



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi -Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Sciences biologiques

Option: Biochimie Appliquée

Thème :

Etude de l'activité antioxydant et antibactérienne
des huiles essentielles d'orange

Présenté par :

BOUAKKAZ Sarah

GUESMI Ourida

Devant le jury :

Mr. GOUDJIL Tahar	MCB	Université de Tébessa	Président
Mr. DJABRI Belgacem	Pr	Université de Tébessa	Rapporteur
Mme .ZEGHIB Assie	MBA	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance:

17/06/2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

« وَقَالُوا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدِيَ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ »

سورة الاعراف: الآية 43

ملخص

Citrus sinensis هي فاكهة حمضية تعتبر مصدر أساسي لاستخلاص الزيوت الأساسية لها فوائد صحية تفيد الكائنات الحية خاصة الانسان ودالك مضادة للأكسدة ومضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية.الهدف من هذه الدراسة هو معرفة الخصائص المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا الخاصة بالزيوت الأساسية لقسور البرتقال. يتم استخلاص الزيوت الاساسية بطريقة التقطير بالبخار و يتم الكشف عن النشاطات المضادة للأكسدة للزيوت الأساسية لقسور *Citrus sinensis* بالمقارنة مع فيتامين C باستخدام طريقة ارجاع الجذر الحر DPPH وتم تحديد التراكيز المثبطة 50%(CI 50). الخاصية المضادة للبكتيريا تم اختبارها على 04 أنواع من البكتيريا مردود الزيت الأساسي لقسور *Citrus sinensis* يقدر بـ (0,73%). دراسة الخاصية المضادة للأكسدة تظهر أن الزيت الأساسي لقسور *Citrus sinensis* يملك نشاط ضئيل جدا بالمقارنة مع الفيتامين C كذلك ما يخص الخاصية المضادة للبكتيريا(CI50 = 2212,20 µg/ml vs 281,73 µg/ml) .

الكلمات المفتاحية : الزيت الأساسي, *Citrus sinensis*, الخاصية المضادة للأكسدة, الخاصية المضادة للبكتيريا.

Abstract

Orange (*Citrus sinensis*), like all fruit and *citrus* fruits, is an important source of secondary metabolites. These compounds have beneficial effects on human and animal health because they have low dose of biological activities such as antioxidant and antibacterial activity.

The objective of the present study is the *in vitro* evaluation of the antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *C. Sinensis*.

Extraction of the essential oils of *C. Sinensis* (C.S.H.E) was carried out by hydrodistillation. Some physicochemical characteristics of C.s H.E (density, pH, refractive index, acid index, ester index and saponification index) were measured. The antioxidant activity of C.SH compared to vitamin C was assessed by the use of the DPPH free radical reduction method and confirmed by the iron reduction test (FRAP).

The antibacterial activity was tested on 04 bacterial strains of ATCC type, 02 Gram positive: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* and 02 Gram negative: *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli*. The yield of *C. sinensis* essential oils was 0.73%. The physicochemical characteristics of C.S H.Es were as follows: density = 0,825 g/ml, pH =7,43 refractive index =1,541 ; acid index = 11,22 , ester index = 44,98 and saponification number = 56,2 .

The study of antioxidant activity shows that C.S.H has a very low antioxidant activity compared to vit.C (IC 50 = 2212.20 µg / ml vs 281.73 µg / ml). These results were confirmed by the iron reduction test.

The results of the antibacterial activity shows that the 04 strains tested are resistant to H.E. S.C. This work shows that H.E.S.C. can not be recommended in any therapeutic regimens for bacterial infections or diseases generated by oxidative stress.

Key words: Essential oil, *Citrus Sinensis*, antioxidant activity, antibacterial activity.

Résumé

L'orange (*Citrus sinensis*), comme tout fruit et agrume, est une source importante de métabolites secondaires. Ces composés ont des effets bénéfiques sur la santé humaine et animale car ils possèdent des activités biologiques à faibles doses telle que l'activité antioxydante et antibactérienne. L'objectif de la présente étude est l'évaluation *in vitro* des activités antioxydante et antibactérienne des huiles essentielles des écorces de *C. Sinensis*.

L'extraction des huiles essentielles de *C. Sinensis* (H.E de *C.S*) a été réalisée par hydrodistillation. Certaines caractéristiques physicochimiques des H.E de *C.S* (densité, pH, indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester et indice de saponification) ont été mesurées. L'activité antioxydante des H.E de *C.S* comparée à la vitamine C a été évaluée par l'utilisation de la méthode de réduction du radical libre DPPH et confirmée par le test de réduction du fer (FRAP). L'activité antibactérienne a été testée sur 04 souches bactériennes de type ATCC, 02 Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* et 02 Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*.

Le rendement en huiles essentielles du *C. sinensis* était de 0,73%. Les caractéristiques physicochimiques des H.E de *C.S* étaient comme suit : densité = 0,825 g/mL pour, pH = 7,43, indice de réfraction = 1,541, indice d'acide = 11,22, indice d'ester = 44,98 et indice de saponification = 56,2. L'étude de l'activité antioxydante montre que l'H.E de *C.S* possède une activité antioxydante très faible comparée à la vit.C (CI₅₀ = 2212,20 µg/mL vs 281,73 µg/mL). Ces résultats ont été confirmés par le test de réduction du fer. Les résultats de l'activité antibactérienne montre que les 04 souches testées sont résistantes aux H.E de *C.S*.

Ce travail montre que l'H.E de *C.S* ne peut pas être recommandée dans quelconque schémas thérapeutique des infections bactériennes ou de maladies générées par un stress oxydatif.

Mots clés : Huile essentielle, *Citrus. Sinensis*, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Dédicaces

À la pensée de mon père je prie Dieu le tout puissant de le garder dans son
Vaste paradis

À ma mère ; mes frères ; mes sœurs et à mes cher petits enfants :
Selwen, Ghasen et Raoued.

À ma binôme Ourida, mes chers amis

Et tous ceux que je m'aime

Sarah Bouakkaz

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, spécialement,
à mon père Chafaï que Dieu le guérisse et Ma mère que Dieu la protège

à mes très chères frères et sœurs

et leurs petites familles

à toutes la famille GUESMI

à ma chère binôme Sarah pour tous les moments que nous avons partagé ensemble

à ma collègue DJALLEB Wafa

Je dédie aussi mon travail à l'âme de son père DJALLEB Sghaier

à tous ceux que je m'aime.

Avec un cœur ouvert et une immense joie je dédie mon travail à mon encadreur DJABRI Belgacem

GUESMI Ourida

Remerciement

"Louange à ALLAH qui nous a donné la force, la patience et la volonté d'accomplir ce modeste travail".

Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos profonds remerciements à la souveraineté du **Professeur DJABRI Belgacem**, pour ses précieux conseils et son orientation qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas été mené au bon port. Nous voulons vraiment vous remercier car nous avons eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadreur de notre mémoire.

Nos vifs remerciements aux membres de jury **Dr.GOUDJIL Tahar** et **Dr.ZEGHIB Assia** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous n'oublions pas de remercier vivement la technicienne du laboratoire - Département de Biologie Appliquée- : **Souad** et le technicien du laboratoire des Sciences de la Terre **Hacène** pour leurs aides.

Enfin, nos vifs remerciements vont à tous ceux qui ont collaboré à l'achèvement de ce travail.

Sarah & Ourida

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
01	Description botanique d'orange	04
02	Valeur nutritive d'une orange moyenne pour 100g	05
03	Composition chimique pour 100g de l'écorce d'orange	06
04	Principaux composés de l'orange	09
05	Principaux radicaux libres et leurs structures chimiques	22
06	Principales compositions des huiles essentielles à activité antibactérienne	32
07	Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction	34
08	Liste d'appareils et réactifs utilisés pour l'activité anti-DPPH.	40
09	Liste d'appareils et réactifs utilisés dans le test du FRAP	42
10	Matériels de l'activité antibactérienne	43
11	Souches bactériennes utilisées	44
12	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre du halo d'inhibition	45
13	Propriétés organoleptiques d'huile essentielle du C.S	47
14	Indices des paramètres physicochimies	48
15	Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) d'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	56

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Coupe transversale d'une orange	05
02	Isoprène ou 2-méthyl-1,3-butadiène (formule semi développée)	11
03	Isopentényl-pyrophosphate (formule semi-développée)	12
04	Schéma de l'IPP et du DMAPP avec la numérotation des carbones	12
05	Synthèse des classes terpéniques chez les végétaux	13
06	Phosphoénolpyruvate (formule semi-développée)	14
07	Structures de quelques composés aromatiques	15
08	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	18
09	Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique	20
10	La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	21
11	Origine des différents radicaux libre oxygénés	24
12	Réseau des antioxydants	27
13	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test du FRAP	28
14	Mode d'action des antibiotiques	29
15	Séchage des écorces d'orange (<i>Citrus sinensis</i>).	34

16	Pycnomètre en verre pour la mesure de la densité relative (photo personnelle)	36
17	PH mètre utilise pour mesure l'indice physique le potentiel ydrogène	38
18	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	39
19	La réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	41
20	Réduction de DPPH d'acide ascorbique et d'H.Es de <i>C.S</i>	50
21	Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations d'H.E du <i>C.S</i> et vit c	51
22	Détermination de la valeur IC ₅₀ de la vitC et de l'H.E	52
23	Courbe d'évaluation du pouvoir d'antioxydant par la méthode de FRAP de l'acide ascorbique et d'H.E de <i>C.S</i> avec le temps	54
24	Photo personnelle des tests antibactériennes de <i>Citrus sinensis</i> vis-à-vis des bactéries testées de Gram(+)	56
25	Photo personnelle des tests antibactériennes de <i>Citrus sinensis</i> vis-à-vis des bactéries testées de Gram (-)	57

Liste des abréviations et symboles

(-) : Résistante.

(+) : Sensibilité limitée.

(++) : Sensibilité moyenne.

(+++) : Très sensible.

µl : microlitre

Abs : Absorbance.

ADN : Acide désoxyribonucléiques.

AFNOR : Association Française de Normalisation

AFNOR : Association Française de Normalisation

ARNm : Acide ribonucléiques messenger.

ATCC : American type culture collection.

ATP : Adénosine triphosphate.

C.s : *Citrus sinensis*.

Ca : Calcium

CI50 : Concentration inhibitrice 50%.

CMIs : concentrations minimales d'inhibitions

CPG/MS: Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

Cu : Cuivre

d : densité

DMAPP : diméthyl-allyl-pyrophosphate

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

DPPH : 2.2 diphényl-1 picryl hydrazyl.

E.coli : Escherichia coli

EOA : Espèces oxygénées activées.

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FPP : farnésyl pyrophosphate

FRAP: Ferric reducing antioxidant power.

g : gramme

GGPP : géranyl géranyl pyrophosphate

GPP : géranyl pyrophosphate

Gpxs : Glutathion peroxydases.

h : heure
H.E : huile essentielle
H+ : proton
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.
HCl : acide chlorhydrique
I% : pourcentage d'inhibition
Ia : indice d'acide
IPP : isopentényl-pyrophosphate
IR: indice de réfraction
KOH : hydroxyde de potassium
M : molarité
Mg : Magnésium
mg : milligramme
MH : Mueller-Hinton.
MH: Mueller Hinton
Min : minute
ml : millilitre
Mn : manganèse
N : normalité
nm : nanomètre
NO° : Monoxyde d'azote.
O₂⁻ : Radical superoxyde.
O₂° : Anion superoxyde.
OH° : Radical hydroxyle.
ONOO : Peroxynitrite.
Ph : potentiel d'hydrogène
R : Rendement.
RLO: Radicaux libres oxygénés
RO : Alcoxyles.
ROOH : Peroxydes.
SODs : Super oxydes dismutases.
UV : ultra violet
Vit : vitamine
Vit C : Vitamine C.

ملخص	
Abstract	
Résumé	
Dédicaces	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations et symboles	

Table des matières

Introduction	01
I. Synthèse bibliographique	
I.1. Plante d'étude	03
I.1.1. Généralité	04
I.1.2. Description botanique, morphologique et physiologique	04
I.1.3. Valeur nutritive de l'orange	05
I.1.4. Composition chimique des écorces d'orange	06
I.1.5. Utilisation de l'écorce d'orange	07
I.1.5.1. Utilisation alimentaire	07
I.1.5.2. Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques	07
I.1.6. Orange douce (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)	07
I.1.6.1. Nomenclature	08
I.1.6.2. Systématique de la plante	08
I.1.6.3. Variétés de <i>Citrus sinensis</i>	08
I.1.6.4. Composition chimique et valeur nutritive de <i>Citrus sinensis</i>	09
I.2. Huiles essentielles	10
I.2.1. Qu'est-ce qu'une huile essentielle (HE)?	10
I.2.2. Localisation	10
I.2.3. Biosynthèses d'H.E	11
I.2.3.1. Voie terpénique	11
I.2.3.1. Voie aromatique ou voie de l'acide shikimique	13
I.2.4. Compositions chimiques des huiles essentielles	14
I.2.4.1. Terpènes et Terpénoides	14
I.2.4.2. Composés aromatiques	15

I.2.4.3. Composés d'origine diverses	16
I.2.5. Facteurs influençant la composition chimique	16
I.2.6. Rôles physiologiques	16
I.2.7. Propriétés physiques	16
I.2.8. Méthodes d'extraction	17
I.2.8.1. Distillation	17
I.2.8.2. Extraction à froid	18
I.2.8.3. Extraction assistée par micro-ondes	19
I.2.8.4. Extraction par les solvants et les graisses	19
I.2.8.5. Extraction par fluides supercritique.....	19
I.2.9. Effets biologiques	20
I.3. Activité biologique	21
I.3.1. Stress oxydant	21
I.3.1.1. Définition	21
I.3.1.2. Radicaux libres	21
I.3.1.3. Production des radicaux libres (la source).....	22
I.3.1.4. Conséquences du stress oxydant.....	24
I.3.2. Activité anti-oxydante.....	24
I.3.2.1. Antioxydants endogènes	24
I.3.2.2. Antioxydants exogènes	24
I.3.2.3. Mode d'action des antioxydants	25
I.3.2.4. Tests d'activité antioxydante	27
I.3.2.4.1. Test du DPPH	27
I.3.2.4.2. Test de réduction du fer FRAP	28
I.3.3. Activité antibactérienne	29
I.3.3.1. Définitions	29
I.3.3.2. Origine d'antibiotique	29
I.3.3.3. Cibles bactériennes des antibiotiques	29
I.3.3.4. Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles	30
I.3.3.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	31
I.3.3.6. Relation entre l'activité antibactérienne et la composition d'huile essentielle.....	32

II. Matériel et méthodes

II.1. Extraction des huiles essentielles	33
II.1.1. Matériel végétal	33

II.1.2. Matériel d'extraction.....	34
II.1.3. Procédé d'extraction.....	35
II.1.4. Calcul du rendement de l'huile essentielle	35
II.2. Evaluation de quelques indices physicochimiques des huiles essentielles	35
II.2.1. Mesures des indices chimiques.....	35
II.2.1.1. Indice d'acide.....	35
II.2.1.2. Indice d'ester.....	36
II.2.1.3. Indice de saponification	36
II.2.2. Mesure des indices physiques.....	36
II.2.2.1. La densité relative à 20°C.....	36
II.2.2.2. Indice de réfraction.....	37
II.2.2.3. Potentiel d'hydrogène (pH)	37
II.3. Tests des activités biologiques	37
II.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante (Test d'activité anti DPPH).....	38
II.3.1.1. Matériel et réactif	39
II.3.1.2. Mode opératoire	40
II.3.1.3. Détermination de pourcentage d'inhibition	40
II.3.1.4 Détermination de la CI50.....	40
II.3.2. Test de la réduction du fer (FRAP)	41
II.3.2.1. Matériel et réactif	42
II.3.2.2. Mode opératoire	42
II.3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	43
II.3.3.1. Matériel.....	43
II.3.3.2. Test d'activité antibactérienne	43
II.3.3.2.1. Souches d'étude.....	44
II.3.3.2.2. Milieu de culture.....	44
II.3.3.3. Protocole expérimental.....	44
II.3.3.4. Lecture	45

III. Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	47
III.2. Caractérisation des huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i>	47
III.2.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i>	47
III.2.2. Propriétés physicochimiques.....	47
III.3. Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	49

III.3.1. Etude cinétique de la réaction par le test DPPH.....	49
III.3.2. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH.....	51
III.3.3. Détermination de l'IC50 (Concentration inhibitrice 50%).....	52
III.3.4. Etude cinétique de la réaction par le test de FRAP.....	53
III.4. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	56
Conclusion	59
Références bibliographiques	60

Introduction

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits « bio » naturels, sans conservateurs a conduit l'industrie à envisager l'incorporation de substances considérées comme « non synthétiques ». Ainsi de nombreux composés phytochimiques y compris les huiles essentielles, commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles ont fait l'objet de plusieurs études pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires et anticancéreux (**Benyahia, 2015**).

L'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles telles que les plantes médicinales et aromatiques (**Sanchez-Moreno, 2002**). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**De-Gauljac et al, 1999**).

Les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme (**Guinoiseau, 2010**). Pour faire face à ce problème d'antibio-résistance, il est impératif de chercher constamment de nouvelles molécules ayant des activités antibactériennes.

L'étude des métabolites secondaires est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. Parmi les métabolites secondaires extensivement étudiés figurent les huiles essentielles qui possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques telles que la propriété antioxydante et antibactérienne (**Lemaoui, 2011**). Il est de plus en plus fréquent que les industries ajoutent ces huiles essentielles pour

parfumer leurs produits : savons, détergent..., mais aussi désodorisants ou parfum d'intérieur ou encore aux denrées alimentaires, ces huiles essentielles sont aussi des composés puissants, qui nécessitent des précautions et des recommandations d'usage (**Pibiri, 2005**).

C'est dans cette optique que ce travail a été réalisé sur les huiles essentielles de l'orange douce *Citrus sinensis* afin de valoriser les écorces (sèches) riches en composés volatiles (huiles essentielles) susceptibles d'avoir des activités antioxydantes et antibactériennes.

Le présent travail sera organisé autour d'un plan comportant les grandes parties suivantes :

- Une première partie consacrée à la revue bibliographique
- Une deuxième partie qui va concerner le matériel et les méthodes utilisés, résultats et leur discussion.

I. La plante d'étude

I.1. Généralités

Les agrumes sont originaires du Sud-est Asiatique. Ce sont des arbres de la famille des *Rutacées* composés de 156 ou de 16 espèces, selon que les auteurs ont ou n'ont pas pris en compte les hybrides (**Swingle et Reece, 1967**). La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement. Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduits dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. L'introduction des agrumes en Afrique de l'Est a été faite par les commerçants arabes et hindous vers le XIVE siècle (**Loussert, 1989**). L'expansion dans le sud de l'Europe au XVe siècle est le fait des portugais, qui les ont exportées d'Asie. Au moment de la conquête, l'orange traverse l'atlantique avec le Bigarade, la lime et le cédrat. Ces derniers ont été cultivés dans les Antilles, au Mexique et en Amérique du sud Aujourd'hui, l'oranger est l'arbre fruitier le plus cultivé dans le monde (**Blondy, 2003**).

Parmi les raisons qui ont donné aux agrumes un poids économique sur la scène internationale figurent leurs bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques (par exemple, les glycosides flavanones, acides hydroxycinnamiques) (**Marchand, 2002**), la vitamine C (**Halliwell, 1996**) et les Bien que les fruits soient utilisés principalement pour le dessert, ces derniers sont aussi des sources d'huiles essentielles en raison de leurs composés aromatiques (**Chutia et al., 2009 ; Minh Tu et al., 2002**).

La production d'agrumes est très répandue autour du globe. Cependant, la majeure partie de la production se concentre dans certaines zones géographiques et est cultivée dans l'hémisphère Nord (environ 70 % de la production totale) et est répartie en plusieurs variétés d'agrumes dans laquelle l'orange représente 57%, la mandarine 30%, le pamplemousse 7% et le citron et la lime 6%. Le Brésil est le premier producteur d'oranges dans le monde. Il assure 34% de la production mondiale, suivi par la Chine, les Etats-Unis et l'Union Européenne.

l'agrumiculture occupe une place primordiale et constitue l'une des préoccupations majeures des décideurs au niveau du ministère de l'agriculture algérien. L'INRAA en 2006 a rapporté que l'Algérie détient une collection variétale composée de 227 variétés d'agrumes Cette richesse arboricole constitue un patrimoine génétique inestimable (**Karboa, 2001**).

I.2. Description botanique, morphologique et physiologique

L'oranger est un arbre au port harmonieux, planté en pleine terre, ou en pot, atteint rapidement 7 à 8 m caractérisée par :

- **Fleurs** : blanches immaculées sont très parfumées, ses feuilles vertes profondes, sont légèrement ailées ; s'épanouissent à partir de fin du printemps
- **Fruits** : varient en forme, et en couleur selon les variétés. Il en est de même pour la pulpe plus ou moins acide et dont la couleur varie de l'orange au rouge (*Citrus sinensis*) qui se développe en région subtropicale .Les oranges encore vertes sont délicieuses, n'ayant pas besoin de devenir orange pour acquérir tout leur gout. (**Bachès, 2011**).
- **Ecorce du fruit** (péricarpe) est appelée « flavédo », comprend une partie externe, l'épicarpe (dénommé « zeste »), coloré en jaune, orangé à rouge à maturité, parsemé de nombreuses poches sécrétrices schizolysigènes remplies d'huile essentielle, et un mésocarpe externe. Le mésocarpe interne, appelé « albédo » de couleur blanche, a une texture plus ou moins spongieuse et d'épaisseur variable. L'épiderme interne ou endocarpe, émet des poils renflés charnus qui forment la pulpe sucrée et comestible (**Teuscher et al, 2005 ; Dupont et Guignard, 2007**). Cette partie est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Elle renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (**Hendrix et Redd, 1995 ;Guimaraes et al, 2010**). Le tableau 01 représente les caractères botaniques d'orange.

Tableau 01: Description botanique d'orange (**Bachès, 2011**)

Aspect	Arbre au port harmonieux et de croissance rapide
Taille	Grande taille en pleine terre (7 à 8 m)
Fleurs	Blanches et immaculées, très parfumées
Ecorce	lisse ou à peine rêche
Feuilles	Vert profond, légèrement ailées
Fruits	De forme et de coloration variable en fonction des différents groupes auxquelles ils appartiennent : baie, ronde ou allongée, de taille très variable
Pulpe	Juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés

A la surface d'orange dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (Figure 01).

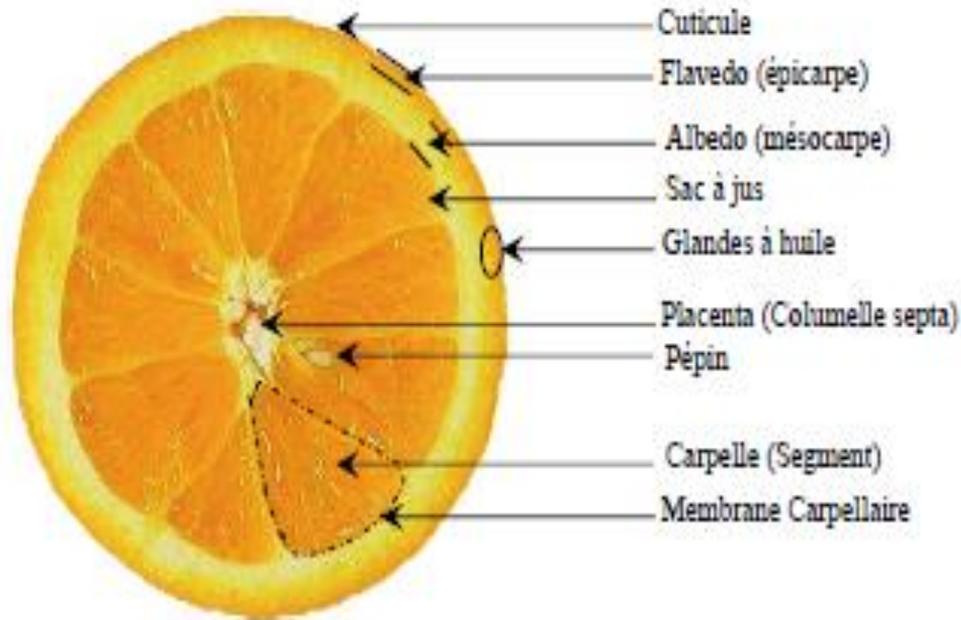


Figure 01 : Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et al, 2010).

I.3. Valeur nutritive de l'orange

L'orange est une composante de l'alimentation méditerranéenne. Sur le plan nutritionnel la perception de ce fruit réside principalement sur son contenu en vitamine C et d'autres composants comme les polyphénols, les caroténoïdes et les minéraux présentant une activité antioxydante. Valeur nutritive d'une orange moyenne pour 100g exposé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 02: Valeur nutritive d'une orange moyenne pour 100g (Gardner, 2000)

Minéraux					
Fer (µg)	100	Zinc (mg)	0,070	Mg (mg)	10-12
Potassium (mg)	151-200	Cu (mg)	0,045	Ca (mg)	47
Sodium (mg)	3	Phosphore (mg)	28	Mn (mg)	0,027
Vitamines					
Vit A (mg)	11	Vit E (mg)	0,24-0,38	Vit B5	0,025
Vit C (mg)	40-80	Vit B3 (mg)	0,028	Vit B9	0,037
Glucide (g)	11.75	Sucre simple (g)	08,5-09,5	Energie (Kcal)	42-69
Lipide (g)	0,12-0.3	Protéine (g)	0,8-1,6	Flavonoïdes (mg)	44,93
Fibre (g)	2-3	Eau (g)	87-92	Caroténoïdes (g)	11.75

I.4. Composition chimique des écorces d'orange

La composition chimique des écorces d'orange est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux. Ces dernières constituent un gisement riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels telles que les huiles essentielles, les fibres, les caroténoïdes, la vitamine C et les composés phénoliques) (**Ramful et al, 2010**). La couleur verte des oranges immatures est due aux chlorophylles. Au cours de la maturité, la couleur de l'épiderme ou flavédo vire du vert au jaune orangé. Ce virage résulte de la dégradation des chlorophylles et l'augmentation de la synthèse des caroténoïdes associée à la disparition des chloroplastes et la formation des chromoplastes (**Meléndez-Martínez, 2007**). Ainsi, la couleur des écorces et de la pulpe de la plupart des oranges matures est due aux pigments caroténoïdes. La couleur de certaines variétés appelées orange sanguines telles que l'orange Maltaise est due aux caroténoïdes et aux anthocyanes. Une alimentation riche en caroténoïdes peut diminuer le risque du cancer, la dégénérescence musculaire, les dommages de la peau induits par les brûlures du soleil et les maladies cardiovasculaires (**Aust Et Al., 2001 ; Wang et al, 2008**).

La composition chimique globale des écorces d'agrumes des principales variétés comestibles, exprimée en g pour 100g base sèche (bs), le tableau ci-dessous résumer les compositions chimiques d'orange

Tableau 03: La composition chimique pour 100g de l'écorce d'orange (**Teuscher et al, 2005**)

Constituants	Quantités g
Fibres	41.64
glucides	15.01
Protéines	1.79
Lipides	1.66
Caroténoïdes	0.04
Phénols	1.89
Vitamines	0.15
Huiles essentielles	0.6
Eau	3.14
Minéraux	3.45
Vitamine C	0,145

I.5. Utilisation de l'écorce d'orange

I.5.1. Utilisation alimentaire

En cuisine, les écorces d'oranges peuvent être utilisées en tant que confites, pâtes de fruits, glaces, eau de fleurs d'oranger, liqueurs à base d'écorces d'oranges douces et amères (**Bousbia. ,2011**). Les fibres des écorces d'agrumes sont naturellement associées avec des composés bioactifs (composés phénoliques, vitamine C) ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles multiples pour les utiliser dans la formulation des aliments diététiques (**Fernandez-Lopez et al, 2004**). La pectine est utilisée en industries agroalimentaires grâce à son pouvoir épaississant, texturant mais aussi pour son pouvoir gélifiant et stabilisant explorer sur plusieurs formulations (produits laitiers, préparations à base de fruits, crèmes glacés, produits à base émulsionnée, confiture et gelées) (**Hawthorne et al, 2000**).

Grâce à leur pouvoir adsorbant de l'eau, les fibres consommées gonflent dans l'estomac et l'intestin et jouent le rôle de coupe-faim en procurant une sensation de satiété. Les fibres insolubles facilitent le transit intestinal, tandis que les fibres solubles favorisent la croissance de la flore intestinale et améliorent par la suite la digestion. La consommation des fibres réduit le risque des maladies cardiovasculaires, du cancer du côlon et de l'obésité.

I.5.2. Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques

Les extraits naturels des écorces sont également l'un des intrants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et autres produits cosmétiques (**Lohrasbi et al., 2010**). La pectine peut être utilisée dans la fabrication des suspensions pharmaceutiques (**PiriyaPrasarth et Sriamornsak, 2011**), des médicaments de détoxification et anti-diarrhéiques (**Liu et al, 2003 ; Fernandez-Lopez et al, 2004**), également permet de réduire le niveau de cholestérol (**Wang et al, 2014**) et se présente aussi comme agent anticancéreux (**Maxwell et al, 2012**).

I.6. Orange douce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

Au 17^{ème} siècle, son appellation était Orange du Portugal, Orange douce et le plus populaire Orange de la Chine. Depuis, son nom scientifique est devenu *Citrus sinensis* (agrumes chinois). Elle représente l'espèce commerciale de *Citrus* la plus importante dans le monde.

I.6.1. Nomenclature

- ✓ **Nom commun** : Orange douce.
- ✓ **Nom scientifique** : *Citrus sinensis* variété *Thomson navel*

I.6.2. Systématique de la plante

D'après **Guignard (2001)**, la position systématique de l'orange douce est comme suit :

Règne : Végétal.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement : Angiospermes.

Classe : Eudicotylédones.

Ordre : Rutales.

Sous-classe : Rosidées.

Famille : Rutaceae.

Genres : Poncirus, Fortunella, et Citrus.

Espèce : *citrus sinensis*

I.6.3. Variétés de *Citrus sinensis*

L'oranger *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, est l'espèce du genre Citrus la plus importante, tant par le nombre de variétés qu'elle renferme, que par l'importance de ses productions. Les fruits sont de forme et de coloration variables suivant les variétés, ce qui permet de classer les oranges en quatre groupes :

- **Les oranges blondes Navel (précoce)** : Elles se différencient des autres par deux caractéristiques : la présence au sein de l'apex, d'un fruit rudimentaire « *Navel* » et l'absence de pépins. les variétés les plus communes sont *Washington*, *Thomson* ;
- **Les oranges blondes** : communes (multipliées traditionnellement et contenant des pépins) et fines (plus cultivées pour leur productibilité, époque de production, absence de pépins). Les variétés de ce groupe sont : *Salustiana*, *Hamlin*, *Cedenera*, *Shamouti* et *Valencia late* ;
- **Les oranges sanguines** ne se distinguent des blondes que par la présence de pigments anthocyaniques dans l'épiderme et la pulpe. Les variétés sont : *Double fine améliorée*, *Moro* et *Tarocco* ;

- **Les oranges sans acidité** : comme les Limettes, limonettes, et les citrons doux sont insipides. Les variétés sont Impérial, Réal, Lima. (Ferhat et al, 2010).

La production des oranges en Algérie est très diversifiée, apparaitre des variétés diffères les plus cultivent : Les variétés précoces, *Thomson* et *Washington navel*, *Valencia-Late*, *Sanguine* et *Double Fine*, *Sanguinelli*.

I.6.4. Composition chimique et valeur nutritive de *Citrus sinensis*

L'orange contient en moyenne 12 % de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C (80mg/100g), vitamines P, B1, B9, E, provitamine A. Riche en calcium (40 mg /100 g), riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion. (Bousbia, 2011). Le tableau 04 représente les principaux composés de l'orange

Tableau 04 : Principaux composés de l'orange (Anonyme, 2007)

Constituants	Teneurs
Glucides	8,5 à 12 % dans le fruit à maturité, représente par le saccharose (40 %). Fructose et glucose
Acides organiques	1,2 %, surtout de l'acide citrique et de l'acide malique
Autres composés Energétiques	Lipides concentres dans les pépins peu de protéines
Vitamines	Teneur élevée en vitamine C (40 à 80 mg pour 100g). Vitamines hydrosolubles qui sont toutes des vitamines du groupe B (B1 et B9, en particulier), vitamine A (0,05 à 0,2 mg pour 100g), vitamine E (0,24mg pour 100g).
Minéraux	Calcium, Magnésium, Potassium et Phosphore
Oligoéléments	Fer, Cuivre, Zinc, Manganèse, Nickel, Iode, trace de Bore et de Sélénium
Fibres	Une teneur de 2,4 % en moyenne, elles ont l'originalité d'être riches en pectine (environ 50 %)
Flore mésophile	Levures et lactobacilles indispensables à sa bonne digestion
Substances aromatiques	Ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (aldéhydes, esters... etc.), des essences odorantes
Pigments	Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orange pour les flavonoïdes et les caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge ou rouge violace pour les anthocyanes

I.2. Les huiles essentielles

Le terme « Huiles essentielles (H.Es) » est un terme générique qui désigne les composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une forte et caractéristique odeur. En effet, les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques (**Duquénois et Anton., 1968**). Les H.Es ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**Bruneton., 1999**).

I.2.1. Qu'est-ce qu'une huile essentielle (HE)?

Selon sa profession, chacun répondra à la question d'une manière différente. Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste (**Moro Buronzo A., 2008**). Avant tous, il ne faut pas confondre essence et huile essentielle. Une essence est une sécrétion naturelle élaborée par un organisme végétale tandis qu'une huile essentielle est un extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques obtenu par distillation. Sont également définis comme des substances huileuses de composition généralement assez complexe, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation (**Belaiche., 1979**).

Par conséquence, l'huile essentielle est une essence extraite et modifiée selon les procédés d'obtention mis en œuvre. Elle répond aux critères de la norme **AFNOR NF 75-006 (février 1998)** comme étant un « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (**Clarke S., 2008**).

Les H.Es ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**Bruneton., 1999**).

I.2.2. Localisation

Les H.Es n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèces qu'elles regroupent en particulier dans les familles : Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Apeaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae Asteraceae (**Mohammedi, 2006**).

La synthèse et l'accumulation des H.Es sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans les cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), dans les poils sécréteurs (*Lamiacées*), dans des poches sécrétrices

(*Rutaceae*) ou dans les canaux sécréteurs (*Apiaceae*). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essence sont localisées dans les tissus internes.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huiles essentielles sont entourées de membranes spéciales constituées d'ester, d'acide gras hydroxylés hautement polymérisés associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et de leur perméabilité extrême réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (**Iskender et al, 2009 ; Bruneton, 2009**).

Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, Eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore, gingembre), sève (encens, myrte), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graines (carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe (**Bruneton., 1999**).

I.2.3. Biosynthèses d'H.E

Dans les métabolites secondaires on trouve deux groupes chimiques majeurs entrant dans la composition des huiles essentielles : les terpènes (issus de la voie de synthèse terpénique) et les composés aromatiques (issus de la voie de synthèse aromatique) (**Hopkins, 2003**).

I.2.3.1. Voie terpénique

Les terpènes naturels sont des molécules plus ou moins complexes résultant de la condensation d'un nombre entier d'unités isopréniques. Une unité isoprénique est pentacarbonée et ramifiée. La molécule de base de la voie de synthèse des terpénoïdes est l'isoprène (molécule à 5 atomes de carbone) la formule semi-développée présentant dans la figure

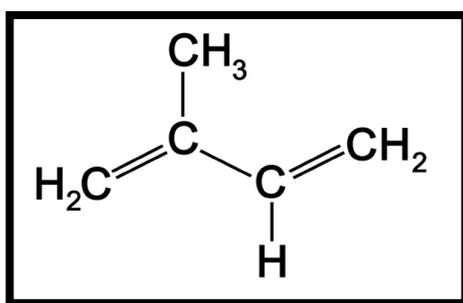


Figure 02: Isoprène ou 2-méthyl-1,3-butadiène (formule semi-développée) (**Lamarti et al, 1994**)

Ensuite par phosphorylation l'isoprène est transformé en isopentényl-pyrophosphate (IPP) aussi appelé « isoprène actif ».

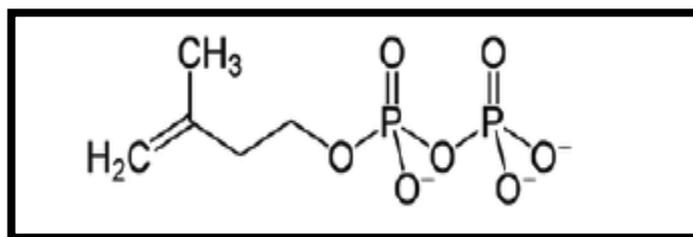


Figure 03 : Isopentényl-pyrophosphate (formule semi-développée) (Lamarti et al, 1994)

De façon simplifiée le nombre variable de combinaisons de molécules d'IPP (parfois appelées unités isopréniques) va aboutir à la formation des différents groupes de terpénoïdes :

- **monoterpènes** : 2 unités isopréniques (2x5C)
- **sesquiterpènes** : 3 unités isopréniques (3x5C)
- **diterpènes** : 4 unités isopréniques (4x5C)
- **triterpènes** : 6 unités isopréniques (3x5C + 3x5C)
- **tétraterpènes** : 8 unités isopréniques (4x5C + 4x5C)

Ce dernier, sous sa forme réactive est isopentényl-pyrophosphate IPP qui se transforme en diméthyl-allyl pyrophosphate DMAPP schématisée dans la figure 04. Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranyl pyrophosphate GPP, précurseur des monoterpènes en C10. On trouve dans la nature plus de 900 composés.

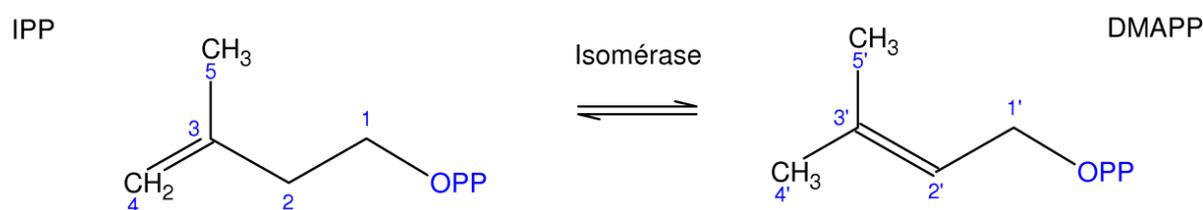


Figure 04 : Schéma de l'IPP et du DMAPP avec la numérotation des carbones (Rohmer et Rohmer 1999).

Une deuxième molécule d'IPP réagissant sur le GPP, fournit farnésyl pyrophosphate FPP, précurseur des sesquiterpènes en C15, puis une troisième molécule d'IPP réagissant sur FPP fournit le géranylgéranyl pyrophosphate GGPP, précurseur des diterpènes en C20. (Sienkiewicz et al, 2012) (Leopoldini, 2004). Ces précurseurs de terpènes sont synthétisés par des enzymes de la famille des prényltransférases par condensation de l'IPP avec le DMAPP, le GPP ou le FPP respectivement. Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, l'hydratation, la conjugaison et /ou d'autres

transformations donnent une variété de terpénoïdes (Dubey et al, 2003). les différentes étapes montrées dans la figure 05.

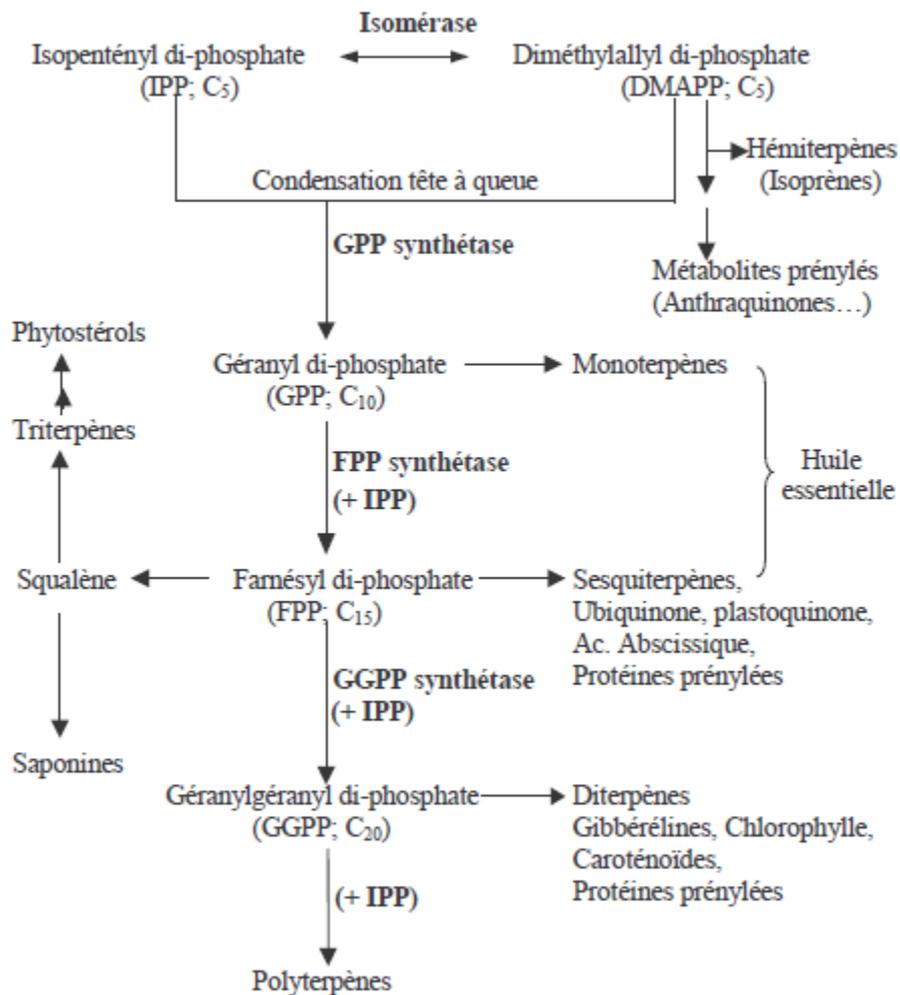


Figure 05: synthèse des classes terpéniques chez les végétaux (Dubey, 2003).

I.2.3.2. Voie aromatique ou voie de l'acide shikimique

Il existe une deuxième voie majeure aboutissant à la synthèse des molécules présentes dans les huiles essentielles : il s'agit de la voie aromatique, aussi appelée voie non terpénique ou encore voie des phénylpropanoïdes. La molécule de base de cette voie de synthèse est un métabolite issu du fructose : le phosphoénolpyruvate (PEP) dans la figure 06.

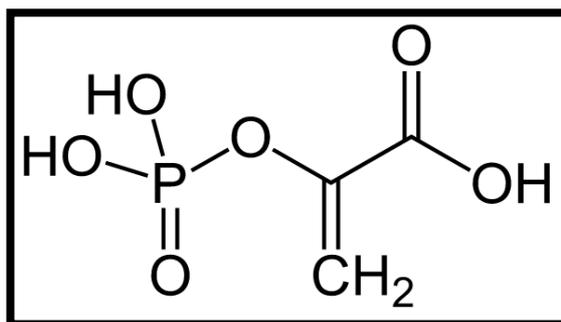


Figure 06 : Phosphoénolpyruvate (formule semi-développée)

La succession de réactions chimiques qui se déroulent au cours de cette voie de synthèse fait intervenir un intermédiaire : l'acide shikimique (qui a aussi donné son nom à cette voie de synthèse) et aboutit à la formation directe de composés oxydés tels que les phénols, les acides ou encore les coumarines. Ces composés pouvant à leur tour être transformés en d'autres tels que les phénol-méthyl-éthers. (Courtial, 2005).

Remarque : à côté de ces deux principales voies métaboliques il existe des voies minoritaires permettant la synthèse de composés à très courtes chaînes carbonées (moins de 10 atomes de carbones) ou encore des composés soufrés ou azotés entrant dans la composition des huiles essentielles.

I.2.4. Compositions chimiques des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977).

Plus de 300 composés différents peuvent être identifiés dans les huiles essentielles. Trois groupes de composés ont été décrits (Pichersky et al, 2006). Le principal groupe est composé de terpènes et les Terpénoïdes, majoritairement des monoterpènes et des sesquiterpènes (Ruberto and Baratta, 2000), les autres groupes comprennent les composés aromatiques (phénoliques) et dans une moindre mesure des composés aliphatiques (alcanes et alcènes) qui sont généralement en trace. Tous les composés sont caractérisés par un faible poids moléculaire (Bakkali et al, 2008).

I.2.4.1. Terpènes et Terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes (C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes

(C₁₅H₂₄), les diterpènes, formés de quatre isoprènes (C₂₀H₃₂). Les tétraterpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes (C₅H₈)_n où n peut-être de 9 à 30 (**Hernandez-ochoa, 2005**). Les Terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide, etc.).

- **Monoterpènes**

Ils sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.Es, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de des substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone, β- vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate α- terpinyle)

- **Sesquiterpènes**

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β-caryophyllène, β-bisabolène, α-humulène, α- bisabolol, farnesol (**Bruneton, 1999 ; Hernandez-ochoa, 2005**).

I.2.4.2. Composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (**Teisseire, 1991**). voir la figure 07

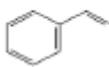
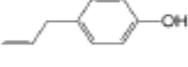
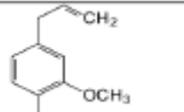
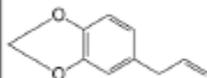
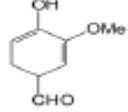
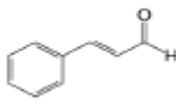
			
Styrene benzene	Cinnamyl alcohol alcohol	Charvicol phenol	Eugenol phenol
			
Anethol Methoxy derivative	Safrol Methylene dioxy compound	Vanilline Phenol	Cinnamaldehyde phenol

Figure 07: Structures de quelques composés aromatiques

I.2.4.3. Composés d'origine diverses

Il existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléique et α -linoléique en (3-cis hexanol, decanal, β -ionone) (**Piochon, 2008**).

I.2.5. Facteurs influençant la composition chimique

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'H.E. Ainsi, la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction ; sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les citrus ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée. Les fleurs de *Chrysanthemum caronarum* sont riches en H.E sous l'effet de fertilisants (**Bruneton, 1999**).

I.2.6. Rôles physiologiques

Le rôle physiologique des huiles essentielles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés. Selon **Bakkali (2008)**, les H.Es peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables.

I.2.7. Propriétés physiques

Les H.Es sont en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeur très forte, incolores, jaunes pâles ou quelques fois bleues. Leur densité est <1 sauf pour les H.Es de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), Cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et Sassafras (*Sassafras albidum*). Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants, les huiles et la vaseline; très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (**Charpentier et al, 2008**). Le terme huile s'explique par la propriété de solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus au moins forte dégagée par la plante (**Teusher et al., 2005**).

I.2.8. Méthodes d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.Es, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

I.2.8.1. Distillation

Selon **PIOCHON (2008)**, il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

- **Hydrodistillation** : Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'H.E se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'H.E étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (figure 08). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi, 2005**).

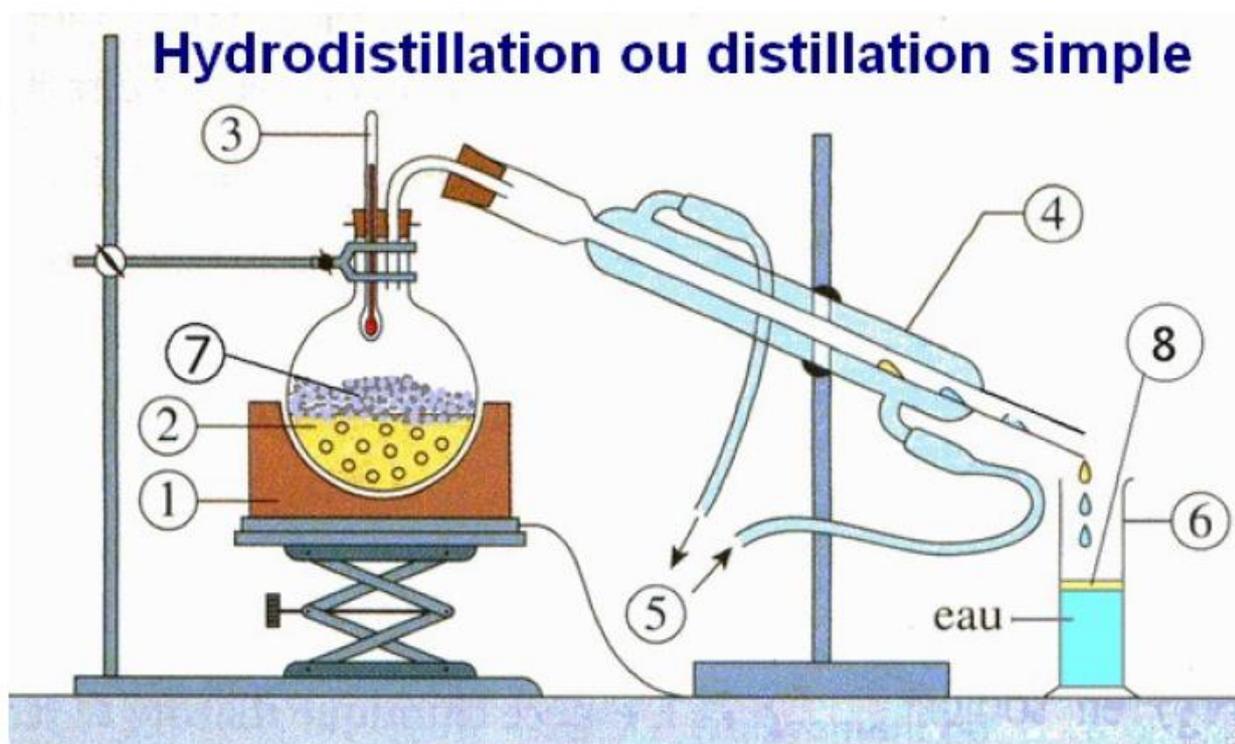


Figure 08: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (**LUCCHESI, 2005**).

- | | |
|-------------------|----------------------------------|
| 1- Chauffe ballon | 5 - Entrée et sortie d'eau |
| 2- Ballon | 6 - Erlenmeyer |
| 3- Thermomètre | 7 - Matière à extraire l'essence |
| 4- Réfrigérant | 8 - La couche d'H.E |

- **Distillation par entrainement à la vapeur d'eau** : dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.
- **Hydrodiffusion** : cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils.

I.2.8.2. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**).

I.2.8.3. Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon et al, 2007**).

I.2.8.4. Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne

contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E (**Hernandez-ochoa, 2005**).

I.2.8.5. Extraction par fluides supercritique

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (figure 09). En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit. Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars, $T^{\circ}= 31,1^{\circ}\text{C}$), le CO_2 possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (**Piochon, 2008**).

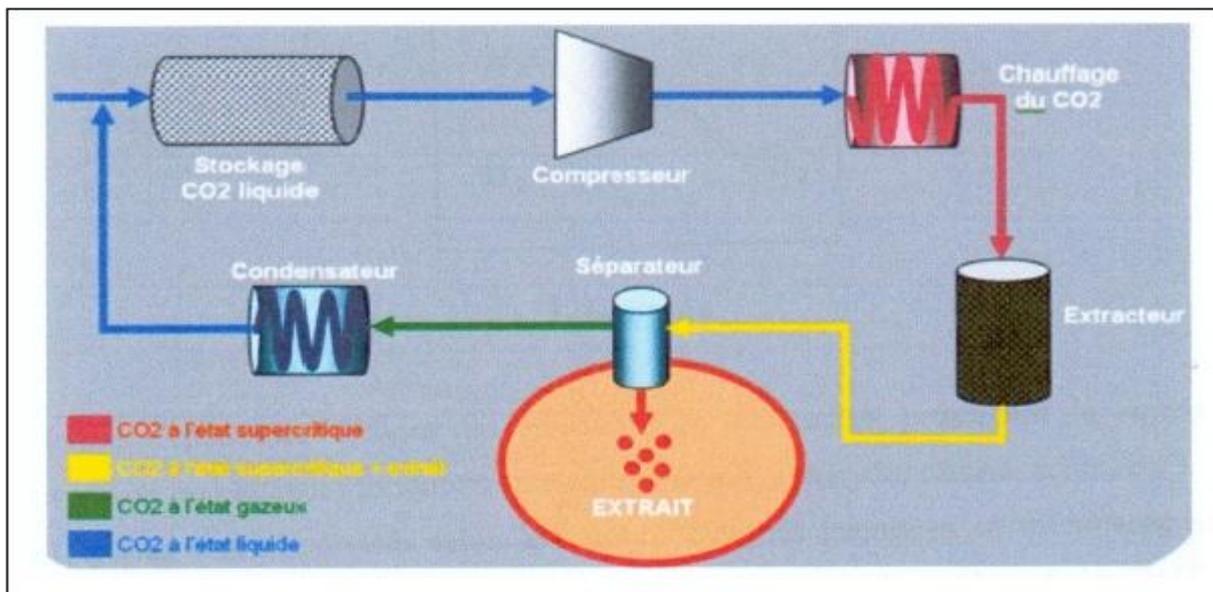


Figure 09: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO_2 supercritique

(**Pourmortazavi, 2007**).

I.2.9. Effets biologiques

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (**Bandoniene et al, 2000**). Les HEs ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisés pour leurs propriétés antiseptiques (**El Kalamouni, 2010**). Plusieurs

travaux de recherche ont rapporté les nombreuses applications thérapeutiques des HEs (**Valnet, 1984; Franchomme et Pénoel, 1990; Bruneton, 1999 ; Bakkali et al, 2008**). Ces dernières sont utilisées dans divers domaines : en cosmétologie, pharmacologie, nutrition, aromathérapie, etc. (**Lubinic, 2003 ; Teuscher et al, 2005 ; Liu, 1995 ; Ouraïni et al, 2005 ; Neffati et al, 2009 ; Sultos et al, 2009**). Plusieurs H.Es présentent un potentiel antioxydant par le piégeage des radicaux libres, entre autres l'HE du girofle, du gingembre, du curcuma, etc. (**Teuscher et al, 2005**). En cosmétologie, les H.Es sont utilisées comme éléments parfumant et servent aussi à préserver ces cosmétiques. En industrie agroalimentaire, utilisées sous forme d'épices, elles sont introduites dans les denrées alimentaires pour rehausser leur goût et exercer un effet antimicrobien. (**Bruneton, 1999 ; Bekhechi et Abdelouahid, 2010**).

De nombreuses études ont montré que l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (**Lahlou, 2004**) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant (**Pibiri, 2006**).

I.3. Activité biologique

I.3.1. Stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans cette situation, on dit que la balance antioxydants/ peroxydant est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ». (Favier, 2003).

I.3.1.1. Définition

Le stress oxydant est défini comme une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui dépasse leurs capacités antioxydantes (Favier, 2006) entraînant un déséquilibre entre la production d'oxydants et les mécanismes de défense antioxydante (Morena et al., 2002). La figure 10 explique les circonstances menant à un stress oxydatif. Ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. (Haleng et al., 2007).

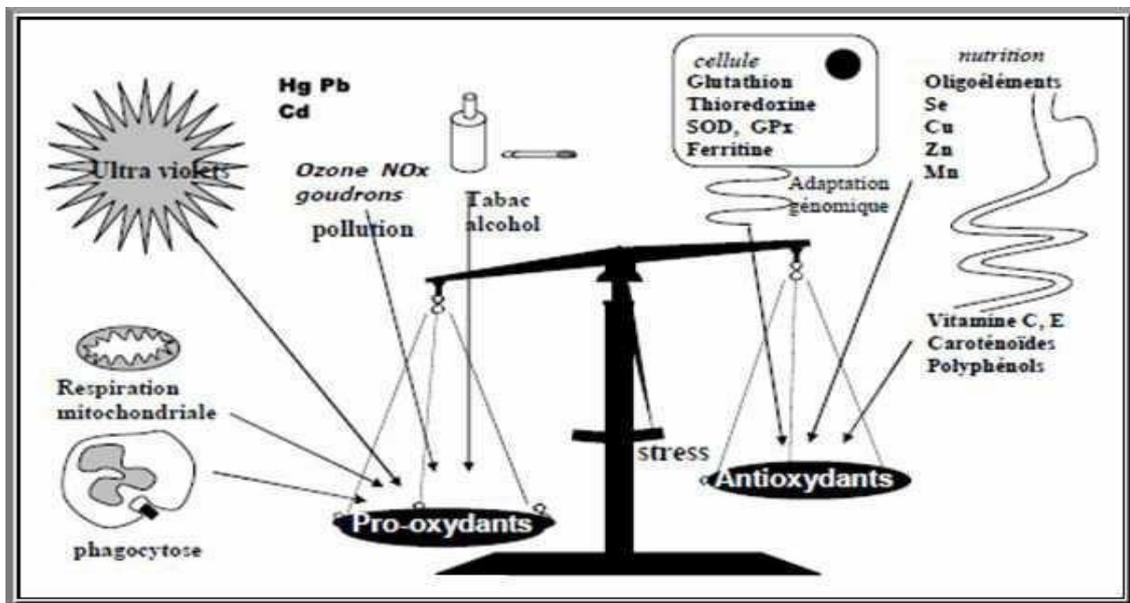


Figure 10. La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006)

I.3.1.2. Radicaux libres

La présence des radicaux libres dans les matières biologiques a été découverte à moins de 50 ans (Dröge, 2002). Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène ou espèces réactives à l'oxygène (ERO). Dans certaines

conditions pathologiques, ces ERO ainsi que leurs dérivés sont produits de façon excessive (Afonso et al., 2007).

- **Définition**

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, (Tessier et Marconnet., 1995 ; Gaudable et Favier, 1997) capable d'avoir une existence indépendante (<< libre >>) et contenant un ou plusieurs électrons célibataire (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable. Il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Gaudable et Favier, 1997). Tous les ERO ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité est très variable selon la nature du radical (Afonso et al. 2007).

Certains radicaux libres sont bénéfiques et utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions cellulaires comme la prolifération et la mort cellulaire programmée (apoptose), impliquant des modifications des voies de signalisation intracellulaires associées à une modulation de l'expression génique (Hassaine, 2016).

- **Formes des radicaux libres**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, un ensemble de composés radicalaires jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les principaux radicaux libres sont résumés dans le Tableau 01 (Haton, 2005).

Tableau 05. Principaux radicaux libre et leur structure chimiques (Haton, 2005)

Radicaux libre (nomenclature)	Structure chimique
Anion Superoxyde	$O_2^{\circ-}$
Peroxyde d'Hydrogène	H_2O_2
Radical Hydroxyle	OH°
Radical Hydroperoxyde	HOO°
Radical Peroxyde	ROO°
Radical Alkoxyde	RO°
Peroxynitrite	$ONOO^{\circ}$

Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^\bullet , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003)**.

I.3.1.3. Production des radicaux libres (la source)

On distingue deux types de production des radicaux libres :

- **Production endogène**

Les sources de l'Anion superoxyde ($O_2 \cdot^-$) sont multiples, L'une des sources ces physiologiques majeurs est La chaîne respiratoire mitochondriale (**Marfak, 2003**). Peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. Environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction 01) conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$, au niveau de l'ubiquinone (oucoenzyme Q).

Réaction 01



De même, la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, peuvent conduire à la formation de radicaux $O_2^{\cdot-}$. (**Monique et al., 2003**). Il peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes (**Marfak, 2003**).

D'autre part les ROS peuvent se produire au cours des processus pathologiques ou la production du radical répond à une stimulation et intervient dans le processus inflammatoire (la xanthine oxydase) (**Antwerpen, 2006**). D'ailleurs le système xanthine/xanthine oxydase permet aussi la production de l'anion superoxyde selon la Réaction02 :



Une autre espèce réactive oxygénée produite au cours de l'inflammation est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; en vue de réagir directement ou de produire l'acide hypochloreux par l'intervention de myéloperoxydase. Cette espèce (HClO) est caractérisée par un pouvoir oxydant plus élevé que le H_2O_2 .



Le monoxyde d'azote est produit aussi par un système enzymatique NO synthétase (NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (Favier, 2003).

- **Production exogène**

Les êtres vivants sont soumis à l'agression de différents agents exogènes capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV (ultra-violet) sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ , soit en activant des molécules photo sensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Favier, 2003).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels) sont responsables d'une auto oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Hassaine, 2016). Les différentes sources des ERO mentionnées précédemment, ainsi que leurs différentes cibles sont résumées dans la figure 11.

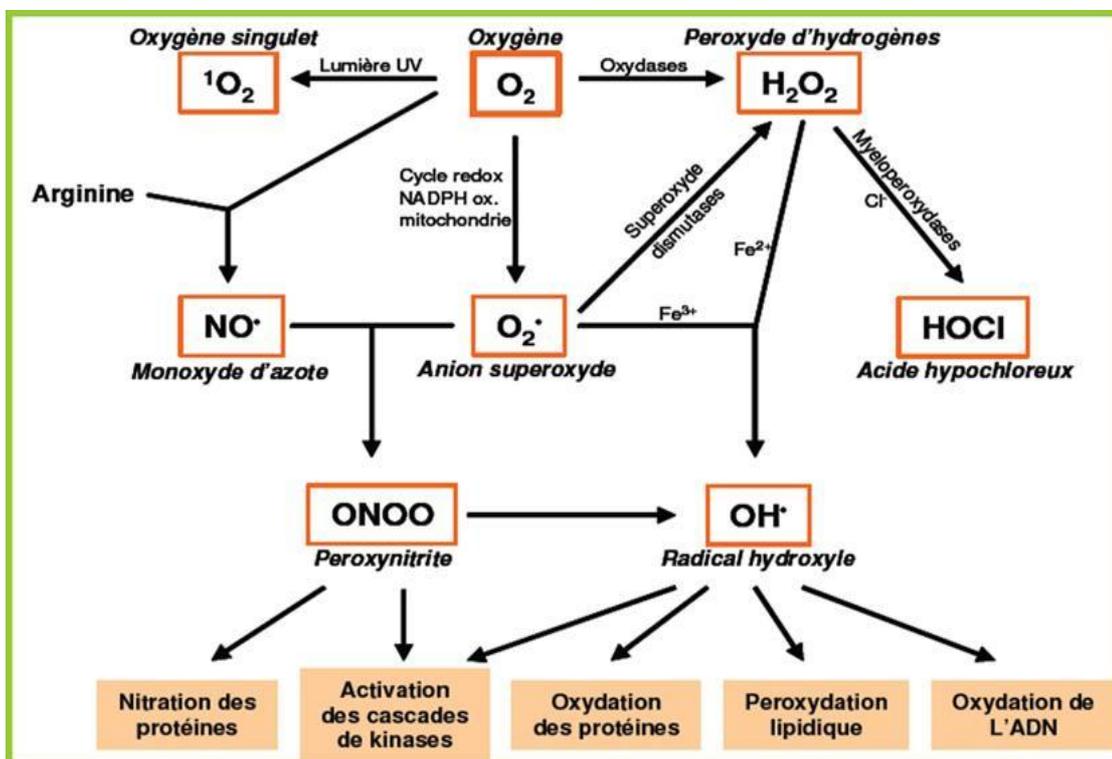


Figure 11. Origine des différents radicaux libre oxygénés (Favier, 2003).

Les ERO non détoxifiés par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact (notamment les lipides, les protéines et l'ADN) (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

I.3.1.4. Conséquences du stress oxydant

Les Radicaux libre sont impliqués dans différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (athérosclérose), la cataracte, le cancer, le vieillissement, les maladies inflammatoires (asthme, arthrite rhumatoïde, allergies), et les maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer) (**Issaadi, 2010**).

Le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres ce qui explique l'implication de ce stress. Les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créent des lésions de l'ADN, amplifient les signaux de prolifération et inhibent les gènes suppresseurs de tumeur (**Hassaine, 2016**).

De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : malformations des fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2006**).

I.3.2. Activité anti-oxydante

Des nombreux composés phytochimiques y compris les H.Es commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants (**Hellal, 2011**).

- **Définition**

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO (**Favier, 2003**). Ils sont des agents qui réagissent facilement avec les substances oxydantes pour les inactiver et les éliminer, ou diminuer leur production. La plupart des antioxydants peuvent être divisés en 2 groupes : endogène et exogène (**Massarat., 2011**).

I.3.2.1. Antioxydants endogènes

Antioxydants endogènes enzymatique

- **Superoxyde dismutase (SOD)**

Cette enzyme catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} en H₂O₂. La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une

forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Garait, 2006).

- **La catalase**

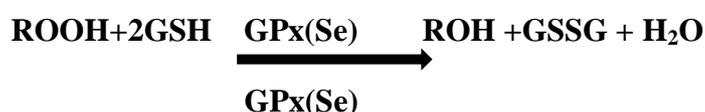
L'On retrouve principalement au sein des peroxysomes, dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Valko et al., 2006)

- **La glutathion peroxydase**

Le (GPX) est un enzyme qui décompose aussi le peroxyde d'Hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène (Bédane, 2008).

Elles catalysent la réduction par la glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène en eau et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (ROOH) en alcools et des espèces radicalaires en espèce non radicalaire.

Les réactions mise en jeu sont les suivantes (Reichel, 2010).



Antioxydants non-enzymatiques

Ce type d'antioxydant possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Parmi ces molécules on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et certaines protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'ERO (Pincemail., 2002).

I.3.2.2. Antioxydants exogènes

L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogène naturel présent dans son alimentation (pham-Huy et al., 2008 ; Kalam et al., 2012) dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Parmi ceux-ci, on retrouve certaines vitamines : la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (ascorbate), les

caroténoïdes (vitamine A et β -carotène, les flavonoïdes...), les polyphénols, les acides gras (oméga-3 et oméga-6) et les oligoéléments (zinc, manganèse et sélénium) et les huiles essentielles (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Ces substances ne permettent que l'élimination d'un seul radical libre à la fois pour pouvoir fonctionner à nouveau. Donc, ils peuvent être régénérés par d'autres systèmes (Pham-Huy et al., 2008). Les différents antioxydants sont résumés dans la figure 12.

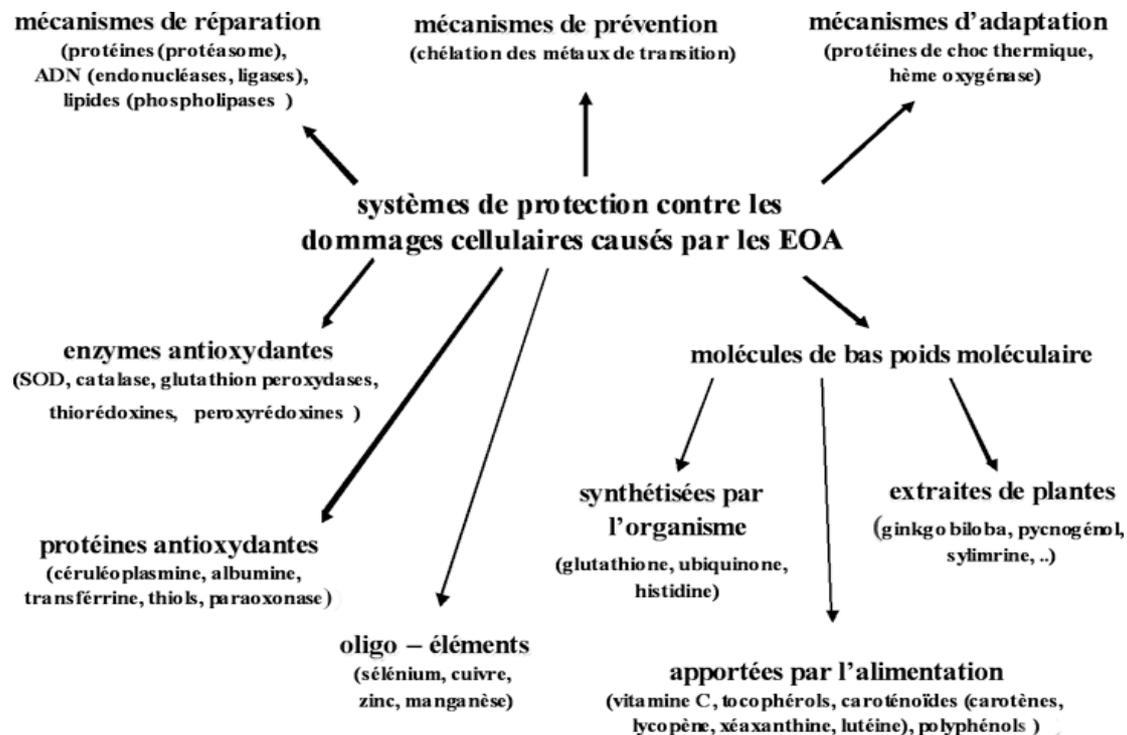


Figure 12. Réseau des antioxydants (Defraigne et Pincemail, 2008)

I.3.2.3. Mode d'action des antioxydants

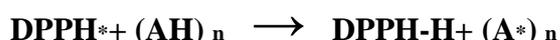
Les antioxydants sont des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Berset et Cervelier, 1996).

I.3.2.4. Tests d'activité antioxydante

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation (Hellal, 2011) parmi lesquelles : test de DPPH, test de la réduction du fer FRAP, test du blanchissement de β -carotène, Ainsi les tests de TEAC et ORAC. Les tests les plus souvent utilisés et faciles sont le test de DPPH et le test de la réduction du fer FRAP.

I.3.2.4.1. Test du DPPH

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William et al., 1995).

I.3.2.4.2. Test de réduction du fer FRAP

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (Ou et al., 2001). La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung et al., 2002). La réaction de réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} à la présence d'un antioxydant (AH) est résumée dans la figure 13

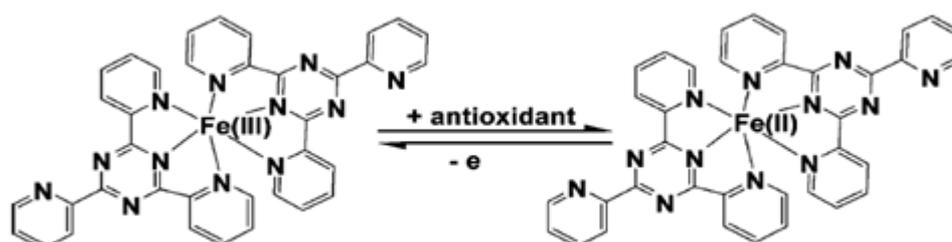


Figure.13 Mécanisme réactionnel intervenant lors du test du FRAP. (Hmid., 2013)

I.3.3. Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1955**). Depuis, de nombreuses huiles essentielles ont été investies pour leur activité antibactérienne (**Burt, 2004**). Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à une autre et d'une souche bactérienne à une autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

I.3.3.1. Définitions

La substance antibactérienne de source végétale est définie comme étant des molécules utilisées pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance; la sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de la substance antibactérienne (**Dorman et Deans 2000**).

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (**Prescott et al, 1995**). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, les antibiotiques peuvent exercer leurs actions sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».

I.3.3.2. Origine d'antibiotique

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (**Newman et al, 2003 ; Singh et Barrett, 2006**). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

I.3.3.4. Cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques avec leurs diverses classes sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie d'une façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. Cette grande spécificité d'action explique leur activité à très faible concentration (**Mevius et al, 1999**). Les différents mécanismes d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne sont résumés dans la figure 14.

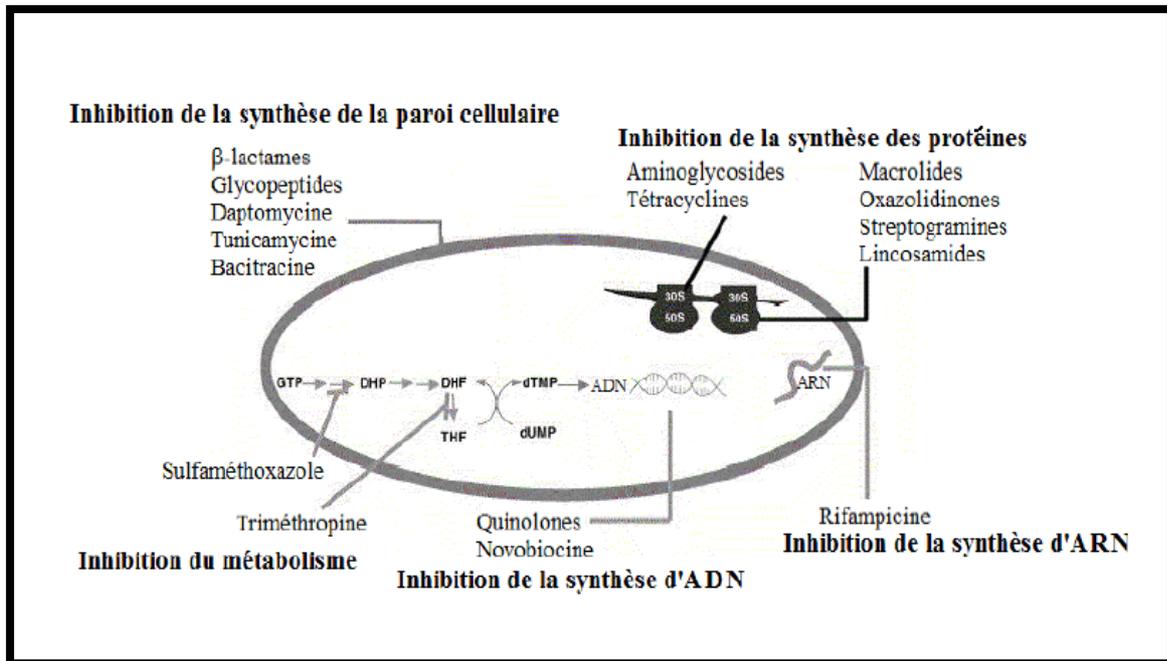


Figure 14 : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

DHP : dihydroptéroate
 DHF : dihydrofolate
 THF : tétrahydrofolate

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens.

Les antibiotiques peuvent également inhiber la synthèse de la paroi cellulaire : la pénicilline et la Céphalosporine prennent le rôle d'inhibiteur de la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane au cours de la multiplication cellulaire (Zeba, 2005).

Un autre mécanisme correspond à l'inhibition de la synthèse des ribosomes bactériens :

- Chloramphénicol et Erythromycine se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction
- Tétracycline Bloque la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome
- Streptomycine se fixe sur la sous-unité 30S du ribosome et bloque en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture

I.3.4.3. Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles :

Les mécanismes par lesquels les H.Es exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique. Il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des H.Es. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Dorman et Deans, 2000**).

Burt(2004) a avancé que la caractéristique importante des H.Es est attribuée l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules. (**Oussalah et al, 2006**), suggère que, l'action des H.Es sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des H.Es dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe dont les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (**Burt, 2004**). Il existe cependant quelques exceptions. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (**crisiani et al, 2007**).

I.3.3.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactéricide et bactériostatique d'une H.E est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques»
- ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».

I.3.3.6. Relation entre l'activité antibactérienne et la composition d'huile essentielle :

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes.

L'activité biologique d'une H.E est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques et cétoniques). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des H.Es et semblent agir en synergie avec les composés principaux (**Zhiri, 2006**) ; les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes (**Dorman & Deans, 2000**).

L'efficacité d'une H.E dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l'H.E est riche en substances actives, plus son activité est importante ; les principaux composés chimiques ayant une activité antibactérienne est résumée dans le Tableau 06.

Tableau 06 : Les principales compositions des huiles essentielles à activité antibactérienne (Burt, 2004)

Composés majoritaires des H.Es	Les caractéristiques fonctionnelles
Carvacrol	<ul style="list-style-type: none"> - Le plus actif de tous - Etre non toxique - Augmenter la perméabilité membranaire (Lambert et al, 2001) - Il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons
Eugénol	<ul style="list-style-type: none"> - provoquer une dégradation de la paroi cellulaire entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires (Gill et Holley, 2006). - utilisé dans les produits cosmétiques et alimentaires. - à activité antibactérienne
Thymol	<ul style="list-style-type: none"> - Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. - Entraîne une diminution de la taille des bactéries. - Une altération de la paroi bactérienne. - Une agrégation du cytoplasme et un rapprochement des cellules
Cinnamaldéhyde	<ul style="list-style-type: none"> - Très actif contre de nombreuses bactéries Gram positives et Gram négatives (Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Entérobactère sp). - Il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (Gill et Holley, 2004 et 2006)

Les principaux constituants des huiles essentielles décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires.

II. Méthode d'analyse

Les différentes recherches effectuées dans cette étude ont été réalisées au niveau de :

- ✓ Laboratoire pédagogique du département biologie appliquée.
- ✓ Laboratoire pédagogique de département des sciences de la terre et de l'univers.
- ✓ Laboratoire de recherche sur les molécules bioactives et applications.

II.1. L'extraction d'huile essentielle

II.1.1. Matériel végétal

Les oranges (originaires du nord algérien) ont été achetées au niveau du marché de la willaya de TEBESSA au cours des mois de novembre à mars et ont été choisies sur la base de critères descriptifs de l'espèce *Citrus sinensis* (variété Thomson navel). Les oranges sélectionnés sont mûrs et sains. Les écorces ont été coupées en petits morceaux puis séchées à l'ombre pendant une semaine à température ambiante.



Figure 15 : Séchage des écorces d'orange (*Citrus sinensis*).

II.1.2. Matériel d'extraction

Le Tableau ci-dessous représente les différents matériels et les instruments utilisés pour la procédure d'extraction.

Tableau 07 : Liste d'appareils, verreries et produits utilisés pour l'extraction.

Appareil	Verreries et Autres	Solvant et Soluté
Balance (Scout Pro)	Eprouvette de 500 ml	Eau distillé
Hydro-distillateur de type Clevenger : Chauffe-ballon Ballon en verre pyrex 2000 ml Une colonne Un réfrigérant Un collecteur	Bécher de 50 ml	Acétone
	Flacon en verre du 5 ml	
	Pissette	
	Entonnoir	
	Papier aluminium	

II.1.3. Procédé d'extraction

Cent grammes (100g) d'épicarpes séchés ont été introduits dans un ballon à fond rond de 2000 ml, auxquels 1200 ml d'eau distillée a été ajoutée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 03 heures. Le chauffe-ballon permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon. La vapeur d'eau provenant de l'échauffement du ballon est condensée dans un réfrigérant. L'huile essentielle étant de densité faible est séparée de l'eau dans collecteur en verre. L'huile essentielle a été récupérée dans un flacon ambrée et stockée à une température de réfrigération jusqu'à son utilisation.

II.1.4. Calcul du rendement de l'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle a été déterminé par le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et celles de la matière sèche utilisée selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'huile essentielle(g)}}{\text{Masse du matière végétal utilisé (g)}} \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle d'épicarpes

II.2. Evaluation de quelques indices physicochimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles caractérisées par leurs propriétés chimiques (indice d'acide, d'ester et de saponification) ainsi que par leurs propriétés physiques (la densité, le pH et l'indice de

réfraction). En outre, les huiles essentielles peuvent être caractérisées par des propriétés organoleptiques qui comprennent l'aspect, la couleur et l'odeur de l'huile.

II.2.1. Mesures des indices chimiques

II.2.1.1. Indice d'acide

L'indice d'acide permet de vérifier la qualité d'une H.E, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant le stockage. Il se définit comme le nombre de milligrammes (mg) d'hydroxyde de potassium KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle (NF ISO 1242 : 1999 (T 75-103) (Lion, 1995)).

➤ Principe

Le test consiste en la neutralisation de la solution d'huile essentielle dissoute dans l'éthanol, à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, en utilisant la phénolphaléine comme indicateur coloré.

➤ Mode opératoire

0,25g d'huile essentielle est introduit dans une erlenmeyer de 25ml, on ajoute 1,25 ml d'éthanol à 96% et environ 2 gouttes de l'indicateur coloré phénophtaléine. Puis on neutralise la solution obtenue avec l'hydroxyde de potassium KOH à 0,1N jusqu'à ce jour ce la solution rose. A la fin, en prend le volume exact de KOH consommé pour le calcul de l'indice d'acide par la relation suivante :

$$I_a = \frac{V.C. 56.11}{m}$$

V : volume en ml de la solution de KOH utilisé pour le titrage

C : concentration en mol/l de la solution de KOH

m : masse en g d'huile

II.2.1.2. Indice d'ester

La valeur de l'ester, définie comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des ester contenant dans 1 g d'H.E (NF ISO 1242 : 1999 (T 75-103) (Lion, 1995)). L'indice est calculé selon la relation suivante :

$$I_e = I_s - I_a$$

I_e : valeur d'indice d'ester

I_s : valeur d'indice de saponification

I_a : valeur d'indice d'acide

II.2.1.3. Indice de saponification

L'indice de saponification représente la quantité en mg de KOH nécessaire pour saponifier les fonctions esters, par g d'huile essentielle.

➤ Mode opératoire

0,5g d'H.E. de *C. sinensis* dans une fiole muni d'un réfrigérant puis on ajoute 5 ml de solution de KOH 0.5 N, puis on porte le mélange à ébullition en agitant de temps en temps pendant 1 h. Ensuite, on ajoute 1 gouttes de phénolphaléine, la solution est titrée avec HCl 0.5 N. Parallèlement on a effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions (Fkayobe et Adobi, 2018). Le résultat expérimental exprimé par l'équation suivante :

$$I_s = \frac{(v_0 - v_1) 28.05}{P} \left(\frac{mg KOH}{gd' HE} \right)$$

V₀ : volume en ml de la solution d'HCl (0.5N) mesuré pour l'essai à blanc

V₁ : volume en ml de la solution d'HCl (0.5N) mesuré pour le calcul d'I_s

N : normalité exacte de la solution chlorhydrique

P : masse en g d'huile.

II.2.2. Mesure des indices physiques

II.2.2.1. La densité relative à 20°C

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile, à la masse d'un égal volume d'eau distillée. Le pycnomètre est rempli successivement avec des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau distillée puis pesé (**Lion, 1955**).



Figure 16 : Pycnomètre en verre pour la mesure de la densité relative (photo personnelle).

➤ Mode opératoire

On pèse le pycnomètre vide après on remplit par l'eau jusqu'à un repère précis et on le pèse autre fois, vider le et on ajoute 01 ml d'H.E et on pèse autrement, après on complète le remplissage

du pycnomètre par l'eau jusqu'à le repère précédent, peser l'ensemble (pycnomètre -H.E-eau).

L'équation suivante exprime le résultat expérimental :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 = masse du pycnomètre vide en g

m_1 = masse du pycnomètre rempli d'eau en g

m_2 = masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle en g

II.2.2.2. Indice de réfraction.

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (**Mohamed et al.,2010**).

➤ Principe

Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700, l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée.

➤ Mode opératoire

A l'aide d'un réfractomètre on peut valoriser l'indice de réfraction d'H.E de C.s, résultat a été lu sur l'afficheur de l'appareil.

II.2.2.3. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H⁺) (appelés aussi couramment protons) en solution (**Mohamed et al. ,2010**).

➤ Principe

Le pH mesure l'acidité ou l'alcalinité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7.

➤ Mode opératoire

Nous avons utilisé pH-mètre (Consort multi-paramètre analyser C3030). Pour cela, nous avons procédé à régler la température du pH mètre sur le milieu ambiant et à rincer et essuyer la sonde à l'aide d'eau distillée. Ensuite, nous avons pris 100ml d'huile essentielle à analyser dans un

bécher dans lequel nous avons plongé la sonde du pH-mètre. Enfin, la valeur du pH a été lue sur l'afficheur de l'appareil.

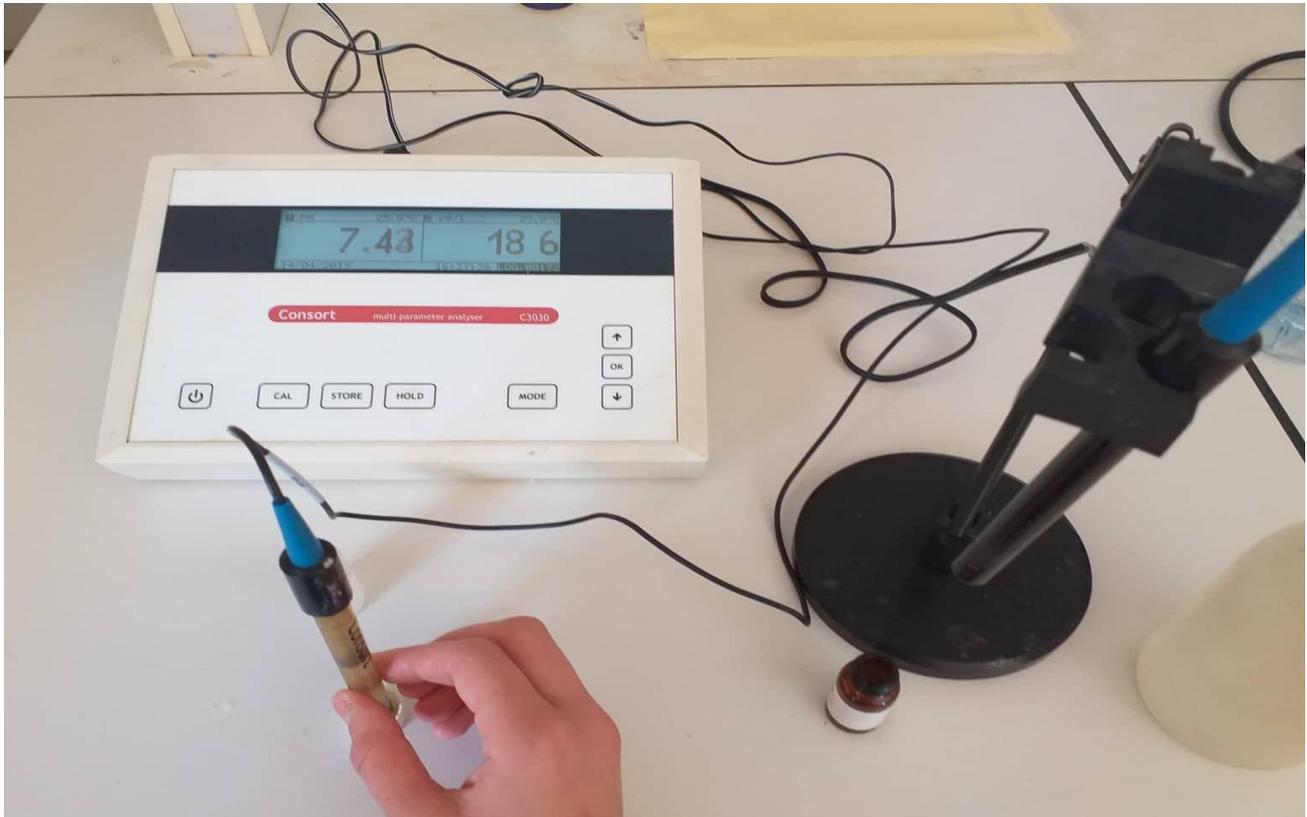


Figure 17 : Le PH mètre utilise pour mesure l'indice physique le potentiel d'hydrogène

II.3. Evaluation de l'activité biologique

II.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité anti-radicalaire des huiles essentielles d'orange a été évaluée dans ce travail en adoptant deux types de tests *in vitro*. Il s'agit de la méthode de piégeage du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle) et le test de réduction du fer (FRAP : ferric reducing antioxidant power).

II.3.1. Test d'activité anti DPPH

- **Principe**

Le DPPDH fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composes phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et al, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Popovici et al, 2009). La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en

mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette (Figure 18) se réduit en 2.2 Diphenyl- 1- picryl hydrazine de couleur jaune selon la réaction suivante : (Maataoui et al, 2006).



DPPH* : 2.2 diphényle- 1- picryl-hydrazyl

AH : un composé capable de céder un H au radical DPPH

A* : le composé oxydé après la réduction de DPPH

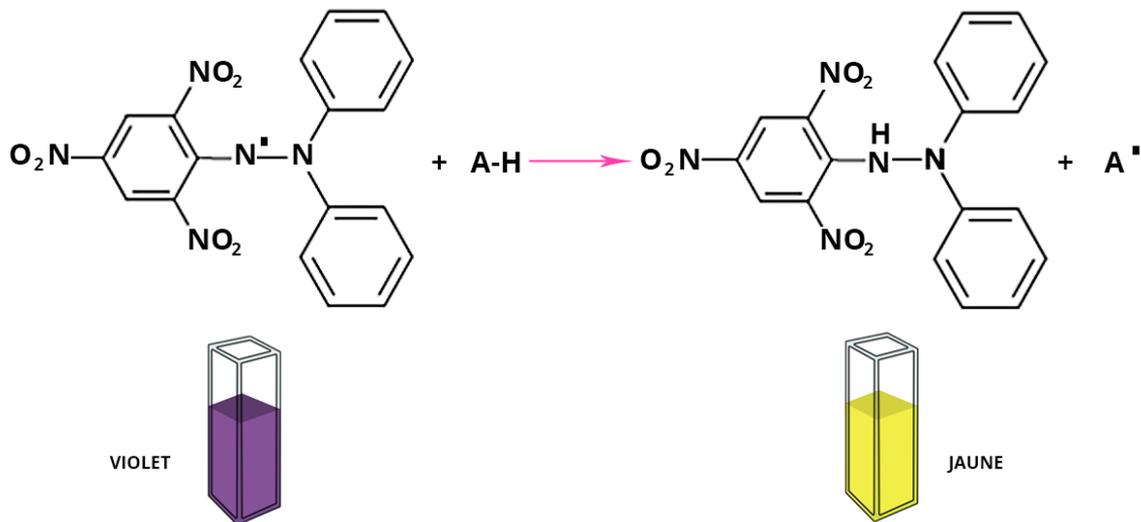


Figure 18 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)

II.3.1.1. Matériel et réactif

Les différents matériels et les réactifs utilisés sont résumés dans le Tableau 08.

Tableau 08 : Liste d'appareils et réactifs utilisés pour l'activité anti-DPPH.

Appareil	Verreries et Autres	Réactifs et Autres	Solvant et Soluté
Spectrophotométrie UV-VISIBLE1700 (Pharma-S-pec SHIMADZU)	Verre de montre	le DPPH (2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl)	Eau distillé
Micropipettes : 100ul-1000ul 10ul-100ul	Fiole jaugé : 100ml et 50 ml	Acide ascorbique	Méthanol
Balance analytique (ALS286 4N)	Tube à hémolyse en verre de 05 ml avec un portoir	H.E d'écorces d'orange	
	Bécher de 50 ml		
	Eprouvettes graduées de 25 ml		
	Entonnoir		
	Les embouts jaunes et bleus		
	Spatule		
	Papier aluminium		

II.3.1.2. Mode opératoire

Selon la méthode décrite par **Burits** et **Bucar (2000)**, 25µl de chacune des solutions méthanolique d'Huile essentielle testée à différentes concentrations (200µg/ml, 400µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) sont mélangées avec 2,5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%) qui est préparée par la solubilisation de 0,004g de DPPH poudre dans 100ml de Méthanol.

Pour déterminer la cinétique de la réaction, l'absorbance a été lue à 517 nm à différents temps (0, 5, 10, 15, 20, 25, et 30 min). Pour des fins de comparaison, l'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine C a été également analysée avec les mêmes concentrations et dans les mêmes conditions. Tous les essais ont été effectués en triple.

II.3.1.3. Détermination de pourcentage d'inhibition

Selon **Sharififar et al. (2007)**, l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) a été calculée de la manière suivante :

$$I\% = \frac{(Abs_{blanc} - Abs_{HE})}{Abs_{blanc}} \times 100$$

Abs blanc : absorbance du blanc (contenant tous les réactif excepté le composé d'essai)

Abs HE : absorbance d'huile essentiel

II.3.1.4. Détermination de l'IC50

La cinétique des réactions des H.Es et de l'acide ascorbique avec le DPPH a été inscrite à chaque concentration examinée. A la fin des réactions, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations en H.E et en acide ascorbique ont été tracés pour obtenir à l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH (**Khoudali et al, 2014**). La CI50 a été déterminée graphiquement en utilisant la formule issue de la régression linéaire.

II.3.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

- Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Oyaiz, 1986 ; Bougandoura, 2013**).

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (**PRIOR et al, 2005**).

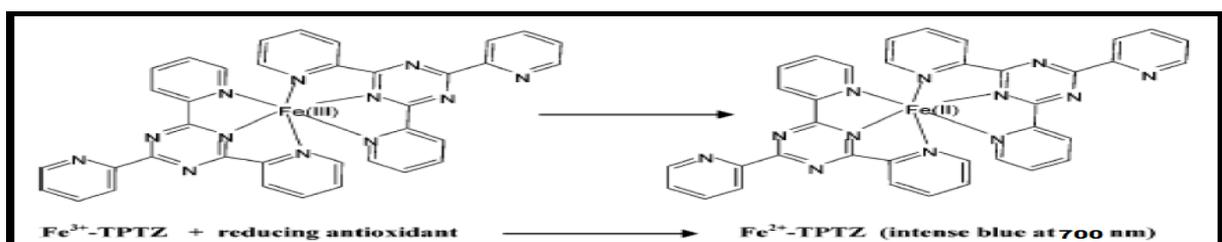


Figure 19 : La réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (PRIOR et al, 2005)

TPTZ: ferric2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine.

Fe²⁺: Ions ferreux.

Fe³⁺ : Ions ferriques (PRIOR et al. 2005).

L'augmentation de l'absorbance en fonction de la concentration d'extrait indique une augmentation de la capacité réductrice (**Chung et al, 2006**). La capacité de réduction d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité antioxydant (**Gunda et al, 2013**).

II.3.2.1. Matériel et réactif

Tableau 09 : Liste d'appareils et réactifs utilisé dans le test du FRAP

Appareil	Verrerie et Autres	Réactifs	Solvant et Solutés
Spectrophotométrie UV-VISIBLE 1700 (Pharma Spec SHIMADZU)	Eprouvette 10 ml	Tampon phosphate de PH 6,6 :	Méthanol
	Firole jaugée 50ml-100ml-250ml	H ₃ PO ₄ et NAOH	Eau distillé
Micropipettes : 100ul-1000ul 10ul-100ul	Bécher de 50 ml	Ferricyanure de potassium [K ₃ Fe(CN) ₆] à 1%	
	Verre de montre		
Balance de précision (ALS286 4N)	Tube à hémolyse de 05 ml avec un portoir	Acide trichloracétique à 10%	
Centrifugeuse	Les embouts bleus et jaunes	Chlorure ferrique [Fe cl ₃ (H ₂ O) ₆] à 0.1%	
Bain-marie	Papier aluminium	Acide Ascorbique	
		H.E d'orange citrus sinensis	

II.3.2.2. Mode d'opérateur

Le protocole expérimental déterminé est celui d'Oyaizu, (1986) où 0,5 ml de H.E à différentes concentrations (200µg/ml, 400µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) dilué dans méthanol est mélangé avec 1,25 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe (CN)₆ à 1 %, puis incubation des tubes au bain-marie à 50°C pendant 20min, laisser les refroidisses. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % est ajouté pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant dix minutes. Finalement 1,25 ml du surnageant est combinée avec 1,25 ml d'eau distillée et 250 µl d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃, 6H₂O) à 0,1 % fraîchement préparée.

La lecture des absorbances se fait contre un blanc semblablement préparé à 700nm par un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions. La cinétique de la réaction a été déterminée à différents temps (0, 5, 10, 15, 20, 25, et 30 min). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Singleton et Rossi, 1965**). Tous les essais ont été effectués en double.

II.3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

II.3.3.1. Matériel

Tableau 10 : Matériels de l'activité antibactérienne

Appareil	Verreries et Autres	Réactifs et Autres	Solvants et Solutés
Balance de précision (ALS 286 4N)	Tube à vis 16×160 mm et portoir	Milieu solide MH	Eau physiologique stérile
Micropipette de 10-100µl	Erlenmeyer 1000ml	Gélose nutritive	Eau distillée
Plaque chauffante/agitateur magnétique (IKA RH basic 2)	Deux flacons de 200 ml	H.E de <i>C. sinensis</i>	Eau de javel
	Spatule		
Etuve (DLAB TECH DAI HAN co LTD)	Anse platine		
	Pipette pasteur		
Etuve (Heraeus typ 5042)	Ecouvillon		
Autoclavage	Boites pétri		
Bec benzène	Disques stériles/Pince		
	Embouts jaunes		
	Papier aluminium		

II.3.3.2. Test d'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne, d'H.E nous avons adopté la méthode d'aromatogramme c'est une méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles de papier WATTMAN.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérienne en gélose, avec une concentration standard pendant un certain temps de contact entre le produit et les bactéries cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone

d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Meddour et al, 2013).

II.3.3.2.1. Souches d'étude

Dans cette activité biologique, nous avons utilisé 04 souches bactériennes de type ATCC (American Type Culture Collection) octroyées du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Tébessa le tableau suivant exploité les souches bactériennes utilisées dans ce test

Tableau 11 : Souches bactériennes utilisées.

Bactéries	Souches	Références
Gram positif	- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 11778
	- <i>Bacillus cereus</i>	ATCC 25923
Gram négatif	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	- <i>E. coli</i>	ATCC 25922

II.3.3.2.2. Milieu de culture

Pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes traitées par huile essentielle de *Citrus sinensis*, nous avons utilisé la gélose nutritive MH qui est la plus employé pour l'aromatogramme. La préparation de ce dernier se fait comme suite :

- Peser avec précision une quantité de poudre déshydratée du MH équivalente 15,2g dans un Erlenmeyer, en y ajoutant 400 ml d'eau distillée.
- Le mélange de poudre-eau distillée est chauffé sur plaque chauffante avec agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 20 min afin d'assurer une bonne dissolution des cristaux.
- Le milieu préparé est ensuite réparti dans deux flacons stériles avant d'être Autoclavé pendant 20 min à 120°C.

II.3.3.3. Protocol expérimental

Le coulage du milieu a été fait sur des boites de pétri. Une quantité suffisante des souches bactériennes pures a été récupérée à l'aide d'une anse de platine. La réactivation des souches se fait dans des tubes à vis contenant 5 ml de l'eau physiologique stérile puis homogénéisation par une faible agitation manuelle. Ensuite, un ensemencement d'une suspension bactérienne a été réalisé sur des boites pétris, à l'aide des écouvillons. Les boites ont été ensuite incubées pendant 24 h dans une étuve réglée à une température de 37 °C pour *E. coli* et *P. aeruginosa* et 30°C pour *B. cereus* et *S. aureus*. Le repiquage des bactéries jeunes a été fait de la même manière.

Trois disques stériles de papier wattman de 06 mm diamètre ont été posés dans chaque boîte de pétri à l'aide d'une pince. Par la suite, 10 μ l d'huile essentielle pure de *citrus sinensis* ont été déposés sur chaque disque. L'incubation a été faite pendant 24 à 48 h dans une étuve réglée préalablement à une température 37et 30 °C.

II.3.3.4. Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de zone d'inhibition qui a apparu autour les disques à l'aide d'une règle, les résultats expérimentaux sont représentés dans le Tableau 12.

Tableau 12: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre du halo d'inhibition (**Duraffourd et Lapraz, 2002**)

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Degré de sensibilité des germes	Résultat
$X \leq 8$ mm	Résistante	-
$8 \text{ mm} < X < 14$ mm	Sensibilité limitée	+
$14 \text{ mm} < X < 20$ mm	Sensibilité moyenne	++
$X \geq 20$ mm	Très sensible	+++

III. Résultat et discussion

III.1. Rendement de l'huile essentielle de *citrus sinensis*

Le rendement en huiles essentielles des écorces d'oranges , obtenues par hydrodistillation avec de la matière végétale était de 0.73% cette valeur est presque similaire aux résultats de **Jeannot et al.,(2005)** ; **Fuselli et al.,(2008)** qui ont rapportés des rendements en huiles essentielles des écorces des oranges douces de *C. S.* de 0.6 et 0.8% respectivement.

En revanche, un teneur de la présente huile parait plus élevée comparée à celle rapportée par **Bouhali (2015)** qui ont trouvé un rendement de $0.39\pm 0.09\%$. Des rendements plus élevés de l'ordre de 1.1% ont été obtenus par **Bousbia (2011)**.

Ces différences entre les résultats peuvent être expliquées par le fait que les rendements d'huiles essentielles sont influencés par plusieurs facteurs lors de leur extraction : soit des facteurs qui concernent la plante (espèce, variété, race chimique, etc.) soit des facteurs liés aux conditions expérimentales (procédé d'extraction, durée d'extraction, etc.). Cette différence pourrait être expliquée selon **Kelen et Tepe (2008)** par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'H.E. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en H.Es (**VEKIARI et al., 2002**).

III. 2. Caractérisation des huiles essentielles de *C.S*

III. 2.1. Propriétés organoleptiques

Les propriétés organoleptiques, illustrées dans le tableau suivant, montre que l'H.E de *C.S* présente un aspect huileux de couleur jaune pâle à une forte odeur.

Tableau 13 : Propriétés organoleptiques d'huile essentielle du *C. S.*

Caractéristiques	d'huile essentielle du <i>C. sinensis.-Thomson Navel</i>
Aspect	liquide, limpide, mobile
Couleur	jaune pâle
Odeur	Une forte odeur

III. 2.2. Propriétés physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques de notre huile essentielle du *C. S* sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14 : Indices des paramètres physico-chimique

Paramètres	Résultats
Indice d'acide	11.22
Indice d'ester	44.98
Indice de saponification	56.2
Densité relative	0,825 g/mL
Indice de réfraction	1,541
Potentiel d'hydrogène (pH)	7,43

La valeur obtenue de la densité relative de nos H.Es est semblable à celle trouvée par les **Saidat et al. (2018)** et qui est de 0,86. Elle confirme sa légèreté par rapport à l'eau.

Pour l'indice de réfraction de H.E de *C.S*, une étude de **Hellal. (2015)** enregistrée une valeur égale de 1,473, cette valeur est inférieure par rapport à nos résultats (1,541). Ce rapport indique la capacité des H.Es à réfléchir la lumière.

Les valeurs concernant les indices d'acide, d'ester et de saponification de H.Es de *C.S* sont largement supérieures à celles valeurs trouvées par **Saidat et al. (2018)**, Par exemple les valeurs d'indice d'acide égalent (11,22 vs 3.88) et les valeurs d'indice d'ester sont (44.98 vs 39.83) de même, pour l'indice de saponification (56.2 vs 43.71).

Autre étude menée par **Toubias (2011)** a trouvé une valeur de 12,34 pour l'indice d'acide de H.E de *C.S* et 177,03 pour l'indice de saponification, Ces résultats sont supérieures à nos résultats. Ces valeurs sont conformes aux normes décrites par l'AFNOR (**Anonyme, 2006**).

Nous constatons que l'indice d'acide est élevé, cela veut dire qu'il y a une quantité importante d'acides gras libres dans l'H.E de *C.S*.

L'indice de saponification présente une valeur faible qui indique que la masse moléculaire des acides gras de cette huile n'est pas élevée.

L'indice d'ester est un indicateur très fort de la qualité de l'huile étudiée. En effet, une huile essentielle de très bonne qualité renferme une très grande quantité d'esters.

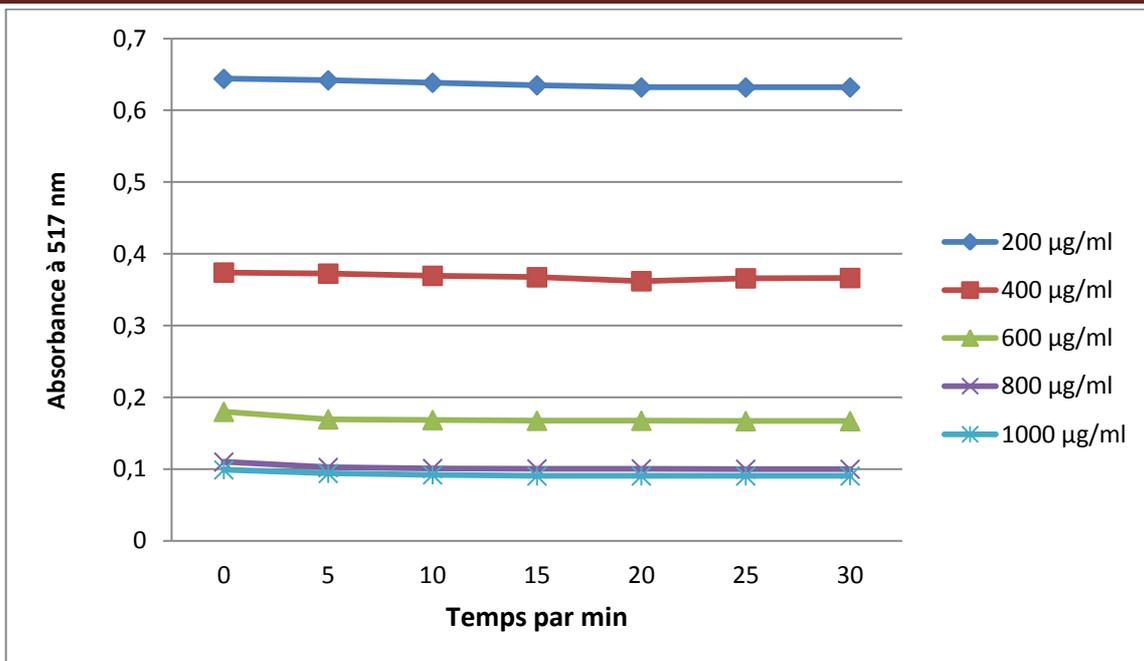
Les valeurs des propriétés physiques et chimiques obtenues ont révélé qu'elles peuvent être utilisées dans différentes industries pour la production d'autres produits de valeur **Saidat et al. (2018)**.

III.3. Activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

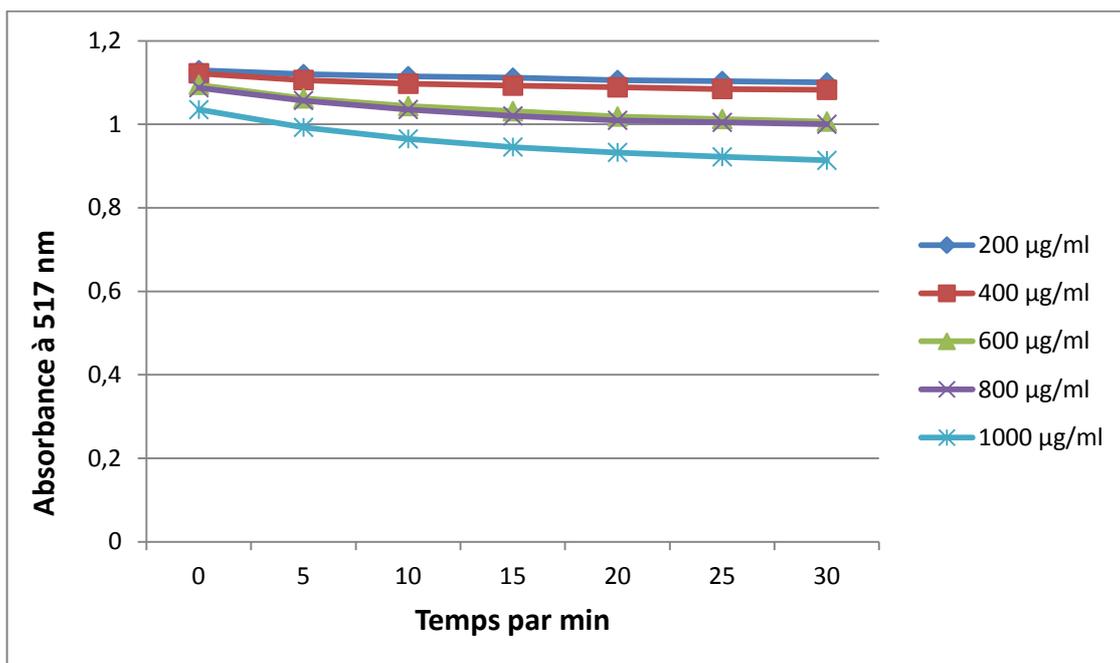
III.3.1. Etude cinétique de la réaction par le test DPPH

Les valeurs obtenues de nos H.Es et de vit C ont permis de tracer des courbes présentées dans la figure 01. D'une manière générale, les absorbances enregistrées pour l'H.Es et la Vit.C diminuent en fonction du temps. Quelle que soit la concentration utilisée, la réaction entre le DPPH et l'acide ascorbique (donneurs d'électron) atteint l'équilibre rapidement après 5 min. Ensuite l'évolution reconnaît une allure stationnaire jusqu'à 30 min. En ce qui concerne l'H.Es de *C.s.*, l'équilibre est atteint un peu plus tard (après 15 min). On observe également que l'intensité de la réaction est dose-dépendante pour la vit.C et pour l'HE. En effet, les valeurs de l'absorbances diminuent avec l'augmentation de la dose utilisée. Par exemple, après 30 min de réaction avec la Vit.C, l'absorbance enregistrée pour la dose de 200 μ g/ml est de 0,632 nm alors qu'elle est de 0,091 nm pour la dose de 1000 μ g/ml. Pour l'HE de *C. S.*, l'absorbance enregistrée après 30 min pour la dose de 200 μ g/ml est de 1,100 nm alors qu'elle est de 0,914 nm pour la dose de 1000 μ g/ml.

Nos résultats montrent que les valeurs d'absorbance enregistrées pour la Vit.C sont beaucoup plus faibles que celles enregistrées pour l'H.Es et ce quelle que soit la dose utilisée et le temps de réaction écoulé. Par exemple, pour la dose de 1000 μ g/ml et après 30 min de réaction, l'absorbance enregistrée pour la vit.C est de 0,091 nm et de 0,914 nm. Ces résultats soulignent que le pouvoir antioxydant de la vit.C est beaucoup plus intense que celui de l'H.E de *C. Sinensis*. En présence d'un radical libre DPPH \cdot , l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH-H, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (**Villano et al, 2007**).



(a) Acide ascorbique (vitamine C)



(b) Huile essentiel de *C. sinensis*

Figure 20 : Réduction de DPPH par l'acide ascorbique et les H.Es de *C. sinensis* au cours du temps

Cette constatation a été confirmée aussi par **Cherif et al. (2006)**, qui affirme une réaction lente entre l'extrait méthanolique de peaux sèche et le radical DPPH* et que l'état stationnaire de l'absorbance n'est atteint qu'au bout de plusieurs heures.

Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par **Hamidi et Limam (2010)** qui ont trouvé leurs extraits (les écorce d'orange et de citron) présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celle de la référence (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0,063 mg/mL.

III.3.2. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été examiné pour chaque concentration d'H.Es de *C.s* et de vitamine C. Les résultats sont consignés dans la **Figure 2**.

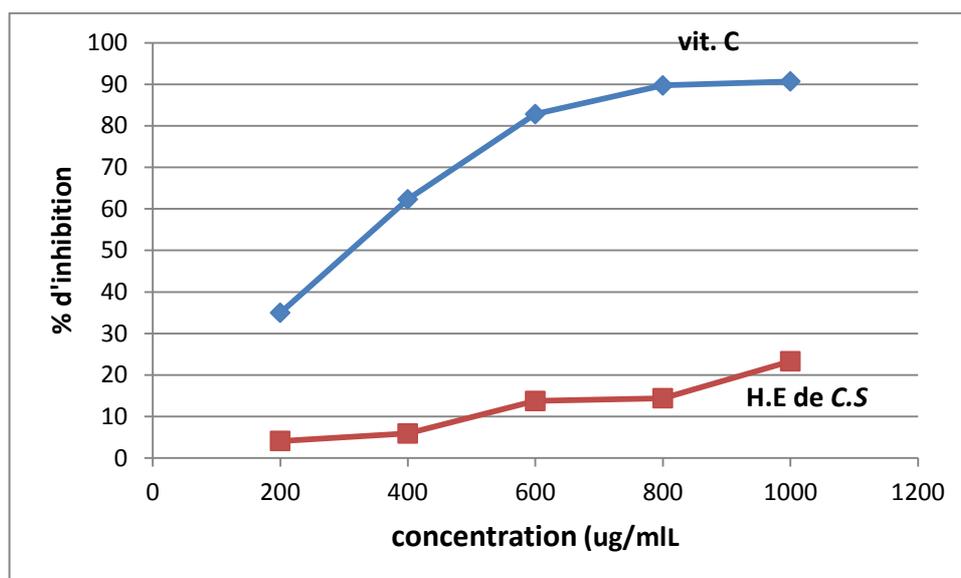


Figure 21. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH en fonction des concentrations de l'H.E du *C.S* et vit.C.

Ces résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation des concentrations que soit pour l'H.E ou pour la vit.C. On observe que pour la doses de 1000 µg/ml, le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'HE est largement inférieur à celui de la vitamine C (90,86% vs 23,30%) et pour la dose de 200 µg/ml le pourcentage d'inhibition de l'HE est très faible (4,11%) alors qu'il est de 34,97% pour l'acide ascorbique. Ceci est en d'accord avec les travaux de **Bouhali (2015)** ont constaté qu'à la plus grande concentration utilisée qui est de 25mg/ml, ils ont obtenu un pourcentage d'inhibition de $11 \pm 0.46\%$ et $9.07 \pm 0.06\%$ avec les H.Es du zeste frais et sec. Ils ont constaté qu'il y a un très fort coefficient de corrélation entre la concentration de l'huile essentielle et son effet scavenger du DPPH (ce coefficient est égal à 0.83 et 0.96 pour l'huile essentielle du zeste frais et sec respectivement).

De même, le travail mené par **Hamdani (2018)** il a observé que l'huile essentielle possède une très faible activité antioxydante (51,3% à la concentration 1000 mg/ml) par rapport à témoins (acide ascorbique 74,91% à 0,2 mg/ml).

III.3.3. Détermination de l'IC₅₀ (Concentration inhibitrice 50%)

À des fins comparatives, nous avons évalué l'IC₅₀ des deux composés (H.E et vit.C). Cet indicateur exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire décroître la concentration initiale du DPPH* à la moitié (50%). L'IC₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé. Cela veut dire que la capacité antioxydant d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petite. Les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire comme c'est illustré dans la **Figure 03**.

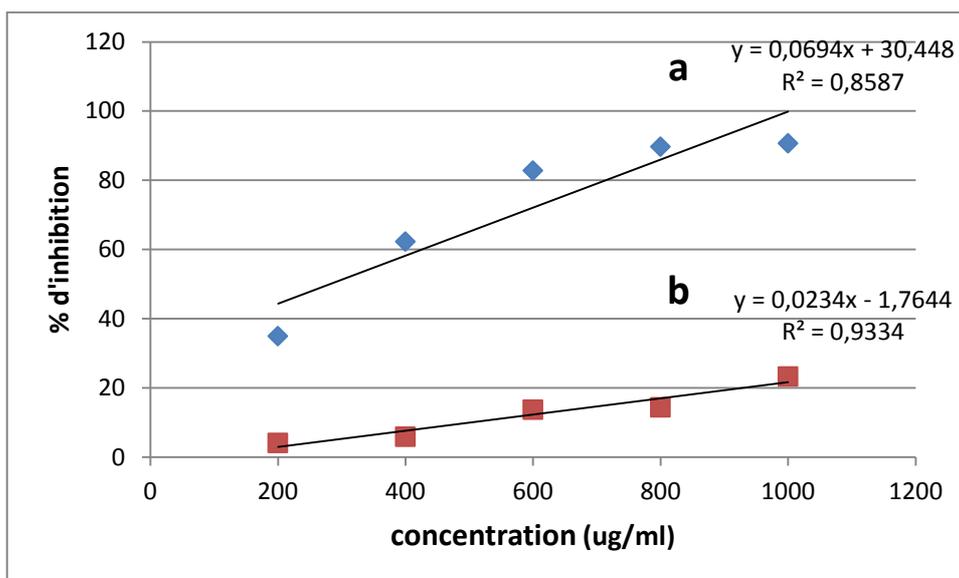


Figure 22: Détermination de la valeur IC₅₀ de la vitamine C (a) et de l'huile essentielle (b).

Concernant la vit.C, l'IC₅₀ est de 281,73 µg/ml qui montrent un pouvoir antioxydant très largement supérieur à celui de l'HE de *C.s* qui marque une valeur d'IC₅₀ de 2212,20 µg/ml. D'après ces résultats on prouve que l'acide ascorbique reste l'antioxydant le plus efficace par rapport à nos H.Es

Une étude comparative montrée par **Hamidi et Limam (2010)**, déterminés que l'acide ascorbique possède un pouvoir anti-oxydant très fort d'une valeur d'IC₅₀ de 8307 mg/ml. Ce résultat est beaucoup plus inférieur que le résultat d'IC₅₀ de H.Es de *C.S* qui 16622.6 mg/ml et IC₅₀ de H.Es de limon est 8310 mg/ml. Nous constatons que l'IC₅₀ enregistrée dans la présente étude est supérieure à certaines valeurs rapportées dans d'autres études.

En effet, **Bouhali (2015)** trouve que La valeurs des IC₅₀ est 0.24 mg/ml d'acide ascorbique. Avec 93.65 ±0.28% à la concentration de 1mg/ml. une grande concentration qui ils sont utilisée est de 25 mg/ml ils ont obtenu un pourcentage d'inhibition de 11 ±0.46% et 9.07 ±0.06% avec les H.Es du zeste frais et sec, respectivement, et suite à la faible quantité de ces huiles, ils ont pas pu

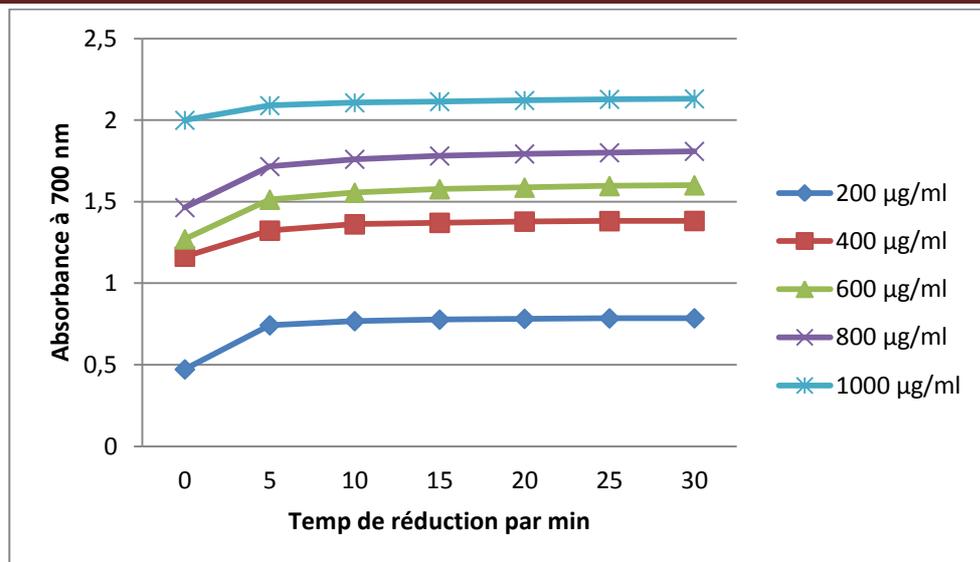
aller au-delà de la concentration 25 mg/ml, par conséquent, il était impossible de déterminer la concentration correspondante à 50% d'inhibition de l'HE.

La différence dans l'activité anti-radicalaire au DPPH entre les extraits des citrus analysés est probablement due à leur composition en différents composés phénoliques. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais à l'interaction entre plusieurs composés, ces interactions peuvent exister dans un extrait pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits. (**Bacco et al. 1998 ; Gorinstein et al. 2001**).

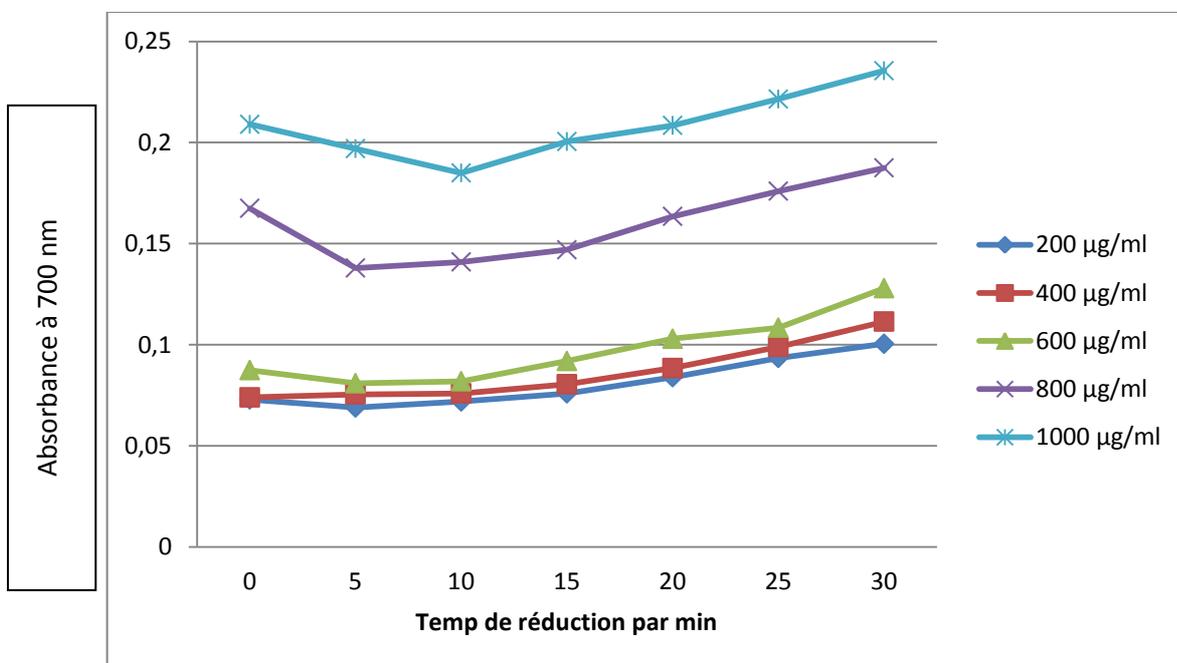
III.4. Etude cinétique de la réaction par le test de réduction du fer FRAP

Les valeurs obtenues de nos H.Es et de vit C ont permis de tracer des courbes présentées dans la figure 03. D'une manière générale, les absorbances enregistrées pour l'H.Es et la Vit.C augmentent en fonction du temps. Quelle que soit la concentration utilisée, la réaction entre le fer ferrique et l'acide ascorbique (donneurs d'électron) atteint son maximum rapidement après 5 min. Ensuite l'évolution reconnaît une allure stationnaire jusqu'à 30 min. En ce qui concerne l'H.Es de *C.s*, on observe une faible diminution de l'absorbance pour toutes les concentrations après 10 min suivi d'une augmentation continue jusqu'à 30 min. On observe également que l'intensité de la réaction est dose-dépendante pour la vit.C et pour l'HE. En effet, les valeurs de l'absorbances augmentent avec l'augmentation de la dose utilisée. Par exemple, après 30 min de réaction avec la Vit.C, l'absorbance enregistrée pour la dose de 200µg/ml est de 0,786 nm alors qu'elle est de 2,131 nm pour la dose de 1000µg/ml. Pour l'HE de *C. Sinensis*, l'absorbance enregistrée après 30 min pour la dose de 200µg/ml est de 0,101 nm alors qu'elle est de 0.236 nm pour la dose de 1000µg/ml.

Nos résultats montrent que les valeurs d'absorbance enregistrées pour la Vit.C sont beaucoup plus élevées que celles enregistrées pour l'H.Es et ce quelle que soit la dose utilisée et le temps de réaction écoulé. Par exemple, pour la dose de 1000µg/ml et après 30 min de réaction, l'absorbance enregistrée pour la vit.C est de 2,131 nm et de 0,786 nm pour nos H.Es. Ces résultats soulignent que le pouvoir antioxydant de la vit.C est beaucoup plus intense que celui de l'H.E de *C. S*. En présence d'un électron oxydé sur le fer ferrique, les antioxydants permettant la réduction de ces électron oxydés. Cette réduction permet la régénération des antioxydants oxydés (**Ksouri et al., 2009**).



(a) Acide ascorbique (vitamine C)



(b) Huile essentiel de *C. sinensis*

Figure 23. Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'acide ascorbique et H.Es de *C. S* avec le temps

Cette constatations a été confirme aussi par **Bouhali (2015)**. Le pouvoir réducteur exercé par le standard BHA est très élevé par rapport à H.E, présentant une absorbance égale à 0.716 à la concentration 0.05mg/ml. Ces résultats aussi sont en accord avec les travaux menés par **Hamdani (2018)**. Il a obtenu par le test FRAP, que l'huile essentielle d'orange possède une très faible activité antioxydante (DO : 1,212) par rapport aux 2 témoins l'acide ascorbique et le BHT. Cette étude présente et les autres études précédentes confirment que l'activité antioxydante d'H.Es de *C.S* est largement faible par rapport à l'activité antioxydante de Vit.C.

III.4. Activité antibactérienne d'huile essentielle de *Citrus sinensis*

Les résultats des tests d'activité antibactérienne des H.Es de *Citrus sinensis* sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15: Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) d'huile essentielle de *Citrus sinensis*

Bactérie	Répétition	Diamètre (mm)
<i>S.aureus</i>	1	06-07mm
	2	
	3	
<i>P.aeruginosa</i>	1	06-07mm
	2	
	3	
<i>B. cereus</i>	1	06-07mm
	2	
	3	
<i>E.coli</i>	1	07-08mm
	2	06-07mm
	3	07-09mm

Nos résultats montrent que les H.Es du *Citrus sinensis* n'exercent aucun effet antibactérien sur les quatre souches de bactéries : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *E. coli* n'ont pas montré aucun halo d'inhibition illustrée dans la figure 24

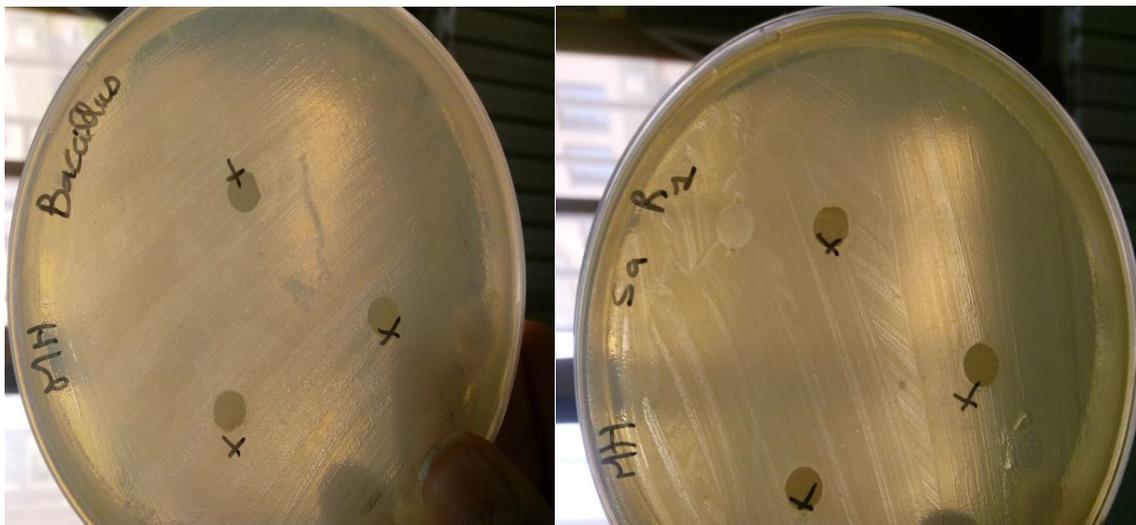


Figure 24 : Photo personnelle des tests antibactériennes de *Citrus sinensis* vis-à-vis des bactéries testées de Gram(+)

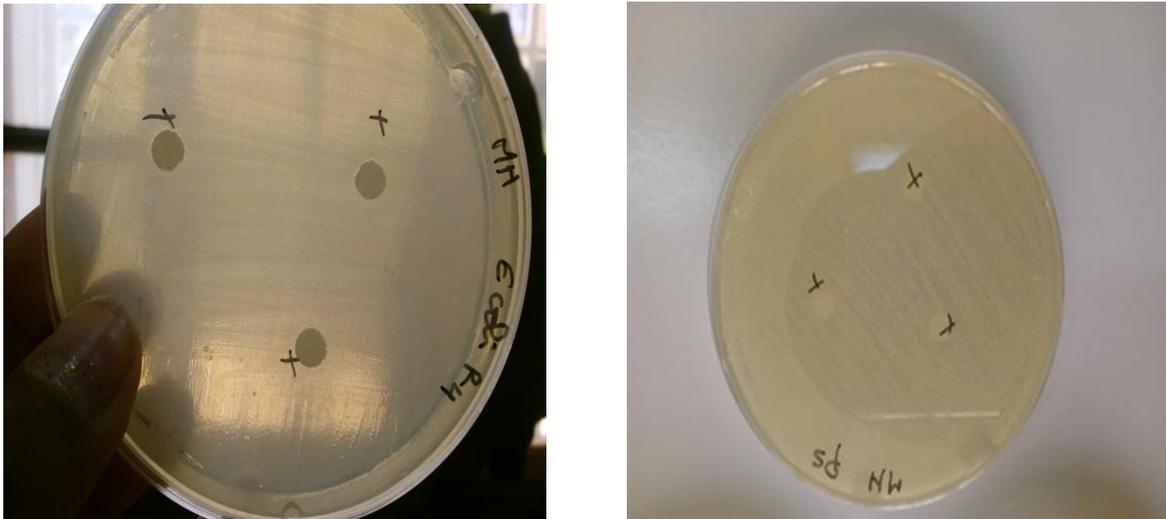


Figure 25 : Photo personnelle des tests antibactériennes de *Citrus sinensis* vis-à-vis des bactéries testées de Gram (-)

Les résultats concernant l'activité antimicrobienne « *in vitro* » obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne des H.Es testées est en fonction de la bactérie cible. Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis les quatre souches. Ces résultats exprime que ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.Es de *Citrus sinensis*. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Hellal (2010)** qui a montré l'absence totale de l'activité antibactérienne du *Citrus sinensis* sur les mêmes souches.

Smith-palmer et al., (1998) ont étudié l'activité antimicrobienne de deux H.Es de *Citrus* (orange douce et lime) contre deux types de bactéries à Gram négatif (*S. Enteritidis*) et Gram positif (*S. aureus*) en utilisant la méthode de diffusion sur gélose en puits. Les résultats obtenus ont montré que l'H.E d'orange douce est active sur *S. Enteritidis*, et celle de lime présente un effet antibactérien sur *S. aureus* avec des CMI de 6,4 mg/ml, et 12,8 mg /ml respectivement. Pour sa part, **Moreira et al. (2005)**, ont testé l'effet antibactérien de l'H.E de *C. limonum* contre *E. coli*. Les résultats ont montré une CMI de 2,5 mg/ml vis-à-vis de cette bactérie.

D'après **Kalemba et Kunicka (2003)**, la sensibilité d'un microorganisme aux H.Es dépend des propriétés de l'H.E et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux H.Es que les bactéries à Gram (-). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des H.Es confirment ce phénomène (**Poole, 2001 ; Cimanga et al., 2002 ; Burt, 2004b ; Bekhechi et al., 2008**).

Selon (Poole, 2001 ; Burt, 2004a ; Busatta et al., 2008), la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux H.Es est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+).

Cependant la comparaison de l'efficacité des H.Es à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables: comme la composition chimique des H.Es qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce. Donc les activités antimicrobiennes d'une H.E peuvent changer par sa composition chimique, par les génotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution). Les résultats obtenus peuvent être différents ; selon le choix et conditions physiologiques des microorganismes, la période de l'exposition du microorganisme à l'H.E, aux doses d'H.E utilisées, le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les H.Es. Ceux-ci autant de facteurs pouvant expliquer parfois des résultats contradictoires des différentes études (Hellal ,2010).

Conclusion

Dans le but de rechercher de nouveaux composés antioxydants et antimicrobiens naturels à intérêt thérapeutique, l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, a fait l'objet d'une étude détaillée. Au terme de cette étude, nous avons pu conclure que :

- Dans un premier lieu, le rendement en H.E du *C.s* est assez remarquable (0.73%).
- Les paramètres physico-chimiques de H.Es du *C.S* présentent une densité de 0.825 g/ml, un indice de réfraction égale 1,541 et un potentiel d'hydrogène neutre égale 7,43. De même, les paramètres chimiques a trouvés une valeur d'indice acide égale 11,22 et indice d'ester égale 44,98 et pour l'indice de saponification une valeur de 56,2.
- l'H.E du *C.S* a montré une activité antioxydante très faible comparée à la vit.C ($CI_{50} = 2212,20 \mu\text{g/ml}$ vs $281,73 \mu\text{g/ml}$).
- Investir d'autres tests évaluant l'activité antioxydante tels que le test de réduction du fer FRAP qui confirme les résultats précédents.
- L'activité antibactérienne montre que l'H.E du *C.S* ne manifeste aucun effet contre les 04 souches bactériennes testées.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus poussée de l'activité antibactérienne et antioxydante :

- Tester d'autres bactéries pathogènes, afin de confirmer l'efficacité ou non des H.Es de *Citrus*.
- Evaluer les activités antioxydantes et antibactériennes des autres espèces et variétés d'orange.

Liste des références bibliographiques

Abdur.R .Ghias U and Jawad .A. (2014).phytochemical analysis and radical scavenging Profile of juices of Citrus sinensis, Citrus anrantifolia, And Citrus limonum. Rauf et al. Organic and Medicinal Chemistry Letters 2014, 4:5

Afonso .V., Champy.R. , Mitrovic, D Collin. P, Lomri. A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismal. Revue du Rhumatisme 74 (2007) 636–643.

Anonyme(2012)-l'égère base de la production agrumicole en 2011/2012

Attou. A(2017). Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent) Etude de Leurs Activités Antioxydante et Antimicrobienne. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen-

Bâches. B ,2012Anonyme, (2007). cité par Ghazzaz .R et Toumi.H –étude de comportement de variété Washington navel, 22 p 'Thèse' 2007-2008

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., & Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.

Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. et Gruzdiene, D. (2000). Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. Food Research International, 33: 785-791.

Bekhechi C., Abdelouahid D. (2010). Les huiles essentielles. Office des publications universitaires. P 14, 31 et 32.

Belaiche P., (1979), Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie, Tome 1 : L'aromatogramme ; Ed: Paris, Maloine.

Benyahia S. (2015). Activités antimicrobiennes et insecticides de thymus capitalus, Daucus crinitus et tetraclinis articulata sur la mineuse Tuta absoluta (Myrick) et la microflore pathogène de la tomate lycopersicum esculentum, thèse de Doctorat. p2

Blondy A. (2003). Bibliographie du monde méditerranéen: relations et échanges de la chute de Constantinople à la reconquête ottomane de Tripoli, 1835(8).

BOUHALI.H. (2015). Caractérisation des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et étude de leur activité antioxydante : étude comparative entre l'huile essentielle des écorces sèche et fraîche. Thés magister. Université A.mira- BEJAYA-

Bousbia N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat en chimie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger. 128p.

Boyle W (1955). Spices and essential oils as preservatives. Am. Perfurmer Essent. Oil Rev. 66: 25-28.

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

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 3eme éd. Paris : Edition médicales internationales. Edition Tec & Doc Lavoisier 1120p.

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253.

Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodriguez M.R.A., Corazza M.L., Vladimir O.J. & Cansian R.L. (2008). Appliication of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology, 25, 207-211.

Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.

Clarke S., (2008), Essential oils; Ed 2: Churchill Livingstone, Elsevier; p: 42- 77.

Courtial S. (2005), Précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmacies d'officine, Thèse, Université de Nantes : Faculté de Pharmacie.

Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. & Micieli D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils.

Defraigne J.O. Pincemail. J (2008) STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS : mythes et réalités Revu Med Liège 2008; 63 : Synthèse 10 2008 : 10-19

De-Gaulejac SC, Provost N et Vivas N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47,425-431.

Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88: 308-316.

Dubey V.S., Bhalla R., Luthra R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. J. Biosc. 28, 5, pp 637-646.

Duquénois, P., Anton, R., 1968. [Search for derivatives of anthracene in 2 African Cassia: *Cassia nigricans* Vahl et *Cassia podocarpa* Guill. et Perr]. *Ann. Pharm. Fr.* 26, 607– 614.

El Kalamouni C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat en sciences des agroressources. Université de Toulouse. 223p.

El-Otmani (2003). le froid des agrumes, Enseignant-Chercheur, « Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat »

extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. Separation and

Favier. A. (2003). Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique l'actualité chimique - novembre-décembre 2003

Favier. A. 2006. Le stress oxydant, Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr.* 2006.108-115 pp.

Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010). Citrus d'Algérie, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. Office des Publications Universitaires. P 38, 42, 52-57

Franchomme, P. and Pénoel, D. (1990). Thérapie. Eléments de médecine aromatique. L'aromathérapie exactement. R.J. édition. Limoges. 30-32, 61

Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., martin J. & Rosalia F. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2067-2072.

Fuselli S. R., S. B. (2008). Garcia De la Rosa, M. J. Euguarus, R. Fritz, Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essence on Honebee bacterial pathogen *Pacnibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood., *Word J. Microbial. Biothechnol.*, 24 2067-2072.

Garait. B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) Ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse doctorat. Université Joseph Fourier. Grenoble 1 Sciences-Technologie-Sante. P : 197.

Gill A.O., Delaquis P., Russo P. & Holley R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83-92.

Goudable.G.Favier.A. (1997). Radicaux libres oxygen et antioxydant. *Nutre clin metabol* 1997;11:115-20.

Guimaraes R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa m. J., Carvalho A.M. et Ferreira I.C.F.R., 2010 : Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food Chem. Toxicol., Vol. 48, pp : 99 – 106.

Guinoiseau E. (2010) Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. UNIVERSITE DE CORSE-PASQUALE PAOLI- thèse de Doctorat.

Halliwell B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. The American Journal of Medicine, 3: 14-22.

Halliwell B., (1996): Antioxidants in human health and disease. Ann. Rev. Nutr., Vol. 16,

Hamidi Et Limam. (2018). étude Phytochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron. Thèse doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie P : 80

Haton.C. (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse doctorat. L'université PARIS VI. P : 167.

Hellal, Z (2010). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*).

Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A. (2007). Microwave-assisted

Hendrix C.M. et Redd J.B., 1995 : Chemistry and Technology of Citrus Juices and By- Products. In : Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.

Hernandez-Ochoa L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.

Hmidi.I. (2013). Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*punica granatum l.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse doctorat. Entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal (Maroc). P : 179.

Hopkins W.G. (2003), Physiologie végétale, De Boeck Supérieur.

Iskender NY, Yayli N, Yildrum N, Cansu TB et Terzioglu S. (2009). The volatile Constituents of the Flower, Leaf, and Steam of *Verbascum viedemannianum* Grown in Turkey. J121. Journal of Oleo Science, 58(3): 117-119.

Issaadi.O. (2010). Etude comparative des activités antioxydantes de deux fruits : la mûre et l'arbose. Thèse doctorat. Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle.(2007).Le stress oxydant. Med Liege 2007; 62 : 10 : 628-638.

Jeannot V, J(2005). Chahboun, D. Russel, P. Baret, Quantification and determination of chemical composition of essential oils extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium L. ssp.aurantium*), Int. J. Aromather., 15 (2) 94-97.

Kalemba D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. 10: 813-829.

Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N. and Ashraf, M. Y. (2011). Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels International Food Research Journal 18: 1275-1282

Kerboua M et al., (2002). Citriculture et citrus certification in the Mediterranean).

Kholkhal.F. (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus ssp coloratus* et *ssp euciliatus*. Thèse doctorat. Université Abou Baker Belkaid- Tlemcen .P : 200

Koechlin- Ramonatxo. C. (2006).Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Science directe .Nutrition clinique et métabolisme 20 (2006) 165–177

Lagha-Benamrouche S, Lydia Addar, Boudershem H, Tani Sa et Khodir M., (2017). Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles -Nature & Technology- 39pp.

Lahlou M. (2004) Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research, , 18: 435-448.

Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J-P. 1994, Biogénèse des Monoterpènes II – La chaîne isoprénique, Société de Pharmacie de Bordeaux.

Lambert PA (2005) Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. Adv. Drug Deliv. Rev. 57: 1471-1485.

Lambert R.J.W. & Pearson J. (2001). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. Journal of Applied Microbiology, 88, 784-790.

- Legendre L. (2012).** Voies de biosynthèse des huiles essentielles. In : Fernandez X. et Chemat F. : La chimie des huiles essentielles, tradition et innovation. Ed. Vuibert. pp.35-57
- Lemaoui F. (2011).** Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L Algérienne. universite Ferhat Abbas –Setif.thèse de Magister.
- Lion, (1995).** Travaux pratiques de chimie organique. Ed. Dunod, Paris.
- Liu, J. (1995).** Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J. Ethnopharmacol. 49: 57–68.
- Loussert ,1987** cité par Ghazzaz.R et Toumi.H-Etude de comportement de la variété Washington navel. Thèse (2007-2008)
- Loussert R. (1989).** Les agrumes.2.paris : production Edition Lavoisier. 157 p.
- Lubinic, E. (2003).** Manuel pratique d’aromathérapie, les huiles essentielles et leur utilisation. Edition Vigot. 331.
- Lucchesi M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes, conception et application à l’extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat de en sciences. Université de la Réunion. 143p.
- Marchand L (2002).** Cancer preventive effects of flavonoids – a review. Biomed.
- Marfak. A. (2003).** radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse doctorat. L’université de Limoges Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé P : 199
- Mevius. D.Rutter. J.Hart C.Imberechts H. Kempf G. Lafont. J. Luthman, J. Moreno.M. Pantosti A.Pohl, P.Willadsen C. (1999)** Antibiotic resistance in European Union associated with therapeutic use of veterinary mediciness. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products. 1-57pp.
- Mitterand H., Albert D., & Jean D., (1971).** Nouveau dictionnaire étymologique et historique.
- Mohamed N., Boukhatem., Mohand S., Hamaidi., Fairouz S.Yahia H., (2010).** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie).- Nature & Technologie-
- Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E. & Roura S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food Science and Technology, 38, 565-570.
- Morena M., M. Martin-Mateo, J.-P. Cristol et B. Canaud. (2002).** Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. Néphrologie Vol. 23 n° 5 2002

Moro Buronzo A., (2008), Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être; Ed : Hachette Pratique, p: 14- 43.

Mouhammedi(2006). Etude phytochimiques et activité biologiques de quelque plantes médicinales de la region Nord et Sud-Ouest de l'Algerie .2013 p85.in memoire de master Université des sciences de la nature et de la vie. Ourgla.

Neffati, A., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Limem, I., Kilani, S., Skandrani, I., Bhourri, W., Le Dauphin, J., Barillier, D., Mosrati, R., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira K. (2009). Antigenotoxic and antioxidant activities of Pituranthos chloranthus essential oils. Environmental Toxicology and Pharmacology. 27: 187–194.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 66: 1022-1037.

Olanipekun Giwa S, Mahmood. M and Giwa. A. (2018). UTILIZING ORANGE PEELS FOR ESSENTIAL OIL PRODUCTION.ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences. VOL. 13, NO. 1, JANUARY 2018

Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M. & Bellabas M.A. (2005). Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. Phytothérapie, 4 ,147-157.

Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection, 69 (5), 1046-1055. Pharmacother. Vol. 56, pp : 296–301.

Pibiri M.C. (2006), Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, , p. 28-52.

Pibiri P. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL (Suisse).

Pincemail .J. Bonjean .K. Cayeux .K. Olivier Defraigne .J. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. Nutrition clinique et métabolisme 16 (2002) 233–239.

Piochon M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.

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

Pourmortazavi s.m. & Hajimirsadeghi s.s. (2007). "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis" *Journal of Chromatography A*, 1162, 2-24.

pp : 33–50.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (1995) *Microbiologie*. De Boeck ed. p 1014.

Purification Technology, 54, 44-50.

Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O.I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278: 75-87.

Rohmer, M. and M. Rohmer (1999). "The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants." *Natural Product Reports* 16(5): 565-574.

Roux D. (2008). *Conseil en aromathérapie*. 2ème édition, Pro-Officina., 187.

Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121– 137.

Singh SB, Barrett JF (2006). Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015

Smith-Palmer A., Stewart J. & Fyfe L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important foodborne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26, 118-122.

Soultos, N., Tzikas, Z., Christaki, E., Papageorgiou, K. and Steris, V. (2009). The effect of dietary oregano essential oil on microbial growth of rabbit carcasses during refrigerated storage. *Meat Science*. 81: 474–478.

Tessier F, P Marconnet. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports Elsevier*, Paris (1995) 10.1-130

Teuscher B., (2005). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z Lebensmittel-Untersuchungund Forschung*, (200): 3-13.

Teuscher, E. ; Anton, R. ; and Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition TEC & DOC Lavoisier. p 6, 77. Université mouloud mammeri de tizi-ouzou- these de Magister

Tobias I. Ndubuisi Ezejiolor, N. V. Eke¹, R. I. Okechukwu¹, R. N. Nwoguikpe and C. M. Duru. (2011). Waste to wealth: Industrial raw materials potential of peels of Nigerian sweet orange (*Citrus sinensis*). African Journal of Biotechnology Vol. 10(33), pp. 6257-6264, 6 July, 2011.

Valnet. (1984) : Aromathérapie. Ed. Maloine. Paris.

Webber, H.J., Reuther, W., ET Batcholor, L.D. (1967). The citrus industry, volume 1: History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California press.

Zeba, B. (2005). Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. Africa journal of biotechnology. 13 : 155-156pp.

Zhiri A. (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News. Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8.