République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Génie des Procédés

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Chimie
Option : Norme et Contrôle Qualité

Thème

EXTRACTION , CARACTÉRISATIONS PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'AGRUMES

Présenté par :

- **Saci Fouzia**
- **Ouahbib Bilal**

Dirigé par :

Mr : Achek Rachid
Melle :Youcef Ettoumi Khadidja

Promotion 2015/2016

Résumé

Dans la présente étude, deux techniques d'hydrodistillation par chauffage, l'une conventionnelle (CC) et l'autre assistée par induction électromagnétique(IM), ont été employées pour extraire les huiles essentielles (HEs) des écorces de *Citrus* à savoir : *C. limonum* (Citron), et *C.sinensis* (Orange douce), comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Une étude comparative en termes de rendement, de cinétique d'extraction et de la qualité des HEs obtenue a été étudiée. Les HEs de *C.sinensis* et *C. limonum* ont été extraites avec des rendements de l'ordre de 3.77 % et 2.86 % respectivement par IM avec un temps d'extraction réduit de 7 à 10 min, par rapport à l'extraction par chauffage classique. La détermination des indices physico-chimiques révèle que les HEs des espèces *Citrus* extraites sont conformes aux normes internationales.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs de *Citrus* testées par aromatogramme et par dilution a été étudiée sur *S. aureus, Ps. aeruginosa, Candida albicans* et, *Escherichia coli.* Alors que, l'activité antioxydante a été testée par DPPH•, les résultats montrent que les huiles essentielles extraites par induction éléctromagnétique ont présenté une meilleure performance biologiques par rapport aux H.Es extraites par chauffage classique.

Mots clés: H.Es de Citrus, Hydrodistillation, Induction électromagnétique, Activité antibactérienne, Activité antioxydante.

Abstract

In the present study, two techniques steam distillation of heating, the Conventional heating (CH) and that assisted by Electromagnetic induction (EMI) have been employed to extract essential oils (EOs) from the peel of *Citrus* namely: *C. limonum* (Lemon) and *C sinensis* (sweet orange) as a potential source of natural bioactive molecules.A comparative study in terms of yield, extraction kinetics and quality of (EOs) obtained was investigated. The EOs of *C.sinensis* et *C. limonum* were extracted with yields up of 3.77 % et 2.86 % respectively by IM With an extraction time reduced to 7 à 10 min compared to the extraction by conventional heating. The physico-chemical indices indicate that the citrus EOs extracted are compatible with international standards.

The evaluation of the antimicrobial activity of Citrus EOS tested by aromatogramme and dilution was studied on *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans and Escherichia coli*. And the antioxidant activity was tested by DPPH •, the results showed that essential oils extracted by electromagnetic induction heating demonstrate better biological performance compared toEOs extracted by conventional heating.

Key words: *Citrus* essential oils, steam distillation, Electromagnetic Induction, antimicrobial activity, antioxidant activity.

ملخص

في هذه الدراسة تقنيتين اثنتين للتسخين الاولى كلاسيكية والثانية جديدة معتمدة على التحريض الكهرومغناطيسي،تم استخدامهما في استخلاص الزيوت الاساسية لقشور بعض الحمضيات وهي الليمون (*Citrus limonum*) **و البرتقال الحلو** (*Citrus sinensis*) باعتبارها مصدرا للجزيئات الطبيعية النشطة. تمت دراسة مقارنة من حيث المردود، حركية الاستخلاص وكذا نوعية الزيوت المحصل عليها، حيث قدر مردود زيوت *C .limonum* و *C. sinensis* ب: 3.77% و 2.86% على التوالي بواسطة التحريض المغناطيسي خلال مدة زمنية قصيرة من7 **الى** 10 **ثواني مقارنة** بالاستخلاص المعتمد على التسخين التقليدي. كما بينت النتائج أن الخصائص الفيزيوكيميائية للزيوت الاساسية المستخرجة من الحمضيات موافقة للمعايير الدولية.

وقد تمت دراسة تأثير الزيوت الأساسية ضد بعض الميكروبات(المكورات العنقودية الذهبية ، الزائفة الزنجارية ، المبيضات البيض, بكتيريا القولون). في حين تم اختبار النشاط المضاد للأكسدة باستخدام محاصرة الجذر DPPH، **فقد** بينت النتائج أن الزيوت الأساسية المستخرجة طريقة التقطير بالتحريض الكهرومغناطيسي أظهرت فعالية بيولوجية أفضل من الزيوت الأساسية المستخرجة عن طريق التسخين التقليدي.

كلمات مفاتيح:
الزيوت الاساسية للحمضيات- طريقة التقطير بالبخار - التحريض الكهرومغناطيسي- التسخين التقليدي– **النشاط المضاد للأكسدة**- النشاط المضاد الميكروبات

Remerciement

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à M^{elle} Youcef Ettoumi Khadidja, qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé.

Sans oublier M^{r}. Achek Rachid pour son encadrement, les conseils, ainsi que pour son encouragement

Nous Remerciements les directeurs de laboratoire de recherche ainsi que le chef service de DSP de Médéa Mr Djekoumi .H et de laboratoire du lycée à l'université Dr Yahia Farés de Médéa, sans oublier de remercier les ingénieurs de laboratoire Amina et Radia pour leurs aides.

Grand et respectueux remerciement va aux membres du jury : Dr Zouambia Y, Mr Latreche. H et Melle Boumediene. F, d'avoir accepter de juger notre modeste travail.

Nous remercions aussi tous nos collègues de la promotion 2015-2016.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Merci.

Dédicace

Merci Dieu tous puissant de m'avoir donner la force et le courage et la santé afin de réaliser ce modeste travail.

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'apporte son appui durant toutes mes années d'étude dans les meilleures conditions

A mon cher père pour ce qu'il a fait pour moi depuis ma naissance, pour son soutient et pour son amour.

A mes très chers frères : Mohamed, Salami, Nadir, Amer, Omer, Abed El Aziz Messoude , sa femme et son enfant ;

A ma très chère sœur Warda

A toutes mes amies Zahra, Meriem, Amani, Selma. Nassima ,Fadila et Razika.

A toute ma famille

FOUZIA

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à:

- Mes chers parents
- Mon épouse
- Mes frères et mes sœurs
- Toute ma famille.

Billal

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction général……...……...……01

Chapitre I : HUILES ESSENTIELLES

I. Introduction …… …….…….…….…03

I.1. Historique…….…….....03

I.2. Définition …….……...04

I.3. Répartition et sites d'accumulation des essences chez les plantes……...04

I.4. Fonction des huiles essentielles dans la plante…….……04

I.5. Composition chimique…….……..…...05

I.6. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles …….…….....06

I.7. Facteurs de variabilité des huiles essentielles……..…….07

I.7.1. Dénominations de l'Huile essentielle……..…….07

I.7.2.Influence du cycle végétatif……..…….....07

I.7.3. Influence des facteurs extrinsèques…….…….....07

I.7.4. Récolte du matériel végétal……08

I.7.5. Transformations du matériel végétal……08

I.7.6. Hybridations, facteurs de mutation, la polyploïdie et les aberrations chromosomiques……...……...08

I.8. Méthodes d'extraction des huiles essentielles……..…….....08

I.8.1.Hydro distillation…….……..…….09

I.8.2. Entraînement à la vapeur…….…..……..10

I.8.3.Hydrodiffusion…….…….…….....10

I.8.4. Expression à froid…….....11

I.8.5. Hydrodistillation par micro-ondes, sous vide…..…...…….....11

I.9. Conditions de conservation et de stockage…….…….11

I.10. Utilisation des huiles essentielles…….…..……..12

I.10.1. En pharmacie…….…….....12

I.10.2. En parfumerie…….…….…….12

I.10.3. En industries agro-alimentaire..……..…….…….12
I.10.4. Dans divers industries……...……..……12
I.10.5.Aromathérapie…….....…..13
I.11. Données toxicologiques…….……....13
I. 12.Activités biologiques des huiles…..…...……...…….....14
I.12.1.L'activité antibactérienne…….…...……..……14
I.12.2. Activité antifongique…….…….....15
I.12.3. Activité anti-oxydante…….……...16
I.12.4. L'activité anti-virale……..…….....16
I.13. Autres Activités des huiles essentielles ……16
I.14. Mode d'action des huiles essentielles……..……17
I.15. Conclusion……19

Chapitre II : Agrumes

II.1 Introduction …….……..…20
II.2 Origine et histoire des agrumes …….....20
II.3 Caractéristiques et description des agrumes …….……..…….…..21
II.4 Classification des agrumes ……...……23
II.5 Transformation des agrumes ……24
II.5 .1 Co-produits de la transformation des agrumes…….……25
II.5.2 Huiles essentielles et essences d'agrumes…..……..……..26
II.6 Aspect économique ……..…….……...28
II.7 Conclusion…….....29

Chapitre III : Matériel est Méthodes

III.1Introduction……..……...….…….……..30
III.2 Produits et matériels utilisés …….....30
III.2.1. Appareillages utilisés ……..……..……..……..…….30
III. 2.2 .Verrerie ……..……...30
III.2.3.Produits utilisée …….…….....31
III- 2.4. Matériel végétal …….……...31
III- 2.5. Matériels Microbiologiques…..…….……..…..32
III.2.5.1.Caractéristiques des souches testées…….....32
III-2.5.1.1 *Staphylocoques aureus*……..……32

III-2.5.1.2. *Escherichia Coli*…… ….……33
III-2.5.1.3. *Candida albicans*…….…..…….33
III-2.5.1.4.*Pseudomonas aeruginosa* …….…….33
III.3. Détermination de la teneur en eau ……..…34
III.4 Extraction des huiles essentielles…….…….....34
III.4.1.Extraction par Hydrodistillation par chauffage classique (CC).....34
III.4. 2.Hydrodistillation assistée par induction électromagnétique …….....35
III.4.3 Isolation des huiles essentielles …….....35
III.4.4 Paramètres intervenant dans le procédé d'Hydrodistillation..…….....36
III.4.4.1.Effet du rapport pondéral……..…….....36
III.4.4.2. Étude de la cinétique d'extraction …….....36
III.4.4.3.Calcul de rendement en huiles essentielles …….37
III. 5. Caracterisation physico-chimique des huile essentielle d'agrume……..37
III.5.1.La densité relative …….…..……...37
III.5.2.Indice de réfraction ……..….38
III.5.3.Indice d'acide…….....38
III.5.4.Indice de saponification …….39
III.5.5.Indice d'ester …….…….…….39
III.5.6.Miscibilité à l'éthanol……..…..…...…….…….....40
III-6.Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs extraites…….……40
III. 6. 1. Préparation de l'inoculum……. 40
III. 6. 2. Test par diffusion sur disque (Aromatogramme)…….....40
III. 6. 3. Test de macrodilution en milieu liquide …… ……41
III.7 Evaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test DPPH…….....42

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1 Teneur en eau d'agrumes…….…….....44
IV.2. Extraction des huiles essentielles…….45
IV.2. 1. Rapport pondéral …….45
VI.2.2. Evolution de la cinétique d'extraction…….....45
VI.3 Caractéristique physicochimique des huiles essentielles d'agrumes…...……48
VI.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne……..…….……..49
VI.4 .1 Aromatogramme……...49
VI.4.2 Concentrations minimales inhibitrices (CMIs)……..……52

IV.5. Evaluation de l'activité antioxydante…… …….....56
IV.5.1 Détermination d'IC50 des huiles essentielles…….…….....56

Conclusion générale ……..…60
Références bibliographique

Liste des abréviations

A	Absorbance de la solution.
AFNOR	Association française de normalisation
ATCC	American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
C	Concentration.
°C	degré Celsius
CC	Chauffage Classique
cm	Centimètre
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice (µl/ml)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl
d_{20}^{20}	Densité relative
EtOH	Éthanol
g	Gramme
HE	Huile essentielle
HD	Hydro distillation
H	Heur
IC50	Concentration inhibitrice à 50%
I_A	Indice d'acide
I_E	Indice d'ester
I_I	Indice d'iode
I_R	Indice de réfraction
I_S	Indice de saponification
IM	Induction électromagnétique
K_F	Karl Fischer
Kg	Kilogramme
Ml	Millilitre
mm	Millimètre
VMHD	Vacuum Microwave HydroDistillation ,

Liste des tableaux

Tableau II.1 : Les plus importants genres d'huiles essentielles produits dans la Famille des *Rutaceae*.……..……..……..…..27

Tableau III - 1 : Les produits chimique utilisée……..…31

Tableau IV.1 : Effet du rapport pondéral……45

Tbleau IV.2 : Evolution du rendement en H.Es des espèces citrus ……...45

Tableau IV.3:Propriétés physico-chimique des huile essentielle d'espace citrus ……48

Tableau IV.4 : Diamètres d'inhibition provoqués par des HEs de *Citus*…..…… . .50

Tableau IV.5 : CMI (µl/ml) des huiles essentielles d'agrumes en milieu liquide..…….55

Tableau IV.6 : Valeurs des IC50 trouvées pour les HE d'agrumes…….58

Liste des figures

Figure I.1 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle ……..…….……..…..9

FigureI. 2 : Schéma du dispositif de l'hydrodistillation ……...……10

FigureII. 1 : Limites climatiques de l'agrumicole et les principales régions productrices dans le monde …….....21

FigureII.2 : Coupe transversale d'une orange ……..…….22

FigureII.3 : Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010……..28

Figure III.1 : A) Citron ; B) Orange…….....31

Figure III.2 : Montage de l'Hydrodistillation par induction électromagnétique….....34

Figure III.3 :Montage de l'Hydrodistillation par chauffage classique …….. ……...35

Figure III.4 : Montage de décantation…….... 36

Figure III.5: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme……....41

Figure III.6 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide…….....41

Figure III.7 : Réaction du DPPH• avec un antioxydant…….42

Figure IV.1 : Teneur en eau ……...44

Figure. IV.2 : Variation du rendement en huile essentielle d'orange en fonction de temps…… ……. 46

Figure. IV.3 : Variation du rendement en huile essentielle de citron en fonction du temps…….....46

Figure IV.4 : Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *S.aureus*.....49

Figure IV.5 : Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *C. alabican*…….……..…49

Figure IV.6: Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *E.Coli*…….…….49

Figure IV.7 : Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *Ps.aeruginosa*……..50

Figure IV.8 : Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *S.aureus*……52

Figure IV.9: Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *E. coli*……..52

Figure IV.10: Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *C. alabican*……52

Figure IV.11: Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *P. aeruginosa*……53

Figure IV.12 : Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *S.aureus*……..…… …53
Figure IV.13: Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *E. coli*……..……..53
Figure IV.14: Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *C alabican*……...……54
Figure IV.15: Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *P. aeruginosa*……..54
Figure IV.16 : Activité antimicrobienne de l'antibiotique sur : **A)** *S.aureus*, **B)** *E.coli*. ……..54
Figure IV.17: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction de concentrations de l'huile essentielle d'orange…… …….56
Figure IV.18: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction de concentrations de l'huile essentielle de citron……..57
Figure IV.19 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction de concentrations de l'acide ascorbique……57

Introduction générale

Pendant de nombreuses années, une variété des composés chimiques différentes a été utilisée comme un agent antimicrobien dans les aliments et les médicaments pour inhiber les microorganismes pathogènes.

Cependant, la généralisation de l'utilisation des conservateurs chimiques a conduit à un certain nombre des problèmes écologiques et médicaux, font qu'il est nécessaire d'adopter des stratégies qui sont accessible, simple dans son application, et non toxique pour les humains et les plantes **[1].**

Cependant, de nos jours il y a un renouvellement d'intérêt scientifique de l'utilisation des antimicrobiens naturels pour la conservation des aliments. Cela est dû à la forte demande des consommateurs pour plus d'aliments naturels qui possèdent encore une longue durée de vie.[2]

Ainsi, de nombreux composés phytochimiques y compris les huiles essentielles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, de leurs activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques **[3].**

Ces dernières années, avec les développements technologiques, l'industrie chimique est toujours en la recherche de nouvelles technologies de séparation, plus efficaces de point de vue de productivité, rendement et sélectivité, liée aux exigences pour la protection de l'environnement, le chauffage par induction électromagnétique, par exemple, participe à cette maitrise.

C'est pourquoi, nous nous somme intéressé à l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de deux sortes de *Citrus* à savoir *C. limonum* (citron), et *C. sinensis* (orange douce) en essayant d'améliorer le procédé d'extraction de ces huiles. C'est une étude comparative alors en terme de rendement, de cinétique d'extraction et de composition chimique des HEs extraites par deux techniques de chauffage classique et celle basée sur un chauffage par induction électromagnétique. Puis à évaluer leurs activités antioxydante et antibactérienne contre quelques microorganismes.

Notre travail est subdivisé en trois (3) parties **:**

- ✓ Une partie bibliographique, débutant par une illustration des huiles essentielles. Elle est suivie par une présentation de leurs propriétés biologiques et un aperçu sur les agrumes étudiées ;
- ✓ Une deuxième partie, consistant en une présentation détaillée du matériel et des méthodes expérimentales utilisés dans ce travail : L'extraction des huiles essentielles et l'identification de leurs propriété physico- chimiques ainsi que l'évaluation de leurs activités antimicrobienne, et antioxydante ;
- ✓ La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats ainsi que leurs interprétations et discussion.

Chapitre I : Huiles essentielles

I.1.Introduction :

Les huiles essentielles occupent une place importante dans la vie quotidienne des hommes. Elles possèdent des propriétés très intéressantes, qui trouvent leur application dans divers domaines : médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. L'usage des huiles essentielles remonte à fort longtemps, puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes **[4].**

Dans ce chapitre nous exposons les différentes notions théoriques concernant les principales caractéristiques des huiles essentielles, leurs méthodes d'extraction et leurs domaines d'applications.

I.2. Historique :

Les premiers rapports sur la fabrication et l'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C(Jésus–christ). **[5]**

Les huiles essentielles semblent, donc, avoir accompagné les civilisations humaines depuis leurs premières genèses. Les égyptiens, puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation …etc. **[6]**

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère de la civilisation musulmane, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. **[7]**

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leurs utilisations ont, aussi, tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice Gattefosse a inventé, en 1928, le terme de l'aromathérapie. Il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés. Ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches. **[6]**

I.2. Définition :

A chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée. **[7]**

La norme AFNOR NF T 75-006 **[8]** a donné comme définition d'huile essentielle (essences est synonyme d'huiles volatiles): «Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procèdes mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procèdes physiques pour les deux premières modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition **[9]**.

I.3. Répartition et sites d'accumulation des essences chez les plantes

Selon Lawrence **[10]**, 17 500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituant qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles ; par exemple : les Myrtaceaa, les Rutaceae, les Laminaceae, les Asteraceae, les Apiaceae, les Cupressaceae, les Poaceae, les Zingiberaceae, les Piperacaea…etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes : (les fleur, les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines. Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peuvent varier selon sa localisation. **[9]** .

Le stockage et la synthèse des huiles essentielles peuvent s'effectuer dans des cavités, alvéoles, poches (cas des hespéridées) ou canaux sécréteurs (cas des Pinus, des commiphora et des Boswilli). Il arrive, parfois, que ces sites consistent en formations très superficielles (poils ou trichomes glandulaires).**[11]**

I.4. Fonction des huiles essentielles dans la plante :

Les fonctions possibles des huiles essentielles sont multiples : la protection contre les prédateurs de la plante, l'attraction des insectes pollinisateurs, l'inhibition de la germination et de la croissance, l'inhibition de la multiplication des bactéries et des champignons. Il est souvent difficile de limiter l'action d'huile essentielle à un rôle particulier. **[12]**

Cependant, la fonction biologique de certains composants tels que les terpénoïdes des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure. **[9].**

L'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques, a été rattachée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes. **[13]**

I.5. Composition chimique :

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir.

Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils. **[11]**

- **Les composés terpéniques**

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C5H8) reconnue par Wallach dès 1887 **[14]**Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par Ruzicka, l'élongation de la chaine isoprénique conduit à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones **[14].**

Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles **[9] ,** et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives **[15].**

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures.

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 : les alcools (géraniol, linalol), les esters (acétate de linalyle), les aldéhydes (menthone, camphre, thuyone), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes.**[16 , 17].**

- **Les monoterpènes**

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est C10H16 **[18]**.

Ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques, monoterpènes monocycliques ou monoterpènes bicycliques **[09].**

- **Les sesquiterpènes**

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est C15H24, soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes **[13].**

Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures **[18].**

✓ Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, caractérisés par l'existence d'un cycle à six atomes de carbone avec trois doubles liaisons alternées, mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente **[16].**

✓ Les composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultants de la transformation de molécules non volatiles entraînables par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînables à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes,.…etc.

Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renfermant l'élément nitrogène. Parmi ces composés on cite l'indole, qui se trouve dans l'huile essentielle de citron et des fleurs de jasmin. **[09].**

I.6. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

- Les HE sont âcres, inflammables, très odorantes, volatiles et très rarement colorées.
- Liquides à température ambiante, leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C.
- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, et insolubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leurs odeurs.

- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Leur densité varie de 0,759 à 1,096, une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques , elles sont dextrogyres ou lévogyres et rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité **[19 , 20].**

I.7. Facteurs de variabilité des huiles essentielles :

I.7.1. Dénominations de l'Huile essentielle :

Il est important de rappeler qu'une huile essentielle doit, sur le plan nomenclature, être liée au matériel botanique d'où elle est issue. **[11].**

I.7.2.Influence du cycle végétatif :

Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal autant en ce qui concerne le rendement et la composition chimique en huiles essentielles. **[11].**

Ceci serait, essentiellement, dû aux différences des états physiologiques de la plante durant le cycle annuel (croissance végétative, induction florale, formation et croissance des fruits, repos végétatif).

I.7.3. Influence des facteurs extrinsèques :

Il s'agit là de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales, la température, l'humidité relative, la durée totale d'ensoleillement et le régime de vents exercent une influence directe**. [09].**

Aussi, les facteurs géographiques et édaphiques exercent une influence sur la composition biochimique de la plante, d'une manière générale et d'une manière particulière la composition chimique des huiles essentielles. **[11, 21].**

I.7.4. Récolte du matériel végétal :

La collecte du matériel végétal pose très souvent le problème de la contamination par d'autres espèces végétales, surtout s'il s'agit de plantes à croissance rapide ou de végétaux qui poussent dans des lieux où se trouvent de nombreuses autres espèces végétales**.[11].**

I.7.5. Transformations du matériel végétal :

Le matériel végétal qui va subir l'Hydrodistillation n'est pas toujours traité immédiatement.

Des modifications physiques et biochimiques dues à l'action de l'air, du soleil, de l'échauffement en tas peuvent se produire et se révéler fâcheuses pour la qualité de l'huile essentielle ; surtout s'il s'agit de fleurs. **[11].**

I.7.6.Hybridations, facteurs de mutation, la polyploïdie et les aberrations chromosomiques

Les huiles essentielles peuvent varier qualitativement ou bien quantitativement. En effet, les hybridations introduisent, par allo-fécondation, de l'hétérogénéité dans les peuplements de plantes. **[5].**

Une race chimique peut, aussi, apparaître par mutation. Ce cas a été signalé avec l'exemple pour le Houblon (Humulus lupulus L.). Par ailleurs, dans la plupart des cas, la polyploïdie augmente les rendements en huiles essentielles (Carvi, Menthe,Camomille) **.[11]**

I.8. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, …), de la nature des composes (par exemple, les l'huile essentielles, huiles lourdes….), le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées. Les principales méthodes d'extraction sont :

1. Distillation à vapeur saturée
2. Entraînement à la vapeur d'eau
3. Hydro diffusion
4. Expression à froid
5. Extraction par solvants
6. Hydrodistillation
7. Extraction par les corps gras
8. Extraction par micro- ondes

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est explicité dans la figure I.1. **[22]**

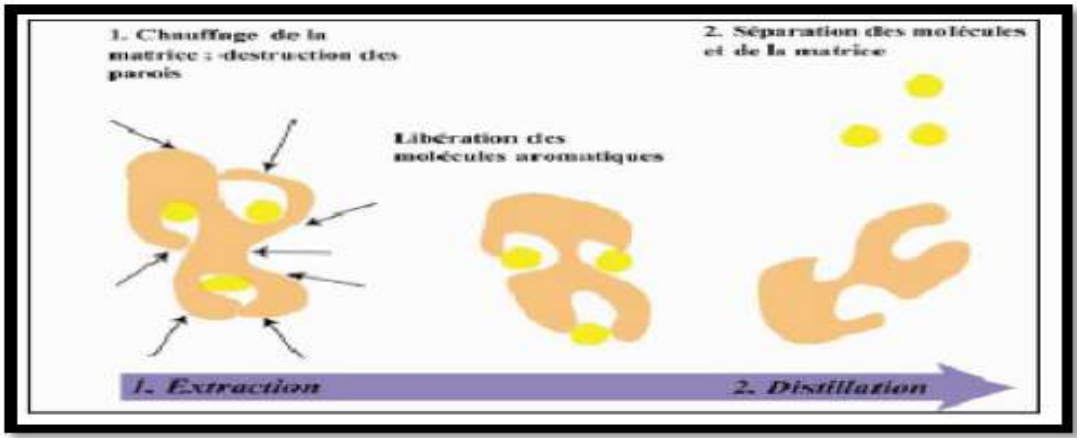


Figure I.1 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle**.**

1.8.1. Hydrodistillation :

L'Hydrodistillation (figure I.2) proprement dite est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité **[22]**. Le principe de l'hydro-distillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique **[23].**

La durée d'une Hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures **[24]**.

Selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait. **[25]**

Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en œuvre du procédé, son sélectivité et donc la qualité des produits obtenus. Cependant l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques.

C'est ainsi que pour certains végétaux fragiles, comme par exemple les pétales de fleurs, une technique d'extraction plus appropriée est utilisée. Il s'agit de la (distillation dite sèche). Cette technique ancestrale, utilisée autrefois par les alchimistes arabes**. [26]**

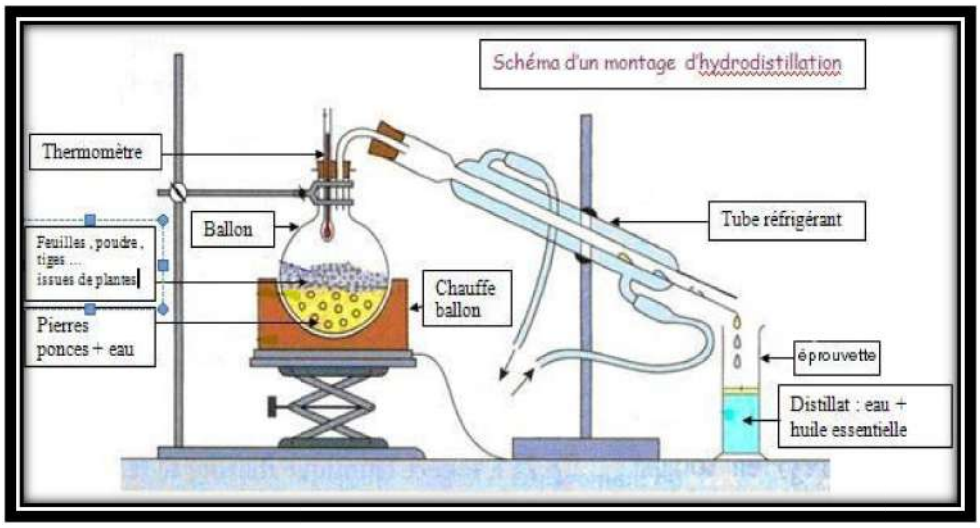


Figure I. 2 : Schéma du dispositif de l'hydrodistillation.

I.8.2. Entraînement à la vapeur :

Souvent, l'entraînement à la vapeur est la méthode d'extraction adoptée pour l'obtention d'une huile essentielle à partir d'un végétal. Le plus souvent, de la vapeur d'eau est injecté au bas d'une charge végétale. La vapeur d'eau chargée en molécules volatiles est récupérée au sommet de la charge puis, par la suite, condensée. Par décantation, une fraction hydrophobe se sépare de la phase aqueuse : il s'agit de l'huile essentielle. **[27].**

Cependant, ces deux procédés (l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur) présentent des inconvénients dus, principalement, à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition, en milieu plus ou moins acide ; provoquant la formation d'artefacts (huiles essentielles riches en acétate de linalyle). **[28].**

I.8.3.Hydrodiffusion :

Ce procédé consiste à propulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02 à 0,15 bar), à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procède permettrait un gain de temps et d'énergie**. [09].**

I.8.4. Expression à froid :

L'expression à froid est un procédé d'extraction très simple. Il est, principalement, utilisé pour les écorces d'agrumes (citron, pamplemousse, bergamote, orange douce, orange amère etmandarine). Cette opération mécanique vise à casser les cavités contenant l'essence dans les zestes des agrumes frais. Dans ce cas en utilise le terme ''essence'' plutôt qu'huile essentielle **[29]**.

I.8.5. Hydrodistillation par micro-ondes, sous vide :

Le procédé Vacuum Microwave HydroDistillation (VMHD), breveté par Archimex, est basé sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Les micro-ondes accélèrent le transfert des molécules vers le milieu extérieur et le vide pulsé permet de réaliser l'entraînement à une température inférieure à 100°C.

Les huiles essentielles, extraites par le procédé VMHD, présentent un profil très proche des essences contenues dans la matière première tout en conservant la note « fraîche » du végétal d'origine.

Grâce à une extraction 5 à 10 fois plus rapide et réalisée à une température plus basse que les méthodes traditionnelles, le procédé VMHD permet de réduire les risques de dégradation thermique **[27].**

I.9. Conditions de conservation et de stockage :

La relative instabilité des molécules constituant les HE exige le respect de précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses et les conséquences sont multiples. Nous pouvons citer, à titre d'exemple, la photosomérisation, la photocyclisation, la coupure oxydative, la peroxydation et la décomposition en cétones et alcools, la thermo-isomérisation, l'hydrolyse et la trans-estérification. Ces dégradations pouvant modifier les propriétés et /ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle.

Ainsi, il convient d'utiliser des flacons propres et secs, en aluminium, vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique ; presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte) ; stockage à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Par ailleurs, des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques **[30].**

I.10. Utilisation des huiles essentielles :

I.10.1. En pharmacie :

Les huiles essentielles constituent le support d'une pratique de soins particulière :l'aromathérapie. Toutefois, il faut souligner que la majorité des constituants des huiles essentielles sont lipophiles et, de ce fait, rapidement absorbés que ce soit par voie pulmonaire, par voie cutanée ou par voie digestive. Il convient, donc, d'être particulièrement vigilant quant aux doses utilisées. S'il est évident que la plus grande prudence s'impose lorsque les huiles essentielles sont administrées par voie orale, en mélange, elles ne doivent pas non plus être utilisées inconsidérément par voie externe : l'agressivité de certaines d'entre elles à l'encontre des muqueuses et /ou de la peau doit inciter à ne le pas laisser ces produits à la portée des enfants et il serait souhaitable qu'ils soient systématiquement délivrés dans des conditionnements adaptés et toujours correctement étiquetés. **[31]**

I.10.2. En parfumerie :

L'industrie des cosmétiques est le débouché principal des huiles essentielles. A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence d'huiles essentielles dans la préparation des bains (calmants ou relaxants). On notera qu'il y a là une possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques. **[31].**

I.10.3. En industries agro-alimentaire:

Si certaines drogues sont utilisées en nature (épice et aromates), d'autres le sont sous forme d'huiles essentielles ou de résinoïdes et d'oléorésines-dispersées, encapsulés et complexés. **[31].**

I.10.4. Dans divers industries :

Surtout dans l'industrie chimique, où on utilise encore, à côté de produit de synthèse, des pinènes de la térébenthine, le sclaréol, le citral des isolats de Litsea cubeba (plante de la famille des Lauracées). Ces Molécules constituent des matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines et de substances odorantes. A titre

d'exemple, nous pouvons citer l'utilisation du safrole (extrait d'Ocotea brésiliens ou d'espèce de Cinnamomum de Chine) pour la synthèse de l'héliotropine utilisée en parfumerie ou du butoxyde de pipéronyle, un synergiste des pyréthrinoides **[31].**

I.10.5.Aromathérapie :

C'est une thérapeutique qui utilise les huiles essentielles provenant de plantes dites «aromatiques».**[32] .**

L'aromathérapie scientifique est une science qui utilise les méthodes et les techniques scientifiques de laboratoire pour mettre en évidence la relation entre la structure chimique des molécules actives des huiles essentielles et leurs activités biologiques.

Le terme « aromathérapie » a été formulé, en 1928, par M. Gattefossé, le bâtisseur de la recherche scientifique sur les huiles essentielles. A partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par des chercheurs et des médecins (tels que Valnet, Belaiche, Duraffourd, Sévelinge, Pellecuer, Pénoël, Franchomme, Mailhebiau …etc.), ont permis à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux molécules qu'elles contiennent des propriétés thérapeutiques. **[33]**

I.11. Données toxicologiques :

Les huiles essentielles sont présentées, généralement, comme « sans danger ». Mais ces substances naturelles sont aussi des composés puissants **. [34].**

Par leur composition chimique, complexe, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome. **[35]**

Les effets toxiques d'une huile essentielle varient considérablement selon sa nature.**[37].**

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles du thym et de la lavande, selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact, par exemple, se sont avérées cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des huiles

essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées du cancer **[17].**

I.12. Activités biologiques des huiles :

L'utilisation des qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ième siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues aux huile essentielle produites par les plantes et présentant un spectre d'action très large ; inhibant aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et, en particulier, de la nature de leurs composés volatils majeurs. **[36]**

Les chercheurs se sont intéressés à des composés, biologiquement actifs, isolé à partir d'espèces végétales pour le controle des micro-organismes pathogènes qui ont fini par développé une résistance aux les antibiotiques utilisés **.[38].**

Il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant ,suivant la nature de leur composés majoritaires : Phénol > alcool > aldéhyde >cétone> oxyde> hydrocarbures > esters. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable. **[39]**.

I.12.1 L'activité antibactérienne

De récentes études, pratiquées sur plus d'une centaine d'huiles essentielles et de composés d'arômes, ont permis de sélectionner une trentaine d'huiles dirigées , spécifiquement, contre les quatre bactéries pathogènes les plus répandues (*Escherichia coli* , *Salmonella sp*., *Staphylococcus aureus* , *Listeria monocytogenes*) et contre les bactéries d'altération des aliments (*Pseudomonas*, *Serratia liquefaciens* , *Lactobacillus curvatus* , *Lactobacillus sake*) **[37].**

Une collection de 20 huiles essentielles de diverses plantes ont été évaluées, en vue d'obtenir un aperçu de la susceptibilité des bactéries de la carie dentaire et estimer le potentiel des huiles dans des traitements préventifs. **[40] .**

I.12.2 Activité antifongique

L'effet antifongique des HE est dû, essentiellement, à la nature de leurs composés majoritaires et, aussi, en partie à la nature de leurs composés mineurs. Dans une étude, faite sur la cannelle**, [42]**ont montré que les composés majeurs, l'aldéhyde cinnamique et l'eugénol, ont une forte activité sur l'inhibition de la croissance d'AspergiIlus parasiticus.

Un extrait organique (l'acétone) de *Lantana camara L*., une plante considérée parmi les mauvaises herbes dans l'Afrique de sud, a montré une activité antifongique contre Fusarium Oxysporium , avec une CMI de 0,08 mg/ml **[43].**

Selon schaller (1999) et Bossokpi (2003) **[44,45]**, l'extrait éther de pétrole de la poudre d'écorces de *racines de Fagara zanthoxyloïdes* a considérablement inhibé la croissance des souches de *Candida albicans*, une levure responsable de mycoses chez l'homme. Selon schaller (1999) et Bossokpi (2003) **[44,45],** l'activité antifongique peut être due à la présence des alcaloïdes présents dans la plante.

Le développement des substances antifongiques se heurte à deux obstacles :

1. Une faible activité fongicide in vivo malgré des résultats in vitro prometteurs ;
2. Une mauvaise diffusion à travers la paroi, très épaisse, des champignons, du fait de sa composition (chitine, phospholipides et stérols); Les substances antifongiques devant, de ce fait, présenter une hydrophobie élevée. **[45].**

Les huiles essentielles utilisées pour leurs propriétés antifongiques sont les mêmes que celles citées précédemment cependant la durée du traitement sera plus longue, par exemple : les huiles essentielles de *cannelle*, de clou de *girofle* et de *niaouli***. [46].**

Le mécanisme de la toxicité des phénols envers les champignons est basé sur l'inactivation des enzymes fongiques qui contiennent le groupement SH dans leur site actif **[47].**

I.12.3. Activité anti-oxydante :

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF ont montré que l'incorporation des huiles essentielles, directement, dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit …etc.) ou l'application par vaporisation, en surface, de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers) contribuent à préserver l'aliment contre les phénomènes d'oxydation **[36]**

L'huile essentielle de *Citrus sinensis* contient, comme principale composante, le limonène (84,5%) qui montre une activité antioxydante très élevée, (plus de 90%). **[5]**

I .12.4. L'activité anti-virale :

Les huiles essentielles sont capables de supprimer les virus de différentes manières. Ils peuvent inhiber leur réplication ou ils peuvent prévenir leur propagation d'une cellule à une autre **[48, 5]**, ont publié leurs résultats sur l'activité antivirale de l'huile de bois de santal (Santalum album), contre le virus de l'herpès simplex de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2). Les auteurs ont constaté que l'HE a inhibé la réplication des virus.

Caillet et All ,(2007) **[37]** ont étudié, in vitro, l'activité antivirale de l'HE de Minthostachys verticillata (une Lamiacées) contre le HSV-1 et PRV (virus de la pseudo-rage). Cette HE influence, négativement, la multiplication de HSV-1 et PRV, une activité qui est attribué aux principaux constituants de l'HE, à savoir la menthone (39,5%) et, surtout, la pulégone (44,6%)**.**

Les virus sont assez sensibles aux huiles essentielles à phénol et à monoterpénol. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Nous pouvons citer l'huile essentielle de *ravintsara*, l'huile essentielle de bois de Hô, ou l'huile essentielle de cannelle de Ceylan **[51].**

I.13.Autres Activités des huiles essentielles :

- **Antiparasitaires** : Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites. Le thym à linalol, la sarriette des montagnes sont d'excellentes huiles essentielles antiparasitaires . **[51].**

- **Antiseptiques** : Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata* **[09] .**
- **Insecticides** : Certaines huiles essentielles sont insectifuges ou insecticides comme celles possédant des fonctions aldéhydes comme le *citronnellal* contenu dans l'eucalyptus citronné ou la citronnelle **[52].**
    - **Activité acaricide** :Contre *Varroa jacobsoni*, parasite des colonies d'abeilles,plusieurs travaux ont été menés sur l'effet toxique de certaines essences et de leur composant **[53].**

Parmi ces derniers, c'est le thymol qui a engendré le meilleur résultat. Il a été prouvé jusqu'à présent qu'un seul traitement à base d'huile essentielle ou d'un composé est généralement suffisant pour maintenir la population de l'acarien Varroa au dessous du seuil de dégât économique pendant toute la saison. **[54].**

- **Anti-inflammatoires :**

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne comme l'huile essentielle de gingembre **[55].**

- **Régulatrices du système nerveux**
    - **Antispasmodiques** : Les huiles essentielles possédant des esters ou des éthers, possèdent une action sur les spasmes des muscles lisses ou striés, comme l'huile essentielle d'hélichryse. **[55].**
    - **Calmantes, anxiolytiques** : Les aldéhydes type citrals contenus par exemple dans l'huile essentielle de mélisse ou celle de verveine citronnée favorisent la détente et le sommeil. **[55].**
- **Analgésiques, antalgiques** : Les huiles essentielles les plus connues pour leur action antalgiques sont les huiles essentielles d'eucalyptus citronné, de gingembre et de lavande vraie**. [55].**

I.14. Mode d'action des huiles essentielles

Il existe très peu de données scientifiques sur les mécanismes d'action des huiles essentielles sur les micro-organismes. Certains auteurs ont attribué cette action à l'interaction de leurs groupes fonctionnels (phénol essentiellement) avec l'enveloppe de la cellule microbienne. **[56, 57, 58]**.

D'autres ont constaté que les huiles essentielles provoquent une détérioration de la membrane cytoplasmique .**[59 , 57]**

Selon Caillet et Lacroix (2007) **[37]** les huiles essentielles agissent en empêchant la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines, chez les bactéries. Chez la levure, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium. De plus, elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines, chez les moisissures.

Selon Caillet et Lacroix (2007) **[37]**, d'une manière générale, le mode d'action des huiles essentielles sur les différentes souches de bactéries se déroulent en trois phases :

1. L'attaque de la paroi bactérienne, par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
2. L'acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
3. La destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie **.**

De son côté, Rhayour, K., (2002) **,[57]** a montré que les huiles essentielles de girofle et d'origan agissent principalement grâce à leurs constituants majoritaires phénoliques (eugénol, thymol et carvacrol) en provoquant des altérations de la paroi et les membranes de plusieurs bactéries (Escherichia coli, Bacillus subtilis., Mycobaceérium phlei et Mycobacterium fortuitum).

Lahlou ,(2004) et Bammi et All , (1997) **, [58]**ont montré une action de l'huile essentielle du thym sur le cycle de vie de la cellule bactérienne , ont montré que l'action de l'huile essentielle s'est traduite par l'apparition de lésions profondes chez différents micro-organismes (E. coli, B. subtilis et Saccharomyces cerevisiae).

Finalement, il apparait clairement que seule une connaissance approfondie du mécanisme d'action des huiles essentielles, contribuera à leur donner plus de considération et conduira à une utilisation correcte dans différents domaines d'application. **[58]**

Bouchikhi et al. , (1994), **[59]**, ont montré que l'action de l'huile essentielle s'est traduite par l'apparition de lésions profondes chez différents micro-organismes (*E.coli*, *B.subtilis* et *Saccharomyces cerevisiae*).

I.15 Conclusion

L’extraction des huiles essentielles est confortée, entre autres, au problème de leur faible teneur dans la matière végétale. par conséquent, des solutions technologiques, permettant la récupération aussi complète que possible d'une huile sécrétée et issue des plantes aromatiques sont a rechercher les différents procédés permettant de les extraire en fonction des propriétés physico-chimiques.

Chapitre II : Agrumes

II.1. Introduction

Les principaux agrumes cultivés pour la production de fruit sont : les orangers, les mandariniers, les clémentiniers, les *citronniers*, et les pomelos.

Le terme général orangeries désigne non seulement les plantations d'orangers mais, par extension toutes plantation d'agrumes constituant le verger agrumicole **[60].**

II .2 .Origine et histoire des agrumes

L'histoire des agrumes, d'après WEBBER H.J et, *al* (1967) **[61]** remonte à 4000 ans avant J-C (Jésus –christ) où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du Sud-Est Asiatique.

La première mention écrite sur les agrumes se trouve dans la littérature Sanskrit environ 800 ans avant J-C (Jésus–christ). La culture des agrumes a commencé en Chine probablement 500 ans avant JC. Le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Theophrastus en 310 avant J-C. Les botanistes grecs qui suivirent Alexandre le Grand dans ses conquêtes, ont découvrert le cédratier en Perse et l'ont baptisé « Pomme de midi ». Le cédrat fut d'abord utilisé comme parfum et comme insecticide. Plus tard, il fut jugé comestible lorsqu'il était correctement préparé. Les romains ont importé les oranges et les citrons de leur province comme un luxe couteux pour leurs banquets. Les plantes qu'ils cultivaient à Rome ont survécu mais portaient peu de fruits.

Au $10^{ème}$ siècle, les conquérants arabes réintroduisent le cédrat en Europe et introduisent de nombreuses nouveautés tels que le citron et l'orange amère (bigaradier). Ces fruits ont été répartis autour de la méditerranée orientale, l'île de Sicile, le Nord d'Afrique jusqu'au Sud de l'Espagne (zone de Séville vers 1150). Aux XI et XII ème siècles et de retour de Jérusalem, les Croisés propagent en Europe occidentale l'utilisation et la culture du citron, du bigaradier et de la lime **[62].**

Les grands navigateurs, ont non seulement élargi notre vision du monde mais également joué un rôle important dans la diffusion des agrumes. C'est lors de son deuxième voyage que Christophe Colomb introduisit en 1493 le citron et la lime dans l'île d'Hispaniola (Haïti). Vasco De Gama découvreur de la route de l'Inde introduit en 1494 l'orange douce dans le Portugal.

C’est par hasard que ces navigateurs, lors des grands voyages, découvrent le rôle de la vitamine C présente dans le citron comme moyen de lutte contre le scorbut. Depuis ce temps là les agrumes partent à la conquête du monde. Les premières plantations dans le continent américain furent introduit sur la côte de l’actuel Mexique en l’an 1518, ensuite au Brésil en l’an 1540, en Floride en 1565, en Caroline du Sud en 1577, au Pérou en 1609, en Arizona en 1707, en Australie en 1718, en Californie en 1769 et au Texas en 1890. Le dernier agrume arrivé en Europe fut le mandarinier au début du 19èmesiècle. Depuis lors, il est devenu l’un des agrumes les plus populaires et une source de développement continu **[63].**

II.3. Caractéristiques et description des agrumes

Les agrumes ont des feuilles persistantes, caractère d’adaptation à des hivers peu rigoureux. Les agrumes sont en principe cultivés autour de l'équateur, du 40º Nord au 40° Sud (Figure II.1). On les rencontre par conséquent en priorité dans les climats de type méditerranéen**[64].**

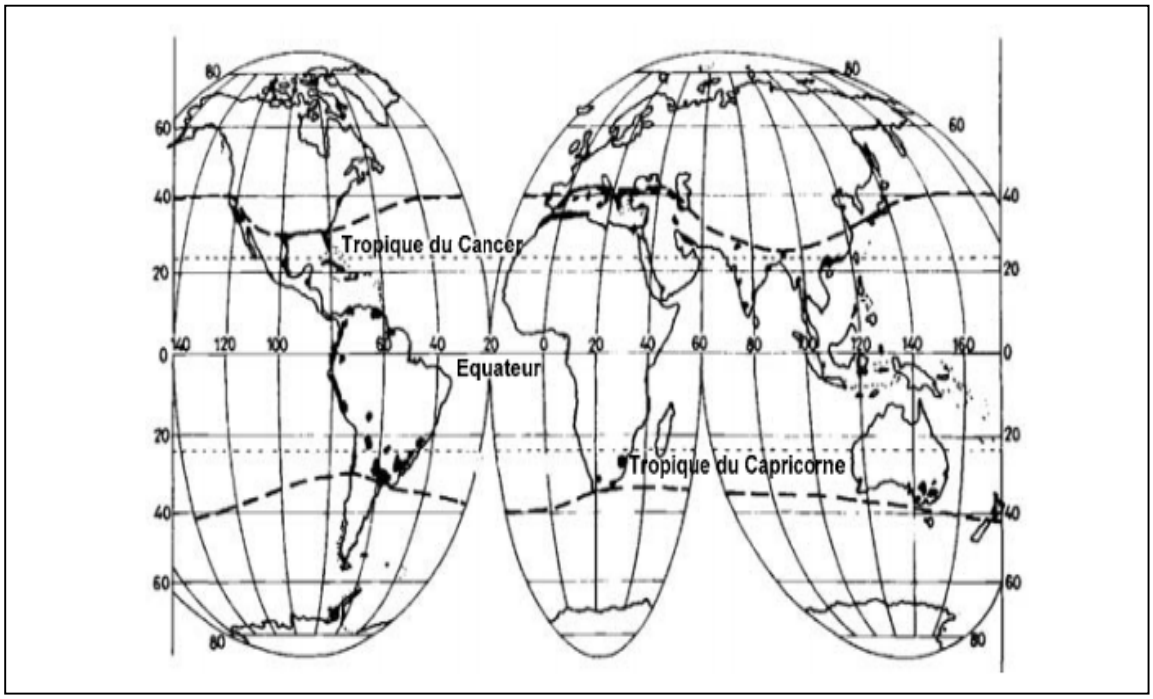


Figure II.1 : Limites climatiques de l’agrumicole et les principales régions productrices dans le monde

Tous les fruits des citrus cultivés ont presque la même structure : l’écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines.

Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse. La pulpe, partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers pouvant varier de 5 à 18 **[65]**

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes

(Figure II .2):

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou flavedo), qui recouvre le fruit et le protège des dommages. Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.

- Un mésocarpe (ou albedo) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.

- La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique **[66 ,67]**

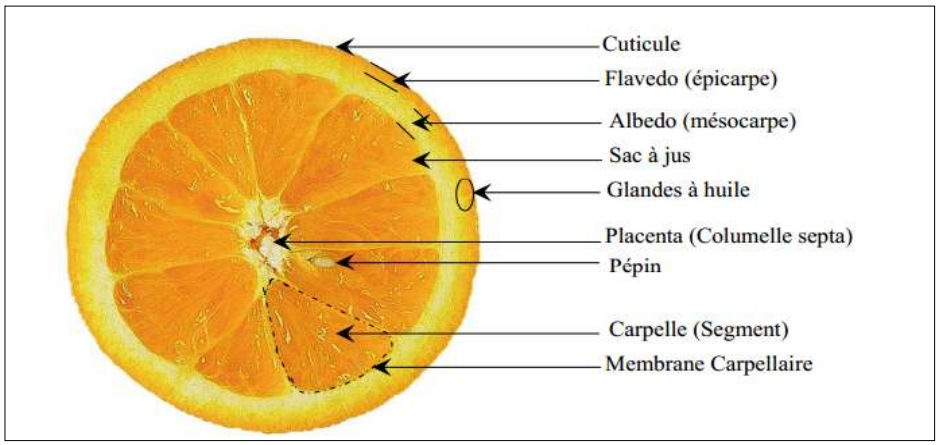


Figure II.2 : coupe transversale d'une orange

II.4. Classification des agrumes :

La composition systématique des agrumes est la suivante :

Règne : Végétal.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous- Embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylidones

Sous-classe : Rosudées

Ordre : Rutales

Famille : Rutaceae

Genre : Poncirus, Fortunella et *Citrus*

On s'intéressera dans ce qui suit seulement au genre *Citrus*.

Le genre *Citrus* ne contiendrait pas plus de onze espèces mais plus de 1500 variétés.

Le genre *Citrus* Linné par exemple contient :

Citrus aurantium (L), bigarades.

Citrus sinensis (L), oranges doux.

Citrus reticulata (L),mandarine.

Citrus clémentina (L), clémentine.

Citrus medica(L), cédratier.

Citrus paradisis (racf), pamplemousse.

Citrus limonum(L), citronier.

Il existe différentes variétés de *Citrus*, agrumes consommés et utilisés industriellement partout dans le monde, citant comme exemples :

- ✓ **Orange**

Nom commun : orange douce.

Nom scientifique : *citrus sinensis.*

Partie utilisé : le zeste.

Famille : Rutaceae

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant légèrement ailé à floraison blanche très parfumée. Ses fruits mettent 10 à 20 mois pour murir, de la taille moyenne, de forme sphérique et de couleur caractéristique orange **[68].**

Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs…) distillée (ou expresses pour les zestes de *Citrus*), il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes **[68].**

- ✓ **Citron**

Nom commun : citron.

Nom scientifique : *citrus limonum*.

Partie utilisé : le zeste

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Le citron est un petit arbre épineux à feuilles persistantes, atteignant 3 à 6 m de hauteur, à cime étalée et peu dense, au feuillage vert claire. Les feuilles composées, unifoliolées, alternées, de formes variables, lancéolées et elliptiques, à bord denticulé, de taille très variable de 5 à 10 cm. Les fleurs sont blanches et odorantes .Le fruit est de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à leur extrémité. La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit ; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre, est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide **[69]**.

II.5 .Transformation des agrumes :

Les agrumes (*Citrus*) sont un bon exemple de transformation des produits agricoles à grande échelle qui utilise une approche de raffinerie. Une gamme de culture d'agrumes est transformée pour produire des huiles essentielles à double usage aussi bien comme arômes que comme ingrédients de parfum. Il s'agit notamment de la bergamote, du pamplemousse, du citron, de la lime, de la mandarine, des oranges douce et amère**[70]**.

L'industrie de la transformation des oranges dans le monde entier a un chiffre d'affaires de plus de 2 milliards de dollars par an. Plus de 400 à 500 millions d'arbres sont cultivés, principalement au Brésil et en Floride, avec respectivement environ 150 et 60 millions d'arbres, et quelques 75 000 tonnes /an de d-limonène et d'huile d'orange produites à partir du fruit et également des huiles essentielles spéciales telles que les huiles de petitgrain et de néroli. Ces chiffres donnent une indication de la taille impressionnante de l'industrie **[70]**, surtout quand on considère que le rendement de d-limonène à partir du fruit ne représente que 0,27% seulement, comparativement à un rendement de 53% pour le jus.

Les oranges sont pressées pour en extraire le jus, qui est concentré par évaporation jusqu'à environ 5 à 6 fois son poids avant d'être expédié. La peau d'orange restante est ensuite soumise à pression ou à être râpée pour en extraire la soi-disante « huile pressée à froid » ou "essence d'agrumes", source d'arômes et de nombreuses molécules utiles au parfum. Ces terpènes oxygénés constituent essentiellement une minorité de l'huile, qui est essentiellement composée de *limonène* et d'autres hydrocarbures terpèniques. Puisque l'oxydation des terpènes peut donner un mauvais goût, l'objectif majeur de la production d'huiles d'agrumes est de réduire sa teneur en hydrocarbures. La méthode traditionnelle est la distillation fractionnée suivie d'un lavage. Il s'agit de prendre une huile concentrée de nombreuses fois et directement la dissoudre dans une solution eau-éthanol. Bien que la distillation soit bon marché, certains constituants arômatiques volatils sont perdus. Une certaine dégradation thermique se produit, et les hydrocarbures ses qui terpéniques ne sont pas éliminés en totalité et restent donc encore disponibles pour une éventuelle oxydation **[71]**.

II.5 .1. Co-produits de la transformation des agrumes :

Les produits résultant de la transformation d'agrumes sont les jus de fruits, les huiles essentielles et la peau. Cette dernière, avec la pulpe et les graines, constituent les résidus industriels et comptent pour 40 – 60 % du poids de la matière première. L'utilisation de ce résidu est une exigence fondamentale de l'industrie de transformation de fruits, non seulement pour des raisons économiques, mais aussi pour réduire l'impact environnemental grave que cela pourrait induire en cas d'abandon.

Les principaux sous-produits issus de ce résidu, sont les suivants :

- L'eau est le principal constituant de ce résidu et représente d'un point de vue quantitatif 80 à 85 % du poids.
- La matière sèche est constituée principalement de sucres solubles (glucose, fructose, et saccharose, et de faibles teneurs de pentoses), de sucres insolubles (cellulose, hémicellulose, protopectine), d'acides organiques (citrique, malique, isocitrique, oxalique) et une teneur importante de flavonoïdes (hespéridine dans la majorité des espèces d'agrumes, naringine dans le pamplemousse, bergamote et bigarade, le diosmine(analogue à l'hespéridine) et ériodicitrine dans la peau de citron).

Les constituants inorganiques du résidu diffèrent de ceux présents dans le jus, principalement par leur teneur élevée en calcium. Les écorces de lime, de bergamote et de

citron sont principalement utilisées dans l'extraction de la pectine alors que les écorces d'autres agrumes sont presque totalement utilisées comme aliments pour animaux. Les huiles essentielles mènent à des sous-produits intéressants tels que les huiles concentrées, les huiles déterpénées et des formulations d'alcool et de *d-limonène*.

Parmi les utilisations multiples de *d-limonène*, notons ses applications dans la production de résines synthétiques, son utilisation comme solvant dans la substitution des solvants minéraux et en tant que base pour la synthèse de composés aromatiques **[72 ,73]**.

Les limonoïdes, sont des triterpènes oxydés qui sont responsable du goût amer dans le jus et dans les pépins si par inattention ces derniers sont écrasés sous les dents. Cette amertume est due à la transformation à pH acide du *limonine* mono lactone non-amer en *limonine* dilactoneamère dans le jus issus d'oranges navel **[74]**. Cette amertume est plus faible dans les jus issus d'orange Valencia **[75]** .

Les *limonoïdes* trouvent des utilisations thérapeutiques contre la cancérogène en induisant l'activité du glutathion S-transférase. Certains des *limonoïdes* agissent comme répulsifs contre les insectes et peuvent lutter contre les ravageurs.

D'autres produits (comme la pulpe lavée, le jus de pulpe, les cellules entières de jus et des extraits de carotène) peuvent être préparés à partir de la pulpe séparée du jus brut.

II.5.2. Huiles essentielles et essences d'agrumes

Les huiles essentielles de la famille des rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction. Les agrumes utilisés dans la production des huiles sont présentés dans le Tableau II.1

La culture d'agrumes est très répandue partout dans le monde où un climat favorable existe. Les huiles conduisant à la plus grande production comprennent l'orange, le citron, le pamplemousse, la mandarine. La distillation des fleurs d'agrumes conduit à une huile appelée « huile essentielle de néroli » très sollicitée par les parfumeurs. L'hydrolat qui est un sous produit de cette distillation s'appelle « eau de fleur d'oranger », très appréciée tant à l'échelle ménagère qu'industrielle.

L'écorce des fruits d'agrumes contient une essence récupérée soit par distillation ou par expression à froid. Enfin, à partir des feuilles et des brindilles d'agrumes nous obtenons une huile qui porte le nom d'huile de petitgrain **[76]**.

Tableau II.1 : Les plus importants genres d'huiles essentielles produits dans la famille des *Rutaceae*.

Nom botanique	Expressé	Distillée	Partie de la plante utilisée
Citrus aurantifolia(Christm.) Swingle	Essence de lime	Huile de lime distillée	Péricarpe, jus de fruits ou fruits écrasés
Citrus aurantium L., syn. Citrus amara Link, syn. Citrus bigaradia Loisel, syn. Citrus vulgaris Risso	Essence de bagaradier (orange amère)	Huile de néroli, orange amère, huile de petitgrain	Fleurs, péricarpe, feuille, et brindilles (rameaux) avec quelquefois des petits fruits verts
Citrus bergamia (Risso et Poit.), Citrus aurantium L. subsp. bergamia (Wight et Arnott) Engler	Essence de bergamote	Huile petitgrain de bergamote	Péricarpe, feuilles, et brindilles avec quelques fois des petits fruits verts
Citrus hystrix DC., syn. Citrus torosa Blanco	Essence de lime kaffir, combava	Huile de feuilles kaffir	Péricarpe, feuilles
Citrus latifolia Tanaka	Essence de lime type persan		Péricarpe
***Citrus limon*(L.) Burm. F**	Essence de citron	Huile de petitgrain de Citron	Fleurs, péricarpe, feuille, et brindilles avec quelques fois des petits fruits verts
***Citrus reticulate* Blanco syn. *Citrus nobilis* Andrews**	Essence de mandarine	Huile de petitgrain de mandarine	Fleurs, péricarpe, feuilles et brindilles avec quelques fois des petits fruits verts
***Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus djalonis* A. Chevalier**	Essence d'orange douce		Péricarpe
***Citrus* × paradisi Macfad**	Essence de pamplemousse		Péricarpe

II.6. Aspect économique

Parmi les raisons qui ont donné aux agrumes un poids économique sur la scène internationale figurent leurs bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques (par exemple, les glycosides flavanones, acides hydroxycinnamiques) **[77]** , la vitamine C **[78]**, et les caroténoïdes**[79]**. Bien que les fruits soient utilisés principalement pour le dessert, ces derniers sont aussi des sources d'huiles essentielles en raison de leurs composés aromatiques **[80,81]** .

Par exemple, les saveurs de la lime sont utilisées dans les boissons, les confiseries, les biscuits et les desserts **[80,82]**. De nombreux auteurs ont rapporté des propriétés antioxydantes et antiradicalaires des huiles essentielles **[83]** et, dans certains cas, une incidence directe liée à l'alimentation **[84]**. Jusqu'à présent, les études sur les composés bioactifs et l'activité antioxydante des agrumes ont principalement porté sur les fruits (écorces, pulpes et jus) et les fractions polaires **[85]**

La production d'agrumes est très répandue autour du globe. Cependant, la majeure partie de la production se concentre dans certaines zones géographiques et est cultivée dans l'hémisphère Nord (environ 70 % de la production totale). Les principaux pays producteurs d'agrumes et spécifiquement d'orange durant les trois dernières années sont portés dans la Figure II.3. Il s'agit du Brésil, des pays du Bassin Méditerranéen, de la Chine et des Etats-Unis. [**86**]

qQW

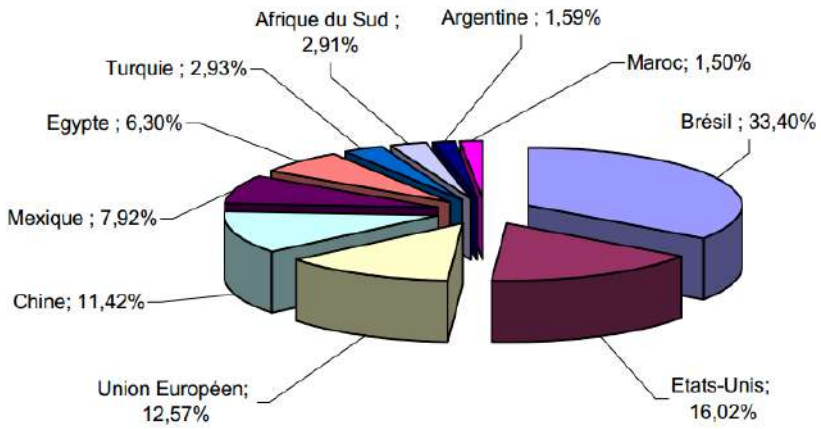


Figure II. 3 : Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010 (USDA, 2010)

II.7. Conclusion

Les HEs d'agrume font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. En conséquence il y a une forte tendance à isoler ces composés organiques naturels pour la protection de la qualité des produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1 Introduction

L'étude expérimentale, a été réalisée au sein des laboratoires du hall technologique, le laboratoire de recherche, au niveau de l'annexe de l'université de Médéa et au laboratoire d'hygiène d'eau de la direction de la santé publique (DSP), dont les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Extraction de l'huile essentielle d'agrumes à partir des zestes de deux espèces de *Citrus* : *C. limonum* (citron), et *C. sinensis* (orange douce), par chauffage classique classique (CC) et par chauffage assisté par induction électromagnétique (IM) ;
- Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites ;
- Evaluation des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles extraites ;

III.2 Produits et matériels utilisés

III.2.1 Appareillages utilisés

L'ensemble des matériels utilisés lors de la réalisation de cette partie expérimentale est donné comme suit :

- Balance : de type Adveturer (OHAUS) ;
- Agitateur : de type Heidolph ;
- Spectroscopie UV-Visible : de type UV 1240 (Shumadzu) ;
- Microscope optique (Olympus) ;
  Etuve : de type Binder ;
- Centrifugeuse : de type Werk Nr ;
- Bain-marie thermostaté ;
- Autoclave ;
- Vortex XH-B ;
- Chauffe ballon : de type FIBROMAN HT-W.

III. 2.2 Verrerie

- Ballon
- Pipette Graduée
- Erlenmeyer
- Becher
- Réfrigèrent
- Ampoule à décanté

III.2.3 Produits utilisés

Tableau III - 1 : Les produits chimiques utilisés

Produit	**Pureté (%)**	**Fournisseur**
Na_2SO_4 (Sulfate de sodium)	**99.5**	Fluka
NaCl (Chlorure de sodium)	**-**	Fluka
Muller Hinton bouillon	**-**	Fluka
Muller Hinton agar	**-**	Fluka
Tween 80	**-**	Sigma-Aldrich
Eau physiologique stérile	**0.9**	Biolyse
Acide chlorhydrique	**37**	Reidel-de Haen
Ethanol	**96**	Reidel- de Hean
Hydroxyde de potassium	**85**	Reidel- de Hean

III- 2.4 Matériel végétal

La matière végétale utilisée dans cette étude sont des fruits d'agrumes des espèces *C.limonum* (citron), et *C. sinensis* (orange douce) .Ils sont très cultivés en Algérie surtout dans la région de Mitidja.

Les fruits ont été bien lavés avec de l'eau de robinet et essuyer avec une serviette propre, et le zeste (épicarpe d'agrume) a été récupéré à l'aide d'un économe (Figure III.1).

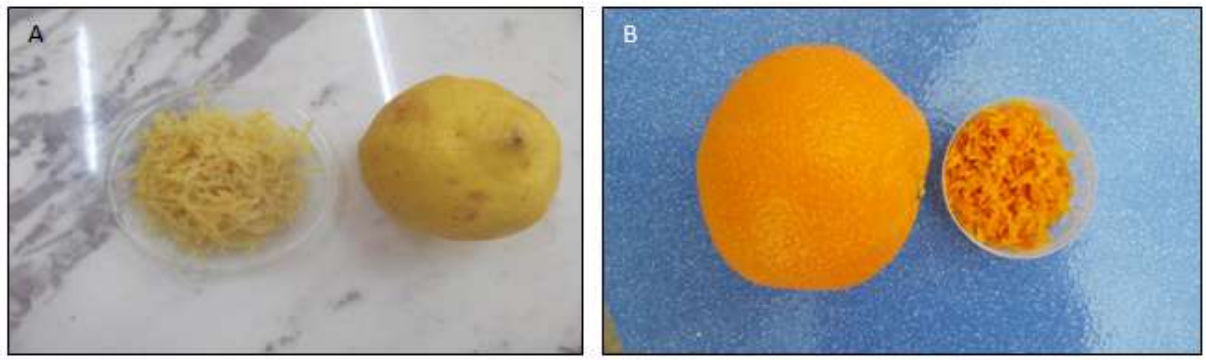


Figure III -1 : A) Citron ; B) Orange

III- 2.5. Matériel de l'étude microbiologique

Pipettes pasteurs, pinces en acier, Anse de platine, Bec bunsen, Micropipettes a volume réglables, et des boites de pétrie en plastique ; disque vide ; Etuve de stérilisation 190°C ; Spectrophotomètre ; Tubes a essai ; Pipettes graduées ; Seringues ; Flacons pour milieux de culture ; Ecouvillons ; Portoir pour tubes.

❖ Les souches testées

La détermination du pouvoir antibactérien et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été fait sur des souches de référence tels que:

- ✓ *Staphylococcues aureus* ATCC (29213)
- ✓ *Escherichia coli* ATCC (11105)
- ✓ *Condidas albicans* ATCC (10231)
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (9027)

III-2.5 .1. Caractéristiques des souches testées

***III-2.5.1.1 Staphylococcus aureus* [85]**

- ➢ **Morphologie** : les *staphylococcues aureus* sont des cocci non capsules, en général groupes en amas plans irrégulier **[87]**. Elles se représentent :

- Sur gélose nutritive, par des colonies arrondies, bombées, luisantes, opaques, a Contours nets et pigmentes après 24 a 36h pouvant alors présenter une coloration ocre-jaune.
- En bouillon nutritif, par un trouble uniforme abondant puis un depot et un voile pelliculaire.

- ➢ **Caractères biochimiques**

- Gram positif.
- Immobile.
- Catalase +.
- Aerobies facultatifs.
- Faisant fermenter les glucides.
- Arginine dihydrolase+.
- Les staphylocoques se multiplient très bien en 24h sur la plupart des milieux usuels.
- Temperature optimal 37°C.
- PH optimal 7,2 a 7,4.

***III-2.5.1.2. Escherichia coli* [85]**

- **Morphologie** : Bacilles de dimension moyenne 0.5 m sur 3m .Se développent aisément sur milieux ordinaires. Sigma-Aldrich
- **Caractères biochimiques**
  - Gram Négatif.
  - Mobiles grâce a une ciliature peritriche.
  - Aérobies facultatifs.
  - Faisant fermenter le glucose avec ou sans gaz.
  - Ne possédant pas d'oxydase.
  - Réduisant les nitrates en nitrites.
  - Lactose +.
  - Indole +.
  - Urée -.

III-2.5.1.3. Candida albicans

- **Morphologie**

Formant des colonies blanches crémeuses. cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire **[88].**

- **Caractères biochimiques**
  - levure non capsulée,
  - non pigmentée,
  - aérobie.
  - diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes
  - pathogène opportuniste,.
  - Temperature optimal 30°C.

III-2.5.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Morphologie :*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 µm de Longueur et 0,5 à 1 µm de largeur **[87]**

- **Caractères biochimiques**
  - Gram négatif.
  - Aérobies stricts.
  - généralement non capsulée mais parfois entourée d'une pseudo-capsule,
  - non fermenter
  - PH < 4.5.

III.3 Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau représente la masse d'eau contenue dans la matière végétale fraîche de citron et de orange Autrement dit, elle représente le rapport entre la masse séchée et la masse initiale, elle est exprimée en pourcentage (%) et donnée par la relation suivante**[88]** :

$$T = m_i - m_f / m_i 100 \quad \text{(III-1)}$$

T: Teneur en eau.

m_f: Masse sèche des écorces d'agrume.

m_i: Masse initiale des écorces d'agrume fraîches.

III.4 Extraction des huiles essentielles

Dans cette partie, on a utilisé deux méthodes d'extraction des huiles essentielles à partir des écorces d'agrumes par hydrodistillation par chauffage classique et par chauffage assistée par induction électromagnétique.

III.4.1.Extraction par hydrodistillation par chauffage classique(CC)

- **Mode opératoire**

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation (figure III.2.). Une quantité de zeste d'agrume frais est introduite dans un ballon de 500 ml imprégnée d'eau distillée, Après installation et fermeture du montage, la mise en marche de chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée.

.



Figure III.2 : Montage d'Hydrodistillation par chauffage classique.

III.4.2.Hydrodistillation assistée par induction électromagnétique

- **Mode opératoire**

L'extraction par induction électromagnétique a été réalisée par une plaque chauffante vitrocéramique à induction magnétique (SAMSUNG).Le montage élaboré est présenté dans la figure suivante figure III.3 est constitué d'un réacteur (1500ml) en acier inoxydable magnétique compatible avec le type de chauffage, dans lequel une quantité de matière végétale est introduite imprégnée d'eau distillée. Le système de réfrigération est composé d'un réfrigérant afin d'assurer une condensation et un refroidissement maximal du fluide hydrodiffusé saturé en molécules aromatiques et d'obtenir un liquide le moins chaud possible pour éviter une dégradation thermique éventuelle des molécules aromatiques. Ce système de refroidissement est raccordé à son tour à un vase florentin où l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuse par différence de densité.

.



Figure III.3 : Montage de l'Hydrodistillation par induction électromagnétique

III.4.3 Isolation des huiles essentielles

La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par simple décantation (figure III.4), Elle est ensuite séchée par sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis récupérée et conservée dans des vials de couleur brune, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation.



Figure III.4 : montage de décantation

III.4.4. Paramètres intervenant dans le procédé d'Hydrodistillation

Cette partie a pour but l'optimisation des facteurs influençant le rendement d'extraction par Hydrodistillation, et qui sont :

- Le rapport pondéral (matière végétale/volume d'eau).
- La durée d'extraction (la cinétique d'extraction)

III.4.4.1.Effet du rapport pondéral

Le rapport pondéral (P) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'échantillon à traiter (m) et le volume de la solution conductrice utilisée. Il est exprimé en pourcentage par la relation suivante :

$$P = \frac{m}{V} \times 100 \quad \text{..... (III-2)}$$

P : Rapport pondérale exprimé en (%).

m : Masse de la matière végétale exprimée en (g).

V : Volume de l'eau distillée exprimé en (ml).

- **Mode opératoire**

Pour tous les essais de cette section :

- Le volume de l'eau distillée introduit dans le ballon est de 200 ml.
- La masse de la matière végétale utilisée est de est de 200g, 100g ,50g et 25g.
- Le temps de distillation est fixé à 120min

III.4.4.2. Étude de la cinétique d'extraction

La cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Dans notre étude, le rendement à été déterminé chaque 07 minutes en tenant compte du temps d'extraction dés la formation de la première goutte du distillat, cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition d'eau.

La cinétique a été explorée en effectuant des prélèvements horaires à intervalles réguliers sur les phases aqueuses et organiques durant l'Hydrodistillation. Afin d'en récupérer des quantités significatives et mesurables,

III.4.4.3.Calcul de rendement en huiles essentielles

Le rendement en H.E est le rapport entre la masse de H.E extraite et la masse de la matière première à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et il est calculé par la formule suivante

$$R_{H.E} = m_{H.E}/m_{M.V} \times 100 \quad \text{.....} \quad \textbf{(III-4)}$$

R H.E: Rendement en huile essentielle (%).

mH.E : Masse de l'huile essentielle en gramme.

mMV **:** Masse de la matière végétale en gramme

III. 5. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles d'agrume

III.5.1.La densité relative

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile essentielle à 20 ºC, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20 ºC. Cette grandeur est sans dimension et son symbole . La densité relative est donnée par la formule suivante **[89]** :

$$d_{20}^{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \text{.....(III-5)}$$

Avec :

***m*0** : la masse en grammes, du pycnomètre vide.

***m*1** : la masse en grammes, du pycnomètre rempli d'eau.

***m*2** : la masse en grammes, du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

Dans notre cas ; et puisque nous n'avons pas assez de quantité d'huile essentielle pour remplir le pycnomètre ; nous avons procédé comme suit :

-Prendre un volume d'huile et le peser ; noter sa masse ;

- Prendre un volume d'eau distillée et le peser ; noter sa masse ;

La densité relative est donnée par la formule suivante :

$$d = \rho \text{ huile} / \rho \text{eau} = (m/V) \text{ huile} / (m/V)e \qquad \textbf{(III-6)}$$

III.5.2.Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à température constante **[89]**.

- **Mode opératoire**
  - Placer l'HE à l'aide d'une pipette dans la cellule de mesure jusqu'au trait de signale;
  - Refermer le couvercle pendant 15 secondes (temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C).
  - Régler avec les deux boutons, jusqu'à la localisation du trait signale au centre de la cellule;
- **Calcul des résultats :**

L'indice de réfraction n_d, à la température de référence T=20°C est donné par la formule suivante **:**

$$n = n + 0.0004 (T - T) \ldots\ldots\ldots \qquad \textbf{(III-7)}$$

Avec :

T': Température de l'expérience (25°C).

III.5.3.Indice d'acide

L'indice d'Acide IA est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g de substance **[89]**.

- **Mode opératoire**

On dissolve une masse de 1g de l'HE dans 50ml d'un mélange à volumes égaux d'alcool (éthanol) et d'éther. Le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0,1M en présence de 0,5ml de solution de phénophtaléine. Après dissolution, on titre par l'hydroxyde de potassium 0,1M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15s au moins (on note n ml d'Hydroxyde de Potassium 0,1M) . L'indice d'acide est calculé par la relation suivante :

$$I_A = 5.61 \times n / m \ldots\ldots\ldots \quad \textbf{(III-8)}$$

III.5.4Indice de saponification

L'indice de saponification est la quantité de potasse (KOH) en milligrammes, nécessaire pour la neutralisation des acides libres et des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle **[89] .**

- **Mode opératoire**

  - Dans une fiole de 250ml de verre borosilicaté munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit la prise d'essai (m=1g) d'huile essentielle;
  - On ajoute 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M et quelques billes de verre;
  - On adapte le réfrigérant et on chauffe à reflux pendant 30min;
  - On ajoute 1ml de solution de phénophtaléine et on titre immédiatement par l'acide chlorhydrique 0,5M (n1 ml d'acide chlorK.hydrique 0,5M);
  - On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions (n2 ml d'Acide)

III.5.5.Indice d'ester

L'indice d'ester IE est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification IS et de l'indice d'acide IA selon la relation suivante:

$$I_E = I_S - I_A \ldots\ldots\ldots\ldots \quad \textbf{(III-9)}$$

III.5.6. Miscibilité à l'éthanol

Une huile est dite soluble dans n volumes ou plus d'alcool d'un titre donné t, si la solution lipmide dans n volumes demeure limpide comparée à l'huile essentielle non diluée , après l addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool **[90]** ,(avec une température de 20 ± 0,2°C)

III. 6. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HEs extraites

III. 6. 1. Préparation de l'inoculum

- **Préparation de pré-culture**

La réactivation des souches a été effectuée par repiquage de l'espèce bactérienne dans des boites de Pétri contenant le milieu de culture spécifique pour chaque souche. Le milieu Chapman pour les *Staphylococcus aureus*, le milieu Hectoen pour les E.*coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, le milieu Sabouraud pour les *Condida albicans,*

Les boites ainsi ensemencées ont été incubées selon les exigences de chaque souche en matière de température et temps d'incubation.

- **Préparation de la suspension bactérienne**

A partir des cultures jeunes. On prélève 1 à 2 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes.

La standardisation de la suspension à 10^8 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm.

III. 6. 2. Test par diffusion sur gélose (Aromatogramme)

- **Mode opératoire**

Sur des boites contenant entre 10-15 ml de gélose MH, ensemencé en surface par écouvillonnage 10^8 UFC/ml de culture bactérienne de la souche concernée. Laisser les boites se dessécher pendant quelques moments, puis déposer en surface des disques imprégnés d'HEs de dose connues. Les disques doivent être appliqués à des distances déterminés (3 à 4 disques/boite). Ensuite, les boites sont incubées dans un incubateur à des températures et temps spécifiques pour chaque souche bactérienne (généralement à 37°C pendant 24h). La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autours de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

➢ **La lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es, (PONCE et *al*., 2003).

- 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.

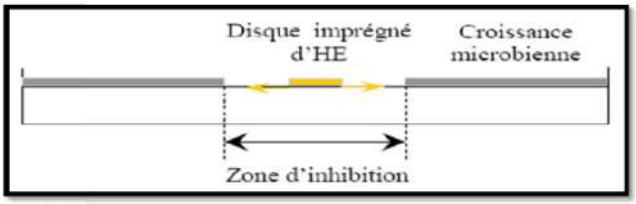


Figure III.5 : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.

III. 6. 3. Test de macro-dilution en milieu liquide

Cette technique consiste à inoculer, par une suspension bactérienne, une série de dilution d'HE effectuée dans du milieu Mueller Hinton bouillon -Tween 80 (0,01 %, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 40µl/ml et 1.25µl/ml. (Figure III.6). **[94]**

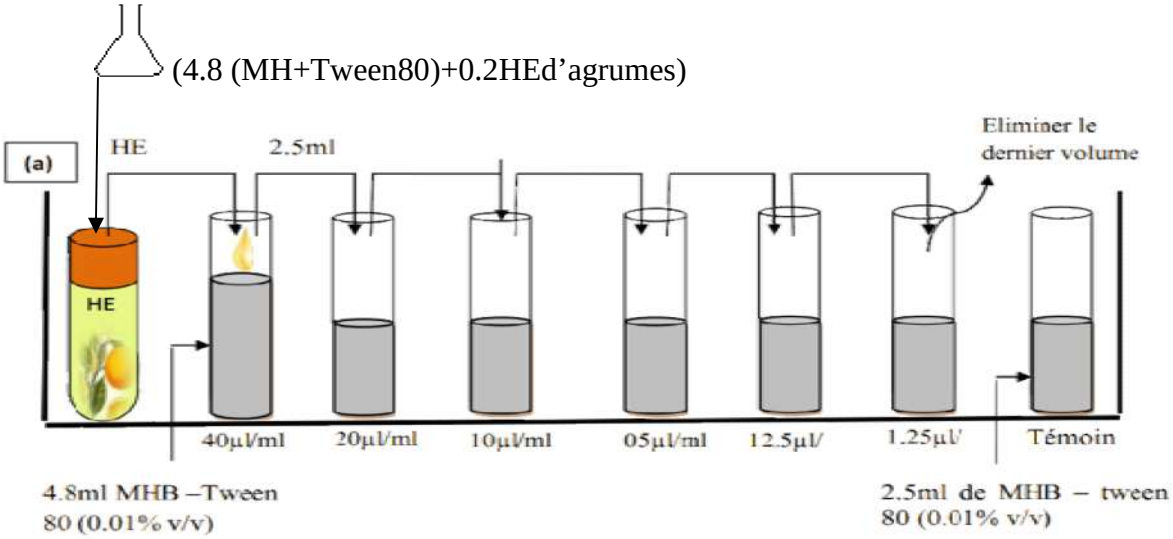


Figure III.6 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

Déposer 0.5 ml d'une suspension bactérienne (108 CFU/ml) dans chacun des tubes de la série, lesquels sont incubés après agitation en vortex, à 37°C pendant 24h pour *S. aureus*, *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et à 30C° pendant 48h pour *Candida albicans* .Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 0.5 ml de la suspension bactérienne ont été déposés dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), est également réalisé.

Après quoi on les observe macroscopiquement, le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les tubes sont centrifugés ensuite à 6000T, pendant 5 minutes pour confirmer la présence ou non de précipité bactérienne.

III.7. Evaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test DPPH

- **Principe de méthode**

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure III.4). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire **[95].**

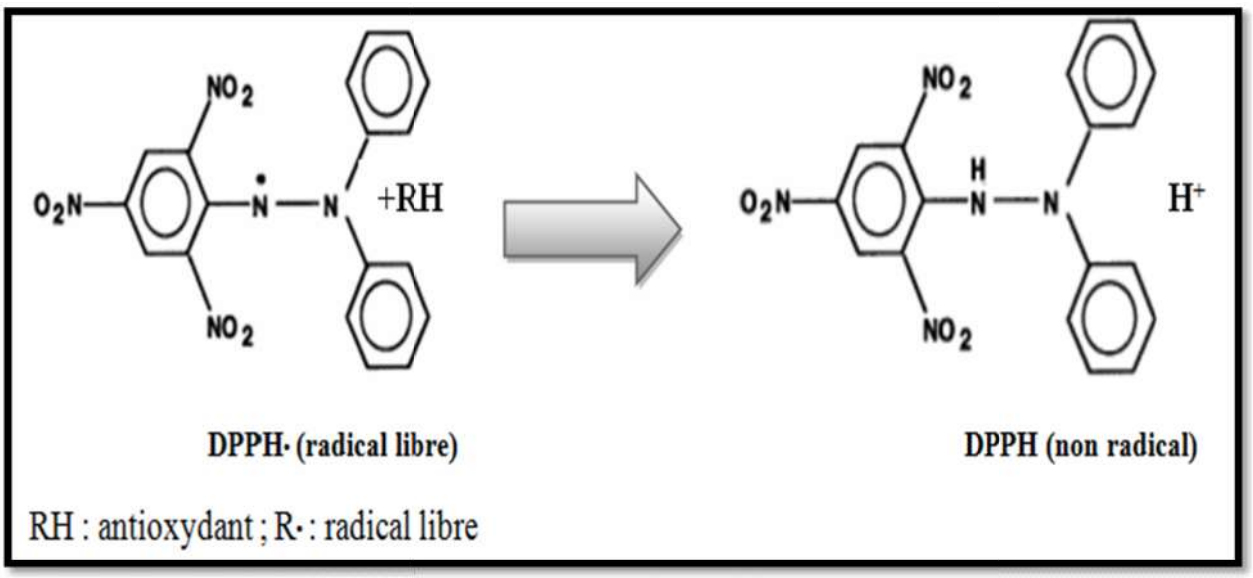


Figure III.4 : Réaction du DPPH• avec un antioxydant**[96].**

- **Mode opératoire**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhammou et al., **[95].**

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0.004% de DPPH dans l'éthanol, différentes concentrations de solutions échantillons sont ajoutées à 1ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517 nm contre le blanc correspondant. Le paramètre IC50 (concentration inhibitrice à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Les résultats exprimés en IC50 qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque échantillon. Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante **[96].**:

% d'activité antioxydante = [Abs contrôle – Abs échantillon / Abs contrôle] x 100

Chapitre IV : Résultats et discussion

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats obtenus ainsi que les interprétations et les conclusions que nous avons tiré.

IV.1. Teneur en eau de la matière végétale :

Les résultats de la détermination de la teneur en eau des différentes matières végétales sont représentés dans la figure IV.1

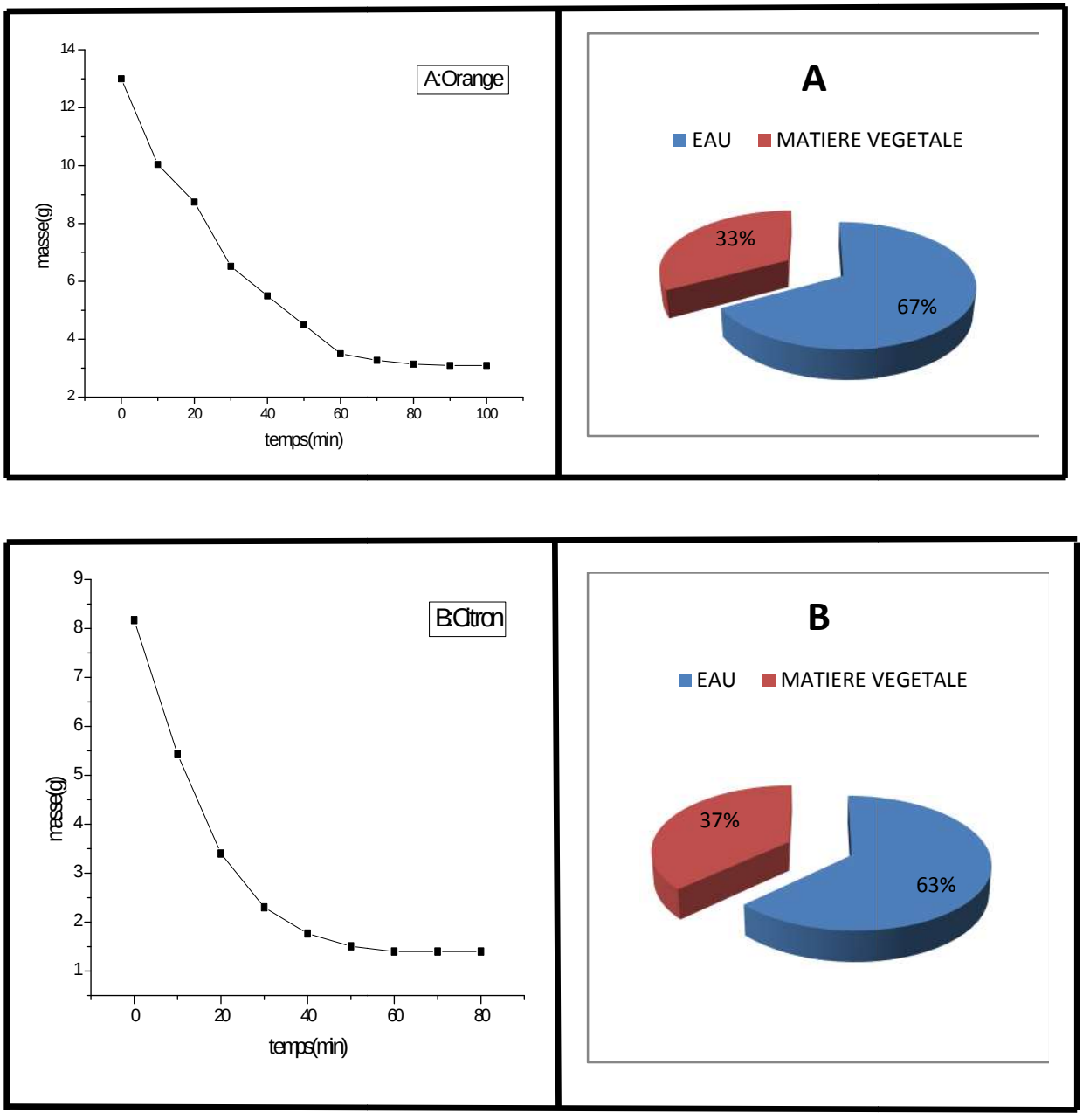


Figure IV.1 /Teneur en eau de :

(A) Orange (*Citrus sinensis*). **(B)** Citron (*Citrus limonum*)

Les résultats obtenus ont montré que le zeste d'agrumes frais est riche en eau avec des teneurs en eau supérieures à 50%. La teneur en eau de l'orange 67% et citron 63%.

IV.2. Extraction des huiles essentielles

IV.2. 1. Rapport pondéral :

L'effet du rapport pondéral est appliqué sur une seule source d'agrumes (orange). Les résultats obtenus sont représentés sur le Tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Effet du rapport pondéral.

RP	**1/1**	**1/2**	**1/3**	**1/4**
Rendement(%)	2.01	3.4	1.64	2.20

D'après les résultats obtenus le rapport pondéral optimal correspond au rendement maximal, donc c'est RP=1/2. Cela peut avoir l'interprétation suivante : que la surface de contact entre la matière végétale et la solution extractive est importante ce qui facilite l'hydrodiffusion et les échanges liquide-solide et augmente par conséquence le rendement en Huile essentielle.

IV .2 .2 Evolution de la cinétique d'extraction

L'évolution de la cinétique d'extraction des huiles essentielles d'agrumes par les deux techniques de chauffage est récapitulée au Tableau VI.2.

Tableau VI.2 : Evolution du rendement en HEs des espèces Citrus.

	t (min)	**0**	**7**	**14**	**21**	**28**	**35**	**41**	**49**
Orange(IM)	R(%)	0	3.40	3.55	3.66	3.72	3.77	3.77	3.77
Orange(CC)	R(%)	0	2.39	2.63	2.71	2.78	2.84	2.86	2.86
Citron(IM)	R(%)	0	2.444	2.596	2.618	2.675	2.682	2.682	2.682
Citron(CC)	R(%)	0	1.94	1.97	2.17	2.18	2.19	2.20	2.20

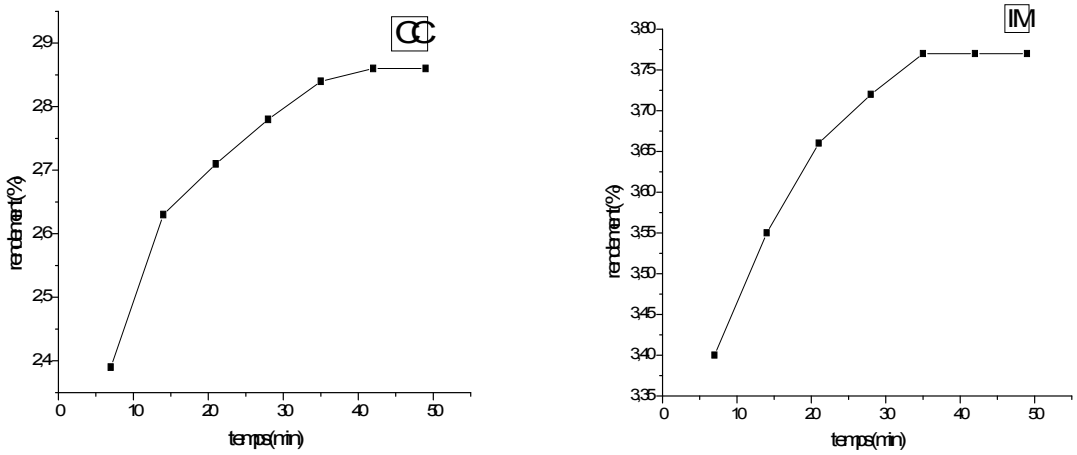


Figure. VI.2 : Variation du rendement en huile essentielle d'orange en fonction de temps

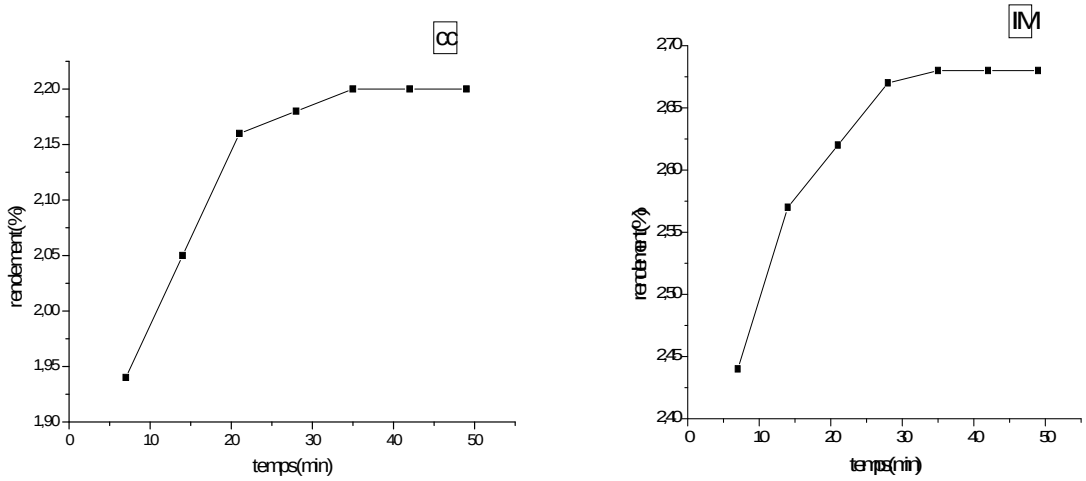


Figure. IV. 3 : Variation du rendement en huile essentielle de citron en fonction de temps.

Les figures IV.2 et IV.3 représentent les cinétiques d'Hydrodistillation (avec un rapport pondéral P=1/2) par les deux techniques de chauffage pour les deux catégories de végétaux utilisées, nous observons que les graphes obtenus ont pratiquement la même allure : le rendement en HE croit au fur et à mesure que le temps d'Hydrodistillation augmente, jusqu'à ce qu'il atteint un palier. Au delà de ce maximum le rendement reste constant.

En effet, durant la distillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'essence des glandes sécrétrices. La solution aqueuse chargée de composés organiques, diffuserait ensuite à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon l'organe, vers la surface extérieure où l'huile essentielle serait vaporisée et entraînée. Ce phénomène se continue jusqu'à l'épuisement total de la matière végétale en huile essentielle qui se traduit par l'apparition d'un pseudo palier.

La comparaison des résultats obtenus de l'extraction des huiles essentielles du *C.sinensis* et *C. limonum* par induction électromagnétique avec ceux obtenus par hydrodistillation classique a permis de mettre en évidence des différences de comportement et d'évolution du rendement selon la méthode d'extraction. En effet, l'hydrodistillation assistée par induction magnétique est nettement plus performante que l'HD classique car il est possible d'augmenter le rendement en HEs de l'ordre de 3.77 % et 2.86 % pour *C.sinensis* et *C. limonum* respectivement dans un temps d'extraction plus court, contre 2.72%et 1.54% par l'HD classique pour *C.sinensis* et pour *C. limonum* respectivement.

Par rapport au système de chauffage conventionnel, la méthode d'extraction des Hes assistée par induction électromagnétique a montré une réduction de temps de 7 à 10 min.

Ces observations laissent à penser que l'accélération de la vitesse d'hydrodistillation par induction électromagnétique est due au champ magnétique, qui permet l'homogénéité et la rapidité de chauffage grâce à son principe de produire la chaleur au sein même du matériau à chauffer. Colic et Morse **[96]** soutiennent que l'eau traitée avec des radiations électromagnétiques produit des agrégats de molécules de taille réduite. Si la taille des agrégats d'eau est réduite, par conséquent l'hydrodiffusion pourrait en être améliorée favorisant une plus grande vitesse d'hydrodistillation. La réduction de la taille des agrégats de molécules intervient sur l'hydrodiffusion et les échanges liquide-solide**.[97]**

IV.3 : Caractéristique physicochimique des huiles essentielles d'agrumes

Le tableau IV.3 regroupe les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles des espèces citrus extraites

Tableau IV.3: Propriétés physico-chimique des huile essentielle d'espace citrus

Propriétés physico-chimiques	**HE d'espace citrus**				**La norme AFNOR**
	orange		*C. limonum*		
	CC	IM	CC	IM	
Misibilité à l'éthanol	2V	1V	3V	2V	
Densité relative	0.814	0.851	0.840	0.828	<0,876
Indice de réfraction	1.4731	1.4730	1.4772	1.4771	(1,4700-1,4780)
Indice d'acide	4.76	4.50	5.04	4.90	- -
Indice de saponification	615	610.7	391.5	382.4	- -
Indice d'ester	610.24	606.2	386.46	377.5	- -

Les caractérisations physico-chimiques des HEs des espèces citrus extraites par les deux techniques de chauffage représentent :

✓ Une densité presque semblables à tous les échantillons testés, avec des valeurs appartiennent à un intervalle étroit, entre 0.814 et 0.851, signifiant que les huiles extraites sont conformes aux normes internationales.

✓ Un indice d'acide allant de 4.50 à 5.04. Cette constante chimique donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, cet indice, demeure relativement élevé. Ceci peut être du à la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation, ce qui est à terme préjudiciable. Un indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres). **[98]**

✓ Un indice de réfraction de l'ordre de 1.4700 correspond aux normes d'AFNOR (1,4700 - 1,4780), ce paramètre est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande

IV.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne

VI.4 .1 Aromatogramme

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es de *Citrus* sur la croissance des souches bactériennes testées: *S. aureus, Ps. aeruginosa, E. coli* et, *C. albicans*, sont représentées dans le tableau IV.4 et les Figures: IV.4, IV.5, IV.6 et IV.7

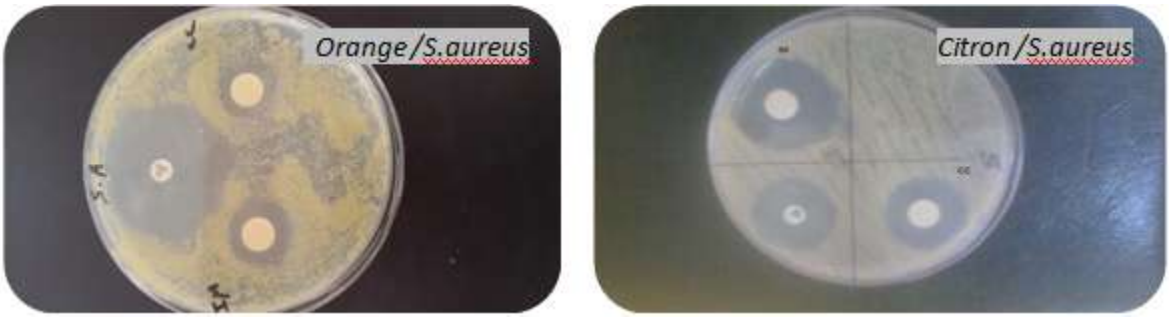


Figure IV.4 : Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *S.aureus*

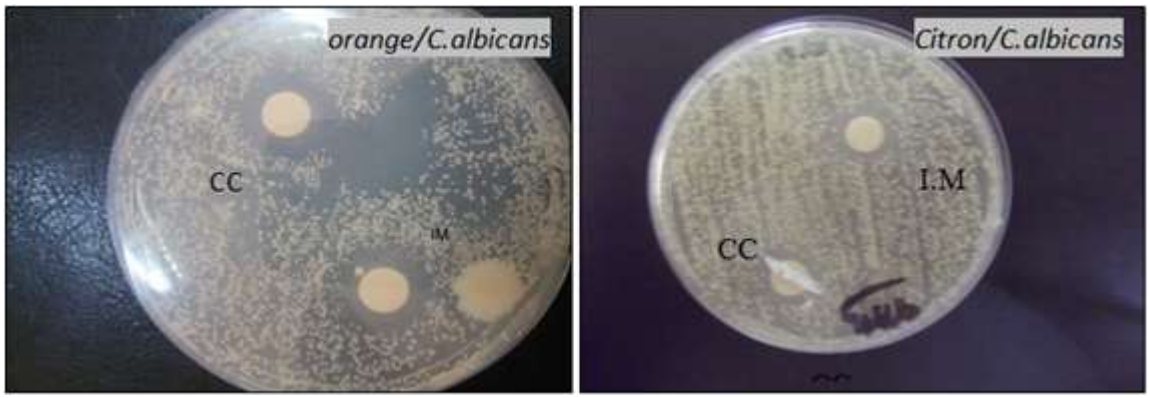


Figure IV.5 : Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *C. albicans*

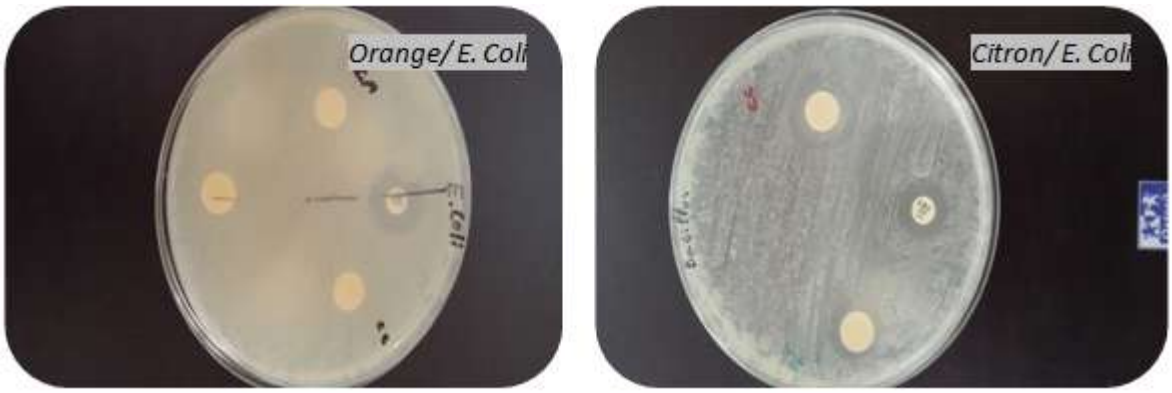


Figure IV.6: Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *E.coli*

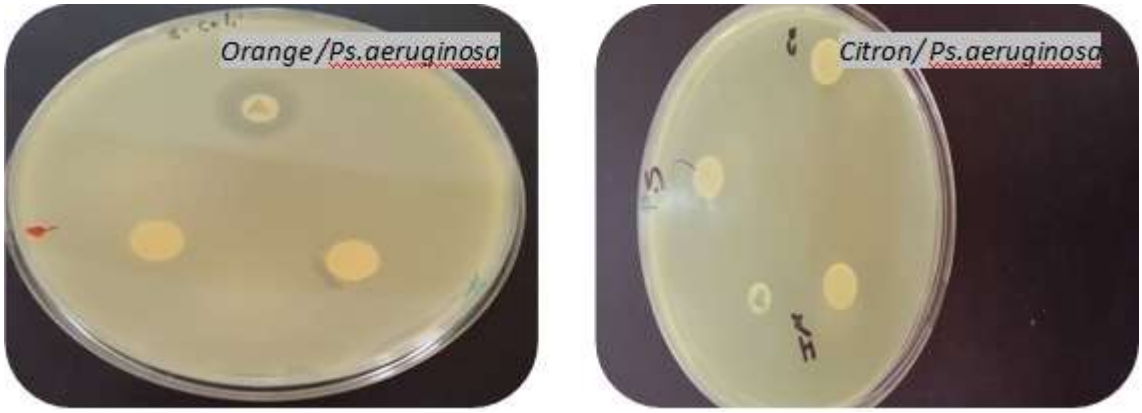


Figure IV.7: Halo d'inhibition de l'H.E de *Citrus* sur *Ps.aeruginosa*

Tableau IV.4 : Diamètres d'inhibition provoqués par des H.Es de Citrus.

Echantillon		**Diamètres d'inhibition (mm)**			
		S. aureus	*E .coli*	*C.albican*	*Ps. aeruginosa*
C. sinensis	IM	22	9	19	9
	Sensibilité	+++	−−	++	−−
	CC	20	9	17	9
	Sensibilité	+++	−−	+	−−
C. limonum	IM	20	18	20	9
	Sensibilité	+++	++	+++	−−
	CC	19	15	18	9
	Sensibilité	++	+	++	−−
Amoxicilline		38	25	-	27

* Les diamètres des disques (9mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

Les résultats d'aromatogramme obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton révèlent que l'activité antibactérienne des H.Es testées est en fonction de la bactérie cible. Il est clair qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Ps. aeruginosa.* Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.Es de *Citrus*. Les résultats ont indiqué aussi que l'H.E de *C. limonum* est la seule à présenter une activité antibactérienne contre *E. Coli* dont le diamètre de la zone d'inhibition est à 15-18 mm. Moreira *et al* **[99]**ont montré que l'H.E de *C. limonum* était efficace contre 3 souches d'*E. coli* avec des diamètres des halos d'inhibition variant de 9

à 12 mm. Par contre *S. aureus* est l'espèce la plus sensible à l'action des H.Es testées (*C. sinensis et C. limonum)* dont le diamètre de la zone d'inhibition est situé 20-22 et 19-20 mm respectivement. Quant à *C. albicans* a montré une sensibilité modérée vis-à-vis des H.Es de *C. sinensis et C. limonum* avec des zones d'inhibitions de 17-19 et 18-20 mm respectivement. Ces résultats concordent avec les travaux de Burt et al. **[100]** qui ont montré que les bactéries Gram négatif étaient généralement plus résistants aux huiles essentielles d'agrumes que Gram positive. Selon Burt et al. **[100]** et Busatta et *al*.**[101]** la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux H.Es est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+).

Cependant la comparaison de l'efficacité des H.Es testées ont montré que l'activité antibactérienne obtenue par aromatogramme des H.Es extraites par IM est légèrement supérieure à ceux obtenus par CC. Ceci peut être vraisemblablement justifie par les doses d'H.E utilisées, ou par la composition chimique des H.Es qui varie selon les conditions expérimentales d'extraction.

VI.4.2 Concentrations minimales inhibitrices (CMIs)

Les résultats des CMIs des H.Es étudiées contre les souches testées sont représentés dans le tableau IV.5 et illustrés dans les figures IV.8, IV.9, IV.10, IV.11, IV.12 IV.13, IV.14 IV.15 et IV.16.

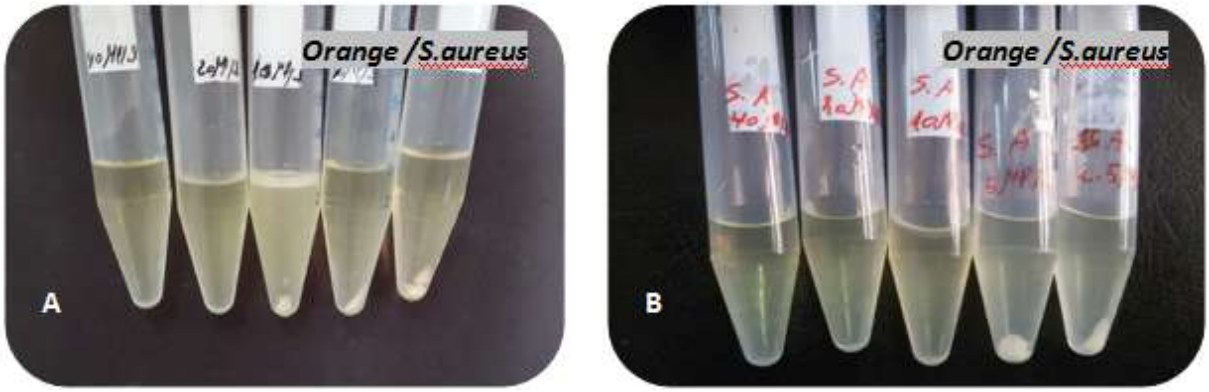
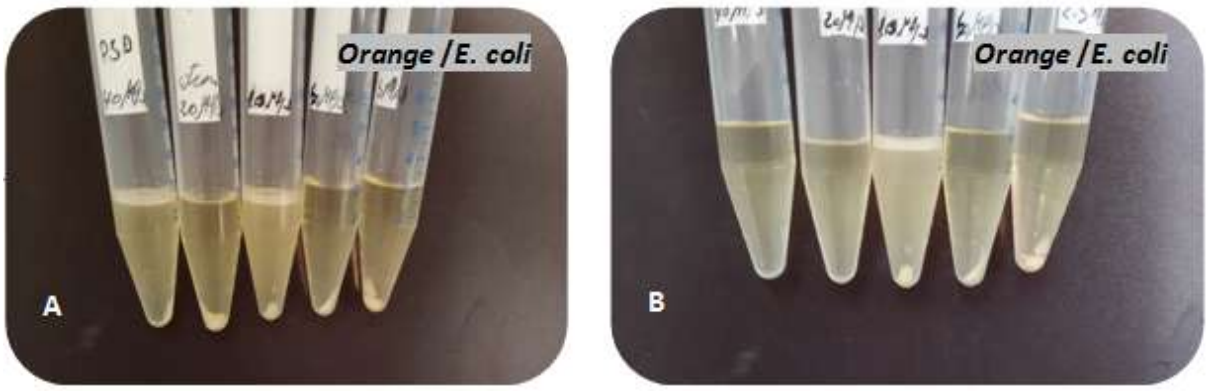


Figure IV.8 : Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *S.aureus*



· **Figure IV.9**: Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *E. coli*

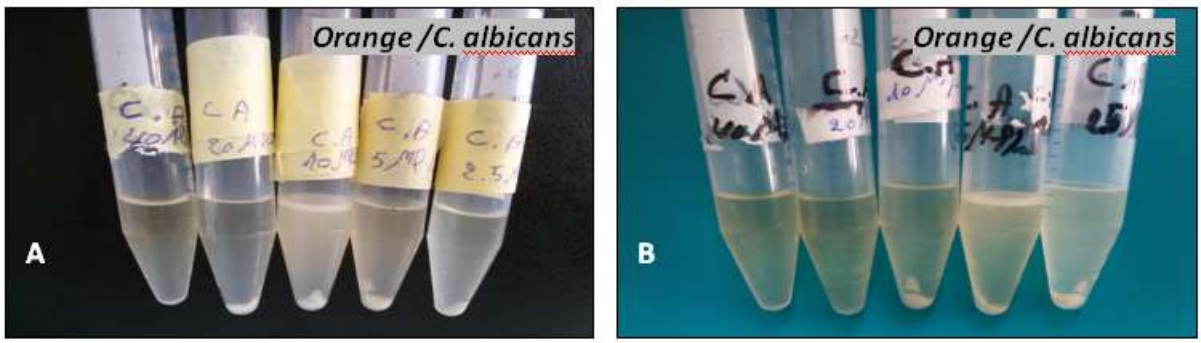


Figure IV.10: Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *C. albicans*

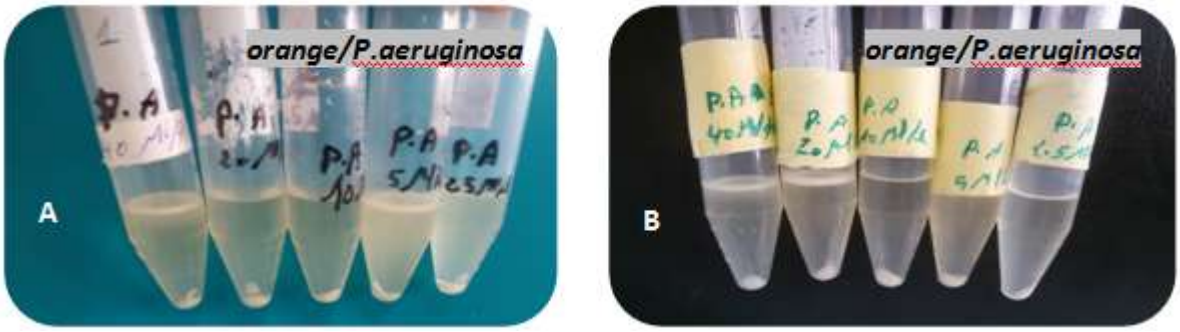


Figure IV.11: Evaluation des CMI de l'HE de *C.sinensis* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *P. aeruginosa*

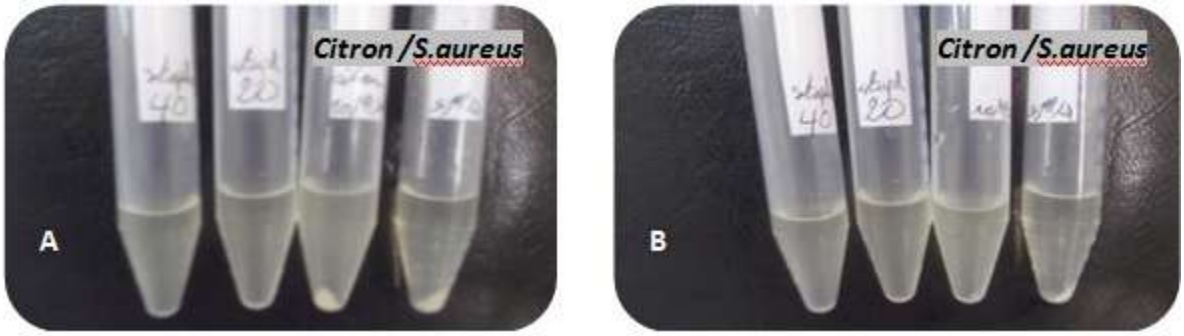


Figure IV.12 : Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *S.aureus*

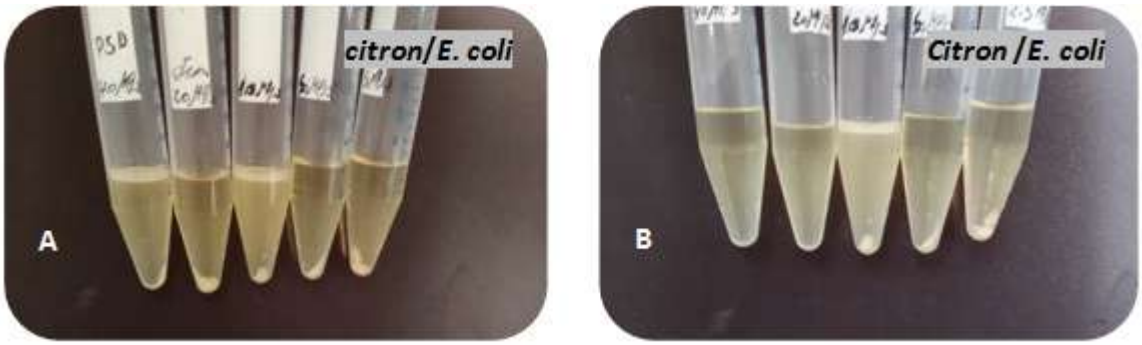


Figure IV.13: Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *E. coli*

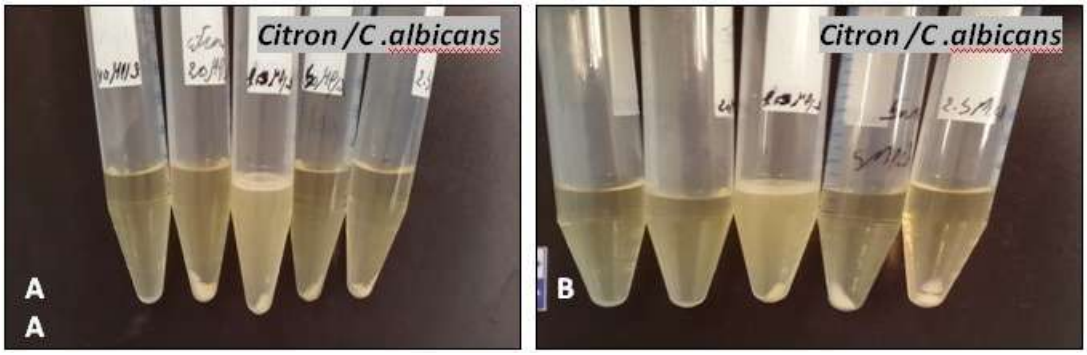


Figure IV.14: Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *C. albicans*

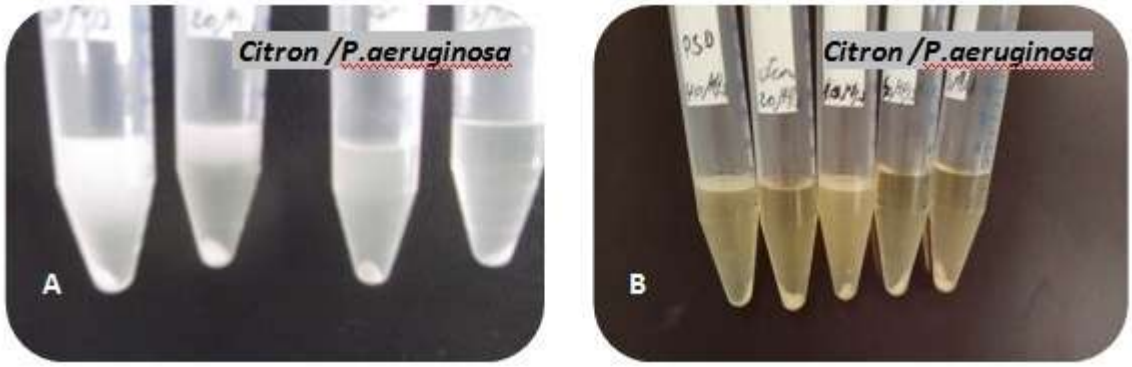


Figure IV.15: Evaluation des CMI de l'HE de *C.limonum* extraites par **: A)** CC, **B)** IM, vis-à-vis de *P. aeruginosa*

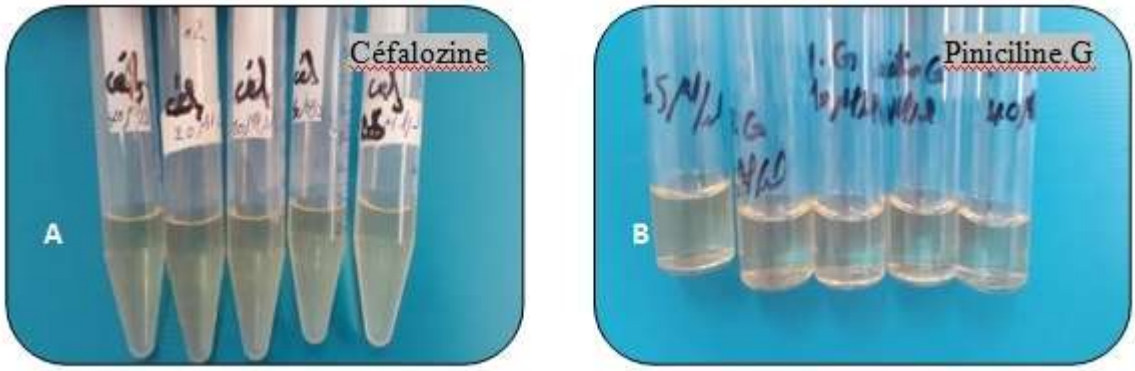


Figure IV.16 : Activité antimicrobienne de l'antibiotique sur : **A)** *S.aureus*, **B)** *E.coli*.

Tableau IV.5 : CMI (µl/ml) des huiles essentielles d'agrumes en milieu liquide

Echantillon		CMI			
		S. aureus	***E. coli***	***C. albicans***	***P. aeruginosa***
***C.sinensis* (Orange)**	**IM**	10µL /ml	20µl/ml	20µl/ml	>40µl/ml
	CC	20µl /ml	40µl/ml	40µl/ml	>40µl/ml
***C. limonum* (Citron)-**	**IM**	10µl/ml	20µl/ml	20µl/ml	> 40µl/ml
	CC	20µl/ml	40µl/ml	40µl/ml	>40µl/ml
Antibiotique	**Céfalozine**	<2.5	___	___	<2.5
	Peniciline G	----	> 2.5	-----	-----

Les résultats d'évaluation de la CMI des HEs testées par la technique de dilution (Tableau IV.5) nous a permis de tirer les points suivants :

- Selon les résultats présentés dans le tableau VI.7 et la figure VI.11, Il est clair qu'aucune CMI n'a été observée vis-à-vis de *Ps. aeruginosa. (*CMI > 40µl/ml). Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.Es de *Citrus*. Ces résultats concordent avec les travaux de Burt et al. **[100]** qui ont montré que les bactéries Gram négatif étaient généralement plus résistantes aux huiles essentielles d'agrumes que Gram positive. **[100].**
- Les huiles essentielles extraites par induction éléctromagnétique ont montré une meilleure performance antimicrobienne par rapport aux H.Es extraites par chauffage classique. avec des CMIs de l'ordre de 10µl/ml, et 20µl/ml des HEs de *Citrus* extraites par IM et CC respectivement vis-à-vis de *S. aureus*.
- Les HEs de *C.sinensis* ont exercé une activité antimicrobienne (CMI=10 µl/ml et 20 µl/ml) à l'encontre de *E.coli*. Contrairement à nos résultats d'aromatogramme, ont montré que cette dernière est résistante aux H.Es de *C.sinensis.* Ce qui signifie que les activités antimicrobiennes d'une H.E peuvent changer par sa composition chimique, par les génotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution) les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différents ;

IV.5 : Evaluation de l'activité antioxydant

IV.5.1 Détermination d'IC50 des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antioxydant, exprimés en tant que pourcentage d'inhibition (I%), des huiles essentielles d'orange, et de citron, a été fait en comparaison avec celle d'un antioxydant de référence, qui est l'acide ascorbique.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH● en sa forme non radicalaire DPPH.H (Figures : IV.17, IV.18 et IV.19) à partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC50 de chaque extraction (Tableau IV-6)

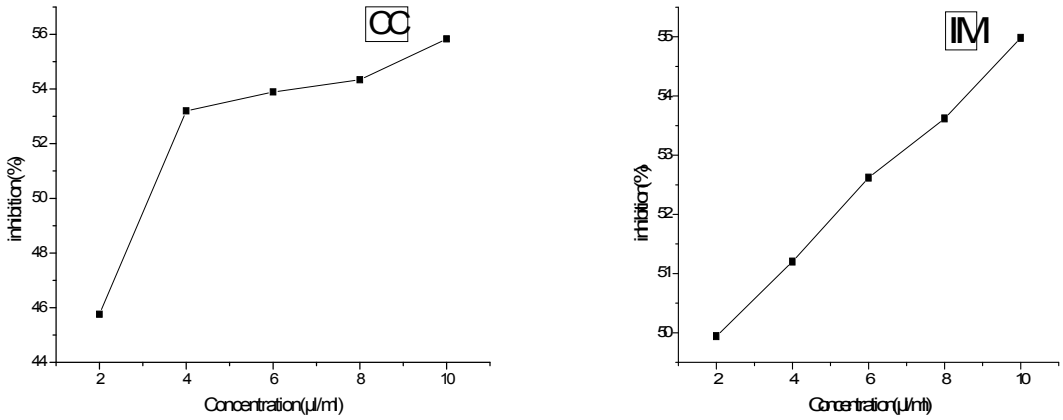


Figure IV.17: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction de concentrations de l'huile essentielle d'orange

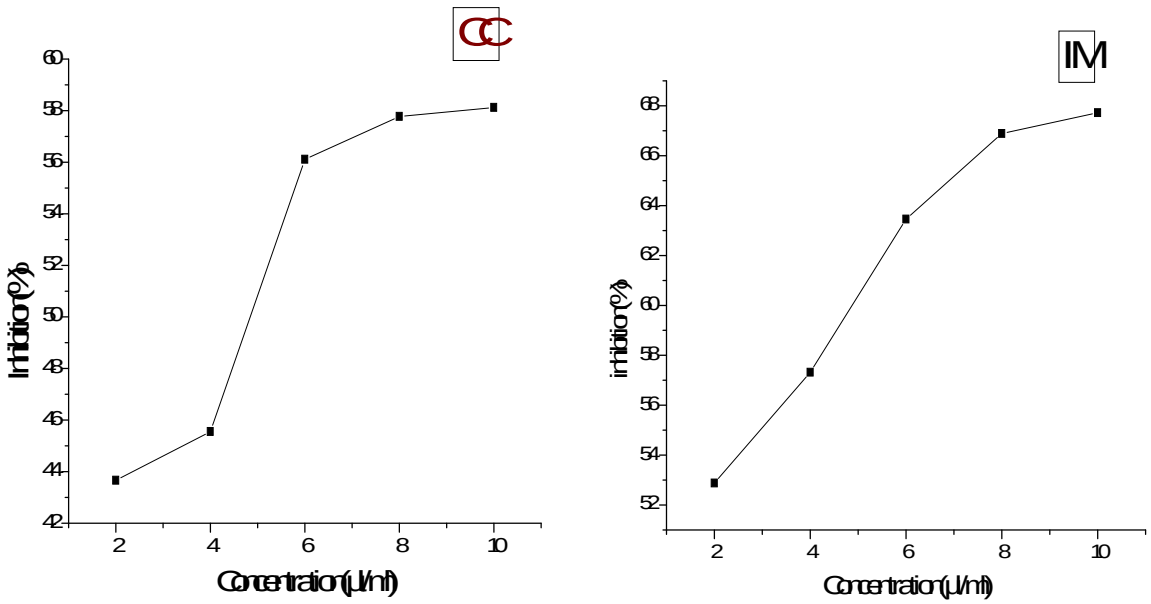


Figure IV.18: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction de concentrations de l'huile essentielle de citron

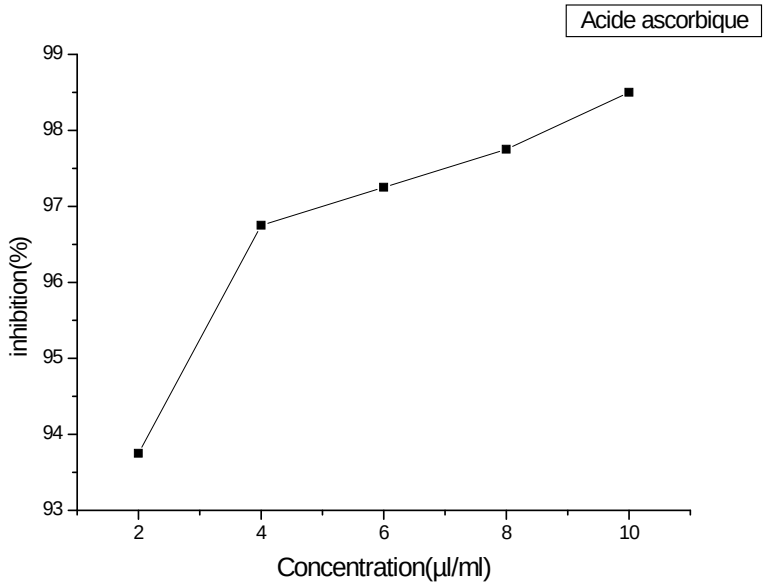


Figure IV.19 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction de concentrations d'acide ascorbique

Tableau IV-6 : Valeurs des IC50 trouvées pour les HEs de *Citrus*

HEs de *Citrus*	Technique d'extraction	IC_{50} exprimées en µl/ml
C. sinensis (Orange)	IM	2
	CC	3.8
C. limonum (Citron)	IM	< 2
	CC	4.5

La capacité antioxydante des différentes HEs a été déterminée à partir des IC50, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH●. Plus la valeur d'IC50 est petite, plus l'activité de l'HE testé est grande **[102].**

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des HEs testées dans cette étude par la méthode de réduction du DPPH° ont montré que le pouvoir antioxydant est proportionnel à la concentration en H.E. Elles présentent un IC50, de l'ordre de 3.8 et 4.5 µl/ml pour les H.Es extraites par chauffage classique de *C. sinensis et C. limonum* respectivement. et de l'ordre de 2 et < 2 µl/ml pour les H.Es extraites par chauffage assistée par induction électromagnétique de *C. sinensis* et *C. limonum* respectivement. Bien que, l'activité antioxydante de l' H.E de *C. sinensis* est légèrement marquée. Par comparaison au *C. limonum*, ceci est probablement liée aux composants majoritaires, aux proportions dans lesquels ils sont présents et aux interactions entre eux. En effet, L'H.E de *C. limonum* ne contient pas les mêmes composants que celle de *C. sinensis.* De plus, Nous remarquons que la méthode d'extraction des HEs assistée par induction électromagnétique a montré des résultats différents en terme d'activité antioxydante, par rapport au système de chauffage conventionnel.

Les études de Kehal **[103].**ont trouvé que la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50) des HE de citron (*Citrus limon*) est de l'ordre de 5.5 µg/ml. Cet écart par rapport à nos résultats peut s'expliquer par la différence dans la composition des huiles essentielles en relation avec l'origine du fruit, la période de récolte et les conditions expérimentales.

En comparant avec l'acide ascorbique, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 93.6 % à une concentration de 4 µl/ml. Ces huiles ont donné alors des activités plus faibles à celle de l'acide ascorbique.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail est de faire une étude comparative en terme de rendement, de cinétique d'extraction et de qualité des huiles essentielles obtenues par Hydrodistillation par chauffage classique et celui assisté par induction électromagnétique. Elle comprend aussi l'étude de l'impact de l'utilisation de la technique du chauffage par *induction électromagnétique* sur les propriétés biologiques des huiles essentielles extraites.

Notre travail s'est axé sur les points suivants:

- Procéder à l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de deux espaces d'agrumes le citron (*Citrus limonum*) et l'orange (*Citrus sinensis*) par Hydrodistillation par chauffage classique et celui assisté par induction électromagnétique.
- Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites et évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles extraites ;

D'après les résultats obtenus, on peut tirer les conclusions suivantes :

- La comparaison des résultats obtenus de l'extraction des huiles essentielles du *C.sinensis* et *C. limonum* par induction électromagnétique avec ceux obtenus par hydrodistillation classique à montrer un rendement en HEs de l'ordre de 3.77 % et 2.86 % pour *C.sinensis* et *C. limonum,* respectivement dans un temps d'extraction plus court, contre 2.72%et 1.54% par l'HD classique pour *C.sinensis* et pour *C. limonum,* respectivement.
- L'effet du rapport pondéral sur le rendement d'extraction des huiles essentielles d'agrumes montre que le rapport pondéral optimal correspondant au rendement maximal, est RP=1/2.
- Sur le plan des caractéristiques physiques de nos huiles (densité, indice de réfraction…), l'ensemble des résultats obtenus semblent répondre aux spécificités de normes internationales (AFNOR). Les résultats d'aromatogramme obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose de Mueller Hinton révèlent que l'activité antibactérienne des H.Es testées est en fonction de la bactérie cible, , aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne et de la composition chimique des H.Es qui varie selon les conditions expérimentales d'extraction.

- L'évaluation de l'activité antioxydante des l'huiles essentielles de Citrus *in vitro* par la méthode de réduction du DPPH°, a montré que cette huile essentielle possède un pouvoir antioxydant. De même, en termes d'activité antioxydante, la méthode d'extraction des HEs assistée par induction électromagnétique a montré des résultats meilleurs, par rapport au système de chauffage conventionnel.

A l'issus de tous ces résultats, il faut signaler que ce travail mérite une poursuite en développant les points suivants :

Développer les techniques d'extraction des huiles essentielles

- La caractérisation des huiles essentielles d'agrumes par des moyens plus puissants comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM),
- La détermination de l'activité antibactérienne des HEs testées sur d'autres souches bactériennes.

Références bibliographiques

[1]: SHUKLA, R., KUMAR, A., PRASAD, C. S., SRIVASTAVA, B., &DUBEY, N. K. 2008. Antimycotic and antia-flatoxigenic potency of Adeno calymmaalliaceum Miers.on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. International Biodeterioration & Biodegradation, 62, 348–351.

[2]: TAJKARIMI, M. M, IBRAHIM, S. A., &CLIVER, D. O. 2010 . Antimicrobial herb and spice compounds in food. Review. Food Control, 21, 1199–1218.

[3]: DUNG, N.T., KIM, J.M., AND KANG, S.C., 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology 46: pp.3632-3639.

[4]:**HADJI, W., 2013**.Valorisation des huiles essentielles : Cas de l'utilisation de l'huile de cade dans les eaux .

[5] : BASER, K.H.C., ET BUCHBAUER, G., 2010. Handbook of ESSENTIAL OILS: Science,Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC . United States of America. 994 p.

[6] : BESOMBES, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo mécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Thèse de Doctorat, Université de la Rochelle, France. P 289.

[7] : PADRINI, F., LUCHERONI, M. T., 1996. Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Edition De Vecchi , Paris. Pages 11, 15, 61 et 111.

[8] : AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6ième édition. AFNOR, Paris.

[9] : BRUNETON, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Tec et Doc Lavoisier, p 1120, Paris.

[10] : LAWRENCE B.M., 2007. Mint, the genus menthe. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America.

[11] : GARNERO, J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Editions techniques- Encyclopédie des médecines naturelles.(Paris, France), phytothérapie, Aromathérapie, C-2, pp. 2-20.

[12] : RICHTER, G., 1993. Métabolisme des végétaux - Physiologie et biochimie. Edition Presses Polytechniques et universitaires romandes. 526 pages.

[13] :BELAICHE, P. 1979. Trait de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromathérapie Tome I. Maloine *S.A*, 204 p, Paris.

[14] :LAMARTI A., BADOC A., DEFFILEUX G. ET CARDE J .P. (1994). Biogénèse des monoterpènes I localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm*. Bordeaux, 133 ,69-78.

[15] :PIBIRI, M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, Ecole Polytechnique fédérale de Lausanne. Suisse. 161 P.

[16] :PARIS, M., HURABIELLE, M. (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome I. Masson, 339 p, Paris.

[17]: SVOBODA, K. P. AND HAMPSON, J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Procceedings NAHA, 25-28 september, St. Louis Missouri, USA 105-127.

[18] : RAHAL, S. (2004). Chimie des produits naturels et des êtres vivants. *O.P.U Edition.* 162 P.

[19] :PHARMACOPEE EUROPEENNE. (2005). 6ème Edition : Tome 1 et 2.

[20] : ZABEIROU. ET HACHIMOU. (2005). Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*MenthaSpicta L*) et de la Poivree*(MenthaPiperita L*) dans la région d'Ouargla. Mémoire de DES Biochimie, Université de Kasdi Merbbah , Ouargla, 69 P.

[21] : GOURINE, N., YOUSFI, M., BOMBARDA, I., NADJEMI, B., STOCKER, P. ET GAYDOU, E.M., 2010. Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of Pistacia atlantica from Algeria. Industrial Crops and Products, 31, 203-208.

[22] : LUCCHESI, M-E. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion. France. 143 P.

[23] : MEYER-WARNOD, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, *Perfumer & Flavorist*, 9, 93-103.

[24] : HERNANDEZ OCHOA, L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » D'origine végétale. Thèse De L'institut National Polytechnique, Toulouse, 217 P

[25] : LAGUNEZ RIVERA, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par introduction thermomagnétique. Thèse de doctorat en : Sciences des Agro-ressources, Toulouse. 328 p.

[26] : LUCCHESI, M-E, CHEMAT, F, ET SMADJA, J. (2004). Flavour And Fragrance. *Journal Flavour Fragrance*, 19, 134–138.

[27] : ANIZON, J.-Y., LEMAIRE, B. ET SURBLED, M., 2003. Extraction assistée par micro-ondes,Techniques de l'Ingénieur, l'expertise technique et scientifique de référence. 12 P.

[28] : GARNERO, J.,1996, Huiles essentielles, Techniques de l'Ingénieur, l'expertise technique et scientifique de référence, 39 p.

[29] : BURONZO, A. M., Grand guide des huiles essentielles, Hachette pratique, 244 p

[30] : DESMARES, C., LAURENT, A. & DELERME, C., 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.

[31] :BOUDOUX, D., 2001. L'aromathérapie se soigner par les huiles essentielles. 2éme Éd Atlanatica, Paris. Pp. 11- 34.

[32] :WICHTL, M. ET ANTON, R., 1999. Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Éd Technique & Documentation, Paris. 636 pages.

[33] : ZHIRI, A. (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. *Fondation pour le libre choix*, 16 P, Royaume Uni.

[34] : DEGRYSE, A., DELPLALA, I. ET VOIBIER, M. (2008). Risque et bénéfices possibles des Huiles essentielles. École des hautes études en santé publique Rennes, France. 44 P.

[35] : BENZEGGOUTA, N., 2005. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatreplantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister, Universitéde Constantine, Algérie, 110p.

[36] : TRAORE, M. C., 2006. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, pp. 175p.

[37] : CAILLET, S. ET LACROIX, M. (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en Sciences appliquées à l'alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand- Frappier, Université de Laval, Québec. 8 P

[38] : ESSAWI, T., ET SROUR, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 70, 343–349. **IN TEPE B.,DAFERERA D., SOKMEN A., SOKMEN M., POLISSIOU M., 2005.** antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae). Food Chemistry 90, 333–340.

[39] : TANTAOUI-ELARAKI, A., FERHOUT, H., ET ERRIFI, A., 1993. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Thymus Broussonettii, T.zygis and T.satureioides. Essent. Oil. Res, 5, 45-53.

[40] : DEANS S.G. ET RITCHIE G., 1987. Antimicrobial Properties of Plant Essential oils. Int. Food Microbiol., Vol. 5, pp : 165-180.

[41] :TEIXEIRA B., MARQUES B.A., RAMOS C., BATISTA I., SERRANO C., MATOS O., NENG N.R.,NOGUEIRA M.F.J., SARAIVA J.A., NUNES M.L., 2012. European pennyroyal(Mentha pulegium) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Industrial Crops and Products 36. Pp. 81–87.

[42] : BULLERMAN ET AL., IN SENHAJI ET AL ., 2006. Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. Phytothérapie 01. Pp 24-30.

[43]: MDEE, L.K., MASOKO, P. ET ELOFF, J. N., 2009. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. South African Journal of Botany75. Pp 375–379.

[44] : SCHALLER 1999. Etude des activités biologiques de fagara zanthoxylodes Lam (Rutaceae). Université de BAMAKO, MALI. 127 p.

[45] : BOSSOKPI, I.P.L., 2003. Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam(Rutaceae). Université de BAMAKO, MALI. 127 p.

[46] : AMEUR, M. ET RAHMANI, F. Z., 2012. L'étude antifongique de la menthe poivrée (Mentha piperita)**.** Mémoire d'ingéniorat, Université Amar Telidji Laghouat. 68p.

[47] : EL AJJOURI, M., SATRANI, B., GHANMI, M., AAFI, A., FARAH, A., RAHOUTI, M., AMARTI, F.,ABERCHANE, M.,2008. Activité antifongique des huiles essentielles de Thymusbleicherianus Pomel et Thymus capitatus (L.) Hoffm. & Link

contre leschampignons de pourriture du bois d'œuvre. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.12(4), 345-351.

[48] : MIGUEL, M.G., FIGUEIREDO, A.C. ET COSTA, M.M., 2003. effect of the volatile constituents isolated from tymus albicans, th. mastichina, th. carnosus and thymbra capitata **IN SUNFLOWER OIL. NAHRUNG/FOOD, 47(6): 397–402. IN BASER K.H.C. AND BUCHBAUER G., 2010**. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994 p.

[49]: EL BOUZIDI, L., ALAOUI, JAMALI C., BEKKOUCHE, K., HASSANI, L., WOHLMUTH, H., LEACH, D.,ABBAD, A., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan Thymus species. Industrial Crops and Products 43. Pp 450– 456.

[50] :**BUCHBAUER G., 2010.** Biological Activities of Essential Oils. Pp 235-273. **IN BASER K.H.C.AND BUCHBAUER G., 2010**. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.

[51] : BENENCIA, F. AND COURREGES, M.C., 1999. Antiviral activity of sandalwood oil againstHerpes simplex viruses-1 and -2. Phytomedicine, 6(2): 119–123. **IN BASER K.H.C.AND BUCHBAUER G. HANDBOOK OF ESSENTIAL OILS:** Science, Technology, andApplications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.

[52] : PRIMO, V., ROVERA, M. ET ZANON, S., 2001. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from Minthostachys verticillata (Griseb.) Epling. Rev.Argent. Microbiol., 33(2): 113–117. **IN BASER K.H.C. AND BUCHBAUER G.HANDBOOK OF ESSENTIAL OILS:** Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994 p.

[53] : KURITA, N., MIYAJI, M.K., TAKAHARA, Y., ICHIMURA, K., 1979. agric. biol. chem.,; 43:2365–2371. **IN LAHLOU, M., 2004**. Essential oils and fragrance compounds:bioactivity and mechanisms of action. Flavour Fragr. J. 19, Pp.159165.

[54]: FRANCHOMME, P., 1981. phytomedicine,; 1–2: 25–47. **IN LAHLOU, M., 2004**. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. Flavour Fragr. J. 19,Pp.159–165

[55]: LAHLOU, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils *phytotherapy research*, **18,** 435-448.

[56] : KNOBLOCK, H., PAULI, A., IBERL, B., WEIS, N.ET WEIGAND, H., 1988. bioflavour,; 87: 287. **IN LAHLOU, M., 2004.** Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. Flavour Fragr. J. 19, Pp.159–165.

[57] : RHAYOUR, K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum. Thèse Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Marroc.

[58] : BAMMI, J., KHELIFA, R. ET REMMAL, A., 1997. .proceedings of the international congress on aromatic and medicinal plants and essential oils, morocco,; 502. **IN LAHLOU, M.,2004**. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms ofaction. Flavour Fragr. J. 19, Pp.159–165

[59] : BOUCHIKHI, T., 1994. Thèse de doctorat, Universite Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.

[60]: LOUSSERT1989,.les agrumes.2.production. Edition Lavoisier, paris.157p.

[61] : WEBBER H.J., REUTHER W. ETBATCHELOR L.D., 1967 .The citrus Industry, volume 1 : History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California Press.

[62]: SPIEGEL-ROY P. ET GOLDSCHMIDT E.E., 1996 . Biology of Citrus. 1ere édition; Edition Cambridge University Press. 239 p.

[63] : HENDRIX C.M. ET REDD J.B., 1995 . Chemistry and Technology of Citrus Juices and ByProducts. **IN : ASHURST, P.R., 1995** : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.

[64]: GUIMARAES R., BARROS L., BARREIRA J.C.M., SOUSA M. J., CARVALHO A.M. ET FERREIRA I.C.F.R., 2010 .Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food Chem. Toxico., Vol. 48, pp : 99 – 106.

[65] : LOUSSERT R.,. Les agrumes.2. Production. Edition Lavoisier, paris 1989**.**

[66]: BOVILL H., 1996 . Natural aroma chemicals from oranges and other botanical sources. Perfum. Flavour. Vol. 21, pp 9 – 11

[67]: CHEETHAM P.S.J., 2010 : natural sources of flavours. cité **IN** : **TAYLOR A.J. AND LINFORTH R.S.T., 2010** . Food flavourtechnology. Edition Wiley-Blackwell, second edition. 360 p.

[68] :**DI GIACOMO A., RAPISARDA P. ET SAFINA G., 1992** . L'industria dei Derivati Agrumari., Stazione Sperimentale Industria Essenze Derivati Agrumari, Reggio Calabria, Italy.

[69] : PADRINI F., LUCHERONI M. T.. Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassageEnergetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris, pp.11, 15, 61 et 111 1996

[70]: KESTERSON J.W. ET BRADDOCK R.J., 1976 . By-products and specialty products of Florida citrus. Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 784, University of Florida, Gainesville, FL, USA, pp : 4 – 25.

[71] : **RODRIGO M.I., MALLENT D. ET CASAS A., 1985** . Relationship between the acid and limonin content of Washington navel orange juices. J. Sci. Food. Agric. Vol. 36, pp : 1125 – 1129

[72] : SONKAR R.K. ET LADANIYA M.S., 1995 . Effect of fruit maturity and degreening on bitterness of 'Nagpur' mandarin juice. Indian Food. Packer November/December, pp. 11–16.

[73]: PEYRON L., 2002 :Production of bitter orange neroli and petitgrain oils. Cité InDugo G. And Di Giacomo A., 2002 : Citrus, the Genus Citrus. Edition Taylor and Francis. 642 p.

[74]:MARCHAND L., 2002 . Cancer preventive effects of flavonoids – a review. Biomed. Pharmacother. Vol. 56, pp : 296–301.

[75]: HALLIWELL B., 1996. Antioxidants in human health and disease. Ann. Rev. Nutr., Vol. 16, pp : 33–50.

[76] : **RAO A.V. et RAO L.G., 2007** . Carotenoids and human health. Pharmacol. Res. Vol. 55, pp : 207 – 216.

[77] :**CHUTIA M., BHUYAN D.P., PATHAK M.G., SARMA T.C. et BORUAH P., 2009** . Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT Vol. 42, pp : 777–780.

[78] : MINH TU N.T., THANH L.X., UNE A., UKEDA H. et SAWAMURA M., 2002 . Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. Flavour Fragrance J. Vol. 17, pp : 169 – 174.

[79] :DHARMAWAN J., KASAPIS S., CURRAN P. et JOHNSON J.R., 2007 . Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: Freshly-squeezed juice. Flavour Fragrance J., Vol. 22, pp : 228–232.

[80] :SACCHETTI G., MAIETTI S., MUZZOLI M., SCAGLIANTI M., MANFREDINI S. ET RADICE M., 2005 . Comparative evaluationof 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem. 91, 621–632.

[81] : MADSEN H.L. ET BERTELSEN G., 1995. Spices as antioxidants. Trends Food Sci. Technol. Vol. 6, pp : 271–277.

[82] : ABEYSINGHE D.C., LI X., SUN C.D., ZHANG W., ZHOU C. et CHEN K., 2007 . Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. Food Chem. Vol.104, pp : 1338–1344.

[83]: GORINSTEIN S., BELLOSO O.M., PARK Y.-S., HARUENKIT R., LOJEK A., CIZ M., CASPI A., LIBMAN I. et TRAKHTENBERG S., 2001 . Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. Food Chem., Vol. 74, pp : 309–315.

[84] : Bousbia. N,2011, Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

[85] : **MEMOIRE (2008-2009)** de l'extraction d'huile essentielle de fenugreek et l'evaluation de l'effet antibacterien, hypoglycemiant et antiinflammatoire

[86] : COSTE, A., M. DUBOURDEAU, M. D. LINAS, S. CASSAING, J. C. LEPERT, P. BALARD, S. CHALMETON, J.BERNAD, C. ORFILA, J. P. SEGUELA, AND B. PIPY. 2003. Ppargamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 19:329-339.

[87] : CHAKER H. 2012 . Regulation de l'adaptation de la bacterie *Pseudomonas aeruginosa* a son hote : implication des metabolites du tryptophane.

[88] :MEMOIRE HAYOULA 2012 extraction et caracterisation physicochimique de biomolecules a partir de bioressources .

[89] : A.F.N.0.R 2000, Paris.
Huiles essentielles, tome 1.
Densité relative : NFT 75- **1** 1 1.
Indice de réfraction : NFT 75- 112.
Indice d'acide : NFT 75- 103.
Indice d'ester : NFT 75- 104.

[90] : AFNOR, 2000, miscibilité à l'éthanol (NF T 75-101 : 1999)

[91] : BENJELALI B., TANTAOUI E.A. & ESMAILI-ALAOUI M. (1986). Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, **20**, 155-167.

[92] : YOUCEF ETTOUMI, K., Extraction des pectines en utilisant le procédé de chauffage par induction électromagnétique. 2011, mémoire de Magister, université de Médéa, Alger.

[**93] : BOUBEKRI,C**.2014,.Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanummelongena par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université de Biskra, Alger .

.

[94]: BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M E., BERSET C.1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**: 25-30 ..

[95]: BENHAMMOU, N., ATIK BEKKARA, F.,; KADIFKOVA, P. **2007**,. Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L. and Pistacia atlantica Desf . Advances in Food Sciences. pp 29(3) .155-161 ..

[96]: COLIC M., MORSE D, **1999**"The Elusive Mechanism of the Magnetic "Memory" of Water", Colloids Surf., A:, Physicochem. Eng. Asp. 154 (1-2), 167-174,.

[**97] : LAGUNEZ RIVERA**, L. **(2006).** « Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe » thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse,

[98]: KANKO C, SAWALIHO BE, KONE S, KOUKOUA G, N'GUESSAN YT. « Étude des propriétés physico-chimiques des huilesessentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». Comptes rendus Chimie 7 (2004) 1039–1042.

[99]: MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E. & ROURA S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food Science and Technology,38, 565-570.,

[100]: BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

[101]:BUSATTA C., VIDAL R.S., POPIOLSKI A.S., MOSSI A.J., DARIVA C.,RODRIGUEZ M.R.A., CORAZZA M.L., VLADIMIR O.J. & CANSIAN R.L. (2008).Appliication of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology, 25, 207-211]

[102]: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N; GORDON, M. (2001). Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

[103]: KEHAL, F.2013, Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche, mémoire de Magister,université de canstantine, Alger.

-