République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Médéa

Faculté de Technologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

en Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème

ENCAPSULATION DES HUILES ESSENTIELLES D'AGRUME A BASE D'ACIDE ASCORBIQUE

Dirigé par :

Dr. YOUCEF ETTOUMI khadidja

Présenté par :

AKAL Amina

TOUMI Fatima Zohra

Année universitaire: 2020/2021

Remerciements

Avant tout, l'ouvrage est dédié à ALLAH, notre créateur et maitre de l'univers de toutes ses bontés, de nous avoir envoyé le prophète MOHAMED qui est notre premier éducateur puis de nous avoir donné tout, du courage pour finir ce travail de recherche.

Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements au Dr ***YOUCEF ETTOUMI khadidja*** *notre promotrice de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer ses conseils et ses encouragements..*

Remerciements et profonde gratitude vont également aux membres de jury pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au laboratoire de chimie 1 du Hall Technologique de l'université de Médéa, et au niveau de groupe de Saidal de Médéa. Nous tenons donc à remercier l'ensemble du personnel qui nous a aidé et soutenu pendant la mise en œuvre de notre travail.

Nous tenons également à remercier Mr. Karim pour son aide et ses conseils.

Ce travail n'aurait pu aboutir ni même voir le jour sans le soutien et l'appui de nos familles, à nos chers parents, notre profonde reconnaissance envers leur compréhension et leur patience dans les moments les plus difficiles.

Sans oublier toutes la promotion de Master Génie des procédés pharmaceutique qui ont passé avec nous des bons moments.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

AMINA & FATIMA ZOHRA.



Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce mémoire à :

A mon très cher père qui m'a tout appris, pour les peines et les sacrifices qu'il s'est donné pour me voir réussir dans la vie, Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.

A Ma mère, qui a œuvrée pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mes très chère frères : Ismail, Adel, Abd nour et Abd moumen.

A mes très chère sœurs : Amina et marwa.

A ma nièce : ma belle mariem que j'aime beaucoup.

Ma grande famille Akal. La famille Sayeh.

A mes chères amies : Masouda, Asma, Narimene et Zahra, avec qui j'ai partagé les meilleurs moments de ma vie.

Mon binôme fatima qui a et qui gardera toujours une place unique dans mon cœur.

Amina.



Dédicace

D'abord et avant tout je dédie ce modeste travail à mes très chères familles qui n'ont pas cessés de m'aider par tous les moyens. Je leur souhaite une longue vie, je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et ses conseils. Mille merci, et je leurs souhaite la santé et le bonheur.

Á très chère ma mère : qui a œuvrée pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon très cher frère Ibrahim : pour sa compréhension, son encouragement, sa confiance et son assistance qui m'ont aidé à réussir. Ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et mon respect.

Á mes frères : Mohamed, Youcef.

Á mes sœurs : Fatiha, Zahiya ,Faiza , Naima , Razika .

Á mon oncle : abdkader.

Á toute les familles : Toumi ,Hoceini.

Á mes chères amie : Ibtissam ,Nossaiba, Ramla, et Ma binôme Amina.

À tous ceux qui me sont proches et qui me sont chers.

Fatima zohra.



ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تغليف الزيوت الأساسية*Citrus sinensis*(البرتقال الحلو) عن طريق الاستحلاب، وقد استخدمت الزيوت الأساسية المستخرجة عن طريق التقطير المائي بمردود2.24٪،في صياغة مستحلبات من نوع :زيت/ ماء .يعتمد على البوليمر الحيوي المستحلب ، أي البكتين ، مضافًا اليه حمض الأسكوربيك ، كمضاد قوي للأكسدة. أظهر تقييم الأنشطة البيولوجية للزيوت العطرية وكذلك لمستحلباتهاأن استحلاب هذه الزيوت يؤدي إلى تحسين قدراتها المضادة للأكسدة و المضاد للمكروبات والمضادة للالتهابات بسبب التأثير التآزري الناتج عن المكونات المختلفة لهذه المستحلبات.

Résumé

Cetteétude a pour principal objectif l'encapsulation des huiles essentielles(HEs) de *Citrussinensis*(Orange douce) par émulsification, Les huiles essentielles extraites parhydro-distillation avec un rendement de 2.24%, ont été utilisées dans la formulation des émulsions de type Huile/Eau (H/E) à based'un bio-polymère émulsifiant, à savoir la pectine, additionnée par l'acide ascorbique, en tant qu'un antioxydant fort. L'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles seules et en émulsion a montré que la mise en émulsion de ces HEs mène à une amélioration de leurs pouvoirs antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire due à l'effet synergique résultant des différentsconstituants de ces émulsions.

Abstract

The main objective of this study is the encapsulation of essential oils (EOs) of *Citrus sinensis*(Sweet Orange) by emulsification, The essential oils extracted by hydroditillation with a yield of 2.24%, were used in the formulation of oil/water(O/W) type emulsions based on an emulsifying biopolymer, namely pectin, added with ascorbic acid, as a strong antioxidant. The evaluation of the biological activities of essential oils and their emulsion has shown that the emulsification of these EOs leads to an improvement in their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities due to the synergistic effect resulting from the constituents of these emulsions.

Liste des Abréviations

Abréviation	Signification
AA	Acide Ascorbique
ANSMA	Gence nationale de Sécurité du Médicament
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
C °	Degré Celsius
CC	Chauffage classique
CGP	Chromatographie en phase Gazeuse
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
DIC	Détente instantanée contrôlée
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
E	Phase Aqueuse
H	Phase Huileuse
HE	huile essentielle
HLB	Balance Hydrophile Lipophile
I%	pourcentage d'inhibition
IC50	Concentration inhibitrice à 50%
IE	Impact électronique
Ir a	Indices de rétention apolaire
Ir p	Indices de rétention polaire
IRTF	Infra-Rouge par Transformée de Fourier.
MH	Mueller Hinton
$\mathbf{m_{HE}}$	la masse de l'huile essentielle en gramme
m_{MV}	la masse de la matière végétale en gramme.
PIT	Phase Inversion Température
Pka	constante d'acidité
R (%)	Le rendement est exprimé en pourcentage
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
T amb	température ambiante
tr/min	Tours par minute
UV	ultraviolet
µL	microlitre.
µS/cm	Micro-Simens par Centimètre

Sommaire

Résumé.

Remerciement.

Sommaire.

Listes des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations

Introduction Générale 01

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. HUILES ESSENTIELLES 03

I.1.1. Bref historique 03

I.1.2. Définition des huiles essentielles 03

I.1.3.Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus* : 04

I.1.4. Propriétés physiques 05

I.1.5. Composition chimique des huiles essentielles: 06

I.1.5.1.Composés terpéniques 06

I.1.5.2.Composés aromatiques 07

I.1.6.Facteurs influençant la composition chimique des HEs 07

I.1.7 .Techniques d'extraction d'huiles essentielle 08

I.1.7 .1 Hydro-distillation 08

I.1.7.2.Entraînement à la vapeur d'eau 10

I.1.7.3. Extraction par micro-ondes 11

I.1.7.4. Extraction par CO_2 super critique 12

I.1.7.5.Extraction par Soxhlet: 13

I.1.7.6.Détente instantanée contrôlée (DIC) 14

I.1.8.Méthodes d'analyse des huiles essentielles 15

I.1.8.1.Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) 15

I.1.8.2.Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) 17

I.1.8.3.Résonance magnétique nucléaire RMN 17

I.1.9.Activités biologiques des huiles essentielles 18

I.1.9.1.Activité antimicrobienne des huiles essentielles 18

I.1.9.2.Activité antioxydant 18

I.1.9.3.Activité anti inflammatoire 19

I.1.9.4. Autre activités 19

I.1.10.Toxicité des HEs 19
I.1.11.Domaines d'application des huiles essentielles 20
I.1.11.1.Pharmacologie 20
I.1.11.2. Aromathérapie 20
I.1.11.3 Industries agroalimentaires 20
I.2.VITAMINE C (ACIDE ASCORBIQUE) 21
I.2.1. Définition et structure 21
I.2.2. Propriétés chimiques 22
I.2.3. Dérivés de la vitamine C 23
I.2.4.Applications 23
I.3 .Emulsification 24
I.3.1. Définition 24
I.3.2. Classification des émulsions 24
I.3.2.1 En fonction de la nature des phases dispersées 24
I.3.2.2 En fonction de la taille des gouttelettes 25
I.3.3. Caractérisation des émulsions et contrôles physico-chimiques 26
I.3.3.1 Stabilité 26
I.3.3.2 Sens de l'émulsion 29
II. Matériels et méthodes
II.1.Introduction 30
II.2.Produits et matériels utilisés 30
II.2.1Produits chimiques utilisés 30
II.2.2.Appareillages utilisés 30
II.2.3.Matériels Microbiologiques 31
II.2.4.Les souches testées 31
II.2.5.Materiel vegetal 31
II.3.Méthodes 31
II.3.1.Extraction des huiles essentielles 31
II.3.1.1.Procédure d'extraction 31
II.3.1.2.Rendements des HEs 33
II.3.2.Formulation des émulsions d' HEs d'orange 33
II.3.2.1.Protocole expérimental 33
II.3.2.2.Caractérisations physicochimiques des émulsions préparées 35
II.3.3.Evaluation de l'activité biologique 36
II.3.3.1.Activité antimicrobienne 36

II.3.3.2.Activité antioxydante par DPPH 36
II.3.3.3.Activité anti-inflammatoire 37
III. Résultats et discussions
III.1.Introduction 40
III.2.Rendement en HEs 40
III.3.Caractérisation physico-chimiques des émulsions stabilisées par la pectine avec et sans acide ascorbique 41
III. 3.1.Observations visuelles 41
III.3.2.Examen microscopique 42
III.3.3.Sens de l'émulsion 45
III.3.4.Mesure du pH et de la conductivité 45
III.5.Effet de la température de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE 46
III.6.Arommatogramme des H.Es de *Citrus.sinensis*seules et en émulsion 47
III.7.Activité antioxydante des émulsions d'HE avec et sans acide ascorbique 48
III.8.Activité anti-inflammatoire 50
CONCLUSION 53
Reference

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure I.1	Ecorces de citron adulte montrant les glandes schizolysigène (poche à essence) au niveau de l'épicarpe (x4).	04
Figure I.2	Structures chimiques de monoterpènes.	07
Figure I.3	Structures chimiques de sesquiterpènes.	07
Figure I.4	Les étapes d'extraction des huiles essentielles.	8
Figure I.5	Extraction des huiles essentielles par hydro-distillation.	9
Figure I.6	Alambic traditionnel.	10
Figure I.7	Appareillage de l'entrainement à la vapeur d'eau.	11
Figure I.8	Montage d'extraction par micro-ondes.	12
Figure I.9	Appareillage d'extraction avec fluide supercritique (CO_2).	13
Figure I.10	Différents types d'extraction par solvants volatils.	14
Figure I. 11	Appareil de CPG avec ionisation de flamme.	17
Figure I.12	Structure de l'acide L-ascorbique.	21
Figure I.13	Représentation du système rédox : acide ascorbique, radical ascorbique libre et acide déhydroascorbique	23
Figure I.14	Les différents types d'émulsions	25
Figure I.15	Processus de déstabilisation d'une émulsion	28
Figure II.1	Zeste d'orange.	31
Figure II.2	Montage d'hydrodistillation.	32
Figure II.3	Décantation.	32
Figure II.4	Préparation de la phase aqueuse	33
Figure II.5	Dispositif d'homogénéisation par Ultra Turax	34
Figure II.6	Microscope	35
Figure II.7	Réaction du DPPH• avec un antioxydant	37
Figure II.8	Photographie de l'administration de carragenine.	38

Figure II.9	Photographie représentant la mesure de la patte.	39
Figure II.10	Photographie représente l'injection d'huile	39
FigureIII.1	Huile essentielle d'orange (*Citrus sinensis*).	40
Figure III.2	Apparence des différentes formulations à T_{amb} pendant 20 jours avec 0% acide ascorbique.	41
Figure III.3	Apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation à T_{amb} avec **1**%, d'acide ascorbique.	42
Figure III. 4	Vues microscopiques des différentes formulations fraichement préparées à base de pectine seule	43
Figure III. 5	Vues microscopiques des différentes formulations à base de pectine seule après 14 jours de conservation.	43
Figure III.6	Vues microscopiques des différentes formulations fraichement préparées en présence d'acides ascorbique	44
Figure III.7	Vues microscopiques des différentes formulations en présence d'acides ascorbique après 14 jours de conservation.	44
Figure III.8	Vue microscopique représente le sens d'émulsion.	45
Figure III.9	Effet de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE	47
Figure III.10	Halo d'inhibition de l'H.E de *C.sinensis*(H) de l'émulsion avec acisde ascorbique (AA) et de l'émulsion sans acide ascorbique (I) sur: *Staphylococcie aureus*	47
Figure III.11	Halo d'inhibition de l'H.E de *C.sinensis*(H) de l'émulsion avec acisde ascorbique (AA) et de l'émulsion sans acide ascorbique (I) sur: *Bacilles subtils*	48
Figure III.12	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH$^{\bullet}$ en fonction des différentes concentrations desHEs seules, en émulsions et de l'acide ascorbique (AA)	50
Figure III.13	Histogramme représentant les moyennes d'épaisseur de l'œdème.	52

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau.I.1.	**C**omposition chimique en % des 3 HEs de *C. aurantium*L. extraites de 3 parties différentes de la plante.	5
Tableau .I.2.	Propriétés physiques et chimiques de l'acide L-ascorbique	22
Tableau II.1	Différents constituants des émulsions d'HE formulés	34
Tableau III.1	Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions stabilisée par pectine sans acide ascorbique	46
Tableau III.2	Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions stabilisée par pectine avec acide ascorbique	46
Tableau III.3	Représente les mesures des diamètres des zones d'inhibition.	48
Tableau III.4	Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'HEsavec et sans acide ascorbique (AA)	49
Tableau III.5	Evolution du diamètre de la patte en fonction de temps pour	51

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les huiles sont des substances grasses, hydrophobes, onctueuses et inflammables, d'origine végétale, animale ou minérale, généralement liquides au-dessus de 10°centigrade, se figeant ou se solidifiant à une température inférieure. Elles se différencient des graisses qui sont pâteuses dans les conditions normales d'utilisation. [1]

Ces huiles ont récemment gagné une grande popularité et un intérêt scientifique. Bien que plusieurs tentatives ont été faites pour exploiter le plein potentiel de ces huiles, elles sont chimiquement instables et sensibles à la détérioration oxydative et la perte de composés volatils, en particulier lorsqu'ils sont exposés à l'oxygène, la lumière, l'humidité et la chaleur. La qualité d'un produit enrichi avec les huiles peut se détériorer en raison de la dégradation oxydative, la formation des goûts et des saveurs désagréables, et la génération de radicaux libres. Ces changements ont un effet négatif sur la stabilité au stockage, les propriétés sensorielles, et l'acceptabilité globale des produits développés [2].

Pour développer des produits de santé naturels contenant des huiles bioactives, l'incorporation de ces huiles dans un système d'encapsulation pourrait être une bonneapproche pour préserver ces composés et maintenir leurs caractéristiques biologiques et fonctionnelles. Elle représente une approche réalisable et efficace pour corriger les problèmes liés à la libération, la stabilité physique, la protection contre les réactions d'oxydation avec l'environnement, la volatilité, la bio-activité, la toxicité et la commodité du patient. L'ingrédient actif est la base du produit encapsulé. La stabilité et les propriétés de libération des produits encapsulés sont hautement dépendant de la composition du matériau utilisé pour l'enrobage [3].

Les différents matériaux d'enrobage doivent avoir différentes capacités, d'efficacité d'encapsulation et des compatibilités avec l'ingrédient actif. Par conséquent, le choix d'un bon polymère est nécessaire pour un fonctionnement optimal du produit final. [4].

Le système d'encapsulation est choisi en fonction de l'utilisation prévue pour la formulation finale, qui peut varier en fonction de la taille, de la forme ou de la nature de la capsule. L'encapsulation peut être réalisée par un large éventail de méthodes ou de techniques, en fournissant l'isolement, le piégeage, la protection ou libération contrôlée de matériaux sensibles ou réactifs (composés volatils) de / à travers la matière environnante. Le domaine de l'encapsulation a fait énormément progresser en introduisant des produits encapsulés de micro

et nano dimensions sous forme de poudres, d'émulsions, de billes, de films, etc. La taille de la substance encapsulée détermine le produit final. Les Nano-capsules ont des propriétés significativement meilleures que les plus grandes particules préparées à partir des mêmes matériaux enrobant, d'ingrédients actifs et avec les mêmes techniques [5].

Le but du ce travail est l'encapsulation de huile essentielle d'orange par formulation d'une émulsion pour garantie leur stabilité, protection contre la détérioration oxydative et la perte de composés volatils. Qui permettent une utilisation dans le domaine thérapeutique, ou agroalimentaire.

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 d'orange, 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, antimicrobienne et anti-inflammatoire). Les résultats obtenus sont ensuite discuté. Suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. HUILES ESSENTIELLES

I.1.1. Bref historique :

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc.[6]

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

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

I.1.2. Définition des huiles essentielles :

Selon l'ANSM « Agence nationale de Sécurité du Médicament » et la Pharmacopée Européenne 7ème édition (2010). « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. » [7]

I.1.3.Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus* :

Les HEs sont présentes en quantité appréciable chez environ 2 000 espèces de plantes aromatiques et médicinales, réparties en 60 familles. Elles se localisent dans toutes les parties vivantes (fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines) de la plante et avec une quantité plus importante au niveau des parties supérieures (fleurs et feuilles). Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule [8]. L'accumulation des HEs, partie des métabolites secondaires, se fait généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante telle que les poils sécréteurs pour la famille des Lamiacées, les poches sécrétrices pour les Myrtacées et des canaux sécréteurs pour les Astéracées [9]. Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae*qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices [10].

Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Le fruit de *Citrus* se compose de l'épicarpe, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (Figure I.1.).

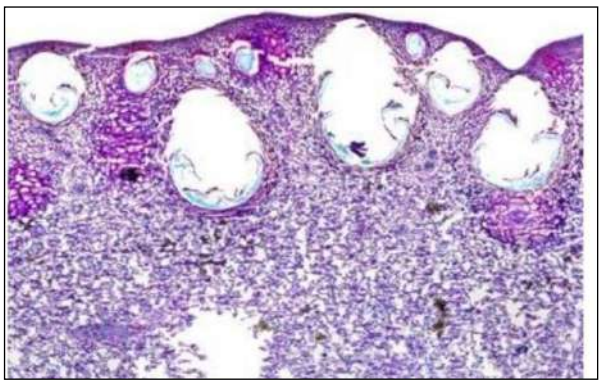


Figure I.1. Ecorces de citron adulte montrant les glandes schizolysigène (poche à essence) au niveau de l'épicarpe (x4) [11].

Le tableau (I.1.)résume la composition des huiles essentielles extraites à partir de trois parties différentes de l'oranger amer *C. aurantium*L. (écorces, fleurs et feuilles)

TableauI.1 : Composition chimique en % des 3 HEs de *C. aurantium*L. extraites de 3 parties différentes de la plante [12].

Essence de Curaçao (écorce)		**Essence de Néroli (fleurs)**		**Essence de Petit grain (feuilles)**	
Linalool	29.14	Limonène	94.67	Linalool	58.21
β- pinène	19.08	Myrcène	2.00	α-terpinéol	7.11
Limonène	12.04	Linalool	0.76	Géranyl acétate	4.49
Trans β-ocimène	6.06	β- pinène	0.62	Néryl acétate	2.18
E- farnésol	5.14	α- pinène	0.53	Trans β-ocimène	4.08

I.1.4. Propriétés physiques :

Les HE possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques [13] :

-Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes(les huiles essentielles, végétales), les émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques,

-Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°C.

-Leur densité est en générale inferieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0,99

-Elles ont un indice de réfraction élevé.

-Elles sont douées de pouvoir rotatoire, dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.

-Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.

-Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).

-Ce sont des parfums, et sont de conservation limitée.

-Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire rétinoïdes, très odorantes et volatiles même à température ambiante (ce qui les différencie des huiles fixes).

-A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pales, il existe, cependant, quelques exceptions, exemple : huile essentielle à azulène de coloration bleue.

I.1.5. Composition chimique des huiles essentielles:

Les HEs sont des métabolites secondaires des plantes. Elles sont d'une composition assez complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. [14], [15].

I.1.5.1.Composés terpéniques:

Les composés chimiques des HEs sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, Bpinène, y-terpinène, etc.) et soit les sesquiterpènes (B-caryophyllène, a-humulène, B-bisabolène, etc.). et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante [16], [17].

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités isopréniques C3HS, soit deux unités pour les monoterpènes(Figure I.2) et trois pour les sesquiterpènes (Figure I.3). Exceptionnellement, quelques diterpènes peuvent se retrouver dans les HEs [18].

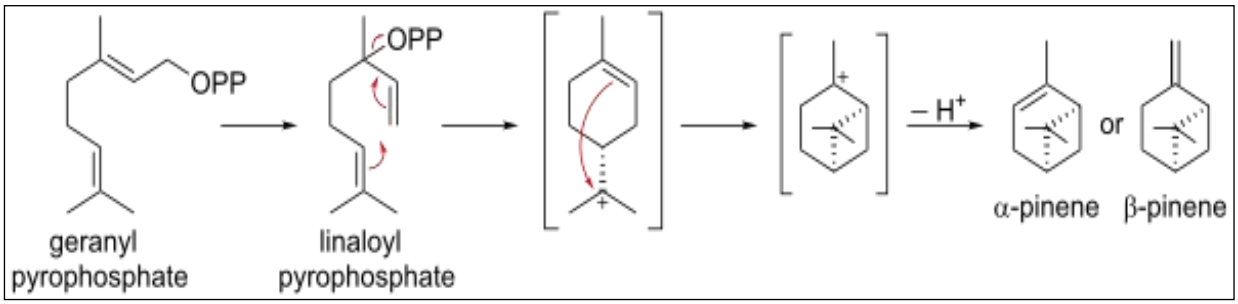


Figure I.2 : Structures chimiques de monoterpènes [19].

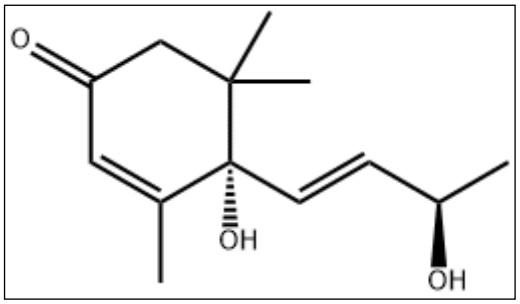


Figure I.3 : Structures chimiques de sesquiterpènes [19].

La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, a-bisabolol), des cétones (menthone, B-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d'a-terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc [20].

I.5.2.Composés aromatiques :

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés dans les HEs est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane [19];[14]. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les HEs d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc. [14].

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple

: Thymus à thymol, à geraniol, à carvacrol, à linalol), et parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement; On l'appelle composé majoritaire [21].

I.1.6.Facteurs influençant la composition chimique des HEs

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant divers facteurs : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes la partie utilisée de la plante, méthode d'extraction [22].

I.1.1.7 .Techniques d'extraction d'huiles essentielle :

Les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte des caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante. Basée sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques seront présentées selon le principe sur lequel elles sont basées [23].

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le « type » d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation, comme il est représenté dans la (**Figure I.4**) [23].

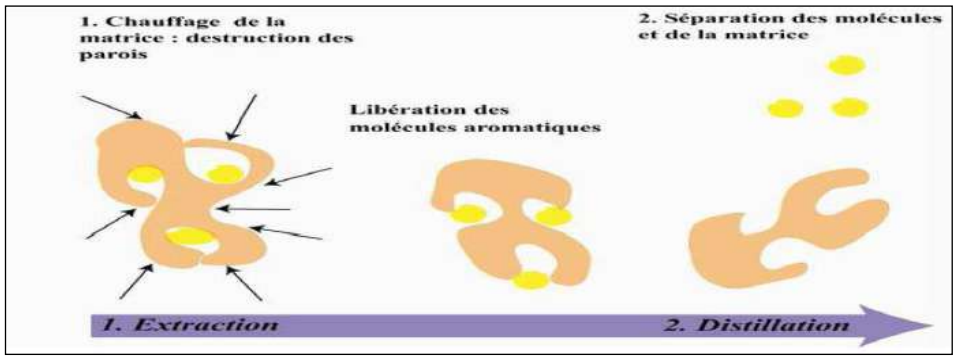


Figure I.4: Les étapes d'extraction des huiles essentielles

I.1.7 .1 Hydro-distillation :

Mot composé de hydro- en grec « eau » et de -distillation qui vient du latin *stilla*,« goutte » et de *distillare*(latin savant), « tomber goutte à goutte ». Ce procédé d'extractiondate de l'époque de la révolution industrielle (au XIXe siècle). Dans ce cas, le matériel végétal est en contact direct avec l'eau (**Figure I.5**). Le procédé consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un récipient rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [24]. Parfois un additif ionique est ajouté, il s'agit souvent de NaCl qui permet d'augmenter la force ionique de l'eau et donc d'obtenir un meilleur rendement en huile essentielle [25].

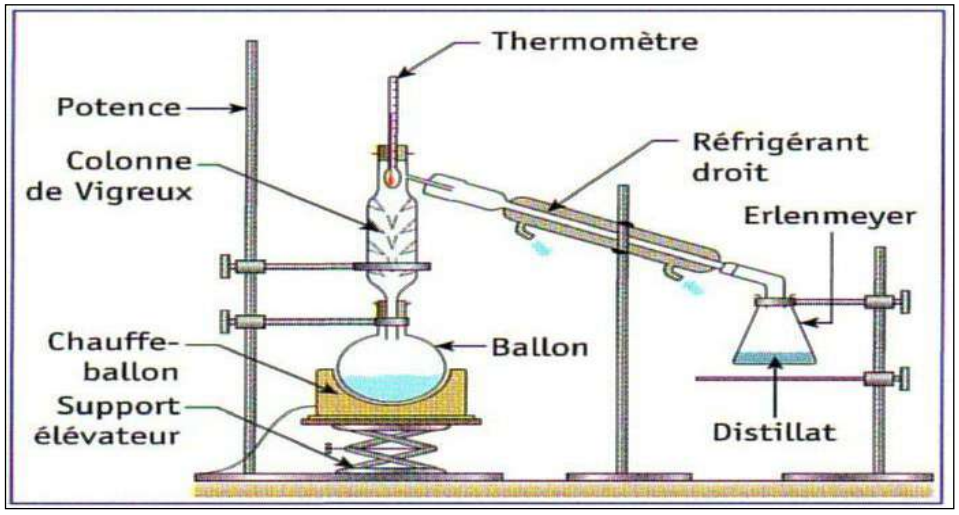


Figure I.5 : Extraction des huiles essentielles par hydro-distillation [26].

L'alambic traditionnel utilisé dans les ateliers artisanaux et les ménages (**Figure I.6)** a pour inconvenient la non métrise de la température du récipient contenant le mélange (eau matériel végétal), ce qui peut modifier la couleur, l'odeur et/ou la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation [27].



Figure I.6 : Alambic traditionnel [26].

Cette technique est généralement indiquée pour les huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants.

Lors de la distillation des huiles essentielles plusieurs phénomènes sont à la base d'échange de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de l'huile essentielle [28].

La durée de distillation est un outil intéressant pour obtenir une composition souhaitée d'huile essentielle [27] ; La durée d'extraction optimale est celle qui correspond à la durée minimale permettant d'extraire toutes les fractions, c'est-à-dire une durée qui se termine dès que la rentabilité de l'extraction commence à diminuer. Les expérimentations montrent que la durée de distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées. Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des huiles essentielles pouvant être superficielles ou internes [29].

I.1.7.2.Entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous

l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (huile essentielle). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et lesmolécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [23]. **Figure I.7**

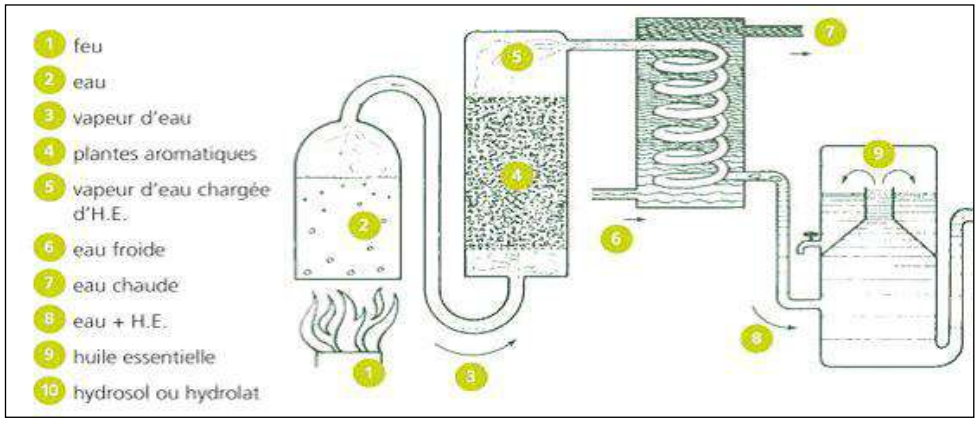


Figure I.7 : Appareillage de l'entrainement à la vapeur d'eau.

I.1.7.3. 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. [**30]**

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 entre coupées par des étapes de refroidissement. Après, une étape de séparation par centrifugation, les échantillons étaient directement injectés sur colonne chromatographique. Golmakani et al. [31] Ont mis en évidence les avantages de l'hydro distillation 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 **(Figure I.8).**

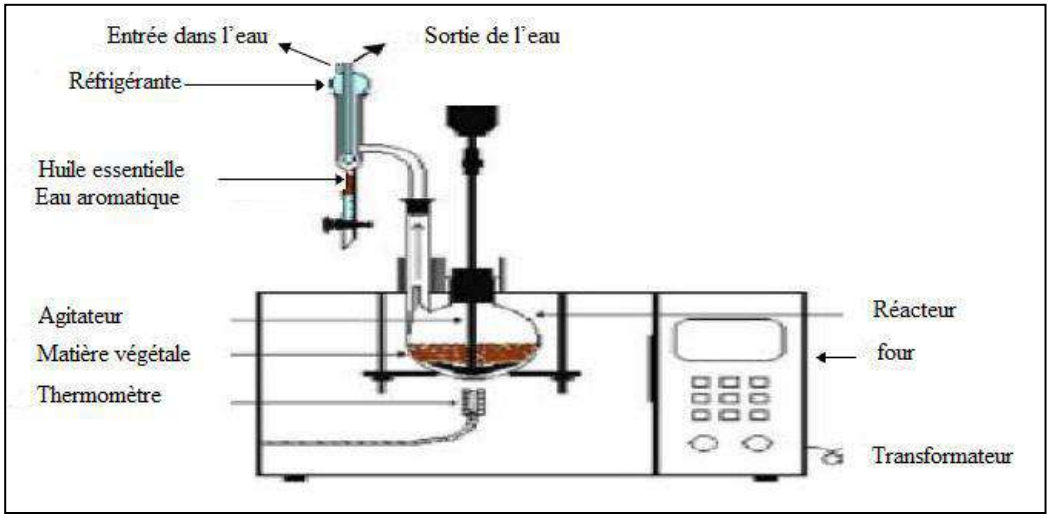


Figure I.8: Montage d'extraction par micro-ondes. [32]

I.1.7.4. Extraction par CO_2 super critique :

L'appareil permet d'émettre en contact le matériel végétal et le CO_2 (est le fluide le plus employé pour l'extraction de matières premières aromatiques) et de varier les conditions de CO_2 ; Température et de pression pour que ce fluide agisse tantôt comme un gaz (viscosité, diffusion), tantôt comme un liquide (densité, pouvoir de solubilisation). Les composés solubles seront alors extraits et séparés (**Figure I.9**). On ajuste donc ces paramètres selon la nature des produits que l'on veut extraire, ce qui nous permet d'être très sélectif et d'obtenir les différents constituants de manière séquentielle. Précisons que cette technologie est celle qui altère le moins l'extrait végétal .Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- Le CO_2 est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et de bon marché, On utilise des basses températures pour la mise en œuvre.

- En fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO_2 à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse.

- Les frais de fonctionnement, à l'échelle pilote ou de laboratoire, sont réduits (le CO_2 est continuellement recyclé).

- L'extraction au CO_2 supercritique est une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante que la

vapeur d'eau). Cependant son installation industrielle reste coûteuse et l'appareillage est encore envahissant [33].

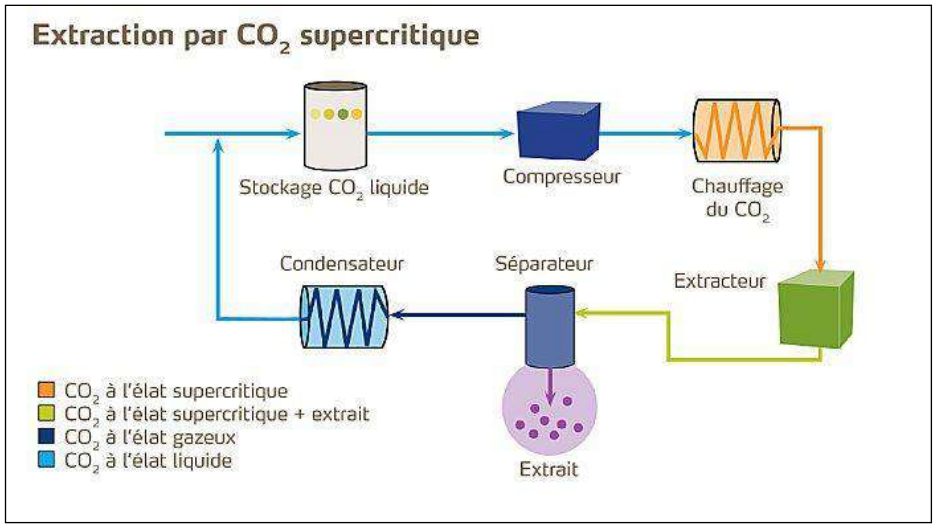


Figure I.9 : Appareillage d'extraction avec fluide supercritique (CO_2).

I.1.7.5.Extraction par Soxhlet:

Il s'agit d'une extraction solide-liquide réalisée dans un appareil qui porte le nom de son inventeur : Franz vonSoxhlet. Cet extracteur est constitué d'un corps en verre dans lequel est placée une cartouche poreuse en cellulose, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction. Le montage se compose d'un ballon contenant le solvant d'extraction, surmonté d'un extracteur dans lequel est insérée la cartouche contenant la matière solide végétale, généralement sous forme de poudre. Un réfrigérant, qui joue le rôle de reflux, est adapté au-dessus de l'extracteur. Dans le ballon, le solvant est maintenu en ébullition constante, grâce à un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide contenu dans le ballon et non de vapeurs pures de solvant. Quand le ballon est chauffé, celles-ci passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le cycle peut alors recommencer et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles. [34].

Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale .Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides [35], ou de divers autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes et aux ultra-sons [36].

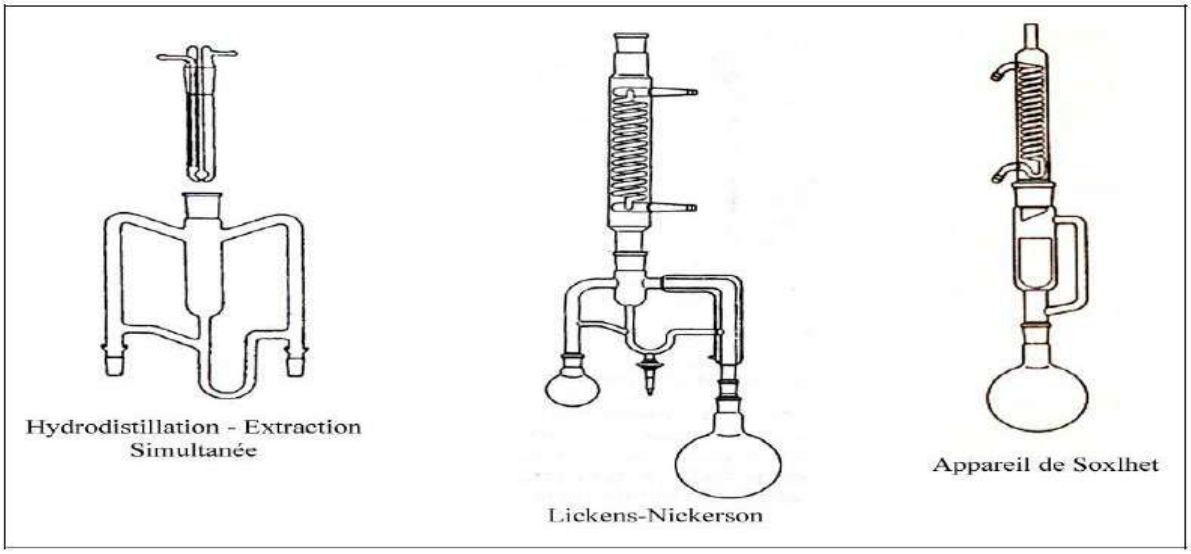


Figure I.10 : Différents types d'extraction par solvants volatils. [37]

I.1.7.6.Détente instantanée contrôlée (DIC) :

Cette méthode d'extraction est née des études théoriques menées par le Professeur Allaf (1989) sur l'expansion par extrusion et suivies de travaux expérimentaux.La Détente Instantanée Controlée (DIC) est fondée sur une chute abrupte de pression vers le vide à la suite d'un traitement thermique de courte durée ; la DIC comporte donc les étapes suivantes :

-Elévation de température & pression : Il s'agit de porter une substance à une température comprise entre 100°C et 120°C tout en élevant la pression généralement jusqu'à 4 ou 5 bars pendant quelques secondes seulement.

- Chute abrupte vers le vide : Après une phase de stabilisation, le vide est fait dans la chambre du réacteur DIC. C'est sous l'effet de cette depression vers le vide que la structure moleculaire de la substance est modifiée ; le résultat visible est une expansion de la substance traitée, par effet de 'puffing'.

- Retour à la pression et à la température ambiante.[38].

Des brevets ont été déposés et de nombreux travaux ont mise en œuvre cette innovation Technologique. Son l'utilisation s'est avérée efficace et présente un large spectre de potentialités dans de nombreux domaines d'activités. On citera notamment ses applications pour la préservation du bois archéologique. l'étuvage du blé, le séchage, la débactérisation , la texturation l'amélioration de l'extraction entre autres des produits lourds tels que les flavonoïdes [39]; des composés volatils à partir de la matière végétale et ce pour divers organes tels que les grains [40], les fleurs le bois les feuilles ou les zestes des agrumes [41].

I.1.8.Méthodes d'analyse des huiles essentielles :

De manière schématique, deux démarches analytiques se distinguent en fonction de l'objectif recherché. La première est l'analyse structurale qui consiste a élucidé la structure d'une molécule qui n'a encore jamais être décrite dans la littérature. La seconde est d'identifier et de quantifier un produit déjà connu et dont les caractéristiques spectrales sont répertoriées.L'analyse structurale nécessite la purification préalable du compose par des distillations fractionnées ou par différentes techniques chromatographiques (CCM, CC, CLHP, CGP) permettant d'obtenir une quantité suffisante de produit pur afin de réaliser une étude spectroscopique complète par Spectrométrie de masse (SM), Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), Ultra-violet (UV) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN-1H et RMN-13C, RMN bidimensionnelle) [42], A partir de la combinaison de ces méthodes complémentaires, il est possible d'établir avec une certitude suffisante la structure de la molécule du constituant inconnu.

I.1.8.1.Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composes gazeux ou susceptibles d'être vaporises par chauffage sans décomposition [43]. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants a partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalises dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribue à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, a température constante (indice de Kováts) [44] ; ou en programmation de température (indices

de rétention) [45] Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse a l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes. Les indices de rétention polaire (Ir p) et apolaire (Ir a) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales [46], ou répertoriés dans la littérature. Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Les variations les plus importantes sont observées lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire avec ceux de la littérature, particulièrement pour ce qui concerne la colonne polaire [47]. Dans le domaine des huiles essentielles, il a été montré que 230 sesquiterpènes de même masse moléculaire présentent des indices de rétention compris dans un intervalle de seulement 300 unités [45]. Il s'ensuit une grande incertitude dans l'identification des constituants. De plus, les nombreux cas de coélution montrent que la comparaison des indices de rétention et même la méthode des surcharges ne suffisent pas à identifier formellement un composé. Le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les huiles essentielles [48]. Ainsi, la CPG bidimensionnelle (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés plusabondants. L'échantillon est injecte dans une pré-colonne, puis les composés qui coeluent sont transfères dans une deuxième colonne pour être sépares.

L'efficacité de cette méthode est illustrée par Marriott et coll. [49] qui ont appliqué la CPG bidimensionnelle à l'étude d'une huile essentielle de vétiver (*Vetiveriazizanioides*). L'utilisation de colonnes chirales en CPG bidimensionnelle permet l'analyseenantiomerique des constituants d'un mélange complexe. Dans de nombreux cas, la détermination de la distribution énantiomérique est utilisée pour la détection d'adultérations dans les aromes [50], [51]. Enfin, la GPG/CPG chirale a être utilisée par könig et coll [52]. pour identifier le (-)-d-amorphène dans une huile essentielle de vétiver.

Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM, IRTF) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification (**Figure I.11**).

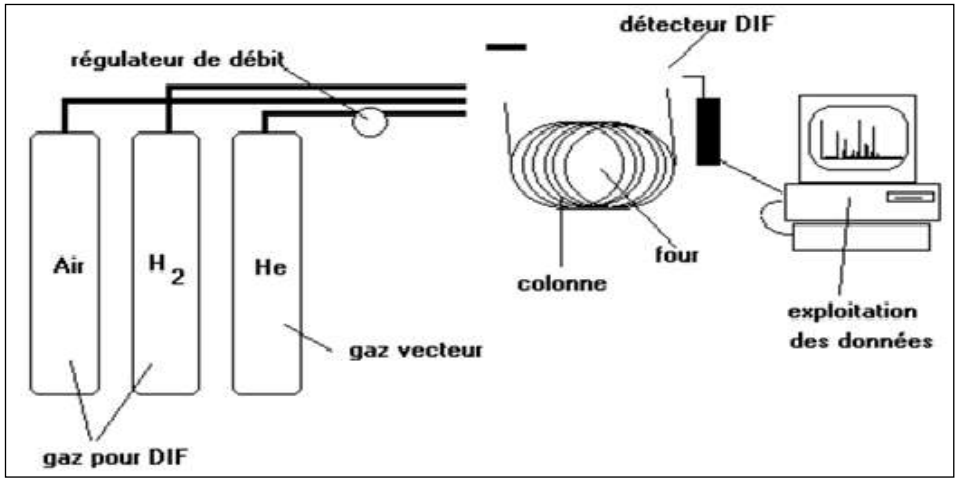


Figure I.11: Appareil de CPG avec ionisation de flamme.

I.1.8.2.Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) :

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques. D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (IE), dit CPG/SM-(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales [53].

I.1.8.3.Résonance magnétique nucléaire RMN :

La RMN permet de sonder la structure moléculaire en faisant interagir l'aimantation naturelle des noyaux avec un champ magnétique. En RMN, l'interaction entre le noyau atomique et le champ magnétique est quantifiée et seule une fréquence particulière (appelée

fréquence de Larmor) permet cette interaction. Cette fréquence dépend du type de noyau observé (proton, carbone, azote, etc.), mais aussi de l'environnement chimique de ce noyau, c'est-à-dire des autres noyaux présents autour, et des électrons impliqués dans la liaison chimique. La fréquence de résonance permet donc de remonter à la structure de la molécule.

La résonance magnétique nucléaire est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé [54].

I.1.9.Activités biologiques des huiles essentielles:

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydants des huiles essentielles des plantes aromatiques [6].

I.1.9.1.Activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants [6]

I.1.9.2.Activité antioxydant :

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques. Les effets antioxydants d'huiles essentielles

et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique. [6]

Les huiles essentielles de Canelle, Muscade, Clou de girofle, Basilice, Origan et Thym possèdent de puissant composes antioxydants. Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrice et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes. L'activité antioxydante est également attribuable à certains alcools, cétones et aldéhydes monoterpéniques [55].

I.1.9.3.Activité anti inflammatoire:

Activité anti inflammatoire des substances naturelles Sur le marché, la plupart des médicaments anti inflammatoires sont chimiquement fabriqués, bien que ces médicaments soient assez puissants, l'administration à long terme entraîne des effets secondaires comme l'intolérance gastrique. C'est dans cette lumière que les remèdes naturels à partir des végétaux, tel que certains composés d'huiles essentielles qui ont un effet anti inflammatoire similaire à celui des médicaments de synthèses avec très peu d'effets secondaires, l'efficacité et la sécurité prouvées sont recherchées comme substituts pour les traitements chimiques.[56]

I.1.9.4. Autre activités :

Les huiles essentielles possèdent aussi des propriétés :

-Régulatrice du système nerveux : anxiolytique, antispasmodique et analgésique.

-Drainante respiratoire : expectorante et fluidifiante

-Cicatrisante

-Anticancéreuse : prévention et suppression du cancer [55,57]

I.1.10.Toxicité des HEs :

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques [58]. Par

leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe [59].

Les huiles essentielles de *Citrus* sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photosensibilisantes. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus limon* extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique [60].

I.1.11.Domaines d'application des huiles essentielles :

I.1.11.1.Pharmacologie :

De nombreuses HE se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produit pharmaceutique : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, le thym, la menthe et autres. [61].

I.1.11.2. Aromathérapie :

En stimulant le système nerveux, les arômes des HE lancent un ordre d'autorégulation. Plus précisément, l'aromathérapie prépare le corps à lutter contre la maladie en stimulant le réflexe d'auto-guérison et en modifiant la structure chimique des liquides corporels (la salive, le sang, la lymphe). Les HE ont également une influence sur les sécrétions hormonales, sur l'équilibre endocrinien et sur les réactions neurovégétatives corporelles [62].

I.1.11.3 Industries agroalimentaires :

Plusieurs segments alimentaires utilisent, à degrés divers, les HE qui leur offrent un formidable potentiel de leurs notes aromatiques dans un registre infiniment varié. On les retrouve presque dans tous les secteurs alimentaires: boissons non alcoolisées, confiseries, produits laitiers, soupes, sauces, produits de boulangerie, produits carnés…etc. [61].

Cependant, c'est seulement récemment que beaucoup d'attention a été donnée à l'application potentielle d'HE comme conservateurs et ceci est dû à la présence dans ces dernières de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes [63].

I.2VITAMINE C (ACIDE ASCORBIQUE) :

I.2.1. Définition et structure :

La vitamine C, acide L-ascorbique, est un composé organique hydrosoluble, très répandue dans le monde vivant. Elle fût découverte pour la première fois au 18e siècle lors d'un voyage maritime. Les matelots étaient atteints d'une très grave maladie : le scorbut, caractérisé par l'apparition de douleur osseuse, d'hémorragie gingivale et une forte anémie. Un médecin de la marine anglaise, James Lind démontra l'efficacité de quelques gouttes de jus de citron ou d'orange dans le traitement préventif et curatif du scorbut. Cette maladie est en effet dû à une carence prolongée en vitamine C. En 1928, « l'acide ascorbique » fût isolé du jus de citron, par le biochimiste hongrois, Albert SzentGyörgyi qui reçut un prix Nobel pour sa découverte.

De formule chimique générale C6H8O6, la vitamine C appartient aux groupes des sucres à 6 atomes et est un dérivé du D-Glucose. Elle est composée d'une fonction cétone, d'un cycle lactone, d'une fonction ène-diol et de deux fonctions alcools : l'une primaire et l'autre secondaire. L'AA possède deux formes optiques : lévogyre et dextrogyre, mais seule la forme lévogyre, forme naturelle (acide L-ascorbique) est biologiquement active [64].

La vitamine C peut être extrait de la nature ou créé par voie de synthèse à partir du D-Glucose.

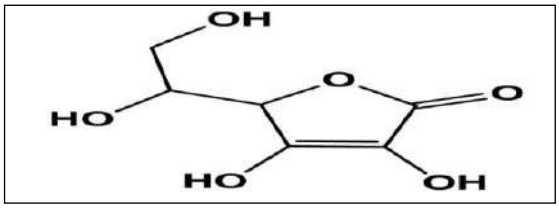


Figure I. 12 : Structure de l'acide L-ascorbique.

Le Tableau (I.2) représente les Propriétés physiques et chimiques de l'acide L-ascorbique :

Tableau.I.2 : Propriétés physiques et chimiques de l'acide L-ascorbique

Aspect	**Masse moléculaire**	**Densité**	**Point d'ébullition**	**Solubilité dans l'eau**	**Constante de dissociation**	**Pouvoir rotatoire**
Solide blanc	176.124 g/mol	1.65 g/cm à 20 °c	191 °c	333.0g/l à 20 °c	Pka_1=4.1 Pka_2=11.8	[αD]=+21° dans l'eau

D'autres noms de la vitamine C : 3-keto-L-gulfuranolactone ; 3-oxo-L-gulofuranolactone ; Acide ascorbique ; L(+)-ascorbicacid ; L-3-ketothreohexuronic acid lactone ; L-ascorbicacid ; L-lyxoascorbicacid ; L-treo-hex-enonicacid, gamma-lactone ; L-xyloascorbicacid ; VitaminE C ; Xyloascorbicacid, L- ; (5R)-5-[(1S)-1,2-Dihydroxyéthyl]-3,4-dihydroxy-2(5H)-furanone

I.2.2. Propriétés chimiques :

L'acide ascorbique est un composé cristallisé, une poudre blanche, inodore et de saveur acide. Il est stable à l'état anhydre (sous forme réduite), à l'abri de l'humidité, de la lumière et s'assombrit progressivement lorsqu'il est exposé à celle-ci. La Vitamine C est très hydrosoluble, peu soluble dans l'alcool et les polyols et insoluble dans l'éther et le chloroforme [65].

L'AA est un réducteur très puissant et possède de ce fait un pourvoir antioxydant, qui est au centre de son activité biochimique. En solution aqueuse, il est sensible à la présence de métaux, d'alcalins, d'oxygène dissous et à la lumière, il se place alors sous sa forme oxygénée. Sa vitesse d'oxydation dépend du pH, de la température et de la nature des métaux présents.

Sa structure est composée d'une fonction ène-diol en C2, celle-ci est très sensible à l'hydrolyse. Elle est responsable de l'acidité de la molécule et de son pouvoir antioxydant. L'acide déhydroascorbique est obtenu par hydrolyse ou oxydation de cette fonction [65].

La réaction entre la forme réduite et oxydée de l'acide ascorbique est réversible selon le mécanisme suivant (Figure I.13):

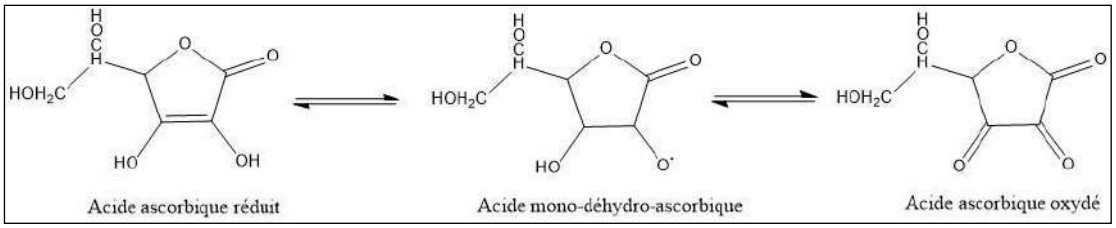


Figure I.13 : Représentation du système rédox : acide ascorbique, radical ascorbique libre et acide déhydroascorbique.

L'acide déhyroascorbique peut subir une hydrolyse irréversible formant l'acide dicétogulonique (acide 2,3- dicétogulonique). Celui-ci se dégrade très rapidement conduisant après décarboxylation et déshydratation à l'acide hydro-3 pyrone-1,2 et à l'acide furoïque, [66].

I.2.3. Dérivés de la vitamine C :

L'acide ascorbique est un composé instable en solution aqueuse. En effet sous forme ionisé, il s'oxyde facilement et est donc difficile à formuler. « Plusieurs précautions peuvent être prises : l'exclusion de l'oxygène durant la formulation, un packaging imperméable à l'oxygène, un faible pH, une quantité minimale d'eau, et l'ajout d'électrolytes et autres antioxydants. » [67].

Les dérivés de l'AA sont des molécules plus stables et donc plus facile à formuler, ce sont des esters de deux types :

- liposolubles (palmitate d'ascorbyle, stéarate d'ascorbyle) caractérisés par une couleur jaunâtre

- hydrosolubles (phosphate d'ascorbyle, l'ascorbyle phosphate de magnésium, le glucoside d'ascorbyle, le glucosamine d'ascorbyle et magnésium ascorbyl PCA) caractérisés par une couleur blanche comme l'AA [64].

I.2.4.Applications :

- **Voie orale** : alimentation et compléments alimentaires : Il est recommandé un apport journalier (AJR) de 60 mg pour un adulte et de 45-60 mg pour un enfant. La dose minimale est de 10 mg par jour afin d'éviter le scorbut. Les besoins en vitamine C sont augmentés chez les sportifs au cours d'infections, de stress ou de fatigue physique et intellectuelle, et également pour les femmes enceintes, allaitant et les fumeurs autour de 100 mg. [68].

- **Voie topique** : produits cosmétiques :

- Anti-oxydante : protège la peau contre les dommages créés par les radicaux libres.

- Anti-âge : stimule la synthèse de collagène

- Eclaircissante : inhibiteur de la tyrosinase, inhibition de la mélanogenèse (Le processus de pigmentation de la peau).

-Effet de l'AA sur la cicatrisation et micro-circulationcutannée: l'ingestion d'acide ascorbique améliore fortement la cicatrisation

-Action sur la production des kératinocytes : diminution de l'épaisseur de la couche cornée. [68].

I.3 .Emulsification

I.3.1. Définition :

Une émulsion est une dispersion de gouttelettes d'une phase liquide dans une autre, les deux phases étant non miscibles. On distingue donc une phase dispersée (discontinue) et une autre dispersante (continue). La persistance de l'état dispersé est assurée par la présence d'un composé stabilisant, en général un agent de surface appelé surfactif ou tensio-actif [69]. Il s'agit d'un système thermodynamiquement instable [70]

On parle d'émulsion directe dans le cas d'une émulsion d'huile dans l'eau (H/E ou O/W pour oil in water), la phase huileuse étant dispersée dans la phase aqueuse. Dans le cas contraire on parle d'émulsion inverse. On peut également trouver des émulsions multiples (H/E/H ou E/H/E).[69]

I.3.2. Classification des émulsions :

I.3.2.1 En fonction de la nature des phases dispersées :

Il existe plusieurs types d'émulsions selon la dispersion des phases aqueuses et huileuses (Figure I.14).

Les émulsions simples sont appelées eau-dans-huile (E/H)(ou bien hydrophile / lipophile) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) (lipophile/hydrophile) pour l'inverse.

Les émulsions multiples sont symbolisées par h/E/H ou e/H/E; h (respectivement e) indique la phase la plus interne et H (respectivement E) indique la plus externe. Les phases h et H ou e et E peuvent être identiques ou différentes.

Les biémulsions sont des émulsions contenant deux différentes phases internes de gouttelettes, soit de même nature (mais de taille différente), soit de nature différente (quelque soit la taille). [71]

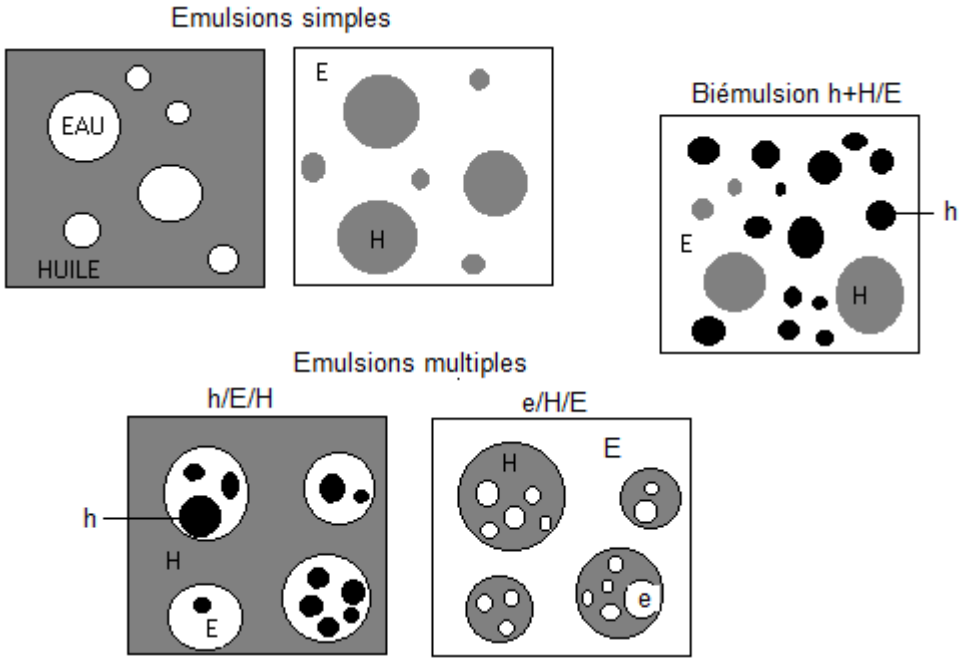


Figure I.14: Les différents types d'émulsions [71]

I.3.2.2 En fonction de la taille des gouttelettes

***Les macroémulsions ou émulsions:** Le diamètre moyen de ces émulsions classiques est supérieur ou égal au micromètre. Compte tenu de leur taille, et en fonction de la viscosité de la phase continue, les gouttes des émulsions sédimentent (ou crèment) sous l'effet de la

gravité. Les émulsions sont des systèmes instables du point de vue thermodynamique, car la séparation des deux phases conduit à une diminution de l'énergie libre. Cependant, la cinétique de grossissement de gouttes peut être suffisamment retardée pour que l'émulsion reste stable pendant une durée déterminée [69].

*__Les nano/mini émulsions:__ ces deux termes sont utilisés pour nommer des systèmes biphasiques, de taille de gouttes comprises entre 20 et 200 nm. En raison de la taille des gouttes, les nanoémulsions sont transparentes ou translucides à l'oeil et sont stables à la sédimentation ou au crémage. La préparation des nanoémulsions exige soit l'utilisation de méthodes hautement énergétiques, comme la microfluidisation, ou bien l'utilisation de méthodes non conventionnelles et complexes, mais de faible consommation énergétique, comme l'inversion de phase. L'avantage des miniémulsions est leur extraordinaire stabilité au vieillissement et à la dilution [69].

*__Les microémulsions :__ ce terme est utilisé aujourd'hui pour désigner un système monophasique dans lequel un tensioactif particulièrement performant rend possible la coexistence, à l'échelle quasi moléculaire, des phases eau et huile. Contrairement aux macro ou nanoémulsions, elles sont thermodynamiquement stables [69].

I.3.3. Caractérisation des émulsions et contrôles physico-chimiques

I.3.3.1 Stabilité: La stabilité d'une formulation revêt plusieurs aspects :

a- Stabilité physique : l'émulsion ne doit pas montrer de démixtion. Une démixtion peut être provoquée par de la coalescence ou par un phénomène de crémage/sédimentation (la phase continue apparaît mais la phase interne peut être redispersée). La stabilité physique inclut aussi une invariance du comportement rhéologique et de la granulométrie [72]

b-Stabilité chimique : aucun des composants de l'émulsion ne doit participer à une réaction chimique pouvant soit modifier de manière grave la stabilité physique, soit perturber les propriétés applicatives (aspect, couleur, odeur, efficacité) [72].

c-Stabilité microbiologique : la formulation ne doit pas être un milieu de culture pour levures, moisissures et germes bactériens, au risque de se dégrader (modification de viscosité, de couleur, d'odeur, démixtion), mais surtout pour éviter tout problème applicatif. Chaque fois que la santé publique est concernée (domaines alimentaire, cosmétique, pharmaceutique), la réglementation impose des normes microbiologiques strictes. La stabilité microbiologique est obtenue par une sélection rigoureuse de conservateurs [72].

Différents mécanismes de rupture de la stabilité existent, ils peuvent être réversibles ou irréversibles (voir figure I.15) :

- **Sédimentation et crémage :**

Ce mécanisme résulte de la différence de densité entre phase dispersée et 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. C'est un phénomène réversible : l'interface existe toujours, il suffit d'agiter pour revenir à l'émulsion. Pour limiter ce phénomène, on a plusieurs possibilités :

- Réduire la taille des gouttes de phase dispersée,
- Ajouter un agent qui augmente la viscosité,
- Diminuer la différence de densité entre les deux phases,
- Eviter l'agrégation des gouttes [71].

- **Floculation :**

Ce mécanisme résulte de l'agrégation des gouttelettes due aux interactions attractives. 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 et irreversible dans le cas contraire. Pour éviter ce phénomène, il faut :

- Eviter le crémage et la sédimentation (car ces phénomènes mettent les gouttes en contact),
- Augmenter les répulsions stériques et électrostatiques (en utilisant des tensioactifs ioniques par exemple) [71]

- **Coalescence**

Ce mécanisme, irréversible, résulte de la rupture du film interfacial entre les gouttes de la phase dispersée. À terme on revient au système diphasique de départ. C'est un processus énergétiquement favorable . Pour éviter ce phénomène, il faut :

-Prévenir la floculation,

-Renforcer la résistance du film par le choix du tensioactif [71].

- **Murissement d'Ostwald ou diffusion moléculaire**

Le mûrissement d'Ostwald correspond à la diffusion des petites gouttes de la phase dispersée vers les gouttes les plus grosses. Ce phénomène irréversible peut être évité par:

- Monodispersion de la population de gouttelettes,

- Diminution de la solubilité en ajoutant du sel dans une émulsion E/H ou un soluté apolaire de masse molaire élevée pour une émulsion H/E,
- Tensioactifs faisant barrière à la diffusion de molécules de la phase dispersée [71].

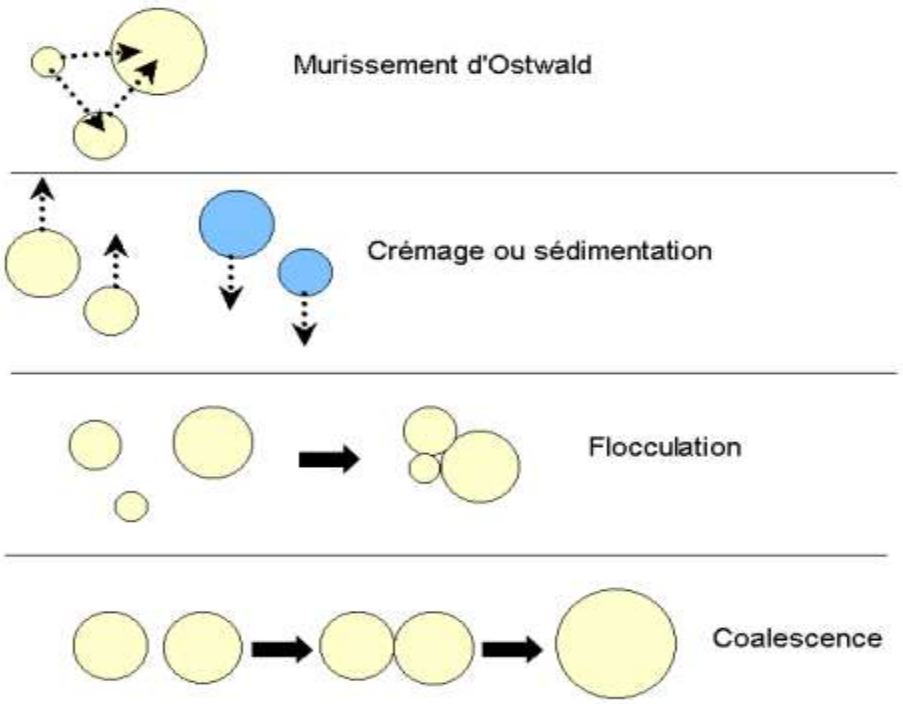


Figure I.15: Processus de déstabilisation d'une émulsion [69].

- **Inversion de phases**

C'est un phénomène irréversible qui se traduit par un brusque changement du sens de l'émulsion [73]. Il est possible de provoquer l'inversion d'une émulsion en augmentant la fraction volumique de phase dispersée, on parle ici « *d'inversion catastrophique ».* Les émulsions peuvent aussi s'inverser par modification de température, ce qui change la valeur de la « balance » hydrophile-lipophile (HLB) du tensioactif stabilisant. Ce type d'inversion apparaît avec les systèmes formulés avec des surfactifs non-ioniques (exemple polyoxyde d'éthylène ; HLB élevé)La température à laquelle se produit l'inversion s'appelle PIT (Phase Inversion Temperature) et s'utilise pour caractériser ce type de tensioactif [70].

L'inversion de phase se produit en deux étapes:

- Floculation généralisée
- Coalescence généralisée

- **Bottle test**

Le test de l'ampoule ou bottle test consiste à observer le comportement d'une émulsion au cours du temps, à une température donnée. Ce test reproduit le vieillissement naturel de la formulation, sa mise en oeuvre est simple, mais le temps nécessaire à l'obtention d'un résultat peut être long. Cette technique est donc mieux adaptée à un travail de développement plutôt qu'à une procédure de contrôle post-fabrication.

Une autre technique utilisée pour mesurer la stabilité d'une émulsion est le vieillissement accéléré, réalisable par deux méthodes :

- Le vieillissement en enceinte climatique fait subir aux émulsions des cycles de chaud-froid répétés ;
- La sédimentation forcée reprend le principe du « bottle test » mais en utilisant une centrifugeuse pour accélérer la sédimentation [69].

I.3.3.2 Sens de l'émulsion :

La nature de la phase externe, et par conséquent le type d'émulsion, peuvent être détectés par différentes techniques, notamment par des expériences de dispersibilité d'un petit volume d'émulsion dans une phase aqueuse ou huileuse. La nature de la phase externe peut aussi être déterminée par des mesures de conductivité. En effet, dans la majorité des cas, l'eau, contrairement à l'huile, contient un électrolyte. La conductivité de la phase aqueuse est donc 100 à 1000 fois plus élevée que celle de l'huile. La valeur de la conductivité d'une émulsion dépendant de sa phase externe, il est donc relativement facile de déterminer si l'émulsion est de type E/H ou de type H/E. La détermination de la phase externe est d'une importance capitale dans l'interprétation des phénomènes, notamment pour détecter l'inversion de phase au cours d'un procédé d'émulsification. De plus, pour une émulsion multiple de type e/H/E, il est possible de déterminer le pourcentage de phase interne grâce à ce type de mesure [69].

MATERIELS ET METHODES

II. Matériels et méthodes

II.1.Introduction

Ce travail a été effectué au niveau des laboratoires du hall technologique de l'université de Médéa et au niveau de groupe Saidal de Médea. Il consiste à encapsuler les huiles essentielles (HEs) d'orange par la technologie d'émulsification de type H/E,à base de pectine avec et sans acide ascorbique.

Pour ce faire, nous avons suit les points suivants :

- Extraction des huiles essentielles à partir des écorces de *Citrus sinensis* (orange douce) par hydrodistillation
- Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites.
- Formulation des émulsions d'HE d'orange à base de pectine hautement méthylé avec et sans acide ascorbique
- Etude de l'activité biologique y compris l'acticité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire des huiles essentielles seules et en émulsion.

II.2.Produits et matériels utilisés

II.2.1Produits 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

II.2.2.Appareillages utilisés

- Balance
- Homogénéiseur : Ultra –Turrax de type IKA®
- Agitateur
- Spectroscopie UV-Visible
- pH mètre

- ❖ Conductimètre
- ❖ Microscope optique
- ❖ Etuve
- ❖ Centrifugeuse

II.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.

II.2.4.Les souches testées

La détermination du pouvoir antibactérien a été fait sur des souches de référence tels que:

- ✓ *Staphylococcie aureus*
- ✓ *Bacilles subtils*

II.2.5.Materielvegetal:

La matière végétale utilisée dans cette étude sont des écorces des fruits d'orange, Les fruits ont été soigneusement lavés, et le zeste (épicarpe d'agrume) a été récupéré à l'aide d'un économe (Figure I.1)



Figure II.1: Zeste d'orange.

II.3.Méthodes

II.3.1.Extraction des huiles essentielles

II.3.1.1.Procédure d'extraction

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation.Cette technique consiste à imprégnerla matière végétale (dans notre cas l'épicarpe frais de l'orange) dans une quantité d'eau distillée suffisante, le mélange est porté à ébullition jusqu'à 1 h après obtention de la première goutte d'huile essentielle. La vapeur d'eau produite entraine les constituants volatiles, qui après condensation dans le réfrigérant sont recueillis dans un erlenmeyer.

Le montage expérimental utilisé pour le procédé d'hydrodistillation est représenté sur la figureI.2.

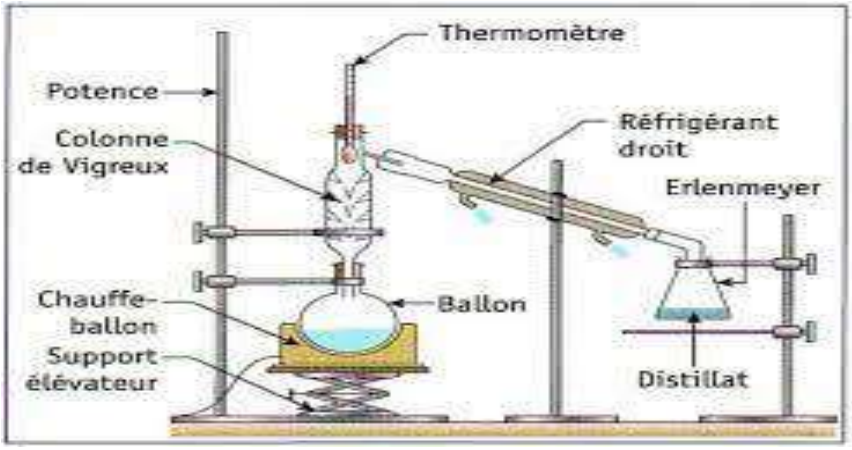
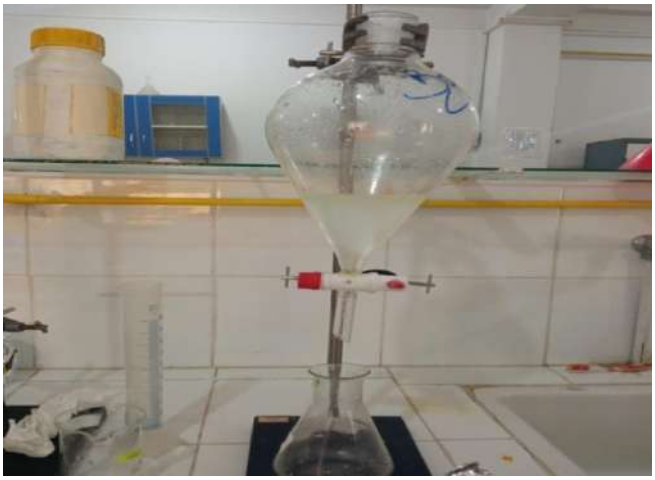


Figure II.2: Montage d'hydrodistillation.

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'HE se séparent par différence de densité(Figure II.3).



FigureII.3 : Décantation.

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°C), à l'abri de la lumière dans un flacon en verre, hermétiquement clos pour éviter toute dégradation. Une huile altérée perd son activité biologique.

II.3.1.2.Rendements des HEs

Le rendement en HE est le rapport entre de poids de l'HE extraite et le poids de la biomasse végétale utilisée. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R\ (\%) = (m_{HE}/m_{MV})* 100 \qquad \textbf{(II.1)}$$

Où m_{HE} est la masse de l'huile essentielle en gramme, m_{MV} est la masse de la matièrevégétale en gramme.

II.3.2.Formulation des émulsions d' HEs d'orange

II.3.2.1.Protocole expérimental

Des émulsions de type H/E ont été préparées selon les étapes suivantes :

1. Préparation de la phase aqueuse par la dissolution complète de la pectine dans un mélange eau : glycérol (1 :2 m/m) additionnée d'un acide ascorbique (0 et 1%), sous une agitation continue à température ambiante (figure II.4)

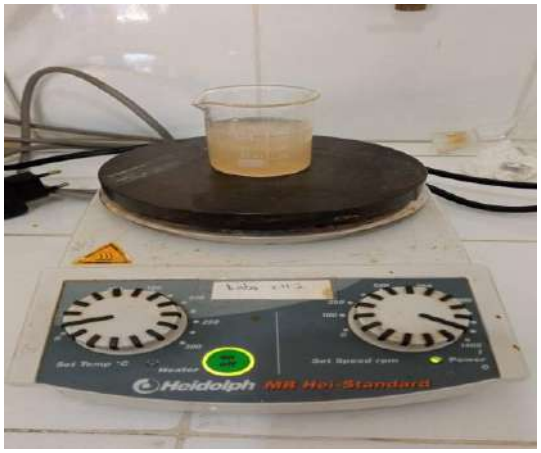


Figure II.4 : Préparation de la phase aqueuse

2. Incorporation de 4% d'HE d'orange dans la phase aqueuse goutte à goutte sous agitation continue par un agitateur à hélice.

3. Le mélange à été homogénéisé par un Ultra Turax avec une vitesse de 1500 tr/min pendant 15 min (voir figure II.5)

Les concentrations (en%) en chaque constituant sont données dans le Tableau II.1.

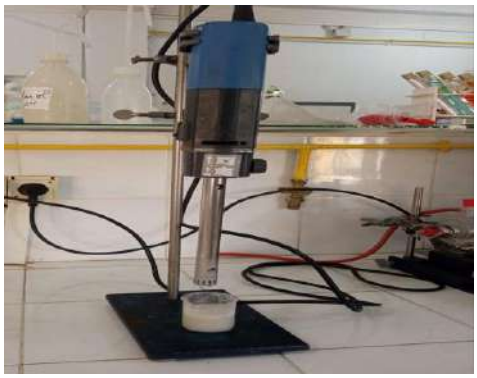


Figure II.5 : Dispositif d'homogénéisation par Ultra Turax

L'effet de l'acide ascorbique sur la stabilité et les propriétés inhérentes des émulsions a été étudié par addition de différentes concentrations d'acide ascorbique (0 et 1%)dans la phase continue, recouverte avec différentes quantités de pectine.

Tableau II.1 Différents constituants des émulsions d'HE formulés

Formulations / Constituants	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Pectine (%)	2	2.5	3	3.5	4	4.5
Phase aqueuse (%)	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp	Qsp
Huile (%)	4	4	4	4	4	4

II.3.2.2.Caractérisations physicochimiques des émulsions préparées

a. Suivi visuel de la stabilité

Afin de déterminer la stabilité des différentes émulsions formulées, nous avons réalisé un suivi visuel des émulsions au cours du temps. En effet, une fois l'émulsion est formulée, on la répartit dans des tubes à essais. Ces tubes nous permettent de réaliser un suivi visuel dans le temps à l'aide de photographies et de déterminer la stabilité par l'absence des phénomènes d'instabilités (coalescence, floculation…)

b. Examen microscopique

La microscopie optique est une technique très intéressantepour l'étude des systèmes colloïdaux. Dans le cas des émulsions, cette technique permet d'évaluer la taille des gouttelettes, d'estimer leur polydispersité, d'identifier certaines instabilités comme la coalescence ou la floculation.

L'échantillon à analyser est déposé au préalable entre lame et lamelle en verre de façon à obtenir une monocouche d'émulsion. La morphologie des formulations est visualisée à l'aide d'un microscope à contraste de phase (×40) connecté à une caméra digitale, l'ensemble étant contrôlé par un ordinateur, permettant de récupérer les images.(Figure II.6)



Figure II.6 : Microscope

c. Mesure du pH et de la conductivité

Toujours dans le but de caractériser les différences entre les émulsions formulées, une étude physicochimique a été élaborée. Cette dernière consiste en une mesure de pH, et de conductivitéélectrique.

d. Effect de la température de conservation sur la stabilité

Afin de déterminer les conditions de conservation adéquates pour assurer la stabilité physique et chimique des émulsions préparées,les formulations ont été conservées sous une

température ambiante à l'exposition de la lumière et sous une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

e. Sens de l'émulsion par le test colorimétrique

Le test est basé sur la diffusion de colorants en poudre dans un échantillon d'émulsion déposé sur une lame, soit avec un colorant hydrophile (exemple : érythrosine, bleu deméthylène…), ou avec un colorant lipophile (ex : rouge de soudan III, rouge-marron…).

La diffusion du colorant dans les phases respectives de l'émulsion donne la nature aqueuse ou lipophile des phases respectives grâce à une observation au microscope optique.

Exemple : le bleu de méthylène est un colorant aqueux, miscible que dans une phaseHydrophile.

II.3.3.Evaluation de l'activité biologique

II.3.3.1.Activité antimicrobienne

- **Mode opératoire**

Dans des boites contenant 10^8 UFC/ml de culture bactérienne effectuée à la surface de 10 ml de géloseMueller Hinton(MH), des disques imprégnés d'HEs de dose connues sont appliqués à la surface à des distances déterminés (3 à disques/boite).les boites sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h min. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autours de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

- **La lecture**

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

II.3.3.2.Activité antioxydante par 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**[74].**

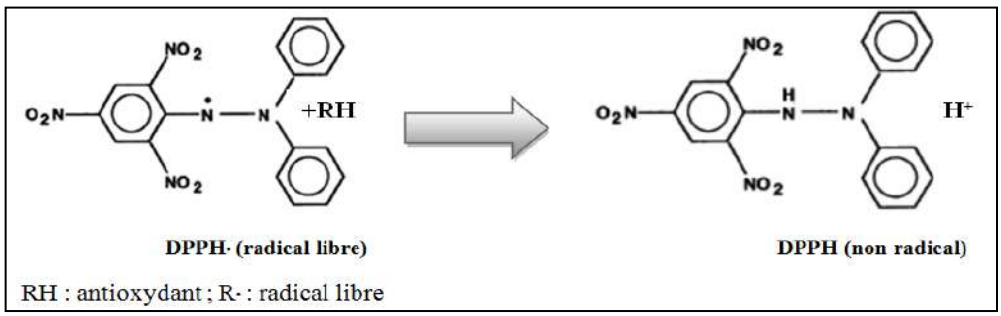


Figure II.7 : Réaction du DPPH• avec un antioxydant**[75].**

- ***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**[76].**

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 :**[74].**

% d'activité antioxydante = [Abs contrôle – Abs échantillon / Abs contrôle] x 100(II.2)

II.3.3.3.Activité anti-inflammatoire

- ***Principe de méthode***

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée in vivo, par la méthode de l'œdème de la patte de rat induit par la carraghénine**[77].**Le principe repose sur l'induction d'un œdème par

l'injection d'un certain volume de carragénine diluée dans la face plantaire de la patte gauche du rat,provoquant ainsi l'œdème dans la région métatarsienne.

La technique d'évaluation de l'œdème consiste à mesurer les variations de volume des pattes gauches et droites au cours du temps et à comparer le développement de l'œdème chez les animaux témoins et références.

- ***Protocole opératoire***

Les rats répartis en 3 lots de 4 souris chacun, ont été pesés puis mis à jeun 16 heures avant l'expérimentation,les animaux reçoivent 5 ml d'eau par gavage pour leur assurer une hydratation optimale et ainsi minimiser les variations individuelles de réponse à l'induction d'œdème. Pour chaque rat, le diamètre initial de la patte postérieure gauche a été mesuré à l'aide d'un Micromètredigital à affichage électronique (pied à coulisse)avant et après l'administration des traitements.

Les différents traitements ont été administrés comme suit :

- Lot 1 (groupe témoin) : constitué d'animaux ayant reçu l'eau physiologique (contrôle négatif)
- Lot 2 (groupe standard) : constitué d'animaux ayant reçu 0.5ml d'une solution de Diclofénac comme anti-inflammatoire(control positif)
- Lot 3 : constitué d'animaux ayant reçu 0.5ml d'huile essentielle d'orange

Trente minutes après l'injection intramusculaire sous abdomendes différentes solutions(voir figure II.10), chaque rat a reçu une injection de de 0.2ml d'une suspension de carrageninepar voie sous cutanée au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte arrière des souris. (Figure II.8)



Figure II.8 : Photographie de l'administration de carragenine.

L'évolution de l'œdème droite a été déterminée avant toute injection puis chaque 15min pendant 1, 2, et 3 heures après l'injection de l'agent inflammatoire, toujours à l'aide d'un Micromètre. (Figure II.9)



Figure II.9 : Photographie représentant la mesure de la patte.



Figure II.10: Photographie représente l'injection d'huile

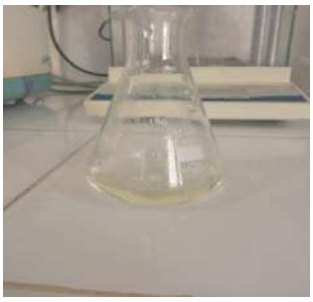
RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1.Introduction

Nous présentons dans cette partie les résultats obtenus ainsi que les interprétations et les conclusions que nous avons tiré.

III.2.Rendement en HEs

L'extraction des huiles essentielles d'orange (*Citrus sinensis*) par hydrodistillation, a permis d'avoir une huile liquide de couleur jaune-orangé et d'odeur caractéristique du zeste d'orange très forte (Figure II.11),avec un rendement en HEs de l'ordre de 2.245%. Les résultats obtenus dans ce travail sont similaires aux résultats cités dans la littérature scientifique. En effet, Hosni et al.**[78].**ont rapporté des rendements allant de 2.31% à 4.62% pour l'orange douce (*C. sinensis)* et la mandarine *(C. reticulata)*, respectivement. Fisher etal.**[79]**Et Eleni et al.**[80]** Ont rapporté que les rendements en H.Es chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%.



FigreIII.1: Huile essentielle d'orange (*Citrus sinensis*).

III.3.Caractérisation physico-chimiques des émulsions stabilisées par la pectine avec et sans acide ascorbique

III. 3.1.Observations visuelles

Toutes les émulsions préparées ont été soumises à des analyses visuelles et organoleptiques telles que l'aspect, la couleur et l'homogénéité. Par ailleurs, la figure II.12 montre l'apparencedes différentes formulations durant le stockage à température ambiante. Toutes les émulsions présentent un aspect laiteux avec une consistance variée selon la teneur en pectine. Il est à noter que les émulsions contenant 4 et 4.5% de pectine ont une consistance plus élevée que les autres formulations, ils sont relativement stables. Cela est dûprobablement 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. **[81]**

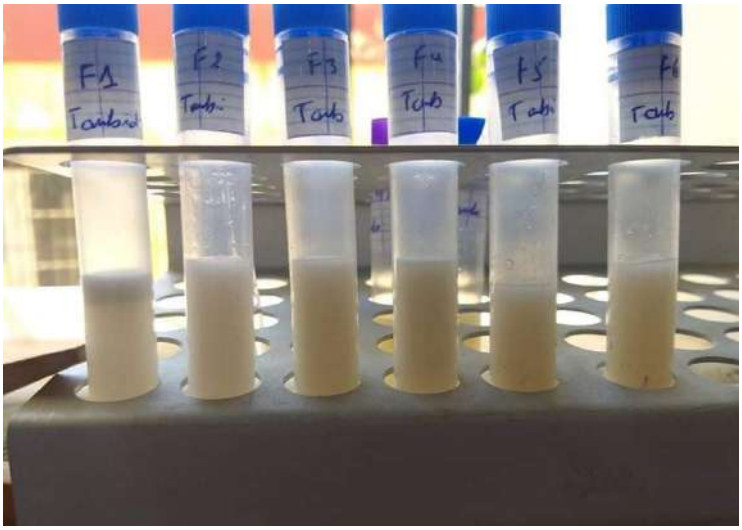


Figure III.2. : Apparence des différentes formulations à T_{amb} après 20 jours avec 0% acide ascorbique.

L'aspect des différentes émulsions d'HE en présence d'acide ascorbique durant 20 jours de conservation a été évalué et les photographies obtenues sont représentées sur la figureII.13. L'examen des résultats obtenus montre que les formulations contenant des quantités faibles en pectine (1 à 2.5%) avecl'acide ascorbique (1%) sont instables à cause du phénomène de crémage. Par contre, l'ajout d'acide ascorbique à des émulsions avec des quantités en pectine allant de 3 à 4%, ne montre aucune séparation de phases, ce qui a permis l'obtention d'émulsions stables. Cette stabilité peut être attribuée aux interactions pectine-acide ascorbique.

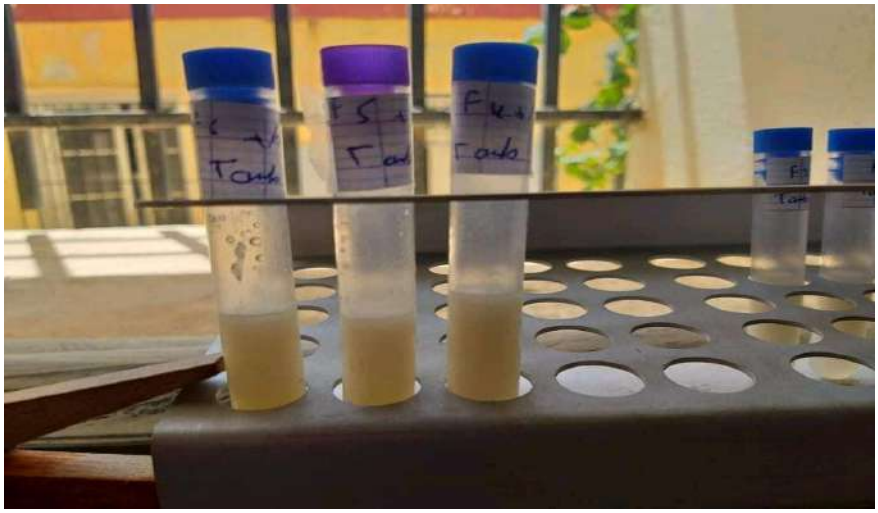


Figure III.3: Apparence des différentes formulations après 20 jours de conservation à T_{amb} avec: 1 %, d'acide ascorbique.

III.3.2.Examen microscopique

Les émulsions fraichement préparées et après 14 jours de conservations, ont été analysées par un microscope optique avec un agrandissement de 10 fois.

L'examen microscopique des figures II.14 et II.15, montre la dispersion des gouttelettes huileuse dans la phase aqueuse. Cette dispersion varie selon la concentration en 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 4.5% en pectine).Une granulométrie plus visible est observée avec des différents diamètres de globules formés.

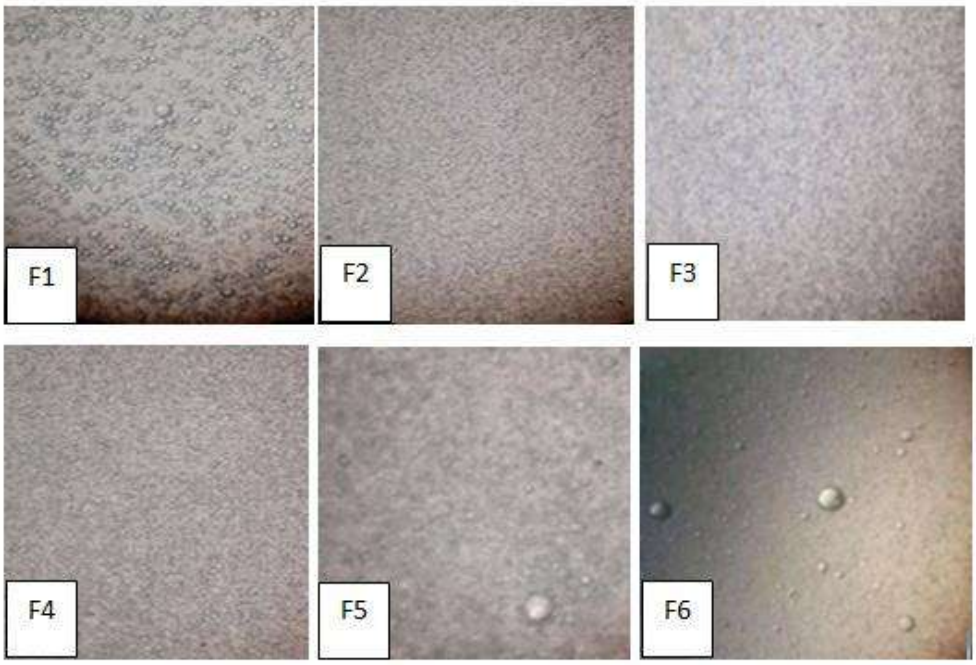


Figure III. 4 : Vues microscopiques des différentes formulations fraichement préparées à base de pectine seule

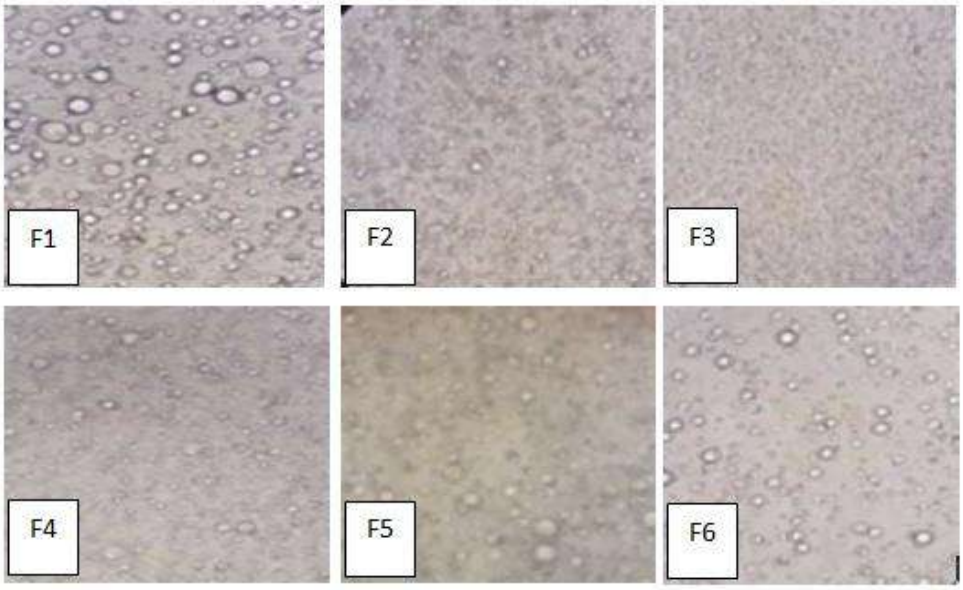


Figure III. 5 : Vues microscopiques des différentes formulations à base de pectine seule après 14 jours de conservation.

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 II.6 et II.7).

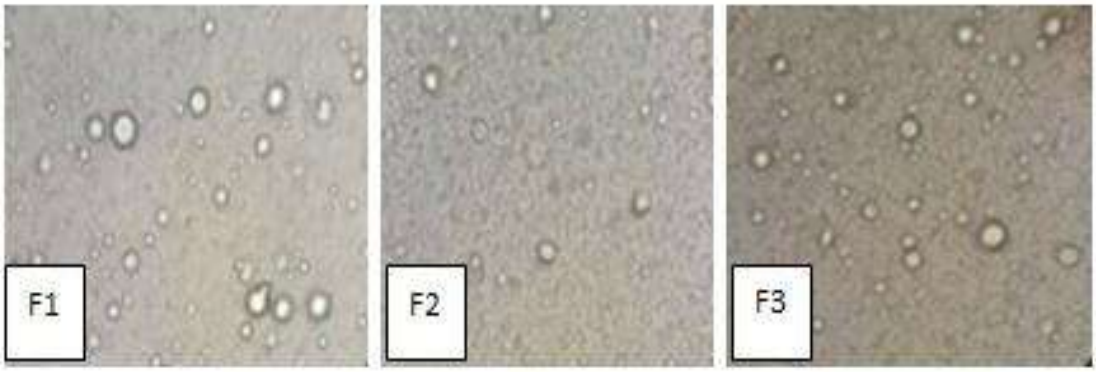


Figure III.6 : Vues microscopiques des différentes formulations fraichement préparées en présence d'acides ascorbique

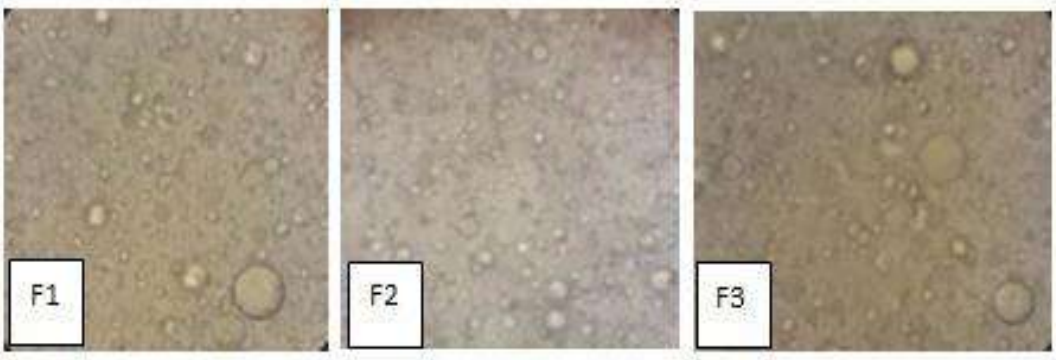


Figure III.7 : Vues microscopiques des différentes formulations en présence d'acides ascorbique après 14 jours de conservation.

III.3.3.Sens de l'émulsion

La figure II.18 présente l'observation microscopique de test colorimétrique effectuée sur l'emulsion d'HE préspaée, elle montre bien la diffusion du colorant qui est le bleu de méthylène de caractère aqueux dans la phase hydrophile, ce qui confirme le sens directe H/E de nos émulsions.



Figure III.8 : Vue microscopique représente le sens d'émulsion.

III.3.4.Mesure du pH et de la conductivité

Les résultats de mesures du pH et de la conductivité électrique pour les différentes émulsions fraîchement préparées avec pectine seule sont représentés dans le Tableau II.2. Il est clair que le pH des différentes formulations présente des valeurs acides (pH =3.37-3.56) dans tout le domaine de concentrations testé. Du fait de la présence d'une chaîne principale d'acides polygalacturoniques, la pectine a un caractère acide**[82].**

Par ailleurs, la conductivité électrique est proportionnelle à la concentration en pectine. Cela est dû 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 420 à 800 µs/cm. Ceci confirme le caractère aqueux des émulsions, c'est à dire que la phase continue est l'eau**[83].**

Tableau III.1 : Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions stabilisée par pectine sans acide ascorbique

Formulations	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ph	3.4	3.37	3.5	3.56	3.51	3.48
Conductivité µs/cm	420	488	510	630	670	800

En comparant les résultats de mesure de pH et de conductivité de Tableau II.2 et ceux de Tableau II.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, ce qui montre que la phase continue est aqueuse, c'est à dire qu'on est toujours en présence des émulsions H/E.

Tableau III.2 : Résultats des mesures de pH et de la conductivité des émulsions stabilisée par pectine avec acide ascorbique

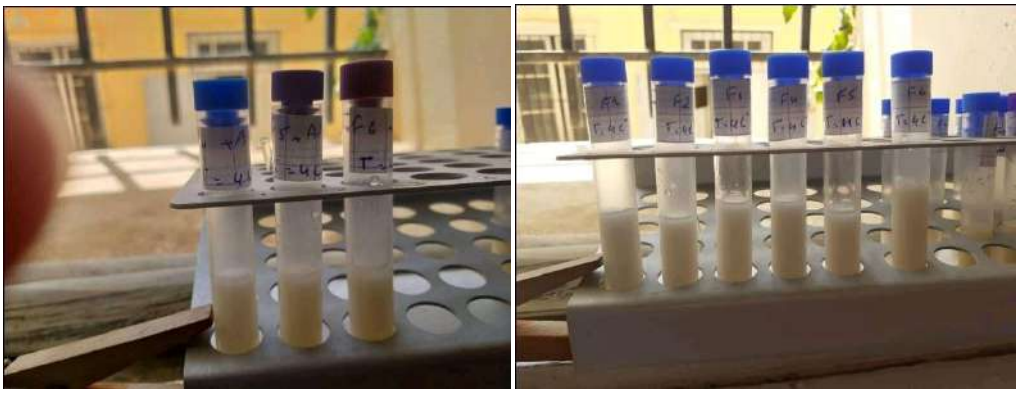
Formulations	F4	F5	F6
pH	3.36	3.43	3.56
Conductivité µs/cm	613	664	680

III.5.Effet de la température de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE

Les résultats d'étude de l'effet de la température et de la lumière sur la conservation des émulsions formulées, a montré queles émulsions d'HE à base d'acide ascorbique conservées sous une température ambiante et à l'exposition de la lumière ont présentées une coloration

jaunâtre au cours du temps(Figure II.19). D'après Yuan et al**[84].**la température a un effet major sur la dégradation de l'acide ascorbique. Donc le changement de couleur dans notre cas, est un signe de dégradation de l'acide ascorbique et donc de l'émulsion.

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.



(A) **(B)**

Figure III.9 : Effet de conservation sur la stabilité des émulsions d'HE

A) avec acide ascorbique, B) sans acide ascorbique

III.6.Arommatogramme des H.Es de *Citrus.sinensis*seules et en émulsion

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es de *Citrus.sinensis*seules et en émulsion,sur la croissance des souches microbiennes testées: *S. aureus et Bacilles subtils* sont représentées dans les Figures II.20 , II.21et le Tableau II.4 .

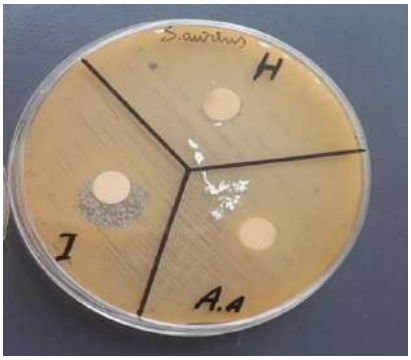


Figure III.10 : Halo d'inhibition de l'H.E de *C.sinensis*(H) de l'émulsion avec acisde ascorbique (AA) et de l'émulsion sans acide ascorbique (I) sur: *Staphylococcie aureus*



Figure III.11 : Halo d'inhibition de l'H.E de *C.sinensis*(H) de l'émulsion avec acisde ascorbique (AA) et de l'émulsion sans acide ascorbique (I) sur: *Bacilles subtils*

Tableau III.3 : Représente les mesures des diamètres des zone d'inhibition.

Diamètre	***Bacilles subtils***	***Staphylococcie aureus***
Pour l'huile	19.5mm	10.2mm
Pour émulsion sans AA	33.9mm	14.5mm
Pour émulsion avec AA	31.6mm	10.3mm

Les résultats d'aromatogramme obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton, révèlent que l'activité antibactérienne des H.Es testées seules et en émulsions est en fonction de la bactérie cible. Il est clair qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Staphylococcie aureus* .Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.Es de *Citrus* testées. Les résultats ont montré aussi que l'H.E de *C. sinensis*à présenter une activité antibactérienne contre *Bacilles subtils* dont le diamètre de la zone d'inhibition est d'environ 19.5 mm, et de l'ordre de 31.6-33.9 pour les HEs en émulsion.

III.7.Activité antioxydante des émulsions d'HE avec et sans acide ascorbique

Le Tableau II.5 et la Figures II.22 regroupent alors les résultats du test DPPH des huiles essentielles seules et en émulsions avec et sans ajout d'acide ascorbique et d'acide ascorbique comme témoin.

Tableau III.4 : Pourcentages d'inhibition (I%) des émulsions d'HEsavec et sans acide ascorbique (AA)

Concentration (10^3mg/ml)	2	4	6	8	10
HE	46.55	49.75	53.79	57.37	60.68
Emulsions sans AA (4%)	95.43	95.81	96.20	96.56	96.93
Emulsion avec AA (4%)	94.88	95.17	95.63	95.87	95.92
AA (Témoin)	97.25	97.29	97.71	97.74	97.78

L'analyse des résultats montre queles émulsions formulées ont présenté une activité antioxydante nettement supérieure à celle des HEs seules, cela peut être attribué à l'effet synergique de l'huile essentielle d'agrume, de la pectine et de l'acide ascorbique utilisés ensemble. Ainsi, les émulsions contenant une proportion d'acide ascorbique provoquent une réduction presque totale de DPPH• avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 96% pour les émulsions d'huile essentielle d'orange.

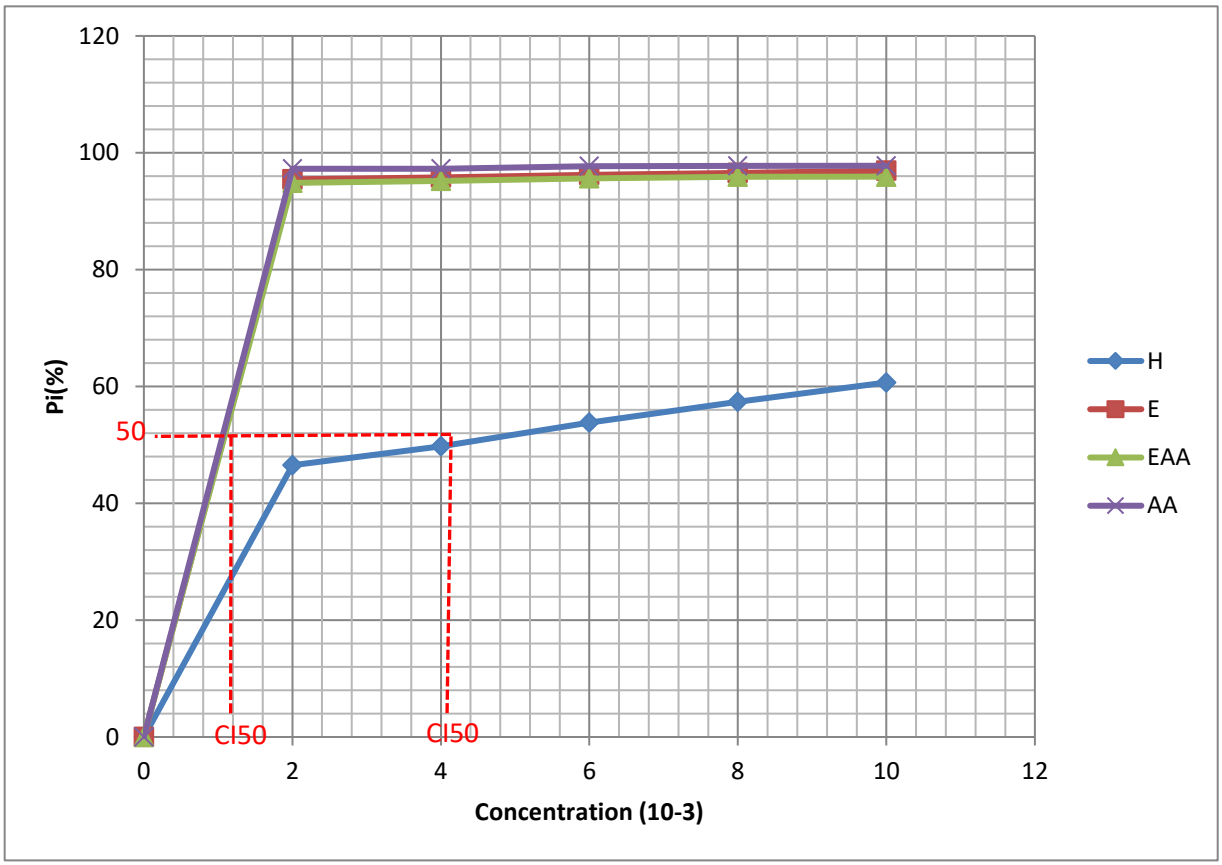


Figure III.12 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des HEs seules, en émulsions et de l'acide ascorbique (AA)

III.8.Activité anti-inflammatoire

Les résultats d'activité anti-inflammatoire déterminée par la méthode de l'œdème de la patte de rat induit par la carraghénine, sont présentés dans le TableauII.6 et la Figure II.23

Tableau III.5 : Evolution du diamètre de la patte en fonction de temps pour

N° de souris	E.physiologique	Diclofénac	HEs
Poids(g)	19.75	18	22
Epaisseur initiale (mm)	1.11	1.19	1.19
Après injection du carragénine(30min)	2.14	2.18	2.13
Après 45min (injection d'huile)	1.82	1.86	2.0
Après 1h	1.80	1.76	1.92
Après 1h15min	1.78	1.67	1.74
Après 1h30min	1.77	1.60	1.76
Après 1h45min	1.76	1.52	1.67
Après 2h	1.71	1.45	1.55
Après 2h15min	1.64	1.38	1.47
Après 2h30min	1.51	1.32	1.39
Après 2h45min	1.42	1.25	1.29
Après3h	1.35	1.2	1.25

*Les valeurs sont exprimées en moyenne

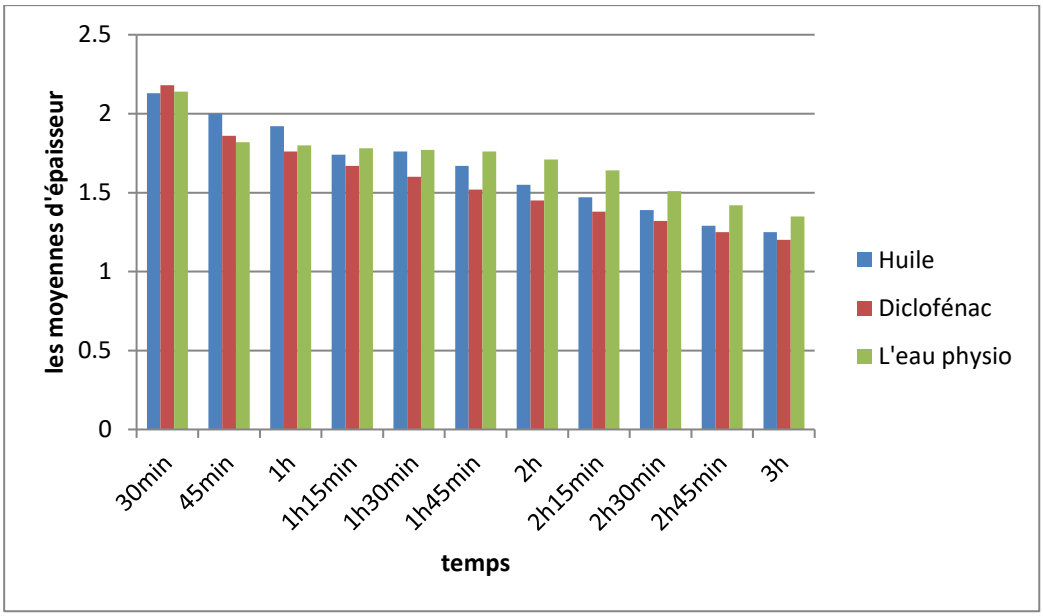


Figure III.13: Histogramme représentant les moyennes d'épaisseur de l'œdème.

Les résultats ont été comparés à ceux de Diclofénac, substance anti-inflammatoire de référence et à ceux du groupe témoin. L'huile de *C.sinensis* administrée avec une dose de 0.5 ml/kg réduitt très significativement l'œdème provoqué par la carragénine.

L'activité anti-inflammatoire des HEs d'orange testées reviendrait à leur composition chimique particulière. En effet, plusieurs travaux ont montré que l'huile d'orange est riche en γ-terpinène, le terpinolène, le géraniol, le β-pinène, de myrcène.Ces molécules sont de plus en plus connuespar leur fort potentiel biologiqueintéressantlesétudes entreprises sur ces composés ont révélé de fortespropriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, même à de faibles concentrations.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Nous rappelons que le but du ce travail est l'encapsulation des huiles essentielles d'orange par émulsification, tout en permettant une préservation de leurs stabilité sur une durée prolongée et optimisée. Donc des émulsions de type H/E ont été élaborées à base d'un biopolymère émulsifiant, qui est une pectine hautement méthylée, additionnée de l'acide ascorbique, en tant qu'antioxydant fort. Des analyses physico-chimiques et biologiques ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces systèmes.

Ce domaine de formulation aqueuse intéresse un nombre croissant de domaines d'applications (agro-alimentaire, cosmétique et galénique).

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

- Extraction des huiles essentielles à partir des écorces de *Citrus sinensis*(orange douce) par hydrodistillation
- Caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles extraites.
- Formulation des émulsions d'HE d'orange à base de pectine hautement méthylé avec et sans acide ascorbique
- Etude de l'activité biologique y compris l'acticité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire des huiles essentielles seules et en émulsion.

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

- L'extraction des huiles essentielles d'orange (*Citrus sinensis*) par hydrodistillation, a permis d'avoir une huile liquide de couleur jaune-orangé et d'odeur caractéristique du zeste d'orange très forte, avec un rendement en HEs de l'ordre de 2.245%.

- 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 par conséquent l'émulsion obtenue est plus rigide et stable. Par ailleurs, 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.

- Le testantimicrobien à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton, révèlent que l'activité antibactérienne des HEs testées seules et en émulsions, est en fonction de la bactérie cible. En effet, l'H.E de *C. sinensis*a présenté une activité antibactérienne contre *Bacilles subtils et* aucune activité n'est signalée contre*Staphylococcie aureus.*

Conclusion générale

- L’évaluation de l’activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus* utilisée seule ou en émulsions,par la méthode de réduction du DPPH°, a montré que ces dernières possèdent un pouvoir antioxydant. Alors que l’ajout de l’acide ascorbique peut provoquer une réduction presque totale de DPPH$^{\bullet}$ (97%)

- Les résultats d’activité anti-inflammatoire déterminée par la méthode de l’œdème de la patte de rat induit par la carraghénine, ont montré que le pouvoir anti-inflammatoire des HEs d’orange testées reviendrait à leur composition chimique particulière.

Dans l'ensemble, cette étude serait utile dans le développement de systèmes plus efficaces avec des propriétés physiques, antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoiresprometteuses dans un large champ d’application.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A. and Liang, L, Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15: 143–182. doi: 10.1111/1541-4337.12179. (2016),

[2] Velasco J, Dobarganes C, Marquez-Ruiz G.. Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. Grasas Aceites 54:304–14.2003

[3] Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, N. Encapsulation in the food industry: A review. International Journal of Food Science and Nutrition, 50, 213–224. (1999).

[4] Murua, A., Portero, A., Orive, G., Hernandez, R. M., de Castro, M., & Pedraz, J. L. Cell microencapsulation technology: Towards clinical applications. Journal of Controlled Release, 132, 76–83. (2008).

[5] Jaganathan, H., & Godin, BBiocompatibility Assessment of Si-based Nanoand Micro-particles. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(15), 1800–1819. (2012). http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.05.008.

[6] Bouguerra M A. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire [Mémoire].Constantine : Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires ; 2012.

[7] l'ANSM « Agence nationale de Sécurité du Médicament » et la Pharmacopée Européenne 7ème édition (2010).

[8]Marrouf, A. Tremblin, G . Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences. 2009

[9]Hernandez Ochoa L.R.,. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine «solvant/actif» d'origine végétale, thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. 2005

[10]Goris A.. Manuel de botanique. Ed. Clin.265-268.1967

[11]Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F.. Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157.2010

[12] Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Theriou K. and Therios I. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece. Molecules .18 : 10639-10647. (2013).

[13] Abdelouahid Dj et Bekhechi Ch. Les huiles essentielles. 2eme Edition. Alger : Office des publications universitaires ; 2014.

[14] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3éme Edition Lavoisier, Paris. 1120.(1999).

[15] Sell C.S The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer.2nd Edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p. (2006).

[16] Belaiche p. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed . Maloine S. A. Paris, T.1, 915 p. (1979).

[17] Loza-Tavera H. Monoterpene in Essentiel oil : Biosynthesis and Properties. Adv. Exp. Med. Biol., 464, 49-62. (1999).

[18] Sallé J.ILes huiles essentielles-synthèse d'aromathérapie. Edition Frison-Roche.

[19] DuraffourdC., D'hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990). Cahier de phytothéraoie clinique. 2éme Ed. Masson,Paris, T.1,89p. .(2004).

[20] Modzelewska A., Sur S., Kumar K.S. and Khan S.R. Sesquiterpenes : Natural products that decease cancer growth. Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents, 5, 477-499. (2005).

[21] Cosentino S., Tuberoso C.I.,Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F*In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett.Appl Microbiol.,29 (2), 103-105.(1999).

[22] Svoboda, K.P.; and Hampson, J.B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and othe related pharmacological activities. *Plant Biology Department,* SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.(1999).

[23] Marie Elisabeth Lucc, thèse sur : Extraction sans solvasnt asistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université de la reunion, 13 juillet 2005, 59-71.

[24] Bruneton J. *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales* (Lavoisier, Paris ed.) ; 1993.

[25] Pistelli L. *Comparaison des systèmes d'extraction des huiles essentiellles avec une, référence particulière aux liquides ioniques (IL).* Université de Piz, Italy, 2015

[26] Cazau-Beyret N. Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et Phytothérapie. Thèse. université Toulouse III Paul Sabatier,2013

[27] Chalchat J. K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. & Chopineau J. *Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils* (Oil Res. ed.),1997

[28] Hajji, S., Beliveau, J. et Simon, D. Comparative study of an essential oil obtained according to two different extraction procedures: steam distillation and hydrodiffusion." *Actes - Colloq. Int. Plant. Aromat. Med. Maroc*: 229-230,1985

[29] El-Kalamouni C.*Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.* Université de toulouse ,2010

[30] https://fr.bestinsectkiller.com/rice-weevil-photo-description-how-to-get-rid-843344

[31] https://www.abatextermination.ca/le-charancon-du-riz/

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

[33] Luthria D, "Oil extraction and Analysis: critical issues and comparative studies, "2004.

[34] Vagi E, Simandi B, Suhajda A, Hethelyi E. Essential oil composition and antimicrobial activity of Origanum majorana L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food research international. 2005;38:51-7.

[35] Zarnowski R, Suzuki Y. Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. Journal of Food Composition and Analysis. 2004;17:649-63.

[36] Luque-Garcıa J, De Castro ML. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. Talanta. 2004;64:571-7.

[37] Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. Journal of Chromatography A. 2004;1043:323-7.

[38] Rezzoug S, Baghdadi M, Louka N, Boutekedjiret C, Allaf K. Study of a new extraction process: controlled instantaneous decompression. Application to the extraction of essential oil from rosemary leaves. Flavour Fragrance J. 1998;13:251-8.

[39] Amor BB, Allaf K. Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (Hibiscus sabdariffa). FoodChemistry. 2009;115:820-5

[40] Colette B. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées Université de La Rochelle; 2008.

[41] Allaf T, Tomao V, Besombes C, Chemat F. Thermal and mechanical intensification of Essential oil extraction from orange peel via instant autovaporization Chemical. Engineering and Processing: Process Intensification. 2013; 72: 24-30.

[42] Silverstein R.M., Bassler G.C., Morill T.C., Spectoscopic identification of organic compounds, 5th edition, John Wiley & Sons, New York, 1991.

[43] Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., Manuelpratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.

[44] :Kováts E., Gas Chromatographic characterization of organic substances in theretention index system, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229-247.

[45] Van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index systemincluding linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J.Chromatogr.*, , 11, 463-471,1963 [89] Joulain D., König W.A., The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg, 1998.

[46] Joulain D., König W.A., The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg, 1998

[47] Grundschober F., The identification of individual components in flavouring and flavoured foods, *Z. Lebensm. Unters.Forsh 1991.*,192, 530-534.

[48] Marriott P., Shellie R., Fergeus J., Ong R., Morrison P., High resolutionessential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology,*Flavour Fragr. J.*, 15, 225-239, 2000.

[49] Marriott P., Shellie R., Cornwell C., Gas chromatographic technologies for theanalysis of essential oils, *J. Chromatogr. A*, 936, 1-22,2001

[50] Casabianca H., Graff J.B., Jame P., Perruchieti C., Application of hyphenatedtechniques to the chromatographic authentication of flavors in food products andperfumes, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1995, 18, 279-286.

[51] Casabianca H., Graff J.B., Faugier V., Fleig F., Grenier C., Enantiomericdistribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils, *J. High Resol. Chromatogr.*1998, 21, 107-112.

[52] König W.A., Bülow N., Saritas Y., Identificatio

[53] Anton R Lobskin A- Plantes Aromatiques. Epices, Aromates, Condiments Et Huiles E Ssentielles ; Tec Et Doc, Paris 522p 2005.

[54] Platzer N. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier, 2002 : P1092

[55] Piochon M. Etude des huiles essentielles d'espèce végétale de la flore laurentienne [Mémoire].Québec : université du Québec ; 2008

[56] Ndoye Foe, F.M.C., Kemegni Tchinang, T.F., Nyegue, A.M., Abdou, J-P., Gbaweng Yaya, A.J., Tchinda, A.T., Oyono Essame, J-L. et Etoa F-X. Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16:117. (2016).

[57] Chuittah O. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite [Thèse].LORAINE: université de Loraine ; 2012.

[58] Hammer K. A. Carson C. F. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdon.pp.255-295. (2011).

[59] Bernadet M. Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles, Eds. Dangles, France. 384p. (1983).

[60] Teuscher, E. ; Anton, R. ; and Lobstein, A. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Edition TEC & DOC Lavoisier.* P 6, 77. (2005).

[61] Richard H.. Epices et aromates. Ed. Lavoisier, Paris. 339 P. (Technique & documentation). 1992.

[62] Odoul M., Les huiles essentielles. La lettre de l'Institut Français de Shiatsu, n. 2, p.p. 874-879. 2003.

[63] Smith-Palmer A., Stewart J. et Fyfe L.,. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogebss. Journal of Food Microbiology, Vol. 26, p.p. 118-122. 1998

[64] Martini M-C et Seiller M.. Actifs et additifs en cosmétologie. Éditions Tec & Doc , Éditions médicales internationales, Paris : Cachan, 1051 p. p. 2006.

[65] Munnich A, Ogier H, Saudubray J-M et Amédée-Manesme O. Les Vitamines : aspects metaboliques, genetiques, nutritionnels et therapeutiques. Masson, Paris, 428 p. p. 1987.

[66] Smuda M et Glomb MA. Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. Angewandte Chemie International Edition, 52 : 4887-4891. 2013.

[67] Stamford NPJ. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. Journal of cosmetic dermatology, 11 : 310. 2012.

[68] Vitamine –C., Estelle –Schwartz., Université du Québec à Chicoutimi, p.p. 13-25. 2016.

[69] Allouche J. Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau [Thèse].LORRAINE : Ecole national supérieur des industries chimique ; 2003.

[70] Thiam A R. Emulsions adhésives et non adhésives : Stabilité et propriétés des interfaces ´étudiées par la microfluidique [Thèse]. PARIS : École doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique ; 2011.

[71] Pierat N. Préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation [Thèse] .Nancy : université Henri Poincaré ; 2010.

[72] Chabni M. Etude de la stabilité physique des systèmes dispersés [Thèse].Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri; 2012.

[73] Kassa D. Etude d'une émulsion à visée anti inflammatoire destinée à la voie orale [Thèse]. Alger : Université Ben Youcef Ben Khada;1991

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

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

[76] Benhammou, N., AtikBekkara, F.,;Kadifkova, P.,. Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacialentiscus L. and PistaciaatlanticaDesf .Advances in Food Sciences.pp 29(3) .155-161 .2007.

[77] Winter C, Risley EA, Nus GV Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drug. ProcSocExpBiol Med 111:544–7.(1962)

[78] Hosni K., Zahed N., Chrif R., et al.. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: evidence for the genotypic influence. Food Chemistry.;123: 1098–1104. 2010

[79] Fisher, K.; Rowe, C.; Phillips, C.,. The survival of three strains of *Acrobacterbutzleri*in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and food. Lett. Appl. Microbiol., *44*: 495–499. 2007

[80] Eleni, M.; Antonios, M.; George, K.; Alexios-Leandros, S.; Prokopios, M.,. High quality bergamot oil from Greece: Chemical analysis using chiral gas chromatography and larvicidal activity against the West Nile virus vector. Molecules, 14:839–849. 2009

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

[82] Youcef Ettoumik., Extraction des pectines en utilisant le procédé de chauffage par induction électromagnétique, Mémoire de Magister, Université de Médéa, Alger. 2011

[83] Luzio G., Cameron R. Contactless Conductivity: An HPLC Method to Analyze Degree of Methylation of Pectin. Florida State Horticultural Society, Proc. Fla. State Hort. Soc. 123:213–216.2010.

[84] Yuan J.-P., & Chen F..Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 507-508.1998.