République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE YAHIA FERES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Norme et Contrôle de Qualité

Thème

CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES D'AGRUMES

Présenté par :

Hadri Nabila

Sahraoui Ilham

Dirigé par :

Dr Zouambia Yamina

Melle Youcef Ettoumi Khadidja

Année universitaire 2014 -2015

Remerciements

Tout d'abord nous tiendrons à remercier ***Dieu*** *le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

Nos plus vifs remerciement vont à Melle ***Youcef Ettoumi Khadidja,*** *qui nous 'a accompagnée et soutenue quotidiennement, nous vous remercie de nous avoir fait profiter de vos compétences, merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.*

Sans oublier ***Dr. Zouambia Yamina*** *pour son encadrement, les conseils qu'elle n'a cessé de nous prodiguer, ainsi que pour son encouragement.*

Nos remerciements vont particulièrement au président et membres de jury qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Nous somme très reconnaissantes envers les directeurs de laboratoire de recherche et de laboratoire du hall technologique a l'université Dr Yahia Farés de Médéa ainsi que le chef service de DSP de Médéa Mr Djekoumi H, pour nous 'y avoir accueillie, ainsi tous les membres de laboratoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude à tous les enseignants du département de Génie des procédés de la faculté des sciences et de la technologie de l'université de Médéa qui ont participé à notre formation.

Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de

Ce travail.

Un grand merci à tous

Dédicace

Avec l'aide de dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

À Mon très cher père (Abdelkader) pour son encouragement.

À la plus chère au monde, ma mère (Meriem) qui m'a permis de continuer mes études dans les meilleures conditions

, pour le soutien qu'elle m'a apporté en toutes circonstances.

À mes très chers frères : Ben sonna, Ahmed, Ismail, hamza.

À mes très chèrs sœurs : Karima, Farida, Fatima.

À tous les membres de ma famille

À ma chère sœur et binôme : Ilham





Nabila

Dédicace

Merci Allah (mon dieu) de m 'avoir donné la capacité d 'écrire et de réfléchir, la force d 'y croire, la patience d 'aller jusqu 'au bout du rêve et le bonheur.

Je dédie ce modeste travail à :

La couronne de ma tête ; mon père (Rachid).

À celle qui m'a donné tout, la lumière de ma vie, la plus généreuse ma chère mère (Nassira).

A mon frère Yahya.

À mes sœurs Hanane Widad Maissa .

À mes familles Sahraoui et Adda.

À tous mes amies de primaire à l'université.

À mon très cher binôme Nabila qui a contribuée à la réalisation de ce modeste travail.

A toute personne que j'aime

Itham

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تثمين قشور الحمضيات وهي: الليمون *C.limonum* ، البرتقال الحلو *C.sinensis*. والرنج *Citroncirus webberi* .من خلال استخدام زيوتها الأساسية باعتبارها مصدرا محتملا للجزيئات الحيوية النشطة الطبيعية. الزيوت العطرية المستخلصة بواسطة التقطير المائي، قد تم تحليلها من خلال تحديد الخواص الفيزيوكيميائية.حيث أعدت مستحلبات الزيت العطري باستعمال بوليمر حيوي ، وهو البكتين، مادة ذات خصائص مضادة للميكروبات، مع إضافة حمض الاسكوربيك كمضاد أكسدة قوي.تم دراسة تأثير تركيزالبكتين و حمض الاسكوربيك على استقرار المستحلبات. أظهرت نتائج النشاط البيولوجي للزيوت الأساسية وكذالك لمستحلباتها باستعمال البكتين ان استحلاب هذه الزيوت لم يؤثر على النشاط المضاد الأكسدة و النشاط المضاد للمكروبات ,بل كان لديها تأثير مزدوج راجع لمكونات هذه المستحلبات.

الكلمات المفتاحية :البكتين, المستحلب, الزيوت الأساسية, الحمضيات, النشاط المضاد للمكروبات, النشاط المضاد الأكسدة

Résumé

Cette étude vise à valoriser les écorces de *Citrus* à savoir : *C. limonum* (Citron), *C. sinensis* (Orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange) par l'utilisation de leurs huiles essentielles comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Les huiles essentielles extraites par hydroditillation, ont été analysées par la détermination des indices physico-chimiques. Des émulsions d'HE extraites de type H/E ont été élaborées à base d'un bio-polymère émulsifiant, à savoir la pectine, substance ayant des propriétés antimicrobiennes, additionnée par l'acide ascorbique, en tant qu'un antioxydant fort. L'effet de la concentration en pectine et de l'acide ascorbique sur la stabilité des formulations a été étudié. L'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles seules et en émulsion à montré que la mise en émulsion de l'HE base de pectine n'a pas affecté leurs pouvoirs antioxydant et antimicrobien, mais plutôt, elle a exercé un effet synergique due à la composition de ces émulsions.

Mots clés: activité antimicrobienne, activité antioxydant, agrumes, émulsion, essentielle, huiles, Pectine.

Abstract

This study aims to enhance the peel of *Citrus* namely: *C. limonum* (Lemon), *C. sinensis* (sweet orange) *and Citroncirus webberi* (Citrange) by using their essential oils as a potential source of natural bioactive molecules. Essential oils extracted by hydroditillation, were analyzed by determining the physico-chemical indices. O/W essential oil emulsions were prepared with biopolymer emulsifier, namely pectin, as substance having antimicrobial properties, added by ascorbic acid as a powerful antioxidant. The effect of pectin concentration and ascorbic acid on the stability of formulations was investigated. The evaluation of the biological activities of the essential oils free and incorporated in an emulsion showed that the emulsification of EO with the pectin did not affect their antioxidant and antimicrobial powers, but rather, she had a synergistic effect due to the composition of these emulsions.

Key Word: antimicrobial activity, antioxidation activity. citrus, emulsion, essential oil, Pectin

Sommaire

Liste des tables

Liste des figures

Abréviations

INTRODUCTION GENERALE ……..1

I. EMULSION 2

I.1 Introduction 2

I.2 Définition 2

I.3 Les tensioactifs 2

I.4 Types d'émulsions 4

I.4.1 Émulsions simples 4

I.4.2 Émulsions multiples 4

I.5 Facteurs déterminant le type d'émulsion 5

I.5.1 Formulation physico-chimique 5

I.5.2 Rapport Eau/Huile (REH) 5

I.6 Détermination expérimentale du type d'émulsion 5

I.7 Formulation des émulsions 6

I.8 Techniques de stabilisation des émulsions 7

I.8.1 Stabilisation par répulsion entre gouttes : stabilisations stérique et électrostatique 7

I.8.2 Stabilisation électrostatique 8

I.8.3 Stabilisation rhéologique 8

I.9 Phénomène d'instabilité 8

I.9.1 Sédimentation et crémage 9

I.9.2 Floculation 9

I.9.3 Coalescence 9

I.9.4 Mûrissement d'Ostwald ou diffusion moléculaire 10

I.9.5 Inversion de phase 10

I.10 Facteurs influençant la stabilité des émulsions 11

I.11 Contrôle des émulsions 11
I.11.1 Examen macroscopique 11
I.11.2 Examen microscopique 12
I.11.3 Détermination du sens de l'émulsion 12
I.11.4 Contrôle de stabilité 13
I.11.5 Détermination de pH 13

I.12 Propriétés et caractérisation des émulsions 13
I.12.1 Granulométrie 13
I.12.2 Viscosité 13
I.12.3 Rhéologie 14

I.13 Applications des émulsions 14

I.14 Conclusion 15
II. HUILE ESSENTIELLE 16

II.1 Introduction 16

II.2 Définition des huiles essentielles 16

II.3 Localisation des Huiles essentielles 16

II.4 Propriétés générales des huiles essentielles 17

II.5 Critères de qualité 18

II.6 Méthodes d'extraction des huiles essentielles 18
II.6.1 Hydrodistillation 18
II.6.2 Entraînement à la vapeur d'eau 19
II.6.3 Extraction par solvants organiques 19
II.6.4 Expression à froid 20
II.6.5 Enfleurage 20
II.6.6 Extraction par les fluides supercritiques 20
II.6.7 Extraction par micro-ondes 21

II.7 Vertus des huiles essentielles 22

II.8 Activités biologiques 22

II.8.1 Activité antioxydante 22
II.8.2 Activité antimicrobienne 23
c) Méthode de dilution de bouillon 24

II.9 Les agrumes 25
II.9.1 Définition 25
II.9.2 Classification 25
II.9.3 Caractéristiques et description des agrumes 25
II.9.4 Différentes variétés d'agrumes 26

II.10 Conclusion 29
III. MATERIELS ET METHODES 30

III.1 Introduction 30

III.2 Produits et matériels utilisés 30
III.2.1 Produits chimiques utilisés 30
III.2.2 Appareillages utilisés 30
III.2.3 Matériels Microbiologiques 31
III.2.4 Matière première végétale 31
III.2.5 Microorganismes utilisés 32

III.3 Méthodes 32
III.3.1 Extraction des huiles essentielles 32
III.3.2 Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles extraites 33
III.3.3 Préparation des émulsions d'HE d'agrumes 33
III.3.4 Caractérisation physico-chimique des émulsions préparées 34

III.4 Activité biologique 34
III.4.1 Evaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test DPPH 34
III.4.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne par la technique Technique de macro-dilution en milieu liquide 35
IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS 38

IV.1 Introduction 38

IV.2 Caractérisation physico-chimique des l'huiles essentielles d'agrumes extraites ... 38

IV.3 Caractérisation physico-chimiques des émulsions préparées sans acide ascorbique 39

IV.4 Caractérisation physico-chimiques des émulsions contenant l'acide ascorbique . 42

IV.5 Evaluation de l'activité biologique..... 45

IV.6 Evaluation de l'activité antioxydante 45

IV.6.1 Détermination de IC50 des huiles essentielles..... 45

IV.6.2 Détermination de l'activité antioxydante des émulsions d'HE..... 46

IV.7 Evaluation de l'activité antimicrobienne 48

V. CONCLUSION GENERALE 51

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Figures

Figure I-1: Structure d'une molécule amphiphile. 3
Figure I-2 : Types d'émulsion. 4
Figure I-3 : Représentation d'interfaces eau/huile 8
Figure I-4 : Phénomènes de crémage et de sédimentation. 9
Figure I-5 : Phénomène de floculation. 9
Figure I-6 : Phénomène de coalescence 10
Figure I-7 : Phénomène de mûrissement d'Ostwald 10
Figure I-8 : Phénomène d'inversion de phase 11
Figure I-9 : Différents types de distributions de tailles de gouttelettes. 13
Figure II-1 : Extraction d'huiles essentielles par la méthode de hydro-distillation. 18
Figure II-2 : Montage d'extraction par micro-ondes 21
Figure II-3 : Acide ascorbique. 23
Figure II-4 : Présentation d'agrume. 25
Figure II-5 : Présentation d'orange 26
Figure II-6: Présentation de citron. 27
Figure II-7 : présentation de Citrange 29
FigureIII-1: A) Orange ; B) Citrange ; C) Citron. 31
FigureIII-2: Montage d'extraction par Hydrodistillation 32
FigureIII-3: Homogénéisation par Ultra Turax. 34
FigureIII-4 : Réaction du DPPH• avec un antioxydant 35
FigureIII-5 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide. 36
Figure IV-1 : Apparence des différentes formulations à T_{amb} pendant 20 jours. 40
Figure IV-2 : Vues microscopiques des différentes formulations d'HE sans ajout d'acide ascorbique. 41
Figure IV-3 : Apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation à T_{amb} avec: a) 0.5%, b) 1 %, d'acide ascorbique. 43
Figure IV-4 : Vues microscopiques des émulsions stables en présence d'acides ascorbique. 44
Figure IV-5 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction des différentes concentrations des l'huile essentielle d'agrume et d'acide ascorbique. 45
Figure IV-6 : Effet de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE. 48
Figure IV-7 : Evaluation des CMI des HEs seules vis-à-vis de : *Staphylocoque aureus* et *Candida albicans* 48

Figure IV-8: Evaluation des CMI des émulsions d'HE de Citrange vis-à-vis de : *Staphylocoque aureus* et *Candida albicans* 49

Liste des tables

Tableau IV-1 : Caractérisation physico-chimiques des HE des espèces citrus. 38
Tableau IV-2 : Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions sans acide ascorbique..... 39
Tableau IV-3 : Résultats des mesures du pH et de la conductivité des émulsions en présence d'acide ascorbique..... 42
Tableau IV-4 : Valeurs des IC50 trouvées pour les HE d'agrumes..... 46
Tableau IV-5 : Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'huiles essentielles d'agrume. 46
Tableau IV-6 : Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'huiles essentielles après 7 jours de conservation..... 47
Tableau IV-7 : CMI (µl/ml) des huiles essentielles en milieu liquide..... 49

Liste des abréviations et symboles

A : Absorbance de la solution.

C : Concentration.

CA : Candida albicans

CMC : concentration micellaire critique

CMI : concentration minimale d'inhibitrice (µl/ml)

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazy

E/H: Emulsion Eau dans Huile.

HE : Huile essentielle

H/E : Emulsion Huile dans Eau.

HLB: Balance Hydrophile-lipophile.

HLD: Différence Hydrophile-lipophile

HM : Pectines hautement méthyle

I: Pourcentage d'inhibition

IC_{50} : Concentration inhibitrice à 50%

pH : Potentiel hydrogénique

REH : Rapport Eau /Huile

SA : Staphylococcus aureus

SEH : Système Eau dans Huile.

T : Température absolue.

UV : Ultra Violet

Introduction générale

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant l'efficacité et la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, l'augmentation de la demande des produits « naturels » sans conservateurs a conduit l'industrie alimentaire à envisager l'incorporation de substances considérées « non chimiques » **[1].**

Ainsi, de nombreux composés phytochimiques y compris les HEs commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives **[2].** Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, et antimicrobiens.

C'est pourquoi, nous nous somme intéressé à valoriser les écorces d'agrumes par extraction des huiles essentielles à partir des zestes de trois espèces de *Citrus* à savoir : *C. limonum* (Citron), *C. sinensis* (Orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange). Puis à caractériser et évaluer l'activité biologique des huiles essentielles extraites seules et incorporer dans une émulsion H/E à base de pectine additionnée par l'acide ascorbique.

Dans cette optique, le manuscrit est donc structuré en trois grandes parties. La première partie propose une mise au point bibliographique mettant l'accent sur trois principaux volets qui sont les huiles essentielles notamment celle de *Citrus*, leurs méthodes d'extraction, et leur mise en émulsions. Dans la deuxième partie qui sera consacré à l'aspect pratique de ce travail, nous avons décrit en détail l'extraction des huiles essentielles, leurs caractérisations physico chimiques, puis leur mise en émulsion par l'optimisation des concentrations adéquates en polysaccharides de formulation en incorporant un antioxydant fort, l'acide ascorbique, et enfin, l'étude de leurs activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne). Les résultats obtenus sont ensuite discuté dans troisième partie. Suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I : les émulsions

I.1 Introduction

Les émulsions font partie de notre vie quotidienne, soit sous la forme des produits consommables dans le domaine alimentaire, de la santé, de l'hygiène, les cosmétiques, de l'utilitaire (peintures, détergents, bitumes),etc., soit comme un intermédiaire pour l'obtention d'autre produits tels que les polymères pour le transport d'hydrocarbures lourd pour la production d'énergie et les fluides d'usinage pour l'industrie métallurgique**[3]**.

Dans ce chapitre, nous rappelons d'abord quelques concepts généraux relatifs à la physico-chimie des émulsions, nous présenterons ainsi les applications de ces systèmes dispersés dans différents domaines industriels en particulier l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

I.2 Définition

Une émulsion est définie comme un mélange de deux liquides immiscibles dont l'un est dispersé sous forme de fines gouttelettes, dans l'autre. Le liquide enveloppant constitue la phase continue ou externe et le liquide dispersé constitue la phase interne. Nous appellerons par émulsion stable, une émulsion qui ne peut pas être rompue sans avoir recours à certaines formes de traitement **[4]**.

Pour que l'émulsion soit durable (c'est-à-dire que l'état dispersé demeure lorsque l'agitation mécanique cesse), il est nécessaire d'utiliser un agent émulsionnant ou émulsifiant, son rôle est de stabiliser le système dispersé en inhibant les phénomènes de dégradation. Les tensioactifs, et les polymères sont des agents émulsionnants. Ceux les plus largement utilisés sont les tensioactifs **[5]**.

I.3 Les tensioactifs

Les composés tensioactifs ou agents de surface ou encore surfactifs, appelés en anglais surfactants, ont la propriété de s'adsorber aux interfaces eau /huiles, et donc de diminuer la tension interfaciale afin de permettre la dispersion des deux liquides non miscibles. Les tensioactifs possèdent une partie polaire et une apolaire ce qui en fait des molécules amphiphiles (figure I.1) **[6]**.

La partie lipophile est constituée par une ou plusieurs chaines hydrocarbonées (s) pouvant être aliphatique(s), linéaire(s), ramifiée(s), aromatique(s) ou encore alkyle aromatique(s) **[6]**.

Le caractère hydrophobe de la partie hydrocarbonée varie avec le nombre d'atome de carbone et diminue avec le nombre d'instauration **[6]**.

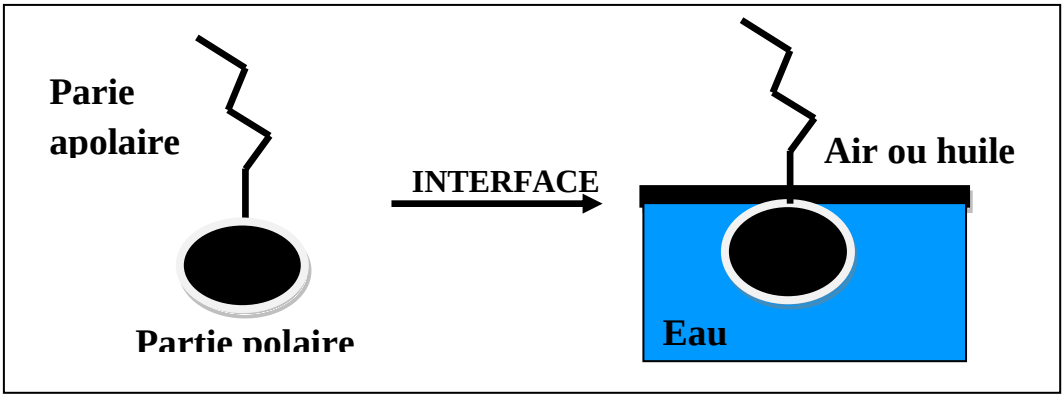


Figure I-1: Structure d'une molécule amphiphile.

La partie hydrophile, ou tête polaire, est constituée par un ou plusieurs groupements polaires (s), ionique(s), ou non-ionique(s). Les agents tensioactifs sont classés en fonction de la nature de la partie hydrophile puisque celle-ci gouverne leurs propriétés **[6].** On distingue :

- **Les tensionactifs anioniques** : comportent un groupement ionique chargé négativement en solution aqueuse (carboxylate, sulfate, sulfonâtes ou phosphate). Ce sont les agents tensionactifs les plus utilisés industriellement [**7]**.
- **Les tensionactifs cationiques :** comportent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse, ce sont généralement des sels d'ammonium quaternaire. Ils forment des complexes insolubles dans l'eau avec les anioniques **[7].**
- **Les tensionactifs non ionique :** ces surfactifs sont caractérisés par une tète hydrophile non chargée et sont compatibles avec n'importe quel autre type de surfactifs. Ils sont émulsionnants, solubilisant et mouillants **[8]**.
- **Les tensionactifs amphotères (**Zwittérioniques**) :** comportent deux groupements ioniques, l'un cationique et l'autre anionique, ils se neutralisent au pH isoélectrique. Ils sont par conséquent par fois classés comme non ioniques **[8]**.

Lorsque le tensioactif est en concentration suffisante, les molécules de tensioactif en excès s'autoassocient en solution sous forme d'agrégats appelés micelles. La concentration à partir de la quelle un composée tensioactif s'autoassocie sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée concentration micellaire critique(CMC). La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif et dépend de la longueur de la chaine lipophile et de la nature de la tête polaire. Par exemple les CMC des tensioactifs non-ioniques sont plus basses que celles

des tensioactifs ioniques de longueur de chaîne comparable. Mais la CMC dépend également de l'environnement physico-chimique : concentration en électrolytes ou température **[8]**.

I.4 Types d'émulsions

I.4.1 Émulsions simples

Les émulsions simples sont généralement constituées d'une phase aqueuse E, et d'une phase huileuse H. Si la phase dispersée est la phase huileuse, l'émulsion est dite directe, de type huile dans eau et notée H/E, tandis que si la phase huileuse est la phase continue (ou phase externe), l'émulsion est de type inverse : eau dans huile E/H [**9]**.La figure I.2 donne une représentation schématique des deux types d'émulsions.

En fonction de la taille moyenne des gouttelettes on distingue des émulsions plutôt grossières, appelées *émulsions* ou *microémulsions* et des émulsions plus fines, submicroniques, appelées *mini* ou *nanoémulsions* **[9].**

I.4.2 Émulsions multiples

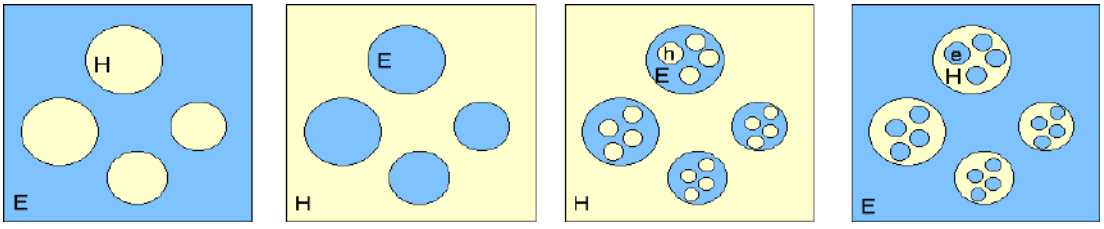
Il s'agit de disperser une émulsion simple dans une phase dispersante :

- la dispersion d'une émulsion E/H dans une phase aqueuse (E) donne une émulsion E/H/E;
- à l'inverse, la dispersion d'une émulsion H/E dans une phase huileuse (H) donne une émulsion H/E/H.

Ces deux exemples correspondent au cas le plus simple d'émulsions multiples : les émulsions doubles (figure I.2). On y distingue trois phases : interne /intermédiaire/ externe **[9].**

La phase intermédiaire sont généralement qualifiées de globules, dispersées dans la phase externe, et les sphères de la phase interne sont appelées gouttelettes.

Cette distinction n'existe pas pour les émulsions simples pour lesquelles les sphères de la phase dispersée sont appelées indifféremment gouttelettes ou globules **[9].**



Emulsion H/E Emulsion E/H Emulsion H/E/H Emulsion E/H/E

Emulsion simple Emulsion multiple

Figure I-2 : Types d'émulsion.

I.5 Facteurs déterminant le type d'émulsion

L'agitation d'un système (Eau-Huile) équilibré, donne une émulsion dont le type dépend de divers facteurs : la formulation, la composition (particulièrement le rapport eau-huile) et le protocole expérimental de préparation **[10]**.

I.5.1 Formulation physico-chimique

En 1913 Bancroft énonça une règle fameuse qui précise que la phase externe d'une émulsion est celle dans laquelle le surfactif est le plus soluble. L'interprétation de ce phénomène, due à Langmuir (1917) est fondée sur le fait que la solvatation estplus forte du côté de l'interface où se trouve la phase externe, ce qui produit un gonflement qui induit la courbure **[9]**.

Cette règle est très souvent suivie sauf dans le cas de systèmes qui contiennent une forte proportion de l'une des phases. Elle peut être exprimée en fonction d'un paramètre de formulation généralisée comme le (HLD) **[**9**].**

I.5.2 Rapport Eau/Huile (REH)

Le rapport eau/huile indique les quantités relatives des phases dans le système:

$$\mathbf{REH = f_e / f_h = f_e / (1\text{-}f_e)} \quad \text{(I.1)}$$

Où f_e et f_h sont les fractions volumiques d'eau et d'huile.

Dans le cas où l'émulsion contiendrait une forte proportion d'un des fluides, typiquement plus de 70%, c'est celui-ci qui deviendrait la phase dispersante, selon ce qui est parfois appelé la règle d'Ostwald **[9]**.

I.6 Détermination expérimentale du type d'émulsion

Il existe plusieurs méthodes expérimentales pour déterminer le type d'une émulsion, la mesure de la conductivité électrique est la plus employée. La présence d'électrolytes dans la phase aqueuse fait que celle-ci possède une conductivité élevée ; par contre, une phase huileuse, du fait de sa nature apolaire se caractérise par sa basse capacité conductrice.

En conséquence, les émulsions possédant une conductivité élevée ont une phase externe aqueuse, et sont donc du type H/E (ou E/H/E), celles qui ont une faible conductivité sont des émulsions E/H (ou H/E/H) **[**9**].**

I.7 Formulation des émulsions

La formulation d'une émulsion vise à apporter au mélange le ou les produits qui vont permettre la formation d'un système stable au repos pour un temps plus ou moins long suivant l'usage prévu. Les paramètres suivant cherchent à illustrer les principales règles de formulation **[11]**.

a. Choix du type d'émulsion

Le choix du type d'émulsion et la teneur en phase dispersée se décident cas par cas en fonction des contraintes techniques, économiques, toxicologiques, et autres, imposés par l'industrie utilisatrice. C'est le système H/E qui est choisi dans le plus grand nombre de cas. De point de vue pratique on distingue trois groupes d'émulsions:

- ✓ Les émulsions à faible teneur en phase interne contiennent jusqu'à 20% de phase dispersée. Ce sont des émulsions fluides, de faible viscosité et leurs comportement rhéologique est le plus souvent newtonien.
- ✓ Les émulsions à teneur moyenne en phase interne contiennent de 20 à 60% de phase dispersée. Elles sont beaucoup plus visqueuses que les précédentes et ne sont généralement pas newtoniennes.
- ✓ Les émulsions à teneur élevée en phase interne contiennent plus de 60% de phase dispersée. Ces émulsions correspondent à des cas très particuliers, relativement peu fréquents **[9]**.

b. Choix de l'agent émulsionnant

Pour les émulsions à très faible teneur en phase dispersée, on a recours à des agents tensioactifs ioniques qui stabilisent le système par la charge électrostatique qu'ils apportent à l'interface gouttelettes émulsionnées – phase continue. Dans ce cas, on doit obtenir une émulsion dont les gouttelettes ont des dimensions très petites. Lorsque la teneur en phase dispersée augmente, la formation d'un film protecteur à l'interface particule – phase continue par adsorption de l'agent émulsionnant devient le facteur prépondérant des stabilisations. Ce sont les émulsionnants non ioniques qui sont les plus aptes à former ce film protecteur aux interfaces. En règle générale, un mélange d'agents émulsionnants, soit deux non ioniques, soit un non ionique plus un ionique, est plus efficace qu'un seul produit pour stabiliser une émulsion. La répartition des agents émulsionnants dans chaque phase, en fonction des solubilités semble jouer un rôle important dans la stabilisation de l'émulsion **[12]**.

c. Préparation des émulsions

Avant qu'une émulsion soit préparée, les constituants liposolubles et hydrosolubles sont séparément dissous dans la phase appropriée, un agent émulsionnant convenable est choisit selon le type d'émulsion désiré, et celui-ci est aussi dissout dans la phase aqueuse ou huileuse suivant leur nature. Le volume de la phase dispersante doit être entre 40% et 60% du volume total **[13]**.

*** Mode de préparation**

Le mode opératoire fixe l'ordre d'introduction des constituants, les températures à respecter à différentes étapes de la préparation, les types d'agitation, les vitesses et les temps d'agitation, le temps de refroidissement. Deux modes opératoires différents par l'ordre d'introduction des constituants peuvent aboutir à deux émulsions radicalement différentes. D'ordinaire, la phase à disperser est introduite progressivement dans la phase continue ou l'on impose l'agitation mécanique. Par exemple, l'huile sera versée dans la phase aqueuse pour préparer une émulsion huile dans eau (H/E**) [12]**.

***Moyen mécanique de dispersion**

Bien qu'une agitation manuelle suffise par fois, un moyen d'agitation mécanique et le plus souvent indispensable à l'obtention d'émulsion ayant une durée de vie importante .Différents moyens mécaniques de dispersion sont utilisables: ancre, hélice, mobile multiple, mélangeur statique, moulin colloïdal, disperseur à ultrasons, homogénéisateurs haute pression. Le type de système de dispersion est à choisir en fonction de la finesse désirée pour l'émulsion **[13].**

I.8 Techniques de stabilisation des émulsions

I.8.1 Stabilisation par répulsion entre gouttes : stabilisations stérique et électrostatique

A l'échelle moléculaire, les forces d'attraction de Van Der Waals, agissant entre les gouttelettes, sont à l' origine de la coalescence d'une émulsion. La stabilisation par répulsion entre gouttelettes consiste à adsorber un tensioactif à l'interface eau-huile. Deux cas se présentent **[14]**:

- Le tensioactif utilisé est un tensioactif non-ionique et sa partie hydrophile, qui est constituée d'une chaine polymère (souvent du polyoxyde d'éthylène), occupe une certaine épaisseur au voisinage de l'interface. Dans ce cas, la répulsion est de nature **stérique** et elle n'est importante qu'à très courtes distances, de l'ordre du double de l'épaisseur de la couche polymère (figure I.3(a)).

- Le tensioactif utilisé est un tensioactif ionique (de type dodécylsulfate de sodium) et l'interface est chargée, les contre-ions s'étant dispersés dans l'eau lors de l'ionisation. Dans ce dernier cas, la répulsion est **électrostatique** (figure I.3(b)).

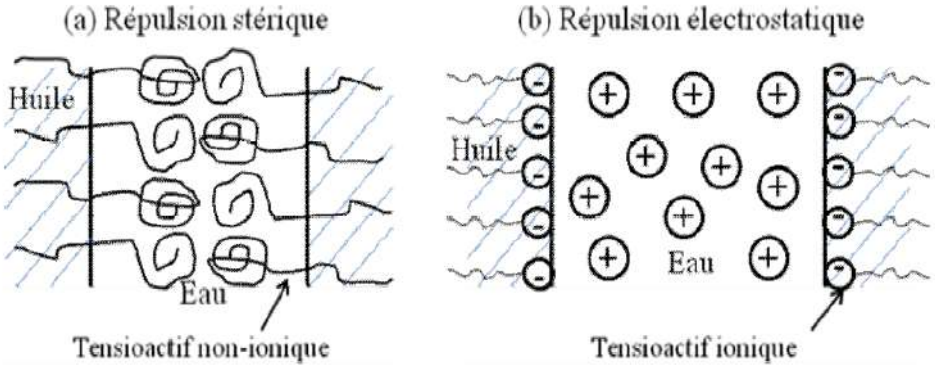


Figure I-3 : Représentation d'interfaces eau/huile **[14]**

(a) répulsion stérique : tensioactif non-ionique,

(b) répulsion électrostatique : tensioactif ionique

Les polymères hydrosolubles peuvent cependant permettre de stabiliser une émulsion H/E concentrée, lorsque les gouttelettes sont en contact et se déforment : les pelotes de polymère prisonnières des films minces aqueux séparant les gouttes inhibent le phénomène de coalescence **[14]**.

I.8.2 Stabilisation électrostatique

Comme pour les dispersions solide-liquide, il s'agit de la coexistence de la stabilité stérique et électrostatique **[14]**.

I.8.3 Stabilisation rhéologique

On augmente la viscosité de la phase continue en ajoutant des polymères viscosifiants ou certains tensioactifs (non-ioniques en excès) pour mobiliser les gouttelettes dispersées **[14]**.

I.9 Phénomène d'instabilité

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instable, la stabilité des émulsions est donc d'ordre cinétique et elle est liée à la physico-chimie du système qui peut ralentir voire inhiber les mécanismes de déstabilisation **[15]**.

I.9.1 Sédimentation et crémage

Ce mécanisme résulte de la différence de densité entre la phase dispersée et la phase continue. On parle de crémage quand il s'agit d'une ascension de la phase dispersée, et de sédimentation quand la phase dispersée chute (Voir figure I.4). C'est un phénomène réversible : L'interface existe toujours, il suffit d'agiter pour revenir à l'émulsion **[15].**

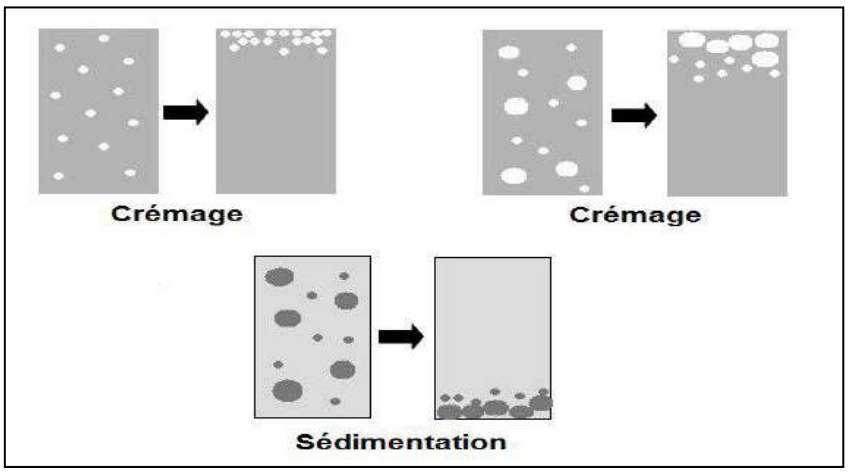


Figure I-4 : Phénomènes de crémage et de sédimentation.

I.9.2 Floculation

Ce mécanisme résulte de l'agrégation des gouttelettes due aux interactions attractives (Figure I.5). L'énergie d'interactions entre les particules est due à la somme des forces de répulsions électrostatiques et au potentiel d'attraction de type Van der Waals. Ce phénomène peut être réversible lorsque l'attraction est peu énergétique ou irréversible lorsqu'elle est très énergétique **[15]**.

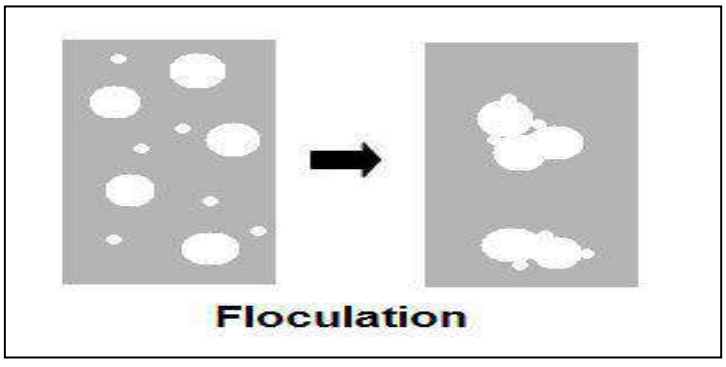


Figure I-5 : Phénomène de floculation.

I.9.3 Coalescence

Ce mécanisme, irréversible, résulte de la rupture du film interfaciale entre les gouttelettes de la phase dispersée. Deux ou plusieurs gouttelettes fusionnent pour former une

goutte plus grosse (figure I.6). Le processus se répétant, l'aire interfaciale devient de plus en plus petite et la phase dispersée dé mixte, et à terme on revient au système diphasique de départ. C'est un processus énergétiquement favorable **[15]**.

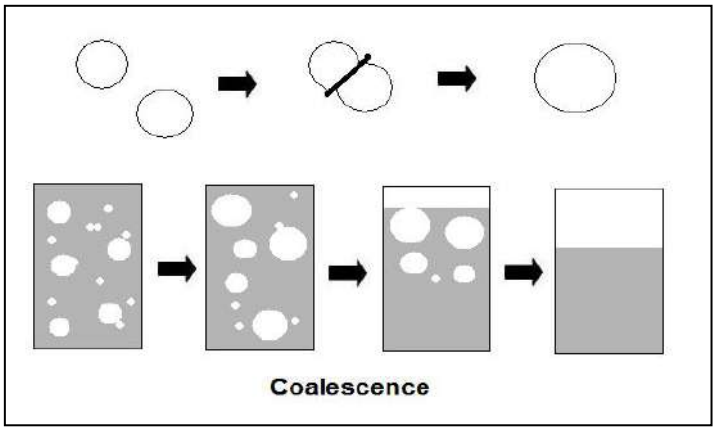


Figure I-6 : Phénomène de coalescence

I.9.4 Mûrissement d'Ostwald ou diffusion moléculaire

Il existe toujours une solubilité partielle de la phase dispersée dans la phase continue. A l'issue de l'étape d'émulsification, la population de gouttelettes n'est pas homogène en taille. Il existe un flux de matière des petites vers les grosses gouttes, au travers de la phase continue, les petites gouttes se vident au profit des grosses, et la granulométrie se modifie puisque les classes de faible taille disparaissent (figure I.7).Ce phénomène irréversible constitue le mûrissement d'Ostwald.

Ce phénomène est en pratique peu gênant dans la plupart des émulsions fabriquées. Par contre, il est prédominant dans le cas de microémulsions **[15]**.

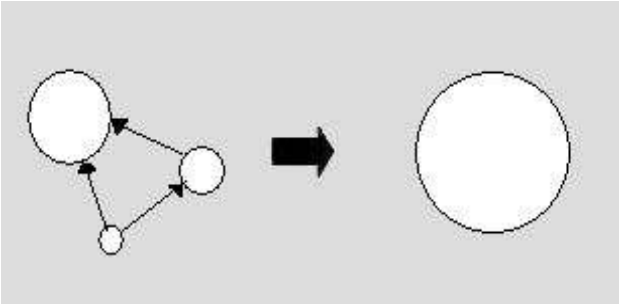


Figure I-7 : Phénomène de mûrissement d'Ostwald

I.9.5 Inversion de phase

L'inversion de phase est un phénomène qui traduit par un changement du sens de l'émulsion c'est-à-dire une transformation d'une émulsion E/H en une H/E ou inversement (figure I.8).Elle peut être induite par :

- La proportion de phase dispersée.

- La température.
- L'inversion de phase est aussi liée à d'autres facteurs tels que : la nature de la phase èhuileuse, la nature et la concentration des sels existant **[15]**.

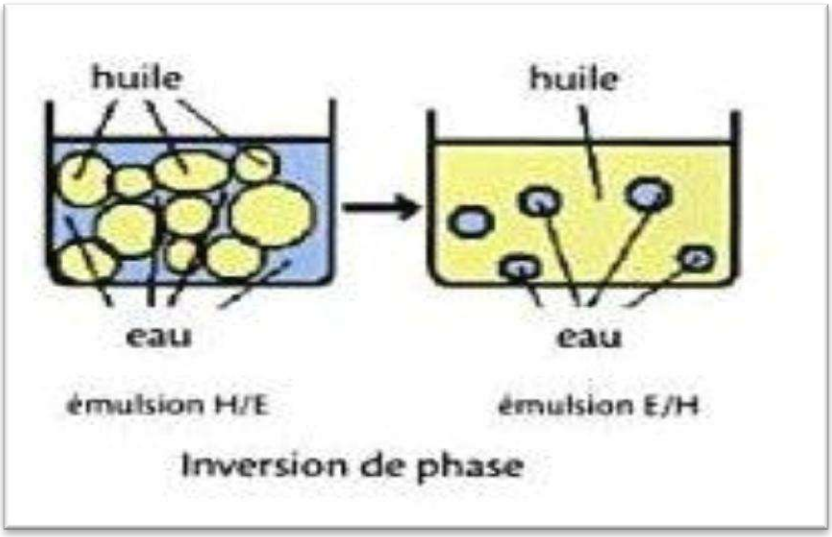


Figure I-8 : Phénomène d'inversion de phase

I.10 Facteurs influençant la stabilité des émulsions

- Le choix de l'émulsifiant
- La quantité d'émulsifiant. Ni trop, ni trop peu, il y a une concentration optimale.
- La nature des phases, le choix des différents composants
- Le rapport volumique des phases.
- Le mode opératoire, ce qui inclut le matériel utilisé (outil cisaillant, pâles, sens et vitesse d'introduction des composants, etc.)
- La température. Le pH
- L'ionisation donc la concentration en sels **[15].**

I.11 Contrôle des émulsions

I.11.1 Examen macroscopique

Ce test est basé sur les critères suivants :

- *Aspect* : il dépend de la nature des phases constituantes, il peut être brillant, satiné ou mat ou bien transparent, translucide ou opaque.
- *Consistance* : elle revêt différents qualitatifs, il est possible par exemple de décrire une rigidité compacte ou filante ou une gélification, ferme ou tremblante.

❖ *Homogénéité* : elle est primordiale et doit être vérifié au niveau de l'aspect qui est lisse ou granuleux et de la couleur **[16]**.

❖ *Critère olfactif :* Il faut détecter la présence ou l'absence de particule étrangère, et l'odeur typique (principe actif, excipient,….).

❖ *Critère tactile :* Après étalement sur le revêt de la main, si la préparation n'est pas caustique, il faut préciser le toucher qui peut être gras, évanescent, collant granuleux, lisse ou rugueux **[16]**.

I.11.2 Examen microscopique

La microscopie optique est une technique très utile pour l'étude des émulsions. L'examen microscopique constitue un excellent moyen pour suivre la stabilité de ces systèmes lors du vieillissement. La microscopie optique est une méthode d'analyse usuelle pour la multiplicité des systèmes, cette méthode permet d'avoir une idée sur la taille des globules aqueux internes souvent de l'ordre du micromètre **[16]**.

I.11.3 Détermination du sens de l'émulsion

Pour lever toute ambiguïté sur le sens d'une émulsion, il convient de réaliser des méthodes proposées :

a-Méthode de dilution

Elle consiste à faire diluer un ou deux gouttes d'émulsion dans l'eau, s'il y'a formation d'un trouble, l'émulsion est de type H/E, sinon elle est E/H.

b-Méthode de coloration

On ajoute à l'émulsion quelques gouttes d'un colorant soluble dans l'une des phases et insoluble dans l'autre. Si l'ensemble de la préparation se colore, la phase dans laquelle le colorant est soluble constitue la phase externe de l'émulsion, si la coloration apparait de manière discontinue, elle consiste la phase dispersée **[16].**

c- Méthode de mesure de la conductivité électrique

La conductivité électrique d'une émulsion est celle de la phase continue **[16]**:

- Les émulsions H/E sont conductrices de l'électricité
- Les émulsions E/H sont isolants électrique

I.11.4 Contrôle de stabilité

La stabilité d'une émulsion peut être appréciée dans une éprouvette graduée, par l'observation, à intervalles réguliers de la sédimentation, du crémage, de la coalescence et de la séparation des phases.

Pour une étude comparative, on obtient des résultats beaucoup plus rapidement en soumettant l'émulsion à différentes vitesses de centrifugation. Le contrôle de la stabilité est complété par des essais de conservation à l'étuve à différentes températures **[16]**.

I.11.5 Détermination de pH

La mesure de pH est nécessaire, car il peut avoir une influence sur les propriétés d'émulsion. La détermination ce fait à l'aide des réactifs colorés ou de pH-mètre **[16]**.

I.12 Propriétés et caractérisation des émulsions

I.12.1 Granulométrie

Une des propriétés importantes des émulsions est la taille des gouttes, qui peut être déterminée par une méthode de mesure appelée « granulométrie ». La taille des gouttes est particulièrement représentative des conditions d'agitation et de formulation dans lesquelles l'émulsion a été élaborée. Dans la plupart des cas, une émulsion contient des gouttes de tailles différentes, notamment à cause du caractère partiellement ou totalement aléatoire des procédés d'agitation. Il faut alors fournir non pas une valeur, mais une distribution de tailles de gouttes qui représente un inventaire statistique de la population présente dans l'émulsion. Sur la figure I.9, ont été représentées quelques distributions typiques dont la largeur est associée à la polydispersité de l'émulsion, c'est-à-dire au nombre plus ou moins important de gouttes de tailles différentes **[16]**.

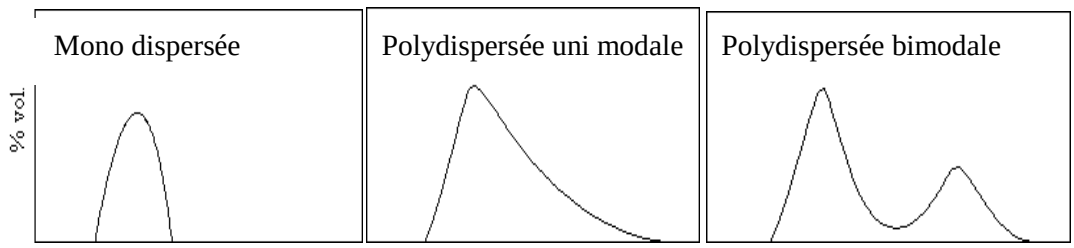


Figure I-9 : Différents types de distributions de tailles de gouttelettes.

I.12.2 Viscosité

Le comportement rhéologique d'une émulsion est souvent complexe en raison de l'influence de nombreux paramètres inhérents à la structure (tailles et organisation des gouttes) ou aux composés chimiques utilisés. De nombreux modèles existent dans la

littérature qui relie la viscosité d'une émulsion à ses caractéristiques, mais ils sont pour la plupart de nature empirique et limités à des cas bien précis [**16].**

I.12.3 Rhéologie

Les propriétés rhéologiques peuvent être divisées en propriétés et combinaisons visqueuses, élastiques et plastiques de ces derniers, la viscoélasticité étant la plus importante pour les semi-solides. Les semi-solides, comme les émulsions, peuvent montrer des propriétés solides et des propriétés liquides dans le même matériau [**17]**.

La viscoélasticité est définie comme une existence simultanée des propriétés visqueuses et élastiques **[17]**.

Les propriétés prédominantes et les valeurs des paramètres rhéologiques dépendent de la contrainte et de la durée de l'application de la contrainte **[17]**. L'analyse des matériaux viscoélastiques est conçue de sorte à ne pas détruire la structure de l'émulsion et que les mesures puissent fournir des informations sur les forces intermoléculaires et interparticulaires existantes. Le comportement viscoélastique linéaire peut être déterminé par des essais dynamiques et statiques. Les essais statiques imposent une variation de la contrainte par palier et l'observation du développement est fait en fonction du temps d'application de la contrainte. Les essais dynamiques impliquent une variation sinusoïdale de la contrainte **[17].**

I.13 Applications des émulsions

Plusieurs produits industriels consistent en des émulsions, dont les plus répandus sont **[18]** :

- En agroalimentaire: on retrouve les émulsions sous formes de mayonnaises, de crèmes, de desserts et de boissons.
- Dans les produits de soin personnel et les cosmétiques, les émulsions se trouvent sous forme de crèmes, de lotions, et de crèmes solaires.
- En phytosanitaire.
- En pharmaceutique, comme les anesthésiques, émulsions lipidiques, les émulsions multiples.
- Le domaine des peintures aussi compte des émulsions parmi ses produits, tels que les résines et la taxes.
- En génie civile on retrouve les bitumes.

La liste ci-dessus est loin d'être exhaustive. Toutes les applications que nous venons de citer ne constituent qu'un effleurement des domaines où l'on fait appel aux émulsions.

I.14 Conclusion

L'obtention d'une émulsion d'un type donné, présentant un taux de rétention, une granulométrie, une stabilité et une viscosité spécifiques, représente un enjeu très complexe, qui dépend certes de la formulation utilisée, mais aussi du protocole de préparation et du procédé mis en œuvre.

Egalement, il est très important d'appréhender tous les phénomènes physiques et thermodynamiques, liés à la formation et à la destruction des émulsions, et les facteurs qui les modifient, avec l'objectif principal de pouvoir les manipuler à notre gré, pour obtenir le résultat désiré.

Chapitre II : les huiles essentielles

II.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 **[19]**.

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. **[20]**.

II.2 Définition des huiles essentielles

Les essences ou huiles essentielles sont des mélanges de substances volatiles et odorantes contenues dans de nombreux végétaux [**21].**

La dénomination « Essentielle » reflète le caractère principal des plantes à dégager des odeurs agréables d'où le terme huile souligne le caractère visqueux et hydrophobe **[22].**

Plus récemment, la norme AFNOR NF T 75-006 (octobre1987) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : «Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur **[23]**, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec» [**24].**

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques très concentrés renfermant des mélanges complexes des substances volatils constitués de plusieurs dizaines de composés **[25-26],** se retrouvent dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe **[27].**

II.3 Localisation des Huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs (bergamotier, tubéreuse..), mais aussi les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier..) et bien que ce soit moins habituel dans des écorces (cannelier), les bois (bois de rose, santal..), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre..), les fruits (toutes épices, anis, badiane..), les graines (muscade..).

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

Ainsi dans le cas de l'oranger amer, le péricarpe frais du fruit (zeste) fournit l'huile essentielle d'orange amer ; la fleur fournit l'essence de néroli et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à l'essence de petit grain bigaradier. La composition de ces trois huiles essentielles est différente **[28].**

Dans cette présente étude on s'intéressera principalement aux écorces d'agrumes qui vont être décrites dans la section II.9 de ce chapitre.

II.4 Propriétés générales des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent plusieurs propriétés:

- Elles ont des propriétés très variées (digestive, tonique, apaisante, relaxante, cicatrisante…),
- Elles n'ont pas de texture huileuse, on parle d' « huile » essentielle, qui est en fait le résultat de l'extraction de l'essence contenue dans les différents organes des plantes,
- Elles sont extraites de plantes aromatiques par distillation à la vapeur d'eau de différents parties de plantes (écorce, feuilles, fleurs, semences…) ou par expression à froid pour les zestes frais d'agrumes,
- Elles sont définies par leur chémotype (molécules biochimiquement actives classées en familles chimiques : monoterpénols, phénols, sesquiterpènes…) **[29].**

II.5 Critères de qualité

La qualité d'une huile essentielle dépend de nombreux facteurs parmi lesquels on cite : l'état de maturation de la matière végétale; sa provenance (les feuilles, les fruits, les rhizomes); son lieu de récolte (qui conditionne sa composition chimique) ; le procédé d'obtention ; son pouvoir aromatisant et ses conditions de conservation **[30].**

II.6 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans en altérer la qualité [**31**]**.**
Le choix de la technique, dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétale. L'extraction s'effectué généralement par les procédés suivants:

II.6.1 Hydrodistillation

C'est la méthode la plus employée pour récupérer les huiles essentielles, elle représente 80% de la récupération des huiles **[32]**. Elle est aussi la plus utilisée, la plus rentable et celle convenant la mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique. **[33]** Généralement, la plante aromatique (entière ou broyée) lorsqu'il s'agit d'organes durs (racine, écorce), sont disposées dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau. Sous l'effet de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur qui sous basse pression, traverse alors la cuve remplie de plantes aromatiques. La vapeur d'eau qui a volatilisé et entraîné l'huile essentielle, se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. La distillation doit être complète pour que l'on récupère tous les constituants aromatiques de l'huile essentielle, ce qui implique souvent une durée relativement longue, variables selon les organes distillés. **[31]** La figure II.1 représente le dispositif de l'hydrosistillation (HD).

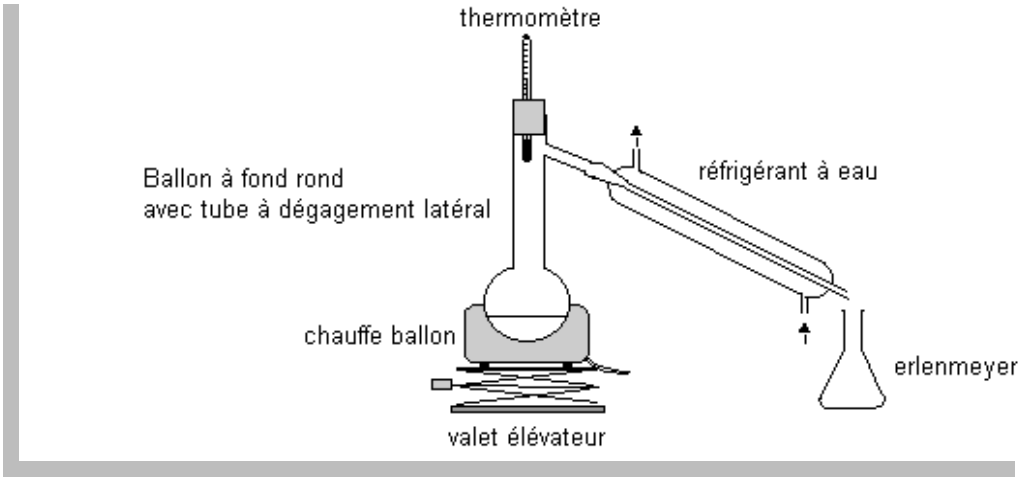


Figure II-1 : Extraction d'huiles essentielles par la méthode de hydro-distillation.

II.6.2 Entraînement à la vapeur d'eau

L'entrainement à la vapeur constitue la technique la plus utilisée et la plus aisée à mettre en œuvre pour la production d'huiles essentielles et elle reste sans doute la plus rentable. L'investissement matériel étant relativement peu important par rapport à celui des autres techniques. Elle peut être utilisée au laboratoire avec un appareil de type Clevenger tout autant qu'à grande échelle (« procédé en continu », « cuve mobile ») **[34].**

Les matériaux végétaux tels que les fleurs, les feuilles, les graines, les fruits, les tiges, les racines, les parties aériennes ou plantes entières, sont placés dans un récipient appelé alambic, qui possède à sa base une grille perforée au-dessous de laquelle on introduit de l'eau, cette dernière est portée à ébullition ; la vapeur obtenue traverse la masse du végétal et entraîne les composants volatiles, lesquels, mélangés à la vapeur d'eau, sont condensés dans un réfrigérant fixé à la sortie de l'alambic, et recueillis dans des récipients appelés « vases florentins » qui permettent la décantation de l'eau et de l'huile essentielle, celle-ci pouvant être plus ou moins dense que l'eau **[35].**

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [**36].**

II.6.3 Extraction par solvants organiques

Les huiles essentielles ont la propriété de se solubiliser dans la plupart des solvants organiques en particulier les hydrocarbures aliphatiques (n-pentane, n-hexane) **[37].**

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique **[36].**

Cette technique utilisera des solvants comme l'hexane, le toluène et les dérivés chlorés. Le solvant est ensuite éliminé par distillation. Elle ne doit pas être employée si l'on veut préparer une huile essentielle à usage thérapeutique car il pourrait rester des traces de solvant. Elle est parfois utilisée dans l'industrie des parfums **[38].**

Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau **[37].**

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf

puisque distillé à chaque cycle **[37].**Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale **[39].** Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides **[40],** ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes **[41]** et aux ultra-sons **[42].**

II.6.4 Expression à froid

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant, ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid. Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois [**43].**

II.6.5 Enfleurage

Cette technique doit son nom au fait qu'elle est réservée aux fleurs, organes les plus fragiles des plantes; elle consiste à pratiquer une diffusion des composés odorants dans une masse de matière grasse animale ; si le procédé se fait à froid, il s'agit d'une extraction par enfleurage ; si par contre l'opération se pratique à chaud, les graisses étant fondues au bain marie (50°C-70°C), la technique est appelée digestion.

En raison de son coût, ce procédé classique et ancien n'est plus utilisé; d'une part, la diffusion est lente et d'autres parts, il est nécessaire de renouveler plusieurs fois les pétales pour obtenir des pommades concentrées. Enfin, il faut ensuite séparer les composés odorants extraits de leur charge grasse. [**44], [45].**

L'enfleurage à froid est utilisé avec des pétales de fleurs fragiles (jasmin, par exemple). Le principe est identique, mais les pétales sont disposés sur une plaque dégraisse froide. Cette méthode n'est pratiquement plus utilisée aujourd'hui, car trop coûteuse [**46].**

II.6.6 Extraction par les fluides supercritiques

Les fluides supercritiques sont obtenus à une pression et une température supérieures respectivement à la pression et la température critiques **[47].** Mais le solvant CO_2 est utilisé en 90°C par cette technique, en raison des faibles valeurs de pression (74 bar) et de température (32 °C) requises pour obtenir l'état supercritique. Par ailleurs, le CO_2 a d'autres particularités intéressantes, il est chimiquement inerte, naturel et non toxique **[48].**

Cette technique a été testée pour plusieurs applications : agriculture, industries pharmaceutiques, alimentaires. Les huiles essentielles sont le deuxième champ d'application (26°C) derrière les arômes et produits naturels (37°C) **[49].**

Certes cette technologie présente de nombreux avantages, mais elle se heurte à des coûts d'installation et de maintenance très élevés, ce qui limite son emploi à des applications pour des produits finis de haute valeur ajoutée **[50].**

II.6.7 Extraction par micro-ondes

Gonzler, Gedye et d'autres en 1986, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique [**51].**

Ce procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée ou non au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires.

L'ensemble était chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement. Après, une étape de séparation par centrifugation, les échantillons étaient directement injectés sur colonne chromatographique. Golmakani et al **[52]** Ont mis en évidence les avantages de l'hydrodistillation assistée par micro-onde du *Thymus vulgaris*L : un temps d'extraction plus court (75 min contre 4h pour HD; un rendement amélioré (2.44% contre 2.39% pour HD) et un impact environnemental moindre. La figure II.2 illustre le montage d'extraction par micro-ondes.

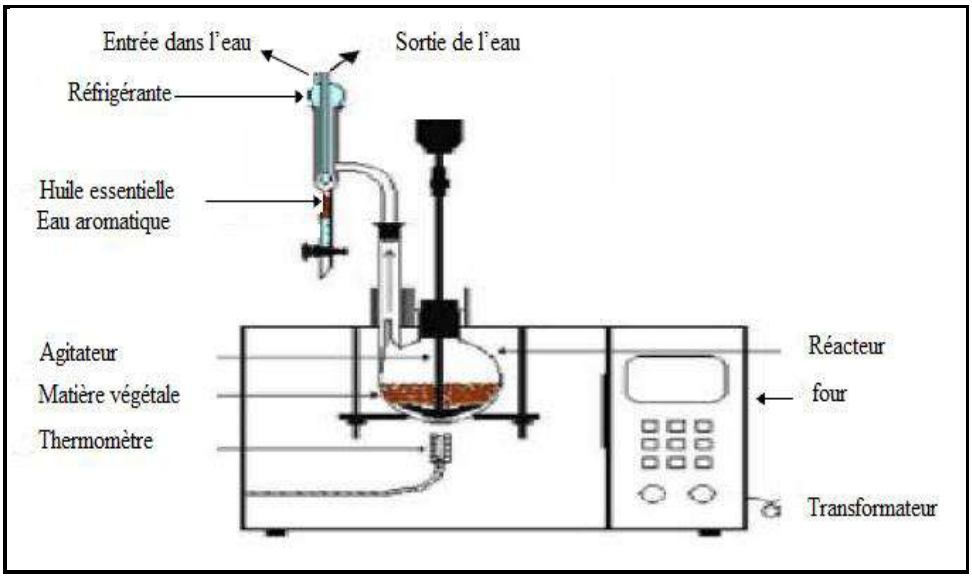


Figure II-2 : Montage d'extraction par micro-ondes **[53].**

II.7 Vertus des huiles essentielles

Toutes les molécules qui composent les huiles essentielles sont très actives et expliquent que ces huiles essentielles soient réputées pour leurs vertus pour la santé **[54]:**

- Les huiles essentielles ont des vertus bactéricides
- Les huiles essentielles ont des vertus antiseptiques si efficaces qu'on sert parfois pour aseptiser des locaux, dans les cliniques et hôpitaux par exemple
- Les huiles essentielles ont des vertus anti-inflammatoires
- Les huiles essentielles ont des vertus analgésiques
- Les huiles essentielles ont des vertus décongestionnantes
- Les huiles essentielles ont des vertus antispasmodiques
- Les huiles essentielles ont des vertus calmantes.

II.8 Activités biologiques

II.8.1 Activité antioxydante

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires **[55]**.

II.8.1.1 *Antioxydants enzymatiques*

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

- ✓ A éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
- ✓ A induire la synthèse des antioxydants.
- ✓ A augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées. **[56]**

II.8.1.2 *Antioxydants non enzymatiques*

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piégeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules prooxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition,

empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques. Néanmoins le nombre d'antioxydants produits *in vivo* est très limité ; on peut citer parmi les plus actifs : le glutathion, le NADPH, les dipeptides, l'acide urique, ou la bilirubine [**56**]**.**

Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer le plus Connu et le plus important ci-dessous :

-L'acide ascorbique (Vitamine C) :

La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactoneoxydase **[57].**

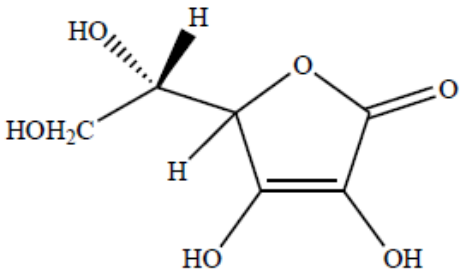


Figure II-3 : Acide ascorbique.

Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène. Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les α-tocophérol **[56].**

II.8.2 Activité antimicrobienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne. **[**1**]** Les constituants des HEs sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

BELLETI *et al.*et FISHER *et al.* **[58-59]** ont démontré que les HEs de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur

certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium jejuni, Listeria monocytogenes, E. coli O157 :H7, Staphylococcus aureus, Salmonella Thyphimurium,* et *Acrobacter butzleri.*

II.8.2.1 *Evaluation de l'activité antibactérienne*

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon. Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients **[60]**.

a) Méthode de l'aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou la méthode de disques ou la méthode par diffusion en milieu gélose .la technique consiste à utilise des disques de papier imprégnés des différent substances à testés, puis déposée à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose Laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus de diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance teste, plus il est petit plus bactérie est résistance. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'H.E sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité **[61].**

b) Méthode de dilution

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme. L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI), ces concentrations nous permettent de connaitre la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide **[62].**

c) Méthode de dilution de bouillon

La méthode de dilution en bouillon est utilisée aussi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices. Une gamme de dilution de l'huile essentielle est additionnée à une

série de tubes contenant un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu **[63]**.

II.9 Les agrumes

II.9.1 Définition

D'après LOUSSERT (1989), le mot « agrumes » d'origine italienne, un est mot collectif masculin pluriel qui désigne les fruits comestibles extension aux arbres qui les portent appartenant au genre « citrus ».

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 **[64].**

II.9.2 Classification

D'après GUIGNARD (2001), la position systématique des agrumes est comme suit :

Règne : Végétal
Embranchement : Spermaphytes
Sous-embranchement : Angiospermes
Classe : Eudicotylédones
Ordre : Rutales
Sous classe : Rosidées
Famille : Rutaceae
Genres : Citrus, Fortunella, Poncirus



Figure II-4 : Présentation d'agrume.

II.9.3 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. On les rencontre par conséquent en priorité dans les climats de type méditerranéen.

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 peuvent varier de 5 à 18 **[65].**

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles.

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe, 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**.**

II.9.4 Différentes variétés d'agrumes

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

a/ Orange

Nom commun : orange douce.

Nom scientifique : citrus sinensis.

Partie utilisé : le zeste.

Famille : *Rutaceae*



Figure II-5 : Présentation d'orange

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 **[66].**

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 **[66].**

a-1/ Composition des huiles essentielles d'orange

L'essence d'orange possède une teneur en hydrocarbures monotepéniques que l'on eut évalué à environ 90%. Le composant dominant de la fraction monotepénique est le d-limonène, suivi de loin par le Myrcéne, le Sabinéne et l'a-pinène. Les composants oxygénés sont responsables du parfum caractéristique de l'essence avec notamment l'aldéhyde décylique qui a une odeur d'orange **[67].**

a-2/ Utilisation du huile essentielle d'orange

L'huile essentielle d'orange provient de l'oranger doux, sont réputées pour leurs actions remarquable :

- Elle s'utilise en cas de dépression, d'énervement, de surmenage dans la vie professionnelle ou privée ou de manque de confiance en soi.
- Elle crée une ambiance sereine, calme, harmonieuse, agréable, elle stimule légèrement et augmente la capacité de concentration.
- Elle calme et induit le sommeil.
- Elle est un excellent tonique de l'épiderme, elle stimule la circulation lymphatique et désintoxique la peau: on l'utilisera pour tous types de peau.
- Grâce à ses propriétés astringentes, elle agira très bien contre les rides et la cellulite.
- Protectrice de l'épiderme, on l'utilisera contre les crevasses et le dessèchement cutané.
- Elle stimule également le système digestif: on l'utilisera pour soulager des flatulences, des crampes ou des spasmes intestinaux, pour calmer un estomac noué ou faciliter la digestion.
- Elle fortifie les glandes et stimule leur fonctionnement. Elle renforce le système immunitaire et peut faire baisser la fièvre en cas de rhume ou de grippe.
- On l'utilisera volontiers en bain de bouche pour rafraichir l'haleine ou traiter une gingivite.
- Elle désinfecte l'air ambiant **[68].**

b/ Citron

Nom commun : citron.

Nom scientifique : citrus limonum.

Partie utilisé : le zeste

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Citrus*



Figure II-6: Présentation de citron.

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].**

b-1/ Composition des huiles essentielles de citron

De façon générale, on peut dire que l'essence de citron est composée de 92 à 93% de terpènes dont le d-limonène est le plus abondant. Le parfum est surtout déterminé par les éléments oxygénés dont le citral ou le géraniale $C_{10}H_{16}O$ à raison de 3 à 5% et le citronellal $C_{10}H_{18}O$ **[70].**

Le développement des techniques modernes d'analyses à permis de déceler dans l'essence de citron plus de 341 composés volatiles. Des différences significatives peuvent être appréciées lors de l'examen comparatif d'essences d'origines de diverses, soit en ce qui concerne les concentrations relatives de certains composants, soit aussi par la présence de certains composés spécifiques **[71].**

b-2/ Utilisation d'huile essentielle de citron

L'huile essentielle de citron est certainement la plus importante de toutes les huiles essentielles d'agrumes. C'est avant tout un antiseptique puissant qui peut être utilisé en diffusion atmosphérique pour éviter tout risque de contagion **[72]**.

Ses propriétés fluidifiantes expliquent son action douce qui accélère le travail émonctoire du foie et stimule ainsi l'ensemble de la fonction digestive. En olfaction, le zeste de citron est efficace contre les nausées de la femme enceinte. Conserver un flacon sur soi quand on est en cours de grossesse est donc une bonne idée. C'est aussi un bon stomachique et une substance apéritive quand on a perdu l'appétit **[72].**

L'huile essentielle de citron est un fluidifiant du sang et un anticoagulant qui agit sur la microcirculation. Active sur l'étanchéité des capillaires et des vaisseaux sanguins, elle facilite le retour veineux (syndrome des jambes lourdes). Mais cette propriété peut aussi augmenter la durée des règles et les flux menstruels. L'essence de citron ne doit donc pas être utilisée chez la femme en début de cycle **[72].**

L'huile essentielle de citron soigne également les infections digestives avec succès. En cas d'infection intestinale ou de diarrhées, un massage du ventre avec de l'essence de citron diluée dans une huile végétale calme les douleurs, agit sur l'infection et régule la gestion de l'eau par l'intestin **[74].**

Enfin, l'huile essentielle de citron est aussi un anti-inflammatoire léger. Elle peut calmer une douleur articulaire légère et d'autres manifestations inflammatoires bénignes **[74].**

c/ Citrange

Nom commun : Citrange.

Nom scientifique : *Citroncirus webberi*.

Partie utilisé : le zeste

Famille : *Rutaceae*

Genre : Citroncirus



Figure II-7 : présentation de Citrange

Le Citrange (*Citroncirus webberi*) est une espèce hybride de l'oranger (*Citrus sinensis*) et du citronnier épineux (*Poncirus trifoliata*). Ce croisement était une tentative pour créer un citronnier/oranger vigoureux et résistant au froid donnant des fruits délicieux. Cependant la plupart des Citrange sont amers. Tolérant au calcaire, cet hybride est de plus en plus utilisé comme porte-greffe pour la majorité des variétés d'agrumes **[73].**

L'arbre de Citrange, plus vigoureux qu'un *Poncirus trifoliata*, présente un feuillage semi-persistant, avec des feuilles généralement trifoliées, mais plus larges que les plantes parents. Le fruit est également beaucoup plus proche de l'orange. Il existe des sélections de Citrange, comme **[74].**

II.10 Conclusion

De nombreux composés phytochimiques y compris les HEs commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens, antiinflammatoire et anticancéreux. En conséquence il y a une forte tendance à isoler ces composés organiques naturels pour la protection de la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs.

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1 Introduction

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'hygiène d'eau de la direction de la santé publique (DSP), ainsi qu'au laboratoire de recherche matériaux et environnement (LME) et au niveau du Hall technologique de l'université "Yahia Fares" de Médéa.

Cette étude expérimentale consiste en une :

- Extraction des huiles essentielles à partir des écorces de trois sortes de *Citrus* à savoir *C. limonum* (citron), *C. sinensis* (orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange).
- Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites.
- Préparation des émulsions d'HE d'agrumes à base de pectine hautement méthylé avec et sans acide ascorbique.
- Etude de l'activité biologique y compris l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles seules et en émulsion.

III.2 Produits et matériels utilisés

III.2.1 Produits chimiques utilisés

- Glycérol
- Ethanol
- Pectine industrielle hautement méthylée fournie par Sigma Aldrich
- L'eau physiologique stérile
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- NaCl
- NaS_2O_4
- Eau distillée stérile
- Acide ascorbique
- Tween 80
- Bouillon et gélose de Mueller Hinton

III.2.2 Appareillages utilisés

- Balance : de type Adveturer (OHAUS)
- Homogénéiseur : Ultra –Turrax de type IKA® T18 basic
- Agitateur : de type Heidolph
- Spectroscopie UV-Visible : de type UV 1240 (Shumadzu).
- pH mètre : de type Jenway
- Conductimètre : de type ORION 3 STAR Conductivité benchtop.

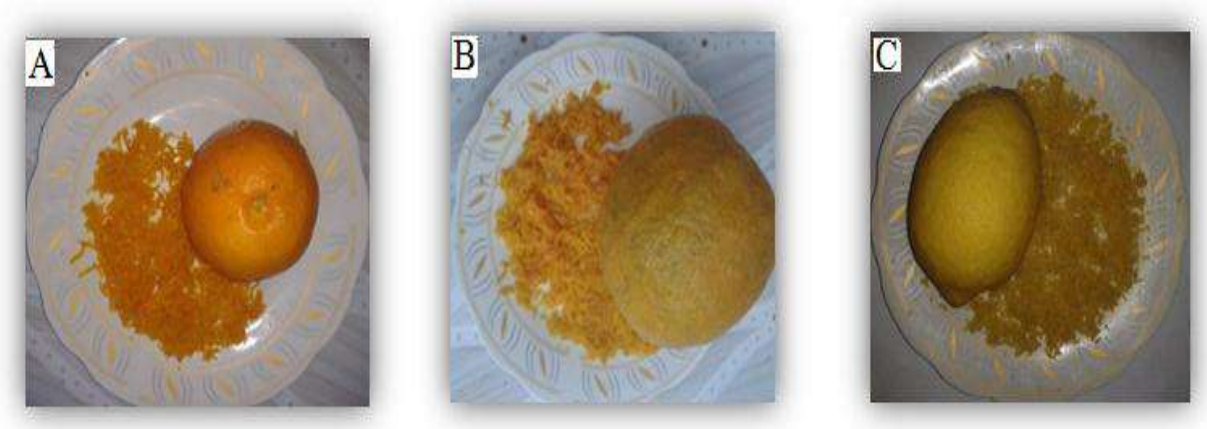
- Microscope optique (Olympus)
- Etuve : de type Binder.
- Centrifugeuse : de type Werk Nr

III.2.3 Matériels Microbiologiques

Pipettes pasteurs, pinces en acier, Anse de platine, Bec bunsen, Micropipettes a volume réglables, et des boites de pétrie en plastique.

III.2.4 Matière première végétale

La matière végétale utilisée dans cette étude sont des fruits d'agrumes des espèces : *C. limonum* (citron), *C. sinensis* (orange douce) et *Citroncirus webberi* (Citrange). Ils sont très cultivés en Algérie surtout dans la région de Mitidja. La récolte a été réalisée durant la période allant du mois de décembre 2014 jusqu'au mois de mars 2015. Les fruits soigneusement collectés, ont été lavés a l'eau de robinet et séchés avec une serviette propre, et le zeste (épicarpe d'agrume) a été récupéré à l'aide d'un économe (Figure III.1).



FigureIII-1: A) Orange ; B) Citrange ; C) Citron.

III.2.5 Microorganismes utilisés

Le choix des bactéries a été porté sur quatre souches fréquentes en pathologie humaine. Les souches utilisées sont alors des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC) : *Staphylococcus aureus* (Gram +) ATCC 6538 d'origine alimentaire, et *Candida. Albicans* ATCC 10231, Ces souches nous ont été gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie des centres hospitaliers de Médéa.

III.3 Méthodes

III.3.1 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation. Le zeste d'agrume frais est introduit dans un ballon de 250 ml imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1 heure. La vapeur d'eau produite entraine les constituants volatiles, qui après condensation dans le réfrigérant sont recueillis dans un erlenmeyer.

Le distillat recueilli subit un relargage par l'ajout de quelques cristaux de chlorure de sodium (le NaCl ayant plus d'affinité a l'eau qu'à l'huile essentielle incite celle-ci à flotter, puisque les huiles essentielles sont moins denses que l'eau). Le distillat est ensuite transvasé dans une ampoule à décanter, l'eau et l'H.E se séparent par différence de densité.

Pour éliminer toute trace d'eau dans la phase organique, on a ajouté le sulfate de sodium (Na_2SO_4). L'huile essentielle ainsi récupérée est conservée à basse température (4^0C), à l'abri de la lumière dans un flacon en verre, hermétiquement clos pour éviter toute dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique.

Le montage expérimental utilisé pour le procédé d'hydrodistillation est représenté sur la figure(III.2).



FigureIII-2: Montage d'extraction par Hydrodistillation

III.3.2 Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles extraites

La caractérisation physico-chimique des huiles essentielles d'agrumes consiste à déterminer les paramètres suivants : Le pH, la densité, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice de saponification, ainsi que l'indice d'ester. Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico- chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (voir annexe 1) **[75].**

III.3.3 Préparation des émulsions d'HE d'agrumes

Des émulsions de type H/E ont été préparées par incorporation de 4% W/W d'HE d'agrumes dans la phase aqueuse, le mélange à été homogénéisé par un Ultra Turax avec une vitesse de 1500 tr/min pendant 3 min (voir figure III.3). Notons que la phase aqueuse a été préparée en dispersant la pectine dans un mélange eau : glycérol (1 :2 W/W) additionnée d'un acide ascorbique (0, 0.5 et 1%), sous une agitation continue à température ambiante pendant 24 h pour compléter leur hydratation. Les concentrations (en%) en chaque constituant sont données dans le tableau III.1. on note que les différentes concentrations en pectine ont été déduit des essais préliminaires.

Tableau III.1 : Les différents constituants des émulsions d'HE formulés.

Essais / **Constituants**	**Essai 01**	**Essai 02**	**Essai 03**	**Essai 04**	**Essai 05**	**Essai 06**	**Essai 07**	**Essai 08**
Acide ascorbique (%)	0 0.5 1	0 0.5 1	0 0.5 1	0 0.5 1	0 0.5 1	0 0.5 1	0 0.5 1	0 0.5 1
Pectine (%)	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5
Phase aqueuse (%)	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp
Huile (%)	04	04	04	04	04	04	04	04



FigureIII-3: Homogénéisation par Ultra Turax.

III.3.4 Caractérisation physico-chimique des émulsions préparées

Après la préparation des émulsions, les échantillons ont été stockés dans des tubes en verre à température ambiante, et la stabilité des émulsions contre la séparation de phase a été contrôlée visuellement.

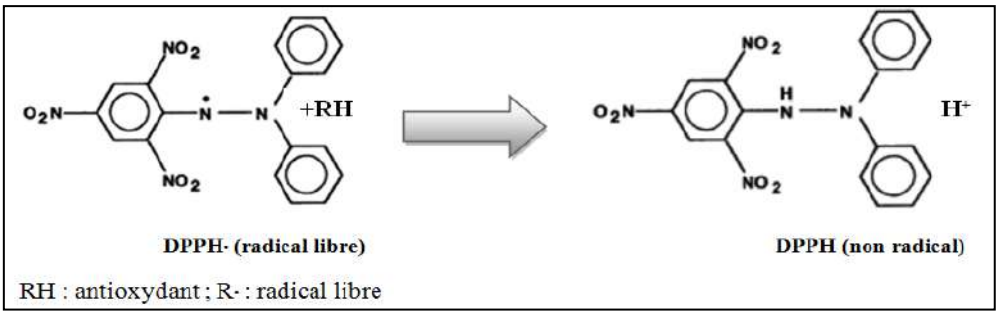
Et dans le but de caractériser les différentes les émulsions formulées, une étude physico-chimique a été élaborée. Cette dernière consiste en une mesure de pH, de conductivité électrique ainsi qu'une analyse microscopique.

III.4 Activité biologique

III.4.1 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 **[56].**



FigureIII-4 : Réaction du DPPH• avec un antioxydant [**76].**

- ***Protocole 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., **[77].**

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 : **[56]**

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

III.4.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne par la technique de macro-dilution en milieu liquide

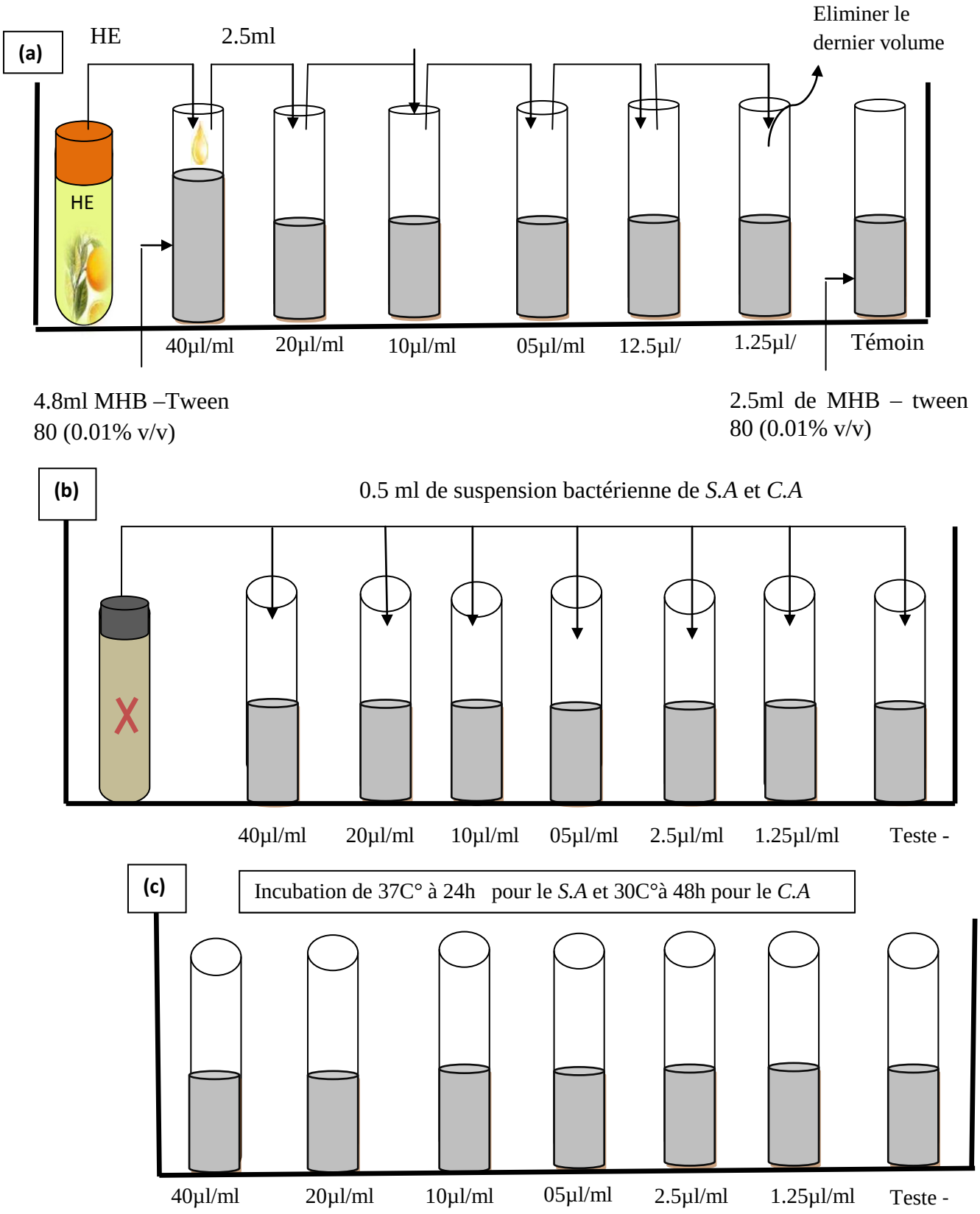
Cette technique consiste à inoculer, par une suspension bactérienne, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne **[78]**.

Pour tester l'activité antimicrobienne des émulsions d'HE, le même protocole a été adopté.

- ***Protocole opératoire***

L'échantillon à tester est placée dans un tube stérile contenant le bouillon Mueller Hinton, supplémenté en Tween 80 (0,01 %, v/v). Une dilution en cascade est 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-1 et 1.25µl/ml **[80].** (Voir figure III.5.a)



FigureIII-5 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

0.5 ml d'une suspension bactérienne, sont déposés dans chacun des tubes de la série (voir figure III.5. b), lesquels sont incubés après agitation en vortex, à 37°C pendant 24h *pour Staphylococcus aureus*, 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 (voir figure III.5. c).

Après quoi on les observe macroscopiquement, le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice. Les tubes sont centrifugés ensuite à 6000, pendant 5 minutes pour confirmer la présence ou non de précipité bactérienne.

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1 Introduction

Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus ainsi que les interprétations et les conclusions que nous avons tiré.

IV.2 Caractérisation physico-chimique des l'huiles essentielles d'agrumes extraites

Les résultats de mesures de densité relative, d'indice de réfraction, d'indice d'acide, d'indice d'ester et d'indice de saponification sont regroupés dans le tableau IV.1.

Tableau IV-1 : Caractérisation physico-chimiques des HE des espèces citrus.

Propriétés physico-chimiques	HE de citrus			La norme A.F.N.O.R
	Orange	Citron	Citrange	
Densité	0.874	0.871	0.839	<0,876
Indice de réfraction	1,4735	1,4710	1,4760	(1,4700-1,4780)
Indice d'acide	1.54	1.94	1.36	--
Indice de saponification	614.23	393.68	272.06	--
Indice d'ester	607.89	381.38	266.4	--

L'examen de tableau IV.1 montre que les caractérisations physico-chimiques des HE des espèces citrus sont conformes aux normes internationales. Elles représentent Un indice d'acide allant de 1.36 à 1.94 Cette constante chimique donne une idée sur le taux d'acides libres. Selon kanko et al [**79**], un indice d'acide inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres)

Les Huiles essentielles de Citrus extraites ont un caractère basique avec des valeurs de pH allant jusqu'à 14.

IV.3 Caractérisation physico-chimiques des émulsions préparées sans acide ascorbique

- **Mesure de pH et de la conductivité**

Les résultats de mesures de pH et de la conductivité électrique pour les différentes émulsions fraîchement préparées sans acide ascorbique sont représentés dans le tableau IV.2.

Tableau IV-2 : Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions sans acide ascorbique.

Pectine	**1%**	**1.5%**	**2%**	**2.5%**	**3%**	**3.5%**	**4%**	**4.5%**
pH	3.74	3.62	3.60	3.56	3.53	3.52	3.42	3.40
Conductivité µs/cm	250	337	427	502	547	627	724	710

Les résultats figurés au tableau IV.2 montre que le pH des différentes formulations présente des valeurs acides (pH =3.74-3.40) dans tout le domaine de la concentration. Du fait de la présence d'une chaîne principale d'acides polygalacturoniques, la pectine a un comportement acide **[80],** ce qui explique la diminution significative du pH.

L'examen de tableau IV.2 révèle aussi que la conductivité électrique est proportionnelle à la concentration en pectine. Cela est du au caractère ionique (anionique) de la pectine qui se comporte comme un polyélectrolyte en solution, et donc l'augmentation de la concentration en pectine contribue à l'augmentation des charges présentes en solution, ce qui conduit à une augmentation de la conductivité électrique, avec des valeurs allant de 250-710 µs/cm. Ce qui confirme que les émulsions sont de type aqueux, c'est à dire que la phase continue est l'eau **[81].**

- **Observation Visuelle**

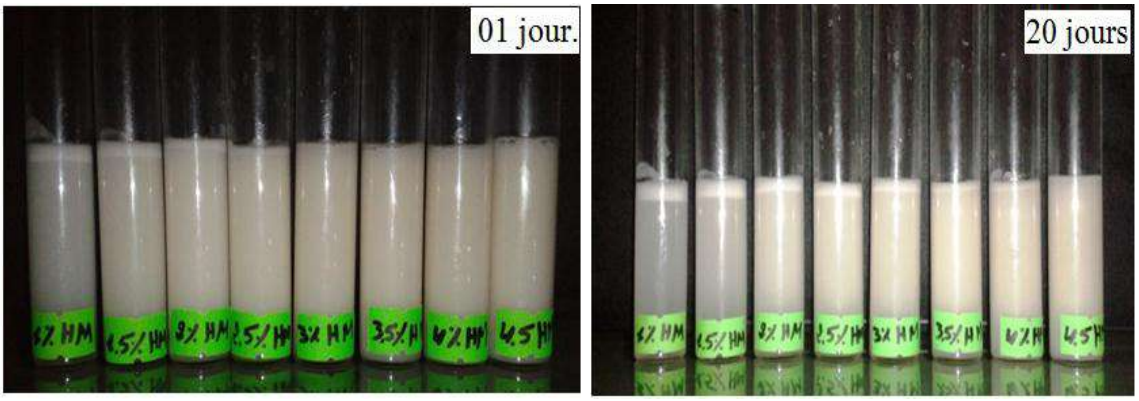


Figure IV-1 : Apparence des différentes formulations à T_{amb} pendant 20 jours.

La figure IV.1 montre l'apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation. Toutes les émulsions présentent un aspect laiteux avec une consistance variée selon la teneur en pectine. Il est à noter que les émulsions 3.5 et 4 et 4.5% de pectine ont une consistance plus élevée que les autres formulations, cela s'explique par la quantité élevée en pectine.

L'analyse de ces résultats montre l'effet de la concentration en pectine sur la stabilité des émulsions préparées. On remarque que les formulations contenant 1-3.5% en pectine sont instables à température de stockage de 21°C, alors avec 4 et 4.5% en pectine sont relativement stables. Cela est du probablement à l'effet de pectine (avec une quantité adéquate) à saturer les gouttelettes et donc aboutit à une stabilisation stérique et électrostatique de l'émulsion **[82].**

- **Examen microscopique**

Les émulsions fraichement préparées ont été analysées par un microscope optique avec un agrandissement de 10 fois. L'échantillon a été placé alors entre une lame et lamelle, et les vues microscopiques des formulations sont représentées dans la Figure IV.2.

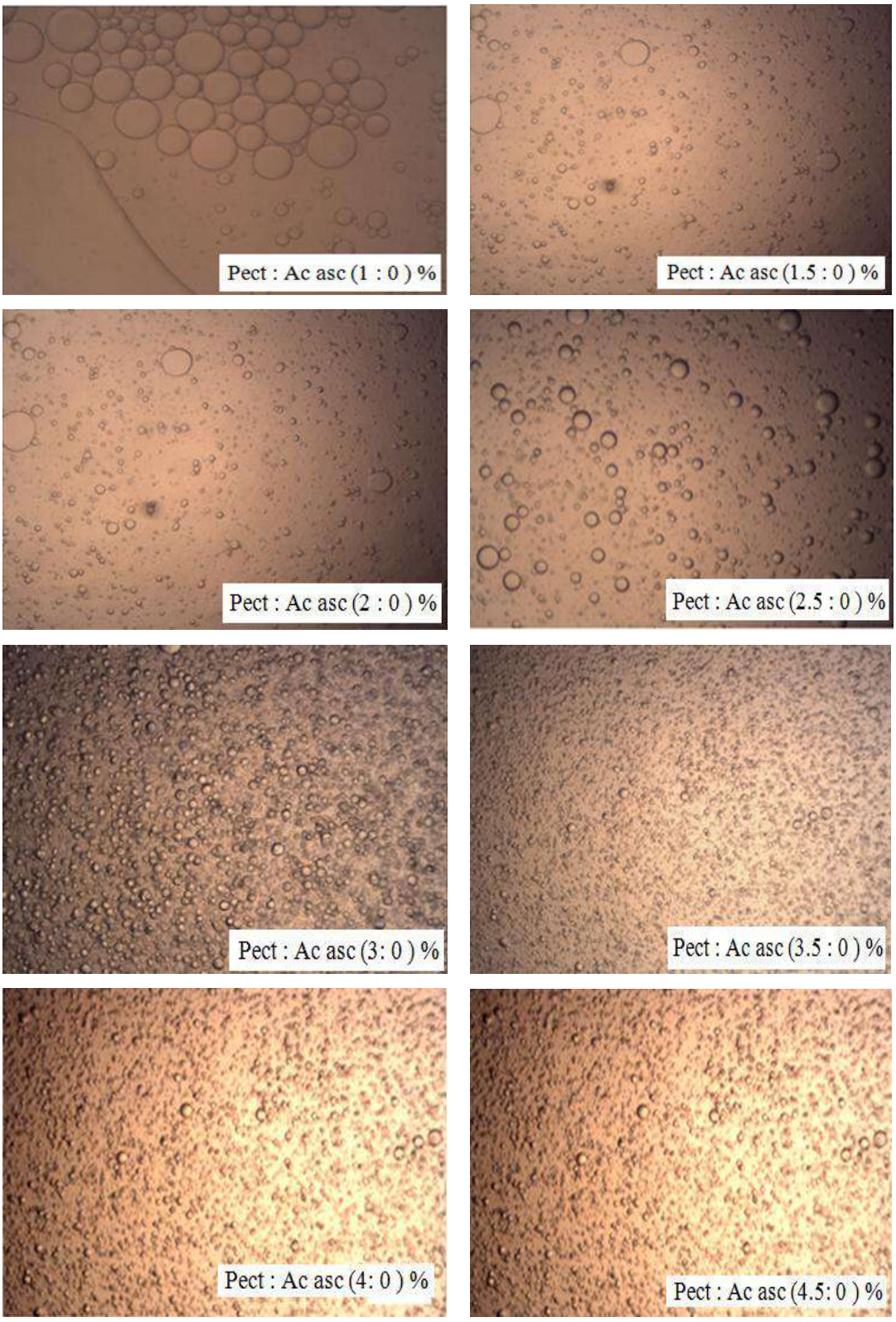


Figure IV-2 : Vues microscopiques des différentes formulations d'HE sans ajout d'acide ascorbique.

L'examen microscopique montre la dispersion des gouttelettes huileuse dans la phase aqueuse. Cette dispersion varie selon la concentration en agent émulsionnant. Plus la

concentration de pectine augmente, plus la dispersion est plus fine, et on obtient une émulsion rigide et stable (formulations contenant 4 et 4.5% en pectine). Une granulométrie plus visible est observée avec des différents diamètres de globules formés.

IV.4 Caractérisation physico-chimiques des émulsions contenant l'acide ascorbique

- **Mesure de pH et de la conductivité.**

Les résultats de mesures de pH et de la conductivité électrique pour les différentes émulsions fraîchement formulées avec 0.5 et 1% d'acide ascorbique sont illustrés dans le tableau IV.3.

Tableau IV-3 : Résultats des mesures du pH et de la conductivité des émulsions en présence d'acide ascorbique

(Pect : Ac asc) %	**(1 : 0.5)**	**(1.5 : 0.5)**	**(2 : 0.5)**	**(2.5 : 0.5)**	**(3 : 0.5)**	**(3:1)**	**(3.5 : 0.5)**	**(3.5:1)**	**(4 : 0.5)**	**(4 :1)**
pH	3.32	3.32	3.31	3.30	3.34	3.4	3.33	3.4	3.32	3.41
Conductivité µs/cm	543	643	714	754	719	676	727	709	774	814

En comparant les résultats de mesure de pH de tableau IV-3 et ceux de tableau IV.3, on remarque bien que l'acidité des émulsions formulées en présence d'acide ascorbique est relativement augmentée par rapport à celles préparées sans acide ascorbique. Cela est certainement du à la présence simultanée de caractères acide de l'acide ascorbique et celle de pectine (acides galacturoniques).

La mesure de la conductivité électrique donne des valeurs élevées et qui montre que la phase continue est aqueuse, c'est à dire qu'on est toujours en présence des émulsions H/E.

- **Observation Visuelle**

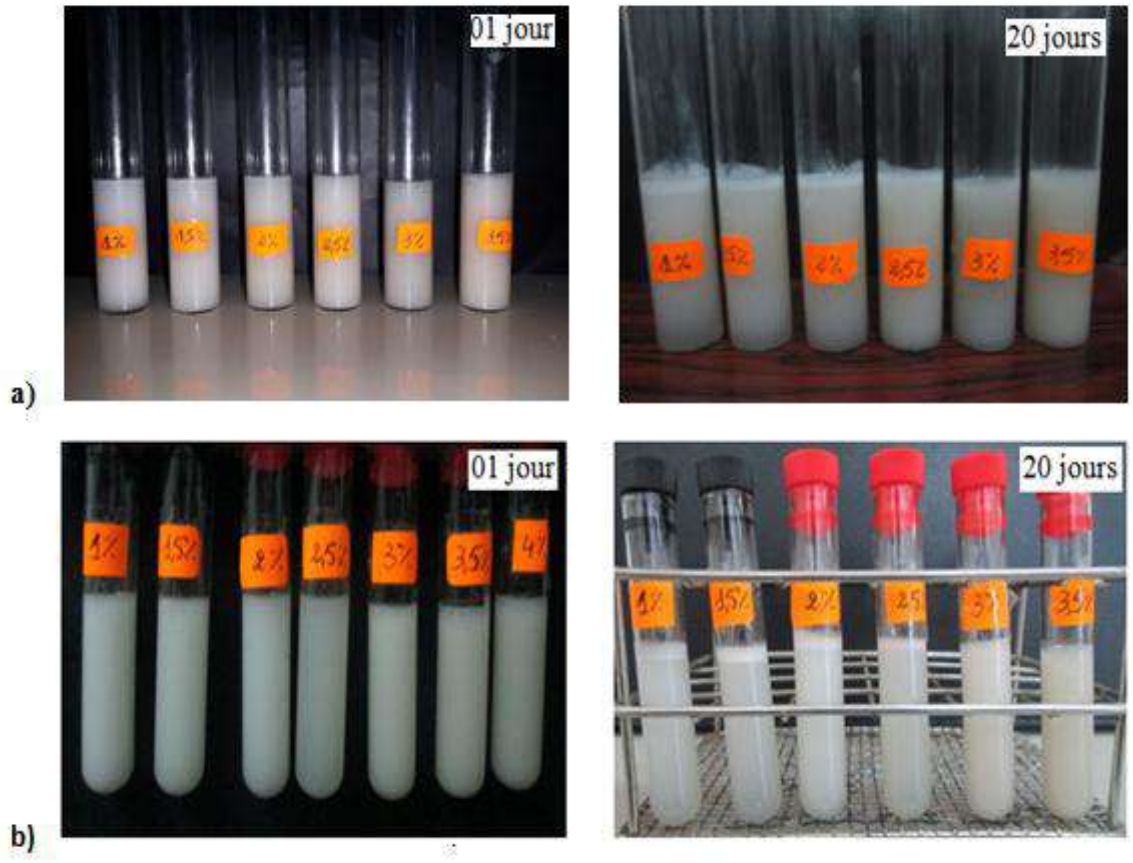


Figure IV-3 : Apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation à T_{amb} avec: a) 0.5%, b) 1 %, d'acide ascorbique.

La figure IV.3 présente l'apparence des différentes émulsions d'HE en présence d'acide ascorbique durant 20 jours de conservation. Elle montre bien que, pour des formulations contenant des quantités faibles en pectine, les émulsions sont toujours instables.

Par contre, l'ajout d'acide ascorbique à des émulsions avec des quantités en pectine allant de 3 à 4%, aucune séparation de phases ne se produit, ce qui aboutit à des émulsions stables.

- **Examen microscopique**

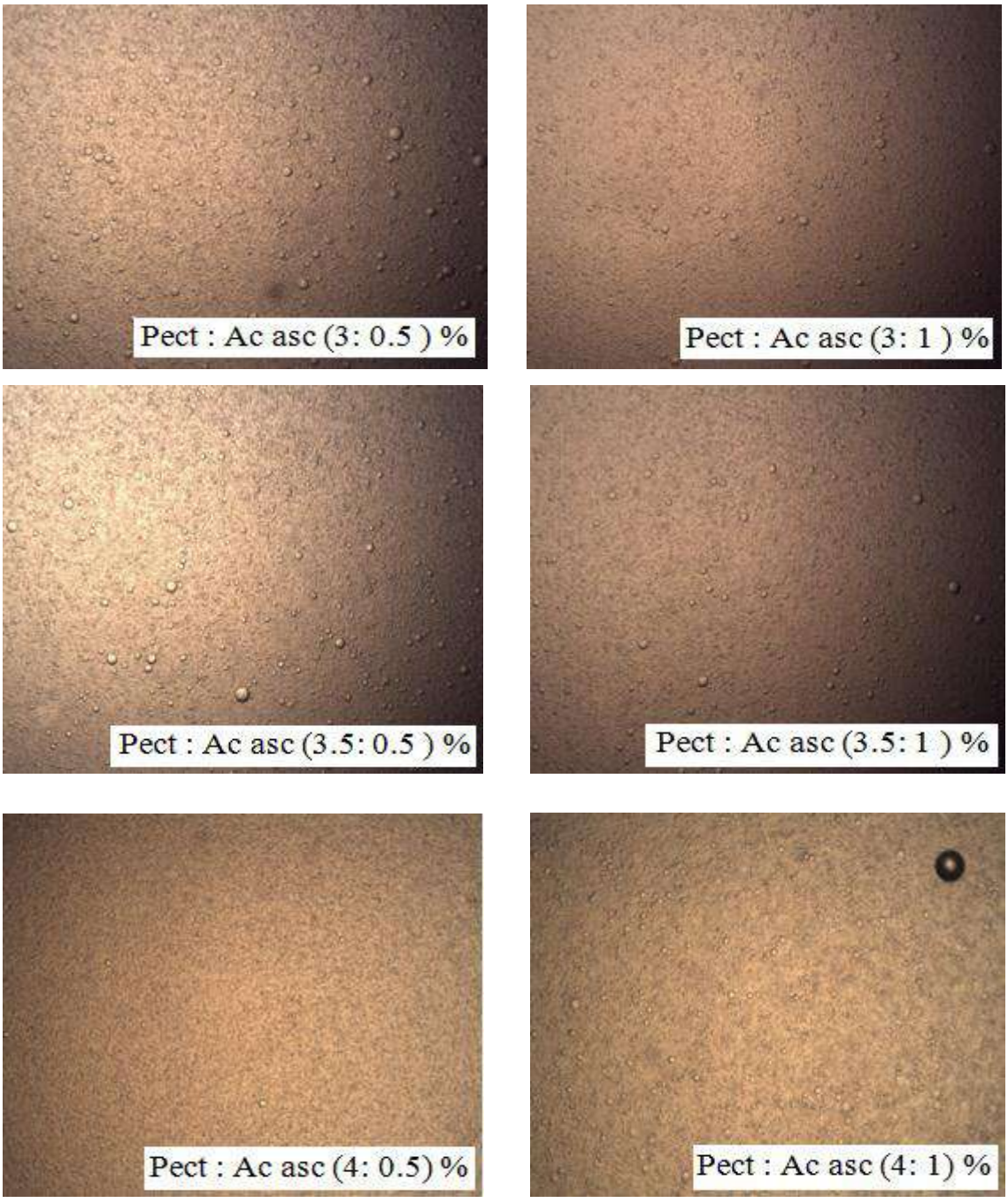


Figure IV-4 : Vues microscopiques des émulsions stables en présence d'acides ascorbique.

L'examen microscopique des émulsions H/E les plus stables en présence d'acide ascorbique montre que, l'ajout de ce dernier ,a permis d'avoir une dispersion des gouttelettes d'huiles relativement plus homogène avec une taille plus fine (voir figure IV.4).

Par ailleurs, Faire augmenter la quantité d'acide ascorbique dans l'émulsion (1%), n'a pas un grand effet sur la granulométrie de l'émulsion.

IV.5 Evaluation de l'activité biologique

Afin d'évaluer l'aptitude d'une émulsion H/E à base de pectine à garder les propriétés biologiques de l'huile essentielle, Il était nécessaire d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobiennes des huiles essentielles seules et en émulsions avec et sans ajout d'acide ascorbique.

IV.6 Evaluation de l'activité antioxydante

IV.6.1 Détermination de IC50 des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antioxydante, exprimés en tant que pourcentage d'inhibition (I%), des huiles essentielles d'orange, de citron, et de citrange 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.5). A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC50 de chaque extrait (Tableau IV.4).

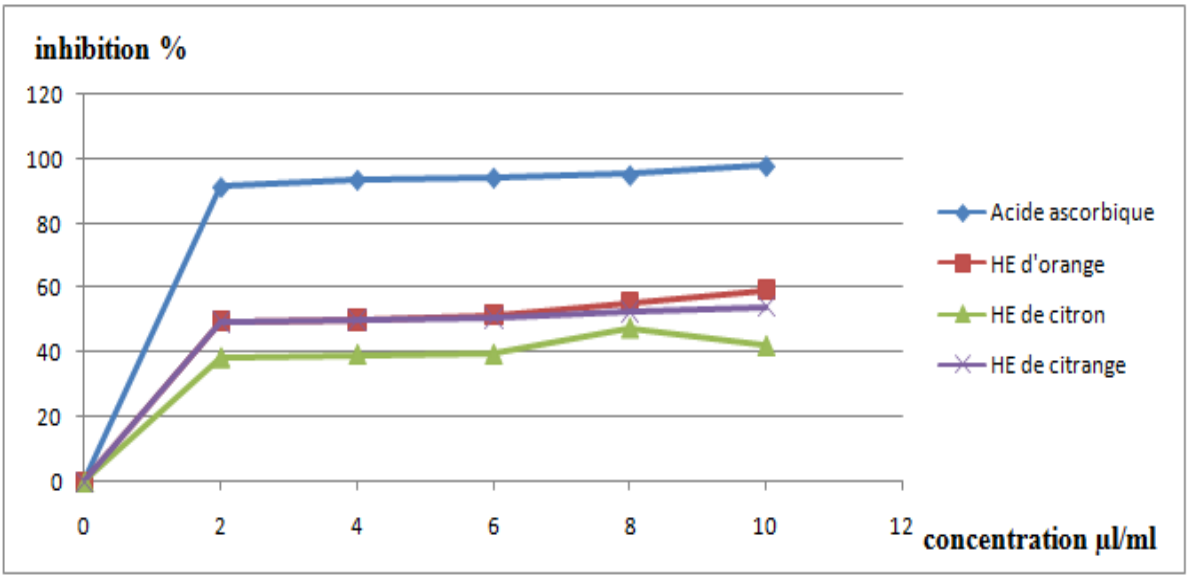


Figure IV-5 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction des différentes concentrations des l'huile essentielle d'agrume et d'acide ascorbique.

Tableau IV-4 : Valeurs des IC50 trouvées pour les HE d'agrumes

HE d'agrume	IC_{50} exprimées en µl/ml
Orange	3.152
Citron	4.589
Citrange	5.246

La capacité antioxydante des différents extraits 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'extrait testé est grande **[83].**

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'HE testées dans cette étude par la méthode de réduction du DPPH° ont montré que ces HE ont un pouvoir antioxydant presque similaire, de l'ordre de 3.152, 5.246 et 4.589 µl/ml pour l'HE d' Orange , de Citrange et de Citron respectivement. En comparant avec l'acide ascorbique, le pourcentage d'inhibition est 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.

Les études de Kehal **[84]** 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.

IV.6.2 Détermination de l'activité antioxydante des émulsions d'HE

Le tableau IV.5 regroupe alors les résultats de test DPPH des huiles essentielles seules et en émulsion avec et sans ajout d'acide ascorbique, à une concentration fixe de 6 µl/ml.

Tableau IV-5 : Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'huiles essentielles d'agrume.

Espèce d'agrumes	HE seule	Emulsions H/E		
		4% Pectine 00% Ac asc	4% Pectine 0.5% Ac asc	3.5% Pectine 0.5% Ac asc
Orange	53.375	51.94	93.47	90-93
Citron	51.271	48.78	89.16	89.00
Citrange	51.900	51.24	86.29	86.382

D'après les résultats trouvés, il est clair que, le pourcentage d'inhibition pour toutes les émulsions avec 4% de pectine et 0% acide ascorbique, est similaire à celui de l'huile essentielle seule, indiquant que sa mise en émulsion à base pectine n'a pas affecté l'activité antioxydante de l'huile essentielle.

Une inhibition d'oxydation de 88-95 % est obtenue pour des émulsions contenant 0.5% d'acide ascorbique. La réduction du DPPH● est presque complète à partir de cette concentration.

Le tableau IV.6 regroupe les résultats d'évaluation d'activité antioxydant effectuée sur des émulsions d'HE conservées sous une température de 4^0C et l'abri de la lumière.

Tableau IV-6 : Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'huiles essentielles après 7 jours de conservation

Espèce d'agrumes	**Emulsions H/E**		
	4% Pectine 00% Ac asc	4% Pectine 0.5% Ac asc	3.5% Pectine 0.5% Ac asc
Orange	50.313	95.77	95.985
Citron	48.641	88.16	88.246
Citrange	51.696	88.63	88.30

Les résultats obtenus sont identiques avec ceux trouvés pour des émulsions d'HE fraichement formulées (Tableau VI.5). Tandis que, les émulsions d'HE a base d'acide ascorbique conservées sous une température ambiante et a l'exposition de la lumière, ont présentées une coloration jaunâtre au cours de temps (voir figures IV.6) .D'après Yuan et al [**85**] la température a un effet major sur la dégradation de l'acides ascorbique. Donc le changement de couleur dans notre cas, est un signe de dégradation de l'acide ascorbique et donc de l'émulsion.

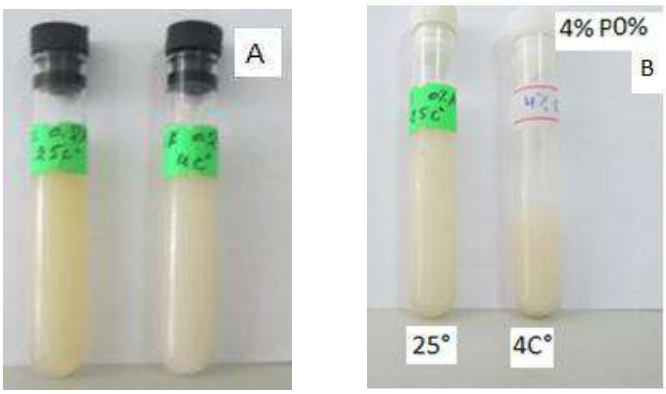


Figure IV-6 : Effet de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE.
A) avec acide ascorbique B) Sans acide ascorbique

A l'issue de ces résultats, faire conserver les émulsions d'HE à base d'acide ascorbique dans des conditions adéquates est un paramètre très important pour garantir leur stabilité chimique.

IV.7 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'Orange (*Citrus sinensis*), de Citron *(citrus limonum*) et de Citrange *(Citroncirus webberi*), a été évaluée par la méthode de Macro-dilution en milieu liquide. La concentration minimale inhibitrice de ces HEs et leurs émulsions, est présentée dans le tableau IV.7 et illustrée dans la figure IV.7 et 8.

N.B : la figure IV.8 représente les émulsions formulés à base de d'HE de citrange, celles d'orange et de citron sont répertoriés en annexe 2.

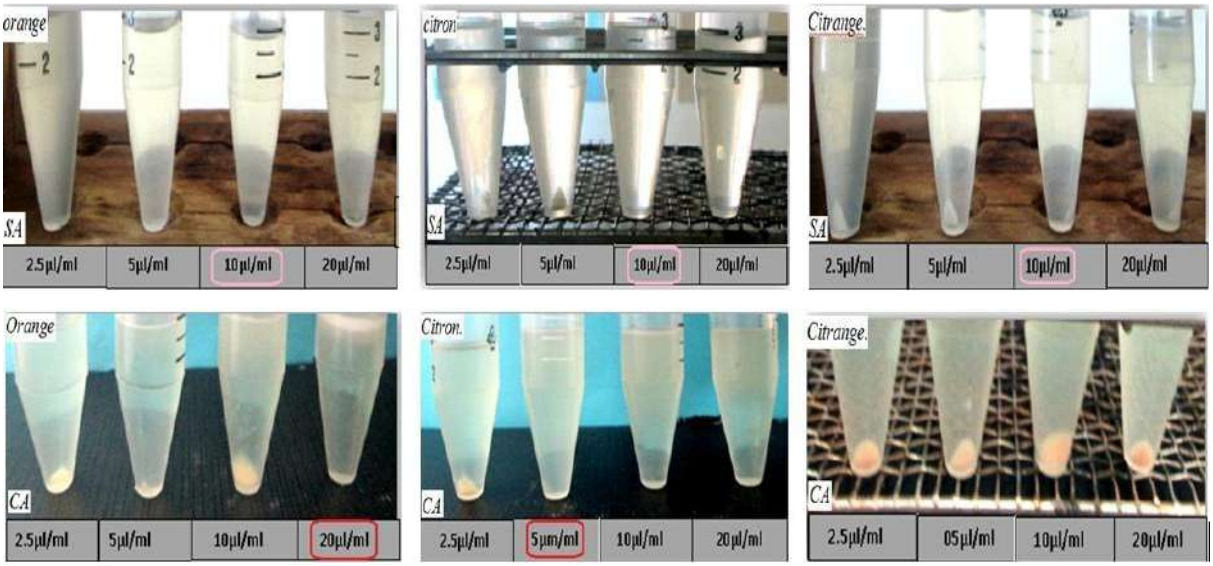


Figure IV-7 : Evaluation des CMI des HEs seules vis-à-vis de : *Staphylocoque aureus* et *Candida albicans (le précipité indique la croissance bactérienne)*

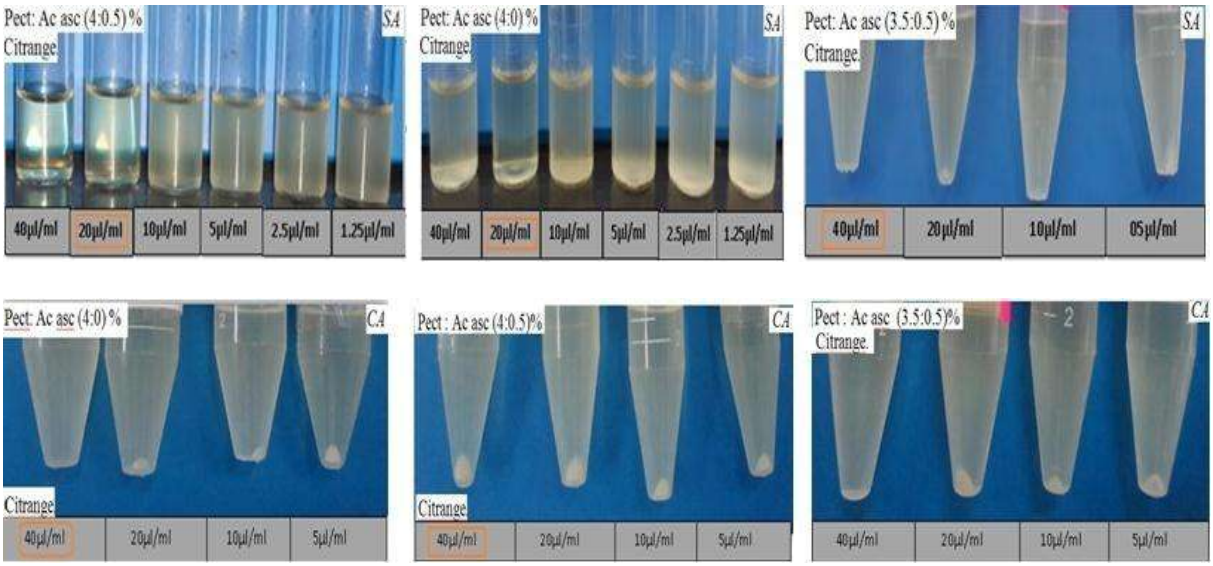


Figure IV-8: Evaluation des CMI des émulsions d'HE de Citrange vis-à-vis de : *Staphylocoque aureus* et *Candida albicans (le précipité indique la croissance bactérienne)*

Tableau IV-7 : CMI (µl/ml) des huiles essentielles en milieu liquide

Echantillons			CMI (µl/ml)	
			Staphylocoque aureus	*Candida albicans*
Orange *(Citrus sinensis)*	HE seule		10	20
	Emulsions	4% Pectine 0% Ac asc	20	> 40
		4% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
		3.5% Pectine 0.5% Ac asc	40	> 40
Citron *(Citrus limonum)*	HE seule		10	5
	Emulsions	4% Pectine 0% Ac asc	20	> 40
		4% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
		3.5% pectine 0.5% Ac asc	40	> 40
Citrange *(Citronciru s webberi)*	HE seule		10	> 40
	Emulsions	4% Pectine 0% Ac asc	20	> 40
		4% Pectine 0.5% Ac asc	20	> 40
		3.5% Pectine 0.5% Ac asc	40	> 40

L'analyse des résultats trouvés (de tableau VI.7) nous a permis de tirer les points suivants :

- La bactérie à Gram positif à savoir *Staphylocoque aureus* a manifesté une sensibilité à l'égard de toutes les huiles essentielles de *Citrus* testées dans cette étude pour une CMI de 10 µl/ml. Selon Poole, 2001, Busatta et al., **[86-87]**, la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux HEs 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 (+).
- Les HEs de citron ont exercé une importante activité antimicrobienne (CMI=5 µl/ml) à l'encontre de *Candida albicans* par rapport aux HEs d'orange et de citrange. Nos observations rejoignent celles qui ont été faites par Dorman et al.**[88]**, qui ont montré que les hydrocarbures monoterpéniques, abondants dans les H.Es de *Citrus* contenant le limonène comme constituant principal est faiblement inhibiteur contre une panoplie de microorganismes.
- L'activité antimicrobienne des émulsions d'HE à base de différentes concentrations de pectine, a permis de révéler une éventuelle synergie entre l'huile essentielle et la pectine. (La CMI est diminue avec l'augmentation de la quantité de pectine)

Conclusions générale

Nous rappelons que les objectifs de cette étude sont la valorisation des écorces du citron (*Citrus limon*), orange (C*itrus sinensis*), et Citrange (*Citroncirus webberi*) par l'utilisation de leurs huiles essentielles comme agents naturels pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne et de l'oxydation des aliments.

Dans ce contexte, notre recherche a été axée sur les points suivants:

- Procéder à l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces complètes de trois types d'agrumes : citron, citrange et orange par hydrodistillation.
- Etudier les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles extraites.
- Elaboration des émulsions d'HE simple à base de pectine et d'acide ascorbique.
- Evaluer les activités antibactérienne et antioxydante des HEs de Citrus seules et en émulsions.

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

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.

L'élaboration des émulsions H/E à base de pectine hautement méthylée, a montré que cette dispersion varie selon la concentration en agent émulsionnant. Plus la concentration de pectine augmente, plus la dispersion est plus fine, et on obtient une émulsion rigide et stable. Il a été observé aussi que l'ajout d'acide ascorbique à des émulsions avec des quantités en pectine allant de 3 à 4%, aucune séparation de phases ne se produit, ce qui aboutit à des émulsions stables.

L'évaluation de l'activité antioxydants de l'huile essentielle de citrus et leurs émulsions, par la méthode de réduction du DPPH°a montré que ces dernières possèdent un pouvoir antioxydant, et que le pourcentage d'inhibition pour toutes les émulsions avec 4% de pectine et 0% acide ascorbique, est similaire à celui de l'huile essentielle seule, indiquant que sa mise en émulsion à base de pectine n'a pas affecté l'activité antioxydante de l'huile essentielle. Alors que l'ajout de l'acide ascorbique peut provoquer une réduction presque totale de DPPH● (88-99%).

En matière d'activité antimicrobienne, Le test antimicrobien des l'huiles essentielles et même de en émulsion a été déterminé par la méthode de Macro-dilution en milieu liquide et a révélé que les deux bactéries testées présentent une sensibilité aux ces huiles, tandis que les

HEs de citron ont exercé une importante activité antimicrobienne (CMI=5 µl/ml) à l'encontre de *Candida albicans* par rapport aux HEs d'orange et de citrange.

Les résultats obtenus semblent très intéressants et doivent être, poursuivis par d'autres études, tels que :

- ✓ la caractérisation des huiles 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 HE testé sur d'autres souches.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] : Hellal, Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus). Mémoire de Magister, université de Tizi-ouzou, Alger. 2011.

[2] : Bruneton J. - Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris. (1999)

[3] : Rodriguez rojas, M.P,. Emulsification en cuve agitée, thèse de l'université de l'institut national polytechnique de Toulouse, 2007.

[4] : Joachim A; développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau, 2003.

[5] : Pierat,N., Préparation d'émulsion par inversion de phase induite agitation, université Henri poincare-Nancy 2010.

[6] : Larpent C. , Tensioactifs-traité constantes physicochimiques, Techniques de l'ingénieur. (1995).

[7] : J.L Salager : surfactifs : types et usages, cahier firp n0 f300-a, université de Los Andes, version 2(2002).

[8] : M.Tir : traitement des émulsions d'huiles de couple par floculation.elecroflottation et electro-floculation"étude comparative «mémoire magister de C.U.Médéa.

[9] : Doumeisc O , profeseur agrégé de biochimie-Génie biologique : les émulsions

[10] : Rondon M : influence de la formulation physico-chimique et des propretés inter faciales sur la stabilité des émulsions asphalténes- eau-huile Application a la déhydratation du pétrole ;thése de doctorat de l'unuversité de pau et des pays de l'Adour 2006 .

[11] : Doumeix O, Operations unitaires en génie biologique: les émulsions 28\06\2013.

[12] : Collection G, Agents de surface et émulsion, Techniques et documentation Lavoisier 1983 .

[13] : Boumenir A, Effet de l'interaction des tensioactifs sur la stabilité d'une émulsion multiples, Mémoire Ingénieur : CU. Médéa 2002.

[14] : Brochette P, Emulsification : Elaboration et étude des émulsions. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J2150 :1-18. (1999).

[15]: http://biochim-agro.univ-lille1.fr/lipides/co/lipides_ 7.html (05/05/2011).

[16] : Chabni M ; étude de la stabilité physique des systèmes dispersées ; chapitre II, physico-chimie des dispersions ; base théorique ; soutenue publiquement

[17]: Barnes H.A., Hutton J.F., Walters K. Linear viscoelasticity. In: Barnes, H.A., Hutton.

[18]: Tharwat F. Tadros, Emulsion Science and Technology, wiley-vch Verlag gmbh & Co. Kgaa, Weinheim, (2009).

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

[20] : Mayer,F., Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite. 2012. Page 10.

[21] :Fluck H. Petit guide panoramique des herbes médicinales, Paris 1977 p136.

[22] : Salle J L : Les huiles essentielles Ed. Frison Roche- Paris. 1991 p : 1-49.

[23] : Lucchesi Marie Elisabeth, Chematfarid, And Smadjaflavour Jacqueline And Fragrance Journal FlavourFragr. J. 2004; 19: 134–138.

[24] : Bruneton .J. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, 2e édition. Technique documentation, Paris. p 406, 410 1993 .

[25] : Bourrel C. Analyse chimique, activités biologiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées., Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse 1993 .

[26] : Raul L. Ochoa H. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » D'origine végétale. Thèse De L'institut National Polytechnique De Toulouse 2005.

[27] : Tigrine-kordjani , N., Meklati, B.Y., Chemat ,F., Extraction et caracterisation physicochimique de biomolecules a partir de bioressources. The International Journal of Aromatherapy.p:141–147. 2006.

[28] :Bruneton.J, Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales, Partie03 : Terpenoydes et stero'ides, Ed : Lavoisier, tec &doc, 2eme edition, pp 387-429, Paris 1993.

[29] : Harrar.A, Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus*L. Soutenu publiquement le, *Chapitre II : Les polyphénols,page 17* 2012.

[30] :Philogène B.J.R., Regnault R.C. & Vincent C. Produits phytosanitairesinsecticides d'origine vegetale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. In Regnault- Roger C.,Philogène B. J. R., Vincent C. Biopesticides d'origine vegetale. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp 1-17 2002.

[13] : Roux D., Chaumont J.P., Cieur C., Millet J., Morel J.M. & Tallec D., Conseil en aromathérapie. 2ème Edition : Pro- Officina : (31, 14, 15) pp 2008.

[32] : Salle J L : Les huiles essentielles Ed. Frison Roche- Paris. p : 1-49 1991.

[33] : Willem J.P., *Les huiles essentielles, médecine d'avenir,* 318 p 2002.

[34] : Sylvainsutour « Etude De La Composition Chimiqued'huiles Essentielles Et D'extraitsde Menthes De Corse Et De Kumquats ». Thèse de Doctorat 2010.

[35] : Boutekedjiret. C, Etude des procèdes d'extraction appliques à la récupération des essences de romarin : transfert de matikre et modelisation, thèse de doctorat. DPT génie chimique .E.N.P.Alger] I999.

[36] : Lucchesi .M.E. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse d'Université de la Réunion 2005.

[37]: Bernard T., Perineau F., Bravo R., Delmas M. &GASET A... (Extraction des huiles essentielles: chimie et technologie. *Informations Chimie*, 298 : 179-184 1988.

[38] : Raynoud. j. prescription et conseils en aromathérapie. Edit;Lavoisier ; France:247p 2006.

[39] : Vagi. E, Simandi. B, Suhajda. A, Hethelyi. E .Essential oil composition and antimicrobial activity of Origanummarjorana L. Extractsbtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. J., p: 38, 51-57 2005.

[40]: Zarnowski. R, Y. SUZUKI. Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains Journal of Food Composition and analysis, J., 17, 649-663 2004.

[41]: Luque-Garcia J.L., M.D. Focused microwave-assisted Soxhletextraction : devices and applications Luque de Castro, Talanta J., 64, 571-577 2004.

[42]: Luque-Garcia. J.L, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds.Journal of Chromatography, , 1034, 237-242 2004 .

[43] : Belyagoubi L, "Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales», Thèse de Magister, université Abou BakrBelkhaid , Tlemcen, Algérie, 2006.

[44] : Paul. I, Encyclopédie des plantes medicinales : Identification, préparation, soins, pp 1-130, Larousse- Bordas : 1997.

[45] : Bruneton.J, Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales, Partie03 : Terpenoydes et stero'ides, Ed : Lavoisier, tec &doc, 2eme édition, pp 387-429, Paris.

[46] : «http://www.union-nature.com/fr/extraction.html/enfleurageenfleurage".Consulté le12/01/2010.

[47] : Perrut M," Extraction par fluides supercritiques", Techniques de l'ingénieur, J2770, 003.

[48]: Pourmortazafi S, HAJIMIRSADEGHI S, "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis", Journal of Chromatography A, 1163, 2-24, 2007.

[49] : Besombes C, Contribution à l'étude des phénomènes d'extractionhydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées», Thèse de doctorat, Université de la Rochelle, 2008.

[50] : Megateli S, « Extraction des huiles essentielles par le procédé de chauffage par induction électromagnétique (Cas du : *Rutachalepensis*L et *Cuminumcyminum*L) ».Thése de Magister.2010.

[51]: Abertvian M, « Microwave hydrodiffusion and gravity new technique for extraction of essential oils », Journal of ChromatographyA, 1190, 14 -17,2008.

[52]: Cpkelco.A Huber Company, « Gemu: book »Rev 04/05(2003) Cpkelco U.S.,Inc.

[53] : Lagunez Rivera. L. « Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ». Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France 2006.

[54] : http://gardenberizh.org/pages/dossier_02_.01.html. (2008), 30/04/2015

[55]: Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. &Leverve, X. Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Edition Springer*, p 255. 2006.

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

[57]: Naidu, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. Nutrition Journal 2 (7), 1-10 2003.

[58]: Belletti N., Nidagijimana, M., Sisto C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. & Gardini F.. Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on Saccharomyces cerevisiae. Journal Agricutural Food Chemistry, 52 (23), 6932-6938 2004.

[59]: Fisher K., Rowe C. & Phillips C. The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and food. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 495-499 2007.

[60]: Kaufmann SHE. Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer; R.G. Landes, New York; Austin, 1997, p. 345

[61] : Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S., Nigam P.S.. *Rosmarinusofficinalis*essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, pp.1070-1078 2010.

[62] : Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C. &Casanovad J. Etude chimique et activité an diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol.24, №1, pp. 94-103 2008.

[63] : Kechkar M., Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 99p 2008.

[64]: loussert,.les agrumes.2.production. Edition Lavoisier, paris.157p 1989.

[65] : Bousbia, N., Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. 2013:

[66] : Loussert R.,. Les agrumes.2. Production. Edition Lavoisier, paris 1989.

[67] : Di Giacomo A. Gli Oli EssenzialidegliAgrumi. Essenza di Arancia Amara. Essenza di Néroli bigarade. Petit-grains.RivistaItalianaEssenze, Profumi, PiantOfficinali, Aromi, Saponi, Cosmetici, Aérosol, , (56), 418-442 1974 .

[68] : Di Giacomo A. Gli Oli Essenziali degli Agrumi. Essenza di Arancia Amara. Essenza

[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] : Goris A.L., Liota., Janota M.M., Goris A. pharmacie galénique. Masson et Cie éd., Paris, 1949

[71] : Jumenter I. les Huiles Essentielles des Citrus et leur Utilisation en Parfumerie. Thèse de doctorat d'Etat, université de Limoges, France, 1984

[72] : http://www.neroliane.com/blog/bienfaits-et-vertus-des-huiles-essentielles-d-agrumes

[73] : http://fr.wikipedia.org/wiki/Citrange.consulté le 011/04/2015

[74]: http://gardenberizh.org/pages/dossier_02_.01.html. 30/04/2015

[75]: Huile essentielle de cumin:NFT 75-346:Novembre .1986.

[76] : Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**: 25-30 .1995.

[77]: Benhammou, N., Atik Bekkara, F.,; Kadifkova, P.,. Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L. and Pistacia atlantica Desf . Advances in Food Sciences. pp 29(3) .155-161 .2007.

[78] : Guinoiseau. E., 2011,Mol_ecules antibact_eriennes issues d'huiles essentielles: séparation, identication et mode d'action, page 66

[79] : 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.

[80] : Youcef Ettoumi, k., Extraction des pectines en utilisant le procédé de chauffage par induction électromagnétique. 2011, mémoire de Magister, université de Médéa, Alger.

[81]: Luzio, G., Cameron,R., 2010.Contactless Conductivity: An HPLC Method to Analyze Degree of Methylation of Pectin. Florida State Horticultural Society, Proc. Fla. State Hort. Soc. 123:213–216.

[82]: Kaltsa,O., Paximada,P., Mandala,I., Scholten,E., 2014. Physical characteristics of submicron emulsions upon partial displacement of whey protein by a small molecular weight surfactant and pectin addition, Volume 66, 401–408.

[83]: Pokorny, J; Yanishlieva, N; Gordon, M. (2001). Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.

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

[85]:Yuan, J.-P., & Chen, F.. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 5078e5082. (1998)

[86]: Poole K., Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Current Opinion in Microbiology, 4, 500-508. (2001).

[87]: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., Appliication of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology, 25, 207-211. 2008.

[88] : Dorman H.J.D. & Deans S.G., Antimicrobial agents from plants:antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88 (2), 308-316. 2000