l'orange amer :

a) Activité veinotonique – vasculoprotectrice :

Cette action est due aux flavonoïdes présents dans les 3 orangers principaux de l'oranger amer : fleurs, feuilles, et surtout péricarpes des fruits. Ces flavonoïdes, appelés dans ce cas citro flavonoïdes sont principalement, comme nous l'avons déjà vu, des hétérosides de flavanones :

- Néohespéridine ;
- Naringine ;
- Hespéridine ;
- Ériocitrine ;
- Néoériocitrine.

Mais ces sont également des hétérosides de flavonols (rutine), des hétérosides de flavone (néodiosmine) et des composées flavonoïdiques polyméthoxylés (sinensétine, nobiletine, tangerétine).

Ces molécules sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires et de renforcer leur résistance. Cette notion d'effet vasculoprotecteur est liée historiquement à l'observation que certaines manifestations de scorbut guéries par l'administration de citron ne le sont pas par l'administration de la seule vitamine C. l'hypothèse a donc été émise que l'acide ascorbique devait être associé à un facteur C2 ou P (facteur vitaminique P) pour pouvoir agir. Ce facteur P a été dans un premier temps identifié aux flavonoïdes.

Même si la FDA (Food and Drug Administration) ne reconnaît aucune activité à ces flavonoïdes, et si peu d'importance est accordée à leur valeur thérapeutique il est néanmoins

important de signaler cette action veinotonique- vasculoprotectrice chez l'oranger amer de par la présence importante de flavonoïdes dans cette espèce végétale. [77]

b) Activité antimicrobienne :

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. Pour résister à ces microorganismes, de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut, schématiquement, en distinguer 3 groupes sont : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise. [78]

Le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes. [79]

Les poly phénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire. [80]

Cette activité s'exerce au niveau des fruits de l'oranger amer par l'intermédiaire de l'huile essentielle d'oranger amer que l'on trouve en grande quantité dans la flavedo des fruits. [80]

Chapitre III : Matériels et les méthodes

III.1. L'objectif :

Ce travail se repose sur le protocole expérimentale suivant :

L'extraction de l'huile essentielle d'espèce végétale étudiée- Analyses effectuées sur l'extrait :-
Analyses physico-chimiques

Tests antibactériens :

- Etude de l'activité antibactérienne vis-à-vis de quelques souches bactériennes ;
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI ;
- Tests antioxydants ;
- Tests antifongiques :- Etude de l'activité antifongique ;
- Détermination de la CMI.

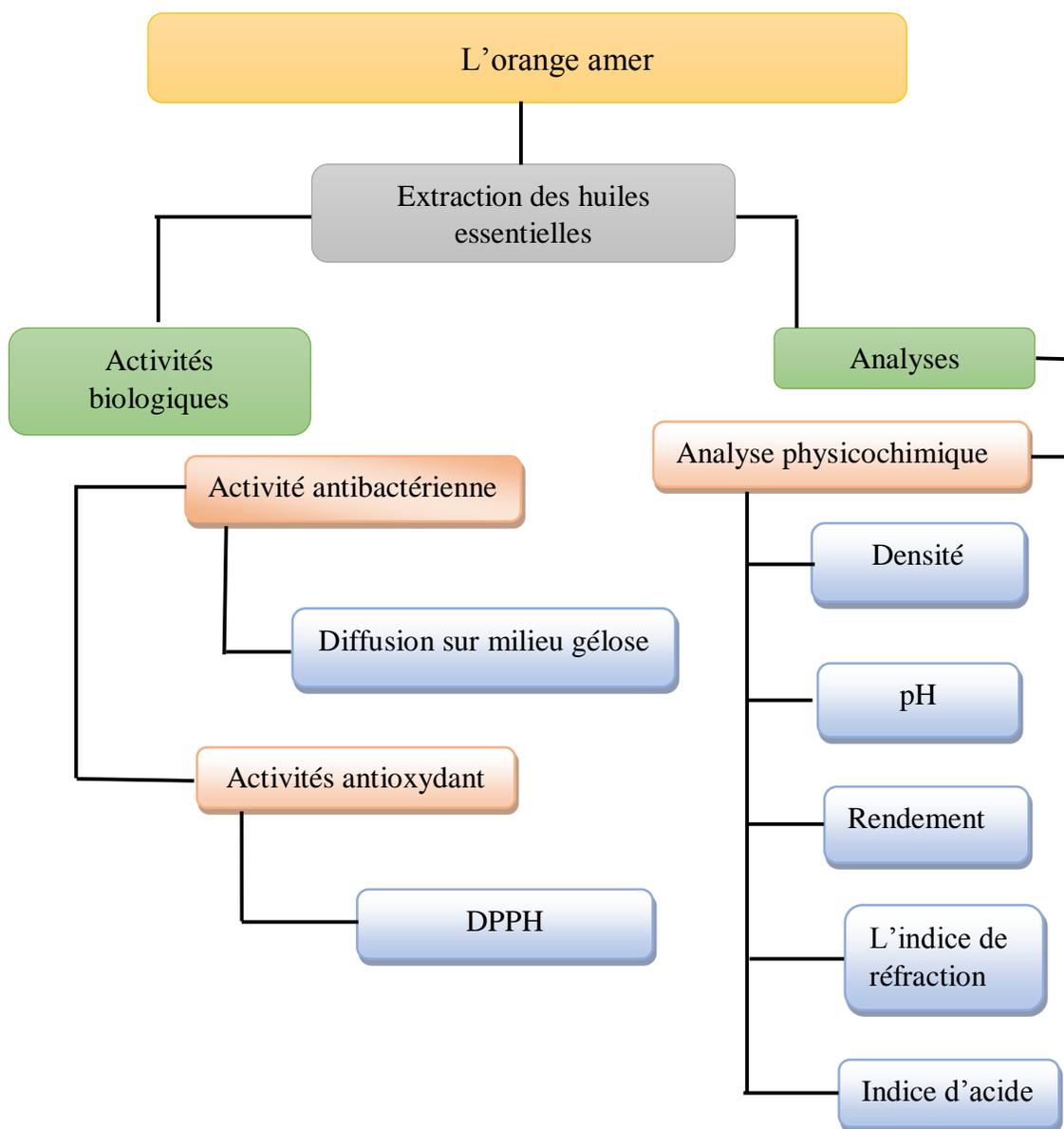


Figure III.8 : Organigramme général de la partie expérimental.

III.2. Matériel :

III.2.1. Matière végétale :

Le matériel végétal est l'orange amer, c'est un grand arbre atteignant de 3 à 5 mètres de haut, sont fruits faites un diamètre de 7cm, et leur écorce dure et une pulpe très acides. Pour les feuilles sont toujours verte et brillant.



Figure III.9 : les feuilles et les zestes d'orange amer

L'orange amer récolté dans la période de la fin de décembre et le début de janvier dans la région de Ghardaïa (le Nord du Sahara algérien) d'un jardin d'hôpital TERICHINE Mustapha. Ensuite le matériel végétal (les fruits et les feuilles) sont coupées en petits morceaux avec un couteau après ont les utilisés dans notre travail.

III.2.2. Matériel biologique :

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'orange amer est évaluée sur 5 souches sauvages bactériennes de référence : *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*,

streptocoque, proviennent du laboratoire des analyses médicales d'hôpital TERICHINE Mustapha (Ghardaïa).

III.3. Extraction de l'huile essentielle :

Nous avons utilisé la technique d'hydrodistillation pour l'extraction d'huile essentielle des fruits et des feuilles.

III.3.1. Matériels et les produits :

- Cette opération est effectuée par le montage d'hydrodistillation ;
- Les feuilles et les fruits d'orange amer ;
- L'eau distillée ;
- L'éthanol pour rincer le montage.

III.3.2. Protocole d'expérience :

L'extraction d'huile essentielle d'orange amer est réalisée par l'hydrodistillation. Un mélange 100g de pulpe d'orange amer et 1600 mL d'eau distillé (pour calculé le rendement) sont chauffés jusqu'à ébullition dans un chauffe ballon. On garder la température à 97°C-98°C.

Le mélange introduit dans un ballon de 2000 ml, relie a un réfrigérant à l'aide d'un coude, une pompe fait circuler une eau froide pour permettre la condensation des vapeurs.

Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes se condensent et chutent dans un puis le distillat obtenue était versé dans une ampoule à décanter et à chaque fois, que cette dernière remplis on élimine de l'hydrolat. L'huile essentielles à faible densité que l'eau et rester sur la surface de cette dernier.

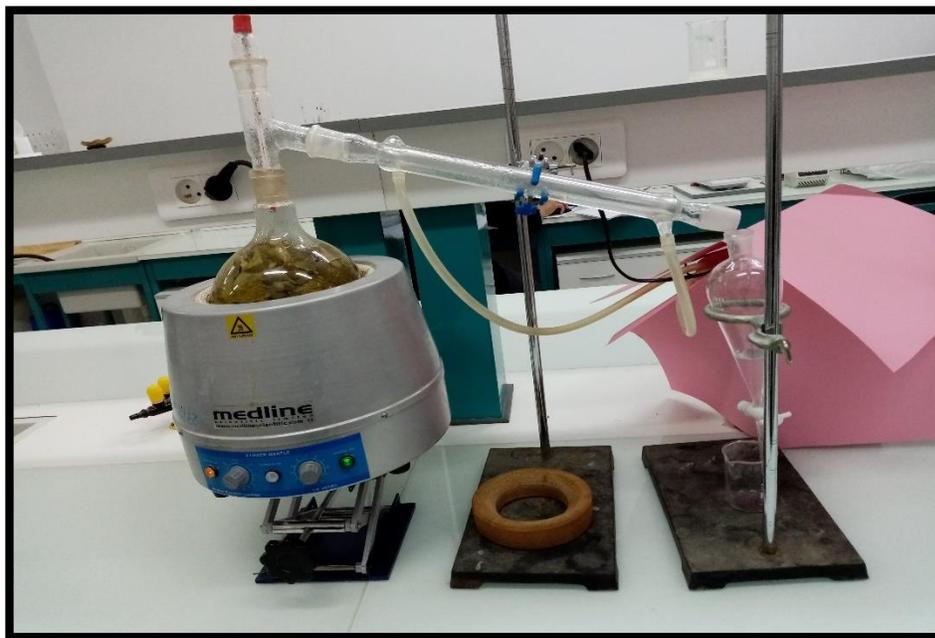


Figure III.10 : l'opération d'hydrodistillation.

Ensuite, en fait la décantation de mélange précédent a séparé en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, en général plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant l'HE situé au-dessus. On récupère l'huile essentielle dans des flacons en verre bien fermé, et conservé dans place opaque à température de 4 à 5°C, pour éviter la dégradation d'huile essentielle. L'opération d'extraction dure deux heures à partir du début d'ébullition, en fait la même opération d'extraction pour les feuilles fraîches (100g de feuilles avec 1L d'eau).

Après nous avons introduit 100g de fruit ou feuille dans le ballon avec 1600ml d'eau distillée les autres étapes sont les mêmes.

III.4-Caractérioration des huiles essentielles :

III.4.1-Analyse physico chimique :

III.4.1.1-le rendement :

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante utilisée (orange amer).Le rendement est exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \text{poids de l'huile essentielle} / \text{poids de la plante} \times 100$$

$$R\% = P_1 / P_2 * 100 \text{ Où } R\%$$

Avec :

R% : rendement de l'huile en pourcentage ;

P₁ : poids de l'huile en g ;

P₂ : poids de plante en g.

III.4.1.2. Indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'une substance est une de ses constantes physiques susceptible de la caractériser au même titre que sa densité ou son point de fusion ou d'ébullition.

III.4.1.3. Matériels et les produits :

- L'appareil de réfractomètre ;
- Micro-seringue ;

- Les huiles essentielles (de feuille et fruits).

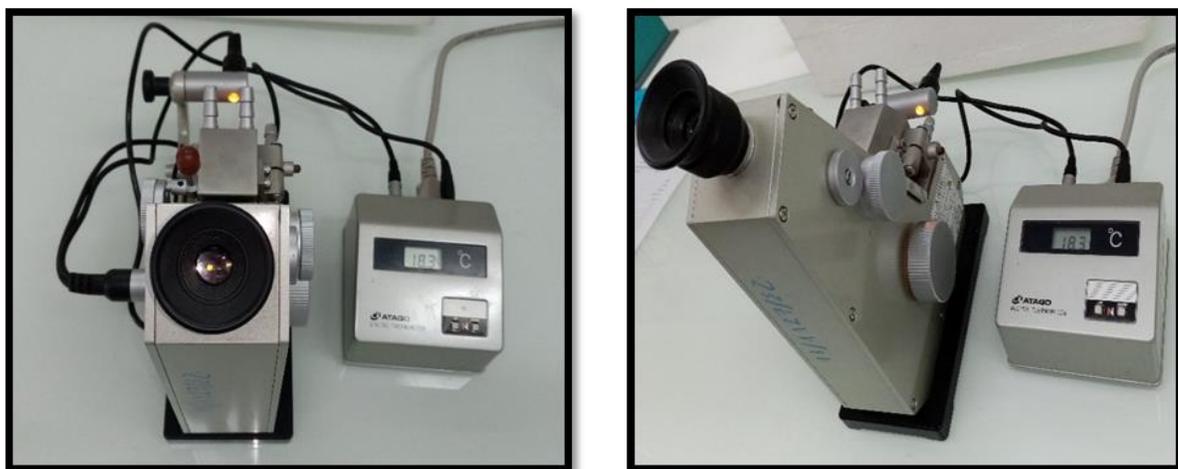


Figure III.11 : un réfractomètre.

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre [1] à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule :

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

Avec :

N_{20} : indice à 20°C ;

N_t : indice à la température ambiante ou de mesure ;

T : température ambiante ou de mesure.

Les produits étalons de qualité pour réfractométrie servent à ajuster le réfractomètre sont les suivantes (les indices de réfraction à 20°C sont donnés dans la parenthèse) :

- eau distillée (1.333) ;
- p-cymène (1.4906) ;
- benzoate de benzyle (1.5685) ;
- bromo-1 naphthalène (1.6585).

III.4.1.3. L'indice d'acide :**III.4.1.3.1. Définition :**

Il donne une évaluation sur la quantité d'acides gras libres. Ces acides sont responsables d'une plus grande facilité au rancissement.

On appelle indice d'acide d'une huile, le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium alcoolique nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un (1) gramme (g) de matière grasse.

III.4.1.3.2. Principe :

Les matières grasses s'altèrent par vieillissement en donnant naissance par hydrolyse des acides gras libres. Cette acidité peut être mesurée par alcalimétrie en milieu éthero-alcoolique, à l'aide de l'hydroxyde de potassium alcoolique titrée.

III.4.1.3.3. Matériels et les produits :

- Montage de titrage ;
- Micro-seringue ;
- Erlenmeyer ;
- Les huiles essentielles (de feuilles et fruits) ;
- KOH ;
- Ether diéthylique /éthanol ;
- Phénolphtaléine.



Figure III.12 : matériel utilisé pour l'indice d'acide.

III.4.1.3.4. Protocole d'expérience :

Une prise d'essai 10g d'huile est solubilisée dans un erlenmeyer contenant préalablement un mélange d'éther diéthylique/éthanol dans les proportions 1/1. 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°. utilisant la phénolphtaléine comme indicateur coloré et cela sous agitation jusqu'au virage au rose.

Les résultats sont exprimés en mg de KOH par gramme d'huile.

Avec :

$$\text{Indice d'acide} = [(V * T * 56.1) / P]$$

V : volume de KOH ;

T : titre de la solution KOH ;

P : prise d'essai en gramme.

III.4.1.4. Variation de la densité :

La densité est le rapport de la masse volumique d'un liquide à celle de l'eau.

Cependant, la mesure des densités de ces huiles a été effectuée par le moyen d'un densimètre type DMA 35N.

III.4.1.4.1. Matériels et les produits :

- Densimètre ;
- Les huiles essentielles (de feuille et fruits).



Figure III.13 : un densimètre.

La densité est mesurée à l'aide d'un densimètre [1] à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule :

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

Avec :

D_{20} : densité à 20 °C ;

D_t : densité à la température ambiante ou de mesure ;

T : température ambiante ou de mesure.

III.4.1.5. Potentiel d'hydrogène (pH) :

Cette mesure est effectuée par un pH-mètre.



Figure III.14 : pH mètre

III.5. Activités biologiques :**III.5.1. Activité antibactérienne :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents huiles essentielles d'orange amer (fruits et feuille fraîches) est effectuée selon la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton. Cette technique consiste à utiliser la méthode d'antibiogramme pour mentionner la sensibilité ou la résistance du microorganisme vis-à-vis des extraits testés.

III.5.2. Matériel et les produits :

- Boites pétris ;
- Bec bunsen ;
- l'autoclave ;
- Anse de platine ;
- un vortex ;
- règle ;
- les souches bactériennes ;
- l'eau de javel ;
- les huiles essentielles (de feuille et fruits) ;
- Muller Hinton ;
- L'eau physiologie ;
- papier Wattman №03 ;
- tube à essai ;



Figure III.15 : l'activité antibactérienne des huiles essentielles

III.5.1.1. Souches bactériennes :

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de d'orange amer a été évaluée sur plusieurs souches bactériennes.

Ces souches sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *streptocoque*, elle proviennent du laboratoire de microbiologie des analyses médicales d'hôpital TERICHINE Mustapha (Ghardaïa).

III.5.1.2. Tests d'activités antimicrobiennes :

a- Préparation zone stérile :

- Désinfecter la paillasse à l'eau de javel diluée ;
- Utiliser un bec bunsen pour réaliser une zone stérile.

b- Préparation des disques :

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman №03, avec un diamètre de 6mm (0.28cm² de surface) par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai stérilisé à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

c- Réalisation d'une suspension :

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton. Les souches ont été par la suite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après incubation, 1 à 2 colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un vortex dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile.

La concentration des différentes suspensions a été ajustée à 10⁸ cellule/ml correspondant à 0,5Mc Farland par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625nm. Les suspensions ainsi réalisées ont été diluées dans de l'eau physiologique stérile pour obtenir les suspensions finales correspondant à 10⁶ UFC/ml en fonction du type de chaque germe. [82]



Figure III.16 : l'eau physiologie



Figure III.17 : les bactéries *Pseudomonas* et streptocoque



d- Ensemencement :

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Dans les boîtes de Pétri, 100µl de chaque suspension bactérienne préalablement préparée sont distribués distinctement sur des boîtes gélosées de Mueller-Hinton puis homogénéisés dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont laissées pendant 15 minutes à la température du laboratoire.



Figure 18 : la suspension des bactéries.

e- Application des disques :

A l'aide d'une pince au Bec Bunsen, les disques de papiers whatman qui ont bien immergés et imprégnés dans l'huile essentielle de fruits ou de feuille fraiches sont déposés à la surface de la boite gélosée de Mueller-Hinton précédemment ensemencées.

Après l'incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque à l'aide d'une règle.

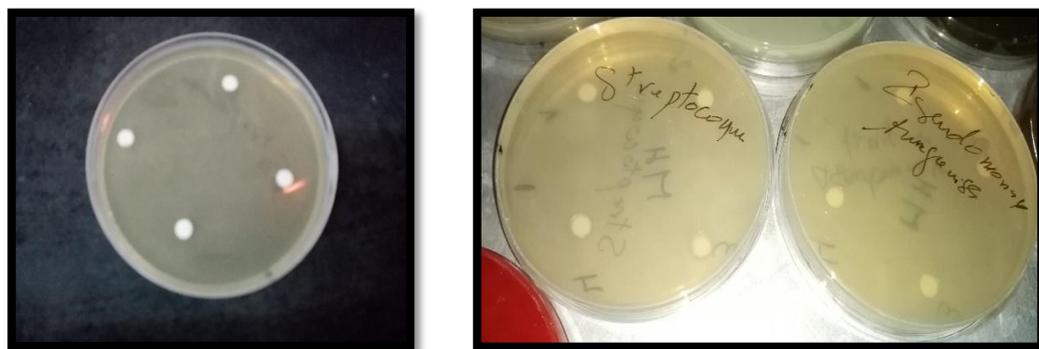


Figure III.19 : l'application des disques.

III.6. L'activité antioxydante :

L'activité antioxydante de l'HE des feuilles fraiches ou fruits de l'orange amère ainsi que celle de standard (DPPH avec le éthanol), a été évaluée par la mesure de la capacité de réduction d'un radical libre synthétique : le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), ce radical libre présente une coloration violet foncé, lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle.

III.6.2. Matériels et les produits :

- L'appareil d'UV ;
- L'appareil d'agitation ;

- Tube à essais secs plus un support ;
- Spatule ;
- Acide ascorbique ;
- DPPH ;
- L'éthanol ;
- Les huiles essentielles (de feuille et fruits).

III.6.2. Le protocole d'expérience :

L'huile essentielle de feuilles et fruits a été préparée par dissolution dans l'éthanol.

Le test s'effectue en mélangeant 1 ml de la solution précédente de DPPH avec 1ml de l'huile à tester à différentes concentrations dans des tubes à essai secs.

Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm. Pour le blanc (contenant tous les réactifs sans le produit à tester) 1ml d'éthanol sont mélangées avec 1 ml de la solution de DPPH. On utilise l'appareil d'UV pour savoir les résultats d'incubation.



Figure III.20 : l'appareil d'agitation.



Figure III.21 : l'appareil d'UV.

Un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique a été utilisé. Son absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

a-Préparation DPPH :

La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 4 mg de la poudre dans 100 ml de l'éthanol, en fermée la fiole, et en fait l'agitation à l'aide d'un agitateur, après recouverte la fiole avec aluminium très bien.

b-Détermination du pourcentage d'inhibition du DPPH :

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage est calculée de la manière suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}$$

Avec :

A_{blanc} : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai) (DPPH + éthanol).

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance du DPPH en présence du composé d'essai.

Les IC_{50} (concentrations donnant 50 % d'inhibition) de chaque échantillon ont été calculées à partir des graphes présentant les pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations. On a utilisé Le logiciel (Excel 2013).

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1. Rendement d'extraction :

Il existe plusieurs techniques d'extraction des substances actives présentes dans les plantes.

L'extraction par hydro-distillation ou distillation simple est l'un des procédés les plus simples et le plus ancien. Il repose sur le fait que la plupart des matières odorantes peuvent être entraînées à la vapeur d'eau.

D'après les résultats obtenus, on observe que Le rendement le plus élevé est celui des fruits (3.41 %) (w/w) Par rapport des feuilles (0.70%) (w/w).

Le rendement en huile essentielle des fruits d'oranger amer est 3.41 %(w/w), ce rendement est très fort Comparativement à ceux résultats obtenus qui est de 1.17%(w/w). Et Le rendement des feuilles d'orange amer est 0,70%(w/w) ce rendement est très fort comparativement des autres résultats obtenus qui est de 0.08 %(w/w) par. [82]

Alors On peut déduire que le rendement en huile essentielle d'une même espèce peut varier en fonction de plusieurs paramètres, telle que :

- L'espèce de la plante ;
- Le temps de récolte ;
- La méthode d'extraction. [83]

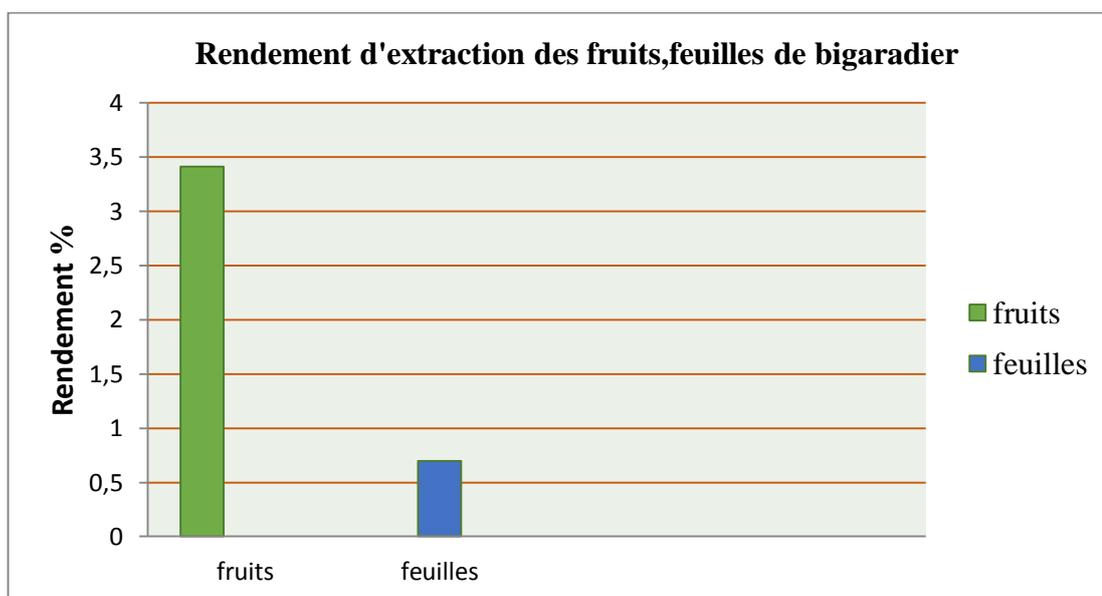


Figure IV.22 : Rendement d'extraction des feuilles, fruits du bigaradier.

IV.2. Paramètres physico-chimique et organoleptiques :

Les paramètres physico-chimiques et organoleptiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE.

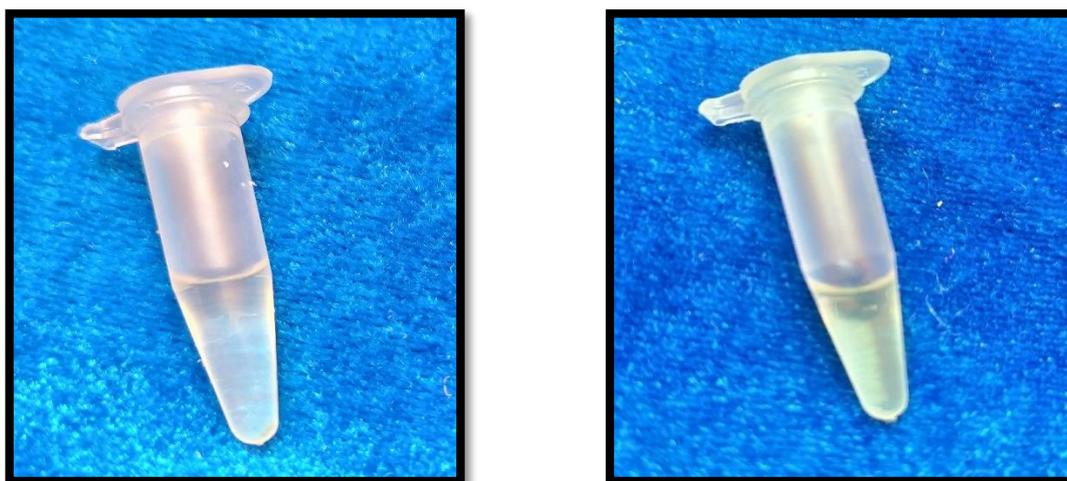
IV.2.1. Caractéristiques organoleptiques :

Les huiles essentielles des espèces de *Citrus aurantium* présentent un aspect liquide visqueux, blanc transparent pour les fruits et jaune pour les feuilles du bigaradier (**Figure 23**). Elles sont caractérisées par une odeur citronnée. (**Tableau 3**).

Tableau IV.3 : Les paramètres organoleptiques d'huile essentielle du bigaradier.

Paramètre	Bigaradier		AFNOR
	Fruit	Feuille	
Aspect	Liquide visqueux	Liquide visqueux	Liquide
Couleur	Blanc transparent	Jaune	Jaune pâle à vert brunâtre
Odeur	Citronnée		Caractéristique d'autre partie de zeste d'orange amer

Les paramètres organoleptiques de notre HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR.

**Figure IV.23** : aspect et couleur de *Citrus aurantium*.

IV.2.2. Caractéristiques physico-chimique :

Tableau IV.4 : Analyses physico-chimiques d'HE de *citrus aurantium*.

Paramètre	Fruit	Feuille	Norme AFNOR
Densité d_{20}^{20}	0.884	0.892	Norme ISO 279
Indice de réfraction	1,4772	1,4773	Norme ISO 280
pH	4.8	5.2	-
Indice d'acide	0,1	0.1	-

La densité d'une HE constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une HE dans différents domaines (cosmétique, pharmaceutique, chimique...etc.).

D'après les résultats des densités obtenues, on peut dire que les huiles ni sont pas conformes aux normes internationales. Les HES appartenant aux espèces *Citrus aurantium* doivent avoir une densité maximale de 0,860 (AFNOR). En effet, nos résultats indiquent des valeurs supérieures de 0,884 pour les fruits et de 0,892 pour les feuilles.

Le bigaradier, est peu comestible à cause de son amertume, et son pH bas, son utilisation est principalement réservée à la production de marmelades ou des huiles essentielles. [66]

Le pH des oranges varie entre 3.0 et 3.5 [84], l'HE de feuille de bigaradier, étant la plus faible par rapport de fruit. Aussi le pH de HE de bigaradier étant plus faible par rapport l'HE des oranges.

L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude cet indice certes dans les normes.

L'indice de réfraction d'une huile essentielle explique le rapport d'absorption de la lumière. Alors dans notre étude l'indice de réfraction des deux parties du bigaradier a été dans les normes internationales.

IV.3. Activités biologiques :

IV.3.1. Activité antioxydant :

L'évaluation des propriétés antioxydants des huiles essentielles des deux *Citrus aurantium* ont été évaluées en utilisant la méthode :

- L'activité de piégeage radical libre DPPH (2,2-diphényle- 1-picrylhydrazyl).

L'essai est basé sur la réduction du DPPH dissout dans du méthanol ce qui cause une diminution de l'absorbance mesurée à 517 nm, et en utilisant l'acide ascorbique comme témoins positifs.

IV.3.1.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH :

Le test au 2,2-diphényle-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est réalisé en utilisant la méthode décrite par [85]. Le DPPH est un radical libre stable violet en solution lorsqu'il est piégé par les antioxydants et change de couleur rapidement en virant au jaune lorsqu'il se réduit en diphenylpicryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire (un donneur de proton H⁺).

Cependant l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu « comme le cas des huiles essentielles » à inhiber le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) par la donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons. [86]

Tableau IV.5 : Activité antioxydant par la méthode de DPPH.

	DPPH IC₅₀ (µg/ml)
fruit	67.1147±0.353
feuille	2.0589±0.029
acide ascorbique	6.4584 ± 0.4256

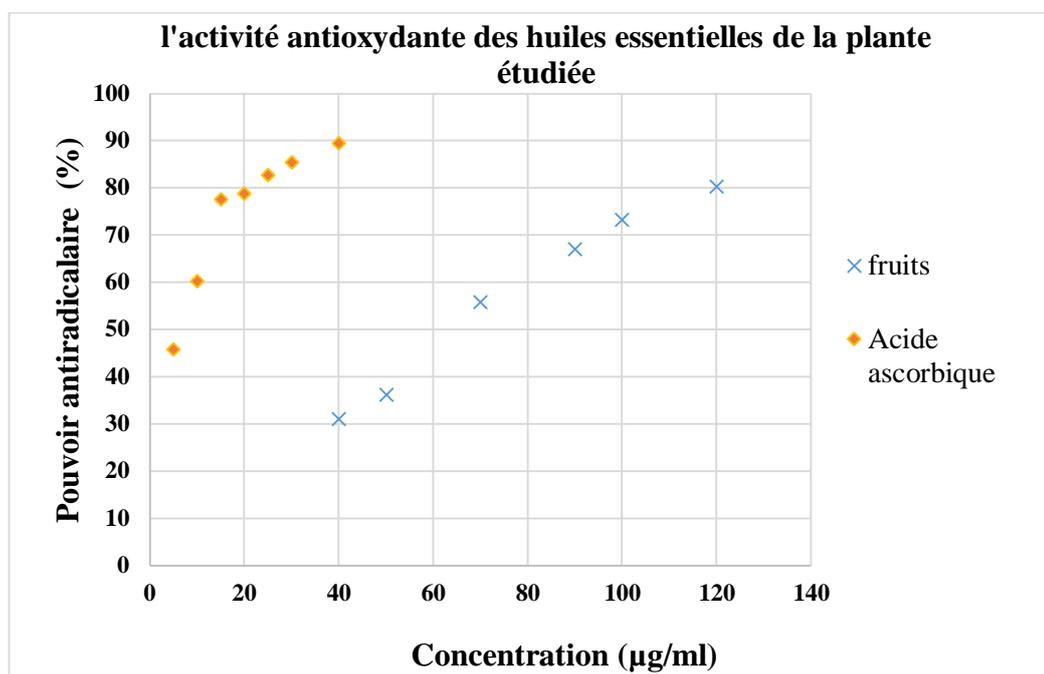


Figure IV.24 : l'activité anti-oxydante d'huile essentielle des fruits du bigaradier.

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle de fruit est inférieur à celui de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations utilisées.

L' IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydant d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %.

D'après la figure 24 on remarque que IC_{50} d'huile de fruits ($IC_{50}= 67.1147 \mu\text{g/ml}$) moins efficace par rapport l'acide ascorbique ($IC_{50}= 6.4584 \mu\text{g/ml}$).

[82] et [87] ont trouvé une valeur de ($IC_{50}= 800 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50}= 190 \mu\text{g/ml}$) on étudie l'effet antioxydant de l'huile essentielle des fruits de la région de Tunisie, ce qui plus grand par rapport notre étude. D'autre parte à comparer avec l'HE des fruits [88] ils se trouvent une valeur d' $IC_{50}= 29.510 \mu\text{g/ml}$ Ce qui inferieur.

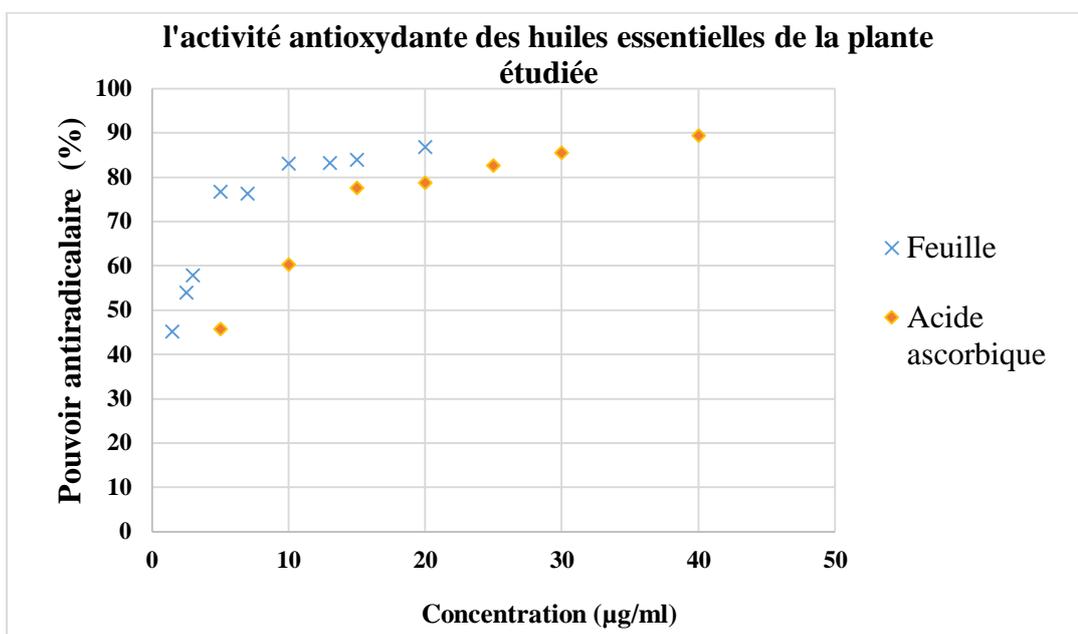


Figure IV.25 : l'activité anti-oxydante d'huile essentielle des feuilles du bigaradier.

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle de feuille est supérieur à celui de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations utilisées.

D'après la figure 25 on remarque que IC_{50} d'huile des feuilles ($IC_{50} = 2.0589 \mu\text{g/ml}$) plus efficace par rapport l'acide ascorbique ($IC_{50} = 6.4584 \mu\text{g/ml}$).

D'après les travaux de [82] et [89] qui ont porté sur l'étude de l'activité antioxydant du différent parti de *citrus aurantium*, l'HES des feuilles présentées un $IC_{50} = 2400 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50} = 1040 \mu\text{g/ml}$ respectivement qui plus élevés par rapport notre résultat de $IC_{50} = 2.0589 \mu\text{g/ml}$.

D'une manière générale, l'HES des fruits possède une activité antioxydant plus faible comparaisons avec celle de l'acide ascorbique, par contre l'HES des feuilles elle est une activité antioxydant plus fort que l'acide ascorbique.

IV.3.2. Activité antibactérienne :

Nous avons étudié dans laboratoire le pouvoir antimicrobienne des extraits des différentes parties : Fruits et feuilles de *Citrus aurantium* par la méthode de diffusion des extraits sur un milieu gélosé, Mueller-Hinton pour les bactéries.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition, les extraits à tester vis-à-vis cinq bactéries : *Pseudomonas*, *staphylococcus*, *Streptocoque*, *Klebsiella*, *E.coli*.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau et la figure suivants, ils représentent les diamètres des zones d'inhibitions des extraits testés.

Tableau IV.6 : Activité antibactérienne des huiles essentielles d'orange amer.

Extrait	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	Gram positive		Gram négative		
Germes	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptocoque</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>
Fruits	10	6	12	9	6
Feuilles	16	6	19	18	15

Tableau IV.7 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition. [90]

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	diamètre < 8mm
Sensible (+)	diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	diamètre > 20 mm

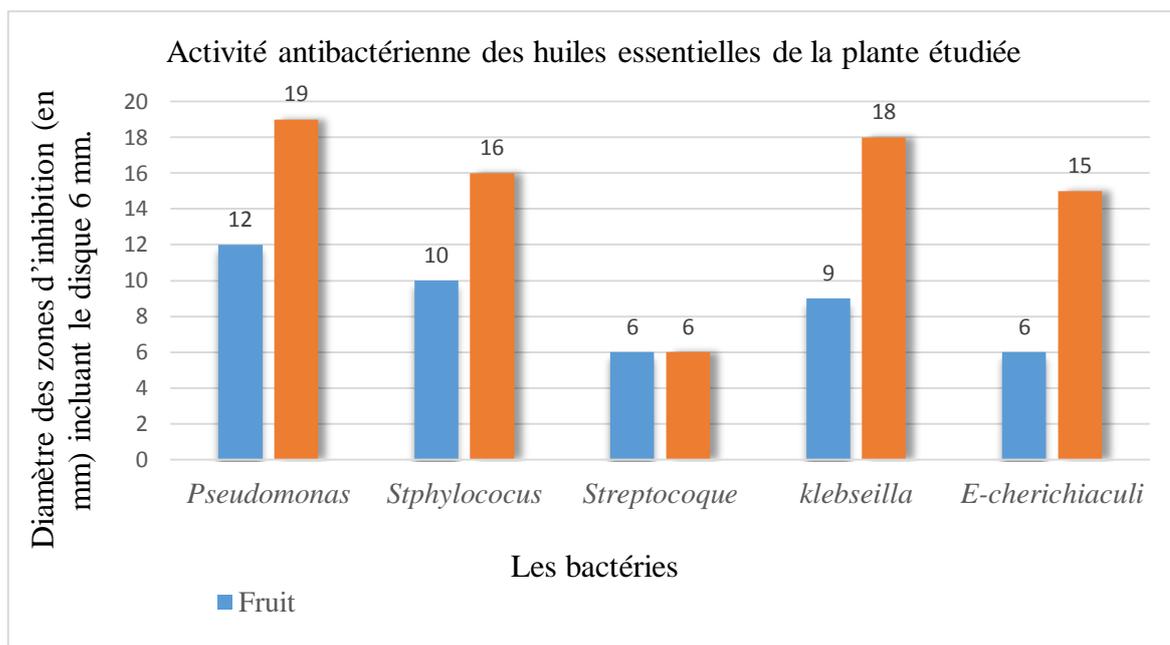


Figure 26 : l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

Les bactéries étudiées ont montré des sensibilités différentes aux extraits testés. Le diamètre de la zone d'inhibition des extraits de différentes parties du bigaradier, qui varie entre 6 mm et 19 mm, ces résultats indiquent l'effet inhibiteurs des extraits vis-à-vis les germes étudiés.

D'après les obtenus les feuilles présentent une meilleure activité antimicrobienne envers *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *staphylococcus*, *E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 19 mm, 18 mm, 16mm, 15mm respectivement, et aucun effet (non sensible) contre *Streptocoque*. Par contre la meilleure activité marquée par l'extrait de fruit contre *Pseudomonas*, *staphylococcus* avec un diamètre de 12mm et 10mm. Cet extrait non sensible contre les autres bactéries qui *Streptocoque*, *Klebsiella*, *E. coli*.

Les résultats obtenue par [82] montre une activité sur *klebsiella* de diamètre de 23mm et *E. coli* de diamètre de 9mm pour les feuilles, par contre les autres bactéries comme *Pseudomonas*, *staphylococcus* (7.5mm), *Streptocoque* (7.5mm) aucune résistance. Quant au [90], il a été trouvé une activité sur *E. coli* (10 mm), *staphylococcus* (9 mm), par contre nos résultats présents une activité pour les feuilles sur *klebsiella* de 18mm et *E. coli* de 15mm.

Selon [91] et [91] à présente une activité antimicrobienne pour les fruits sur les bactéries suivant. Le [82] à été une activité sur *staphylococcus* (7.5mm), *Streptocoque* (7.5mm),

klebsiella (8mm) par contre [91] à été une activité sur *Pseudomonas* (7mm), *staphylococcus* (9mm), *E. coli* (6mm).par rapport notre travaille nous avons une meilleure activité sur *Pseudomonas*, *staphylococcus* avec un diamètre de 12mm et 10mm.

Conclusion générale

Conclusion

- Dans le but de la valorisation d'une des plantes aromatiques médicinales de la famille de *Rutacées*, issue de la région de Ghardaïa, en l'occurrence *Citrus aurantium* nous avons effectué un travail permettant de contribuer à la mise en évidence de l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante des huiles essentielles.

- Notre travail a porté sur une espèce de la famille de *Rutacées*, une des familles les plus importantes dans l'agrumes de l'Algérie.

- Quelques expériences effectuées sur la plante étudiée dont :

- Extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydrodistillation ;

- Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode (DPPH) ;

- Test de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (de feuilles et fruits) sur les souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *streptocoque*.

- Le rendement en huile essentielle de la plante *Citrus aurantium* est de 3.41% pour les fruits et 0,70%(w/w) pour les feuilles. Cette valeur est supérieure aux rendements obtenus chez d'autres espèces du même genre.

- D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante : 67.1147 ± 0.353 ug/ml pour les fruits et 2.0589 ± 0.029 ug/ml pour les feuilles.

- On constate que l'huile essentielle possède une activité antioxydante très importante avec des faibles concentrations

- Les tests antibactériens effectués dans ce travail montrent que l'effet antibactérien de l'huile essentielle de la plante *Citrus aurantium* sur différentes souches bactériennes, est significatif sur certaines souches bactériennes comme *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*. Et inactive sur les souches bactériennes c'est *streptocoque*. Pour les feuilles. Et pour les fruits l'huile essentielle est moins significative par rapport l'huile essentielle de feuilles sur certaines souches comme *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*. Et inactive sur *Escherichia coli*

- L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement active.

Des essais complémentaires seront nécessaires tel que :

- Elle a suggéré d'étudier la composition chimique d'huile essentielle de feuilles et fruits de *citrus aurantium*.
- Détermination des autres activités biologiques de cette plante, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antifongique, ...etc.
- Evaluation de la toxicité de ces huiles essentielles.
- A la lumière des résultats obtenus on peut conclure que l'huile essentielle de la plante *citrus aurantium* présente un pouvoir antioxydant et antimicrobien très puissant sur les souches pathogènes et donne une nouvelle alternative dans la lutte biologique par les huiles essentielles.

Références bibliographiques

Les références bibliographiques :

[1] : Larbi, D., C. Ghezli, and K. Djelouah. "Historical review of Citrus tristeza virus (CTV) in Algeria. Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry Option Méditerranéenne." (2009): 107-110.

[2] : Abeysinghe, D. C., et al. "Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species." Food chemistry 104.4 (2007): 1338-1344.

[3] : ABADLIA Maroua , CHEBBOUR Aicha. " étude des huiles essentielles de la plante mentha piperita et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusoires". Mémoire présentée à l'université de costantine1, faculté de science et de la nature, (2013/2014).

[4] : Ouis, Naouel. "Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil". Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger,(2015).

[5] : Jouault, Solène. "La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité". Diss. Université de Lorraine, (2012).

[6] : Hanson, A. E. "Hippocrates: the" Greek Miracle" in Medicine." Medicine, Lee T. Percy, The Episcopal Academy, Merion, PA 19066, USA, (2006).

[7] : Christiane Desroches Noblecourt, "Le Patrimoine de l'Égypte ancienne", publication Edhasa, (2006).

[8] : Laurent, Julia. "Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine". Diss.(2017).

[7] : AFNOR, "Recueil de Normes: Les Huiles Essentielles, Tome 1. Echantillonnage et Méthodes d'Analyse", Paris (2000) :440.

[10] : AFNOR. "Recueil des normes françaises : Les huiles essentielles, Ed AFNOR, Tour Europe." Paris, (1986) :57

[11] : Ultee,A., M. H. J. Bennik, and R. J. A. E. M. Moezelaar. "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus." Applied and environmental microbiology 68.4 (2002): 1561-1568.

[12] : AFNOR, "association français de normalisation française : huile essentielle, Ed, Afnor",

Les références bibliographiques

Paris, (2000).

[13] : Pierron, Charles. "Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France: exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs." (2014).

[14] : BRUNETON, Jean. " Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, Ed :Lavoisier Tec & Doc, 5^{ème} Edition" , (2016).

[15] : SEDDIK Miloud, analyse physico-chimique et spectroscopie de l'huile essentielle d'Ammodendron Verticillata de la région d'Adrar. étude de son activité biologique et anti-oxydante. Mémoire présenté à l'université d'Oranes-Sania, faculté des sciences, (2010).

[16] : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles -ANSM-

[Internet]. [cité 2 oct 2017]. Disponible sur : http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/657257784ff10b16654e1ac94b60e3fb.pdf.

[17] : BRUNETON, Jean. " Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales, Ed :Lavoisier, Ed :Lavoisier, 2^{ème} Edition ",(1993) :42-387.

[18] : Guignard, Jean-Louis. "Biochimie végétale." (2000) :166.

[19] : Couic-Marinière, F. "Huiles essentielles : l'essentiel. Conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotidien." (2013).

[20] : Dr Sahraoui, " UN 1901. Laboratoire de pharmacognosie", (2014/2015) :1-3.

[21] :,Michel, Monique Hurabielle, and René-Raymond Paris. "Abrégé de matière médicale: Monographies (2. partie): plantes actives sur le système nerveux, sur l'appareil digestif, plantes cardiotoniques, plantes antiparasitaires, plantes insecticides, antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale. Masson", Paris (1981).

[22] : Svoboda, Katya P., and Janice B. Hampson. "Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities." Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW 16 (1999): 1-7.

Les références bibliographiques

- [23] : Chanchal Cabrera, " Clinical aromatherapy : The medicinal value of volatile oils, MNIMH, AHG", (2001) :1-18.
- [24] : Glidewell, Christopher. "Monoterpenes: An easily accessible but neglected class of natural products." *Journal of Chemical Education* 68.3 (1991): 267.
- [25] : Boutekedjiret, Chahrazed. "Étude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences de romarin. Transfert de matière et modélisation". Diss. Thèse de doctorat d'État, École nationale polytechnique, Alger, Algérie, (1999).
- [26] : Golmakani, Mohammad-Taghi, and Karamatollah Rezaei. "Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L." *Food chemistry* 109.4 (2008): 925-930.
- [27] : Bego Ph, "Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB", Paris, (2001) : pp.2-3.
- [28] : Brian, M. L. "The isolation of aromatic materials from plant products." *RJ Reynolds* (1995).
- [29] : Dastmalchi, Keyvan, et al. "Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract." *LWT-Food Science and Technology* 41.3 (2008): 391-400.
- [30] : Tena, M. T., et al. "Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication." *Analytical Chemistry* 69.3 (1997): 521-526.
- [31] : "http://hitex-co2.com/pages/co2_supercritique.php Description et illustration de l'extraction au CO2 supercritique. Copyright 2005 Société Hitex ". Tous droits réservés.
- [32] : Ericsson, M. et Colmsjo, A, "Journal of chromatography A", (2000):877,141.
- [33] : Vinatoru Mircea, Toma Maricela. et al, " ultrasonics Sonochemistry", 177,4,135.
- [34] : Sallé, Jean-Luc, and Jacques Pelletier. "Les huiles essentielles: synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche", (1991).
- [35] : Duquenois, P, "Phytoterapy", (1984):6,7 ;

Les références bibliographiques

- [36] : Gabriela Beirão and Gabriela Bernardo-Gil, Beirão ARB. and Bernardo-Gil MG, "Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2nd Mercosur Congress Engineering. on Chemical Portugal", (2006): 8p.
- [37] : Madhavi DL., Deshpande SS. and Salunkhe DK., " Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives", Marcel Dekker, Inc. New York, (1996) :65p.
- [38] : Kohen, Ron, and Abraham Nyska. "Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicologic pathology* 30.6 (2002): 620-650.
- [39] : Hussain, Abdullah Ijaz, et al. "Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities." *Brazilian Journal of Microbiology* 41.4 (2010): 1070-1078.
- [40] : RASCOL, André "La maladie de parkinson Ed Masson " (1998) :16-19.
- [41] : Beckman, Kenneth B., and Bruce N. Ames. "The free radical theory of aging matures." *Physiological reviews* (1998).
- [42] : Sies, Helmut. "Strategies of antioxidant defense." *European journal of biochemistry* 215.2 (1993): 213-219.
- [43] : Leiris, Joël. "Biochemistry of free radicals." *Heart Metab* 19 (2003): 40-4.
- [44] : Pasquier, C. "Stress oxydatif et inflammation." *Revue française des laboratoires* 1995.276 (1995): 87-92.
- [45] : Fontaine, E., et al. "Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique", *Réanimation* 11.6 (2002): 411-420.
- [46] : Ernould, Audrey. *Les vertus de l'oranger amer et de l'oranger doux*. Diss. 2008.
- [47] : Abeysinghe, D. C., et al. "Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species." *Food chemistry* 104.4 ,(2007): 1338-1344.
- [48] : Bocco, Alessandra, et al. "Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts." *Journal of agricultural and food chemistry* 46.6 (1998): 2123-2129.

Les références bibliographiques

- [49] : Leroy J.F, " Les agrumes.In: les fruit tropicaux et subtropicaux. Ed. presses " Universitaires de France, (1968) :61-77.
- [50] : Ersus, S., and M. Cam. "Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour Citrus aurantium fruits." Chemistry of Natural Compounds 43.5 (2007): 607-609.
- [51] : Ghédira, K, Goetz,P, "Citrus aurantiumL var. amara Link. Phytothérapie 13", (2015) :320-327.
- [52] : Shwart Z,T,2011, "aphylogeny of the putaceae and a biogeographic study of it's subfamily aurantioideae. Degree project for master of science in systematics and biodiversity,biology,department and enviromental science, university of gothemburg ",37p
- [53] : Mohamed amine BEDRANE, « les Agrumes ». 15 janvier 2020, <https://agronomie.info/fr/les-agrumes/>
- [54] : Spiegel- RoyletGoldschimdt E.E -" biologie of citrus". University Press. Cambridge U.K (101), (1996): 23-25p.
- [55] : Hadrich, B., et al. "Etude de séchage des feuilles de bigaradier." Revue des énergies renouvelables, (2009): 145-149.
- [56] : Christine Dufaut et véronique Laporte, "la Rousse en cyclopédie des plantes Médicinales, identification , préparations, soins",190p.
- [57] : Giraud, N, "l'oranger doux, l'oranger amer". thèse d'exercice en pharmacie. Clermont-ferrand université de clermontferrand, (1993) :77p.
- [58] : Guignard J L, " Botanique (11^{ème} edition révisée) ,collection abrégés de pharmacie" paris : Masson (1998) :278p.
- [59] : La Berche J.C. "biologie végétale, (collection abrégés de sciences) ", Paris : dunad (1999) :240p.
- [60] : pharmacopée française 8^{ème} edition, 9^{ème} edition,10^{ème} édition. Moulin, les Metz : Maisonneuve éditeur.

Les références bibliographiques

- [61]: Hendrix, C. M., and J. B. Redd. "Chemistry and technology of citrus juices and by-products." Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. Springer, Boston, MA, (1995):53-87.
- [62] : Messaoudi S, "les plantes médicinales". Edition Dar et Maarifa,(2005).
- [63] : Tenscher, E., R. ET LOBSTEIN A. ANTON, and A. Lobstein. "Plantes aromatiques." Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec and doc. (2005).
- [64] : Bouroukaa A, "Etude biochimique de l'adultération du jus de fruits" .Université de Carthage,(2012) : p3-50/121-124.
- [65] : Salunkhe, Dattajirao K and S Kadam, eds, " Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing. CRC press", (1995).
- [66] : Kimball D.A, "Citrus processing, a complete guide, second edition. Kimball D.A., Ed.Gaithersburg", An Aspen publication,(1999).
- [67]: Manner, Harley I., et al. "Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat)." Species profile for pacific island agroforestry 2 (2006): 1-35.
- [68] : Cerdagne, Isabelle. " L'oranger amer: Citrus aurantium var. amara Link". Diss thèse de docteur en pharmacie. (2004) : 218.
- [69] :GARNIER G, BEZANGER R, BEAUQUESNEL, DEBRAUX G, "ressources médicinales de la flore française tome I, vigot frères éditeurs", paris (1961) :p 634 à 649.
- [70] : Teuscher, Eberhard, Robert Anton, and Annelise Lobstein, "Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles", Tec et Doc, (2005).
- [71] : GIRAUDN, clermont- ferrand 1993, "l'oranger doux, l'oranger amer", thèse de docteur en pharmacie p 77.
- [72] :ENCYCLOPEDIE ENCARTA, (2006).
- [73] : ISSABELLE CERDAGNIE, " l'oranger amer :citrus aurantium", these pour le diplôme de docteur en pharmacie, UNIVERSITE DE LIMOGES (2003-2004).
- [74] : GONTIER J , "L'oranger, Actes du colloque", (2000) :89p.

Les références bibliographiques

- [75] : Abrassart, Jean-Louis. "Guide pratique d'aromathérapie: usage et bienfaits des huiles essentielles de plantes. G. Trédaniel", (2000) :199-271.
- [76] : WEIL P. GRASSE, "ville des parfums : l'oranger amer". Thèse d'exercice en pharmacie.
- [77] : Bruneton, J. "Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3 ème édition, lavoisier." (1999).
- [78] : Hess, J., and S. H. E. Kaufmann. "Principles of cell-mediated immunity underlying vaccination strategies against intracellular pathogens." *Host Response to Intracellular Pathogens* (Kaufmann, SHE, Ed.) (1997): 75-94.
- [79] : BILLING.J.ET SHERMAN, "antimicrobial functions of spices: why some like it hot.The Quarterly review of biology,73(1) ",(1998): 3-49.
- [80] : COWAN M.M. " Plant products as antimicrobial agents. *Chemical microbiology reviews*, 12(4) ", (1999): 564-582.
- [81] : Caccioni, Duccio RL, et al. "Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*." *International journal of food microbiology* (1998), 43(1),118-122
- [82] : Daouda Toure, "Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de CÔTE D'IVOIRE", université de FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY : unite de formation et de recherché sciences medicinlaes ABIDJAN,(2015):153.
- [83] : Dhekra Trabelsi, Ahlem Haj Ammar, Faten Bouabdallah, Fathi Zagrouba, " antioxidant and antimicrobial activitiés of essential oils and methanolic extracts of Tunisian citrus aurantium", January (2014).
- [84] : BENCHEIKH, Salah Eddine. "Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp *Aurasianum* Labiatae". Diss. (2017).
- [85] : Kimball D.A. "citrus processing a complete guide, second edition. Ed. Gaithersburg". An Aspen publication. Kimball, D. A. "Citrus processing." (1999): 27.
- [86] : Rangana, S., VJ GOVINDARAJAN, and K. V. R. Ramana. "Citrus Fruits–Varieties. Chemistry, Technology, and Quality Evaluation. Part II: Chemistry, Technology and Quality

Les références bibliographiques

Evaluation. A: Chemistry." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 18.4 (1983): 313-386.

[87] : Tepe, Bektas, et al. "Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey." *Food Chemistry* 95.2 (2006): 200-204.

[88] : Iness Tabri Karoui and Brahim Marzouk, "characterization of Bioactive compounds in Tunisian Bitter Orange (*citrus aurantium* L.) Peel and Juice and Determination of their Antioxydant Activities", published (13 Jun 2013).

[89] : Reza Fara hamand Far, Beharaad Tirgariam, Bahare Dehgham, Awita Nemati, comparison of different drying methods on bitter orange (*citrus aurantium* L) Peel waste: changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders, Accepted (25 November 2019).

[90] : Mohammed-Bagher Majnooni, Kamran Mansouri, Mohammadi- Motlagh, Nazanin-sadat Afanzase, Mir-Mehdi, Abolghasemi and Marzieh Piriyaie, "chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of *citrus aurantium* L", Accepted (21 September 2011).

[90] : Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. et Roura S.I. "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard". *LebensmittelWissenschaft and Technologic*, 36, (2003):679-684.

[81] : Bnina, Enis Ben, et al. "Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the tunisian *Citrus aurantium* essential oils." *Czech Journal of Food Sciences* 37.2 (2019): 81-92.

Les références bibliographiques

Annexe 1 : Association Française de la Normalisation

This preview is downloaded from www.sis.se. Buy the entire standard via <https://www.sis.se/std-907161>

INTERNATIONAL STANDARD

ISO 9844:2008(E)

Oil of bitter orange (*Citrus aurantium* L.)

1 Scope

This International Standard specifies certain characteristics of the oil of bitter orange (*Citrus aurantium* L.). In order to facilitate assessment of its quality.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO/TR 210, *Essential oils — General rules for packaging, conditioning and storage*

ISO/TR 211, *Essential oils — General rules for labelling and marking of containers*

ISO 212, *Essential oils — Sampling*

ISO 279, *Essential oils — Determination of relative density at 20 °C — Reference method*

ISO 280, *Essential oils — Determination of refractive index*

ISO 592, *Essential oils — Determination of optical rotation*

ISO 875, *Essential oils — Evaluation of miscibility in ethanol*

ISO 4715, *Essential oils — Quantitative evaluation of residue on evaporation*

ISO 11024-1, *Essential oils — General guidance on chromatographic profiles — Part 1: Preparation of chromatographic profiles for presentation in standards*

ISO 11024-2, *Essential oils — General guidance on chromatographic profiles — Part 2: Utilization of chromatographic profiles of samples of essential oils*

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1

oil of bitter orange
essential oil obtained by expression, without heating, by mechanical treatment, from the pericarp of the fruit of *Citrus aurantium* L., of the Rutaceae family

NOTE For information on the CAS number, see ISO/TR 21092.

4 Requirements

4.1 Appearance

Liquid.

4.2 Colour

Pale yellow to brownish green.

4.3 Odour

Characteristic of the outer part of bitter orange peel.

This preview is downloaded from www.sis.se. Buy the entire standard via <https://www.sis.se/std-907161>

ISO 9844:2008(E)

4.4 Relative density at 20 °C, d_{20}^{20}

American type		Equatorial type		Mediterranean type	
min.	max.	min.	max.	min.	max.
0,840	0,860	0,845	0,860	0,840	0,860

4.5 Refractive Index at 20 °C

American type		Equatorial type		Mediterranean type	
min.	max.	min.	max.	min.	max.
1,472	1,478	1,473	1,478	1,472	1,478

4.6 Optical rotation at 20 °C

American type	Equatorial type	Mediterranean type
+ 88° to + 98°	+ 88° to + 95°	+ 88° to + 98°

4.7 Miscibility in ethanol, 90 % (volume fraction), at 20 °C

It shall not be necessary to use more than 8 volumes of ethanol, 90 % (volume fraction), to obtain a clear solution with 1 volume of essential oil.

4.8 Residue on evaporation

American type		Equatorial type		Mediterranean type	
min.	max.	min.	max.	min.	max.
3,5 %	6,0 %	3,0 %	6,0 %	3,5 %	6,0 %

4.9 Chromatographic profile

Analysis of the essential oil shall be carried out by gas chromatography. In the chromatogram obtained, the representative and characteristic components shown in Table 1 shall be identified. The proportions of these components, indicated by the integrator, shall be as shown in Table 1. This constitutes the chromatographic profile of the essential oil.

4.10 Flashpoint

Information on the flashpoint is given in Annex B.

Annexe 2 : matériels d'analyse physico-chimique

L'indice d'acide

Résultat
avants le
titrage



Résultat après le
titrage



Annexe 3 : les activités biologiques

L'activité antioxydant

les résultats
de l'activité
anti-oxydante
par la
méthode de
DPPH
(fruit)



les résultats de
l'activité anti-
oxydante par
la méthode de
DPPH
(feuille)



transformatio
n de la
couleur de
DPPH après
d'ajouter
d'HE



Les résultats
obtenus par
UV-visible



L'activité antimicrobienne

L'incubation
de la
bactérie



Préparation des
boîtes pétries



E. coli



Staphylocoque

