REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par :

Mme HAMDANI Sarra

Sur le thème

Etude chimique et activité antioxydante des huiles essentielles des agrumes cultivés dans la région de Tlemcen

Soutenu publiquement le 26 Juin 2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr TABTI Boufeldja	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr BENSAID Okkacha	Professeur	Université de Tlemcen	Examinateur
Mr DIB Mohammed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Encadreur

Laboratoire LASNABIO
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la santé, la force et la patience, le courage ainsi que la volonté pour achever ce travail qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives « LASNABIO » de la faculté des sciences, Université de Tlemcen.

J'exprime mes remerciements les plus distingués à notre professeur, le promoteur de ce mémoire Mr Dib Mohammed El Amine, d'avoir encadré ce travail.

Je tiens à le remercier pour sa disponibilité, son aide, son objectivité, et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils judicieux qui m'ont permis d'élaborer ce mémoire. Je lui serai très reconnaissante de sa confiance ainsi que de sa contribution à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier monsieur Saïd GHALEM directeur du laboratoire LASNABIO pour son aide et ses conseils précieux.

J'adresse toute ma gratitude à mon enseignant et président du jury, Mr Tabti Boufeldja ; je suis comblée de l'immense honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ce mémoire ; ainsi que l'examinateur Mr Bensaid Okkacha, de m'avoir consacré son temps ; pour ses critiques constructives et ses qualités personnelles et professionnelles.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres de jury, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect d'avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit, de leurs suivis durant toutes ces années et de participer au jury de ma soutenance, en l'occurrence : Mme Merad Nouria, Mme Ain Seba Nabila, Mme Benyarou Meriem, Mr Allali Houcine et Mr Selles Chouki.

Egalement, je tiens à exprimer mes sincères gratitudes à tous nos professeurs du primaire jusqu'à l'université, à tous les enseignants du département de chimie, qui ont contribué à ma formation, ainsi à ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail ; enfin je présente mes remerciements à tous les techniciens, les doctorants et les étudiant de la promotion de chimie des produits naturels 2017/2018.

J’adresse mes plus vifs remerciements, mes sincères reconnaissances et gratitudes aux prunelles de mes yeux, aux deux plus chères personnes de ma vie, qui m’ont guidé depuis mon enfance vers le chemin du savoir, pour leur présence, leur encouragement et leur amour, à mes chers parents que j’admire, sans oublier mon mari pour ses conseils, son enthousiasme, sa patience, sa confiance et son soutien incontestable.

Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes beaux et grands-parents et mes très chères sœurs pour m’avoir toujours soutenu dans les moments difficiles ainsi qu’à toute ma famille. Que dieu les garde pour moi.

Ma gratitude va également à mes très chers (e) collègues, pour l’ambiance cordiale et l’aide qui m’ont apportée à tout moment suite à mes plaintes et mes satisfactions.

Merci à Tous

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION…… 5

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES……7

I.1. Introduction 9

I.2. La filière des agrumes 9

I.3. Huiles essentielles des agrumes 10

I.4. Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles 11

I.5. Intérêt économique des huiles essentielles des *Citrus* 11

I.6. Préparation des huiles essentielles 12

I.7. Analyse des huiles essentielles 13

I.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....13

I.7.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM). 13

I.8. Activités antioxydantes des huiles essentielles 14

II.1. Citrus limon 15

II.1.1. Description botanique 16

II.2. Citrus clementina 16

II.2.1. Description botanique 16

II.3. Citrus sinensis.....17

II.3.1. Description botanique 17

II.4. Citrus aurantium.....18

II.4.1. Description botanique 18

Chapitre III : Résultats et discussions

Partie A: Etude de la composition chimique des quatre agrumes

III.1. Citrus limon 19

III.1.1. Préparation de l'échantillon et composition chimique des huiles essentielles de *Citrus limon*.....20

III.2. Citrus clementina 21

III.2.1. Préparation de l'échantillon et composition chimique des huiles essentielles 21

III.3. Fractionnement et isolement du limonène de l'huile essentielle du *Citrus clementina*.....22

III.4. Citrus sinensis.....22

III.4.1. Extraction des huiles essentielles et composition chimique.....22

III.5. Citrus aurantium.....24

III.5.1. Extraction des huiles essentielles et composition chimique 24

Chapitre III : Résultats et disccussions

Partie B: Activité antioxydante des huiles essentielles et leurs effets synergiques

III.6. Evauation de l'activité antioxydante d'huile essentielle des quatre *Citrus* par la méthode DPPH……. 26

III.6.1. Citrus limon 27

III.6.2. Citrus clementina.....29

III.6.3. Citrus sinensis.....30

III.6.4. Citrus aurantium.....31

III.7. Activité antioxydante des mélanges d'huiles essentielles 32

III.8. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges d'huiles essentielles 32

III.8.1. Mélange de l'huile essentielle de *C. clementina* et *C. limon*.....32

III.8.2. Mélange de l'huile essentielle de *C. sinensis* et *C. aurantium* 33

III.9. Méthode de réduction des ions ferreux FRAP de l'HE des 4 *Citrus* étudiés.....33

III.9.1. Citrus limon 33

III.9.2. Citrus Clementina 34

III.9.3. Citrus sinensis.....34

III.9.4. Citrus aurantium.....35

IV.1. Matériel végétal 36

IV.2. Extraction des huiles essentielles 38

IV.3. Rendement.....38

IV.4. Méthodes d'analyse des huiles essentielles 38

IV.5. Identification des composés.....39

IV.6. Chromatographie sur colonne de silice de l'huile essentielle de *Citrus clementina*.....39

IV.7. Activité antioxydante 40

IV.7.1. Méthode DPPH.....40

IV.7.2. Synergie entre les huiles essentielles 41

IV.7.3. Réduction du pouvoir antioxydant ferrique (FRAP) 41

CONCLUSION……37

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……38

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'importance économique des agrumes sur la scène internationale réside dans leurs bienfaits sur la santé, attribués probablement à la présence des composés phénoliques, la vitamine C, et les caroténoïdes. Les oranges sont des sources d'huiles essentielles en raison de leurs composés aromatiques qui sont utilisées dans les boissons, les confiseries, les biscuits et les desserts[1-3].

Environ 150 huiles essentielles sont couramment commercialisées contre 300 il y a 50 ans. La première huile essentielle mondiale en tonnage est l'huile essentielle d'orange, laquelle est un sous-produit de la production du jus d'orange puisqu'elle est extraite de la peau d'orange par pression à froid ; elle est produite à une hauteur de plus de 50 000 tonnes, principalement issue du Brésil et de la Floride, représentant à eux deux près de 90 % du volume total commercialisé [4].

En général, les huiles essentielles des agrumes ont été reconnues comme une ressource importante naturelle , elles possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés : antibactériennes, anti inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, stimulantes, calmantes et relaxantes [5].

Les huiles essentielles des agrumes représentent une source à la fois abondante et bon marché de terpènes et de terpènes oxygénés qui intéressent de nombreux secteurs, en particulier l'agroalimentaire, la pharmacie, la cosmétique, l'industrie des arômes et des parfums ; les molécules, tels que le myrcène et le linalol, sont contenues en faible quantité dans les huiles essentielles et qui présentent une haute valeur ajoutée en raison de leur profil sensoriel particulièrement recherché ; bien que le terpène non oxygéné le limonène est un composé majoritaire de toutes les huiles essentielles des agrumes [6].

La région méditerranéenne joue un rôle prédominant en tant qu'exportateur d'agrumes frais, avec 60 % du volume global. La production est localisée dans les pays du pourtour méditerranéen mais se concentre surtout en Espagne, en Grèce, en Italie, en Turquie, en Egypte et au Maroc [7].

Le secteur des huiles essentielles en Algérie, est un secteur totalement vierge et qui n'arrive pas à voir la lumière. La situation géographique exceptionnelle de l'Algérie permet une très grande richesse de la flore, située au cœur de la mer Méditerranée est caractérisée par une très grande variation de reliefs et de climats ; depuis le Tell au Nord, les hauts plateaux pour arriver aux dunes de sables du Sahara situées dans le Sud.

Pour pouvoir lancer une production nationale des huiles essentielles, il est primordial de lancer des études recherchant les huiles essentielles à forte valeur ajoutée comme le cas des huiles essentielles des agrumes. Pour se faire nous nous proposons, d'étudier la composition chimique des huiles essentielles de quatre Citrus (*C. limon, C. sinensis, C. aurantium* et *C. clementina*) cultivées

dans la région de Tlemcen, de comparer les compositions chimiques trouvées avec ceux commercialisées dans le monde et l'étude de leurs activités antioxydantes.

Ce travail s'organise autour de quatre chapitres présentant successivement des généralités sur les huiles essentielles des agrumes, la caractérisation chimique, et l'évaluation de l'activité antioxydante des quatre Citrus ainsi que leurs effets synergiques.

Le premier chapitre est consacré à la présentation des huiles essentielles des agrumes et leur importance économique. Par la suite, nous présentons une synthèse des travaux publiés dans la littérature sur les différents composés et familles chimiques contenus dans les quatre espèces. Nous explicitons par la suite les méthodes de préparation des huiles essentielles et les moyens d'analyse appropriés pour la caractérisation de leurs constituants.

Le deuxième chapitre concerne une étude botanique des quatre *Citrus*

Le troisième chapitre présente les résultats de l'étude des compositions chimiques des échantillons d'huiles essentielles de chaque espèce ainsi qu'une description des potentialités antioxydantes des huiles essentielles qui font l'objet de notre étude.

En fin nous terminerons notre travail par **le quatrième chapitre** qui décrit le volet expérimental développé, à savoir, le matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées pour réaliser l'extraction et l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles.

En **conclusion**, nous énumérons les résultats obtenus à travers les études chimiques et biologiques.

CHAPITRE I

GENERALIES SUR
LES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Introduction

L'histoire des agrumes, remonte à 4000 ans avant J-C.; Ils se sont développés un peu plus tard au Maghreb et en Espagne par les Arabes. Le bigaradier fut introduit par ces derniers dans l'empire des Almohades, d'ailleurs en Algérie il embellissait déjà les jardins des Beys (Casbah, hauteurs d'Alger et Constantine) pendant la période Ottomane (du 16 au 18 siècle).

Quelque siècle après, les Maures d'Andalousie ont importé l'oranger ; et le Mandarinier fut introduit au début de la colonisation en 1850 par M. Hardy en Algérie, par la suite le père Clément de l'Orphelinat agricole de Misserghin (W. d'Oran), lorsqu'il a effectué un croisement de Mandarinier avec l'Oranger a pu découvrir la Clémentine qui s'est avérée une variété prématurée parmi le groupe des mandarines [8].



Figure 1 : Champ de *Citrus* de la région de Sekkak

Mis à part la production des jus concentrés, des quantités massives de pelures sont récupérées dans l'industrie du jus d'agrumes. La valorisation de ces sous-produits se fait de différentes manières : production de pectines, aliments pour bétail, récupération d'huiles essentielles, de cires et de flavonoïdes, mais aussi comme confiture [9, 10]. Les huiles essentielles d'agrumes sont d'une importance majeure pour le secteur agroalimentaire (boissons gazeuses), les détergents, cosmétique (parfums, savons, produits de soin), nutraceutique ou encore préparations pharmaceutiques, en aromathérapie et dans les industries de production de biocarburant et de matériaux biodégradables [11].

I.2. La filière des agrumes

La filière fruitière des agrumes a connu une importante progression au cours de ces dernières décennies, ces écorces sont une matrice hautement valorisable vue sa richesse en vitamine C et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques en particuliers les flavonoïdes et les huiles essentielles. Des études récentes ont même montré que ces écorces sont une source de composés biologiquement actifs [12, 13].

I.3. Huiles essentielles des agrumes

Le mot agrume est un terme générique dont l'origine latine acrumen (aigre), signifie dans l'antiquité des arbres à fruits acides [14]. L'agrume (ou hespérides) se définit par sa structure en quartier appartenant à la famille des Rutacées, à la sous famille des *Aurentioidae* et correspond au genre botanique *Citrus* ; indiquant plusieurs variétés [15, 16].

Les agrumes occupent une place de premier plan non seulement pour la production des fruits, mais aussi comme riche source de matières odorantes élaborées dans les diverses parties de la plante groupées en différentes associations selon l'espèce et l'organe de provenance, pour donner naissance aux huiles essentielles [17]. Les huiles essentielles sont la plupart du temps appliquées par massage mais elles sont aussi prises par inhalation ou encore en prenant un bain. Généralement, elles ne doivent pas être prises par voie interne (par la bouche) car elles peuvent être toxiques [18].

En chimie alimentaire, elles ont de multiples applications : boissons, conserves confiseries, glaces, produits laitiers et les industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles) comme matière première pour la synthèse de principes actifs médicamenteux [19, 20]. Le limonène est une molécule à l'origine à la fois de l'odeur du citron et de l'orange. Le Limonène est composé de deux formes isométriques le R- et S-limonène, ce qui fait la différence entre eux.

Le limonène comme étant le composé le plus abondant dans les huiles essentielles des agrumes, au-delà de son odeur fruitée, il est réputé pour ses propriétés antiseptiques, antivirales et sédatives et est employé pour divers usages :

-La formulation de solvants industriels (industries chimiques)

-Utilisation comme solvant biologique et dans de nombreux produits de nettoyage tels que les dégraissants, les agents de démoulage et les solutions de trempage.

-Solvant pour les produits d'esthétiques.

-Agent de saveur dans les aliments et les boissons non-alcoolisées.

-Arome dans les savons, les parfums et les produits d'entretien ménager.

-Production du plastique biodégradable.

-Préparations pharmaceutiques.

- Ralentissement du développement des cellules cancéreuses responsable du cancer du sein (propriétés thérapeutiques).[21-26] Le limonène stimule la digestion, a également une activité cholérétique et cholagogue et favorise l'expulsion des gaz intestinaux. La voie orale et cutanée sont à éviter en raison de la photosensibilisation au soleil ; alors que la diffusion atmosphérique est recommandée [27].

I.4. Facteurs influençant la production et la composition des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier en fonction du stade de croissance, du climat et du patrimoine génétique de l'espèce [28]. Ainsi, des variations qualitatives et quantitatives importantes dans la composition chimique des huiles essentielles de certaines espèces ont été révélées. Par exemple, l'huile essentielle de jeunes feuilles de clous de girofle récoltées en début de cycle végétatif est caractérisée par une faible teneur en eugénol (25-30%) et une forte teneur en acétate d'eugényle (60-70%) alors que celles obtenues à partir de feuilles récoltées durant la période d'épanouissement du végétal est constituée majoritairement par l'eugénol (80-90%) [29].

D'autre part, l'altitude des lieux de récolte intervient en modifiant la production d'esters dans l'huile essentielle de lavande vraie [30]. Enfin, comme les terpènes ont tendance à être à la fois de composés volatils et thermolabiles et peuvent être facilement oxydés ou hydrolysés selon leur structure respective [31], il est admis que la composition chimique des huiles essentielles dépend en outre des conditions de transformation et de stockage de la plante [32, 33].

I.5. Intérêt économique des huiles essentielles des *Citrus*

Les huiles essentielles des *Citrus* deviennent un des principaux produits de commercialisation internationale [34]. Ces essences peuvent être commercialisées et utilisées pour leurs activités biologiques : pouvoir antioxydant, pouvoir antiseptique, antibactériennes et antifongiques ; Comme on dit : à ces niveaux de qualité, correspondent des niveaux de prix différents. Cependant du point de vue commercial, les huiles essentielles de Citrus présentent une importance économique considérable, leur prix varie en fonction du procédé utilisé pour l'extraction, de l'origine et de la qualité et comme elles sont assez courantes, elles ne coutent pas cher [35, 36]. Les couts de production dépendent essentiellement des charges (prix de l'énergie, des intrants nécessaires à la culture, taux d'intérêt, charges foncières, coût de la main-d'œuvre, etc.) [37].

Actuellement, les prix des huiles essentielles des Citrus sont très attrayants (tableau 1). Par exemple 100 ml d'huile essentielle de C. sinensis est commercialisée pour un prix de 5.50 €, alors que celle de C. limon est de 5.50 € pour une contenance de 30 ml ; L'huile de C. clementina est commercialisée pour un prix de 5.90 € les 5ml. Toute fois l'huile de Néroli extraite à partir de ses fleurs blanches est la plus chère (79.00 €) pour une contenance de 10ml. (Tableau 1)

Tableau 1: Les prix des huiles essentielles de *Citrus* en 2017 [38].

Prix d'HE	5 ml	10 ml	30 ml	100 ml
Citrus limon	/	2.80 €	5.50 €	15 €
Citrus clementina	5.90 €	/	/	/
Citrus sinensis	/	2.00 €	2.90 €	5.50 €
Citrus aurantium (Petit grain bigarade)	/	3.50 €	7.90 €	/
Citrus aurantium (Néroli)	42.00 €	79.00 €	/	/

C'est un marché dont l'enjeu économique pèse lourd à l'échelle mondiale [5].

I.6. Préparation des huiles essentielles

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est la plus utilisée à l'heure actuelle. L'hydrodistillation est une distillation hétérogène. L'eau recouvrant le matériel végétal est portée à ébullition sous pression atmosphérique. Une fois libérés, sous forme d'un mélange azéotropique, les composés volatils contenus dans des glandes sécrétrices, sont entrainés mécaniquement par la vapeur d'eau, cette dernière ainsi lestée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir dans le « système Clevenger » préconisé par la pharmacopée européenne, l'eau distillée est recyclée dans le bouilleur par cohobage [39]. La vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface) ; elles sont plus légères que l'eau et non miscibles ; ce qui permet de les séparer dans l'essencier de manière totalement naturelle (on les récupère alors par décantation). Le temps de distillation dépend de la plante concernée : 1 heure pour le lavandin, 1h30 pour la lavande officinale, 4 heures pour le clou de girofle… et le temps complet de distillation doit être respecté pour l'obtention de l'huile essentielle de bonne qualité qui dévoilera « toute son activité » [40].

L'hydrodistillation permet d'obtenir deux produits de distillation : la partie insoluble dans l'eau de condensation est décantée et fournit l'huile essentielle tandis que la partie contenant les composés hydrosolubles constitue l'eau de distillation appelée hydrolat ou encore eau florale. L'huile essentielle est dense en principes actifs (non hydrosolubles) et l'hydrolat est chargé de composés oxygénés aromatiques de l'huile essentielle mais aussi d'autres principes actifs hydrosolubles non présents dans l'huile essentielle qui lui confère des propriétés propres [41]. Ainsi, pour pouvoir analyser la composition chimique des hydrolats par CPG-SM, il faut procéder à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que l'éther diéthylique afin de transférer les constituants volatils de la phase aqueuse à la phase organique qui sera injectée dans le chromatographe.

I.7. Analyse des huiles essentielles

I.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode analytique chromatographique efficace, qui fournit d'excellentes séparations de mélanges quelque peu complexes dans un laps de temps raisonnable. Son principal inconvénient est qu'elle ne convient pas à tous les mélanges, car l'analyse dépend toujours de la volatilité et de la stabilité thermique des molécules étudiées. Cependant, la CPG est l'outil de choix pour l'étude et le contrôle de la qualité des constituants volatils d'un mélange complexe. D'autre part, la CPG permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. C'est une technique d'analyse quantitative qui fournit d'une part, le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé et qualitative sur la base des temps de rétention d'autre part [42].

Pour une colonne donnée, chaque constituant est caractérisé par des temps de rétention ou des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indices de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Ces derniers demeurent constants dans la mesure où la programmation de température reste identique ; ils sont calculés sur colonne polaire (Irp) et apolaire (Ira) et sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence propre au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou encore reportés dans la littérature [43].

I.7.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG-SM).

Depuis les années 1950, cette méthode de couplage CPG-SM n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire, des produits pétroliers, de la parfumerie, des cosmétiques et de la médecine.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge des différents constituants d'un mélange complexe [44].



Figure 2: Chromatogramme CPG/SM du laboratoire COSNA

Deux modes d'ionisations sont utilisés pour l'analyse des molécules vaporisables :

Le premier est l'ionisation par impact électronique (IE) qui consiste en la formation d'ions positifs à partir d'un ion moléculaire M.+ obtenu par interaction entre la vapeur d'un échantillon de masse M et un courant d'électrons (émis par un filament chauffé) accéléré sous vide et sous une différence de potentiel de 70 à 100 eV. Les ions positifs ainsi formés constituent le spectre de masse du composé [45]. Le second est l'ionisation chimique (IC) qui a été utilisée pour l'identification des constituants des huiles essentielles. Il s'agit d'un mode d'ionisation « plus doux » (15 eV). L'ionisation chimique comprend l'ensemble des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactif. Cette technique a trouvé de nombreuses applications chimiques et biochimiques dans les domaines de l'environnement et du médical. Le grand avantage de cette technique est sa flexibilité. En effet, en faisant varier les conditions expérimentales, à savoir la nature du gaz réactant (NH_3, le méthane et NO_2) la pression et la température de la source, il est possible d'observer l'ion quasi-moléculaire des molécules. La faible quantité d'énergie transférée lors de l'ionisation limite les fragmentations et permet ainsi une meilleure différenciation des isomères [46].

I.8. Activités antioxydantes des huiles essentielles

La plupart des antioxydants synthétiques courants qui sont disponibles dans le commerce comme additifs alimentaires, comme, le 2-tertiobutyl-p-hydroxyanisole et 3-tertiobutyl-p-hydroxyanisole (BHA) ou le 2,6-ditertiobutyl-4-méthylphénol (BHT) sont soupçonnés d'être potentiellement dangereux pour la santé humaine [47]. Les huiles essentielles, en tant que sources naturelles de composants phénoliques, retiennent l'attention des chercheurs. Les huiles essentielles de basilic, de cannelle, de clou de girofle, de muscade, d'origan et de thym ont prouvé leurs propriétés anti-radicalaires et antioxydantes dans le test radical DPPH à température ambiante [48].

Les huiles essentielles et leurs constituants ont montré une activité suppressive du cancer sur un certain nombre de lignées cellulaires humaines malignes impliquées dans le cancer du côlon, le cancer gastrique, la tumeur hépatique humaine, les tumeurs pulmonaires, le cancer du sein et le gliome [49]. A titre d'exemple, l'α-bisabolol, un alcool sesquiterpénique isolé de la camomille (*Matricaria chamomilla*), pourrait être considéré comme un inducteur prometteur de l'apoptose dans les cellules de gliome hautement malignes. En plus, il n'est pas toxique chez les animaux et ne réduit pas la viabilité des cellules astrogliales normales [50].

Chapitre II

ETUDE BOTANIQUE DES QUATRE *CITRUS*

II.1. Citrus limon

II.1.1. Description botanique



Le *Citrus limon* est parmi les plus importantes espèces d'agrumes après le *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*, originaire du sud-est asiatique et d'inde, le citronnier fut introduit en Méditerranée par les Arabes. C'est à l'époque des croisades que l'Europe découvre le « Citrus ». Il est cultivé depuis le XIV e siècle en Sicile, qui est actuellement le plus gros producteur de citrons. La Corse produit des citrons d'excellente qualité et de très belle grosseur [51]. Sa culture s'étend aujourd'hui sur le littoral de la Méditerranée et aux régions du globe à climat semi-tropical du monde entier [52, 53].

Figure 3: *Citrus limon*

Le citronnier est désigné sous le nom de *Citrus limon* (L.) Burm. Il peut être cité sous le synonyme de *Citrus limonum* Risso [54, 55] ; c'est un arbrisseau méditerranéen vigoureux aux branches robustes et épineuses atteignant 2 à 4 m de hauteur. [55, 56]

L'huile essentielle de *Citrus limon,* possède de nombreuses propriétés : elle nettoie le foie, aide à purifier le système digestif, calme les nausées de la femme enceinte, aide au déstockage des graisses, renforce les vaisseaux sanguins et favorise la circulation ; Elle favorise la mémoire et la concentration ; elle purifie l'air grâce à ses qualités antiseptiques et bactéricides, elle est également diurétique, anticellulite et anti couperose ; elle donne aussi un teint plus frais, lumineux et éclatant ; en revanche elle aide à éliminer certaines taches de rousseur. L'huile essentielle de *Citrus limon* possède notamment une double action, tonifiante en début de journée et calmante en fin de journée [57, 58].

II.2. Citrus clementina

II.2.1. Description botanique

Le clémentinier (*Citrus clementina*) est un arbre hybride de la famille des Rutacées issu du croisement entre un mandarinier (*Citrus reticulata*) et un oranger (*Citrus sinensis*) ; de 4 à 6 mètres de hauteur, portant des feuilles et des fleurs très parfumées. La clémentine, fruit du clémentinier est pratiquement sans pépin contrairement à la mandarine, savoureuses dotées d'une peau fine d'une couleur verte qui devient orange sous l'effet de la baisse de température en hiver, *Citrus clementina* prend de plus en plus la place de *Citrus reticulata* (mandarine) ; c'est l'une des plus douces et sucrées des agrumes [59].



Figure 4: *Citrus clementina*

L'huile essentielle de *Citrus clementina* est également connue pour calmer les tensions et faciliter le sommeil. La riche composition de l'huile essentielle de *C. clementina* en monoterpènes lui confère de puissantes propriétés anti-infectieuses contre les bactéries, les virus, les champignons mais aussi les vers et les parasites. L'Huile essentielle de *Citrus clementina* est idéale pour la digestion difficile, l'insomnie et le stress ; elle favorise aussi l'élimination des graisses. Certains composés naturels contenus dans cette huile essentielle peuvent présenter un risque d'allergie chez certaines personnes sensibles lorsque l'huile essentielle est incorporée dans une composition cosmétique qui comporte le limonène, et dans une moindre mesure, linalol. [60]

II.3. Citrus sinensis

II.3.1. Description botanique

L'oranger (*Citrus sinensis* L.) est un arbre fruitier de la famille végétale qui produit les agrumes c'est-à-dire la famille des Rutacées ; cet hybride ancien est probablement un croisement entre le pamplemousse (*Citrus maxima*) et la mandarine (*Citrus reticulata*). C'est un arbre sempervirent, pouvant atteindre 10 mètre de haut, au port harmonieux et de croissance rapide, moins vigoureuses que les autres agrumes ; d'une durée de vie de 300 à 400 ans [61-64].



Figure 5 : *Citrus sinensis*

La première huile essentielle mondiale en tonnage provient du *Citrus sinensis* [65] ; elle possède une odeur fruitée et sucrée très agréable qui en fait une incontournable dans la gamme des huiles essentielles en diffusion notamment pour les nourrissons [28]. L'huile essentielle d'orange

douce appartient à la note de cœur, elle se marie avec presque toutes les herbes, les épices, les fleurs et les autres agrumes.[66] C'est une huile décontractante et réputée pour son action à la fois calmante, apaisante, antiinfectieuse, antiseptique, antibactérienne, antivirale elle désinfecte l'air ambiant, c'est aussi un stimulant gastrique qui facilite la digestion ; induit le sommeil, permet de stimuler et de renforcer le système immunitaire ; elle calme le cœur et les tensions nerveuses cardiaques qui agit contre les vertiges et le mal de cœur, lutte aussi contre la constipation nerveuse et aide à traiter les affections des voies respiratoires, comme les rhumes ou les bronchites [67-69].

II.4. Citrus aurantium

II.4.1. Description botanique

Le bigaradier est un bel arbrisseau fruitier de 5 à 10 mètres de hauteur à des branches épineuses portant des feuilles brillantes vert foncé, d'une légère odeur et une saveur amère, ovales, luisantes et persistantes ; elles mesurent environ 8 cm de longueur et 4 cm de largeur.



Figure 6: Citrus aurantium.



Des fleurs de couleur blanche ou rose, pouvant atteindre 25 mm, plus grandes que celles de l'oranger doux et très odorante, duquel on tire l'essence du néroli et l'eau de fleur d'oranger [70, 71].

Figure 7: Fleur d'oranger.

Le bigaradier porte un fruit, la bigarade, également nommé orange amère ce fruit est une baie de couleur vert-jaune ou rouge-orangé à maturité, rond parfois ovalisant ou aplati, il tient longtemps sur l'arbre sans perdre leur parfum, sa peau est rugueuse plus au moins épaisse teintée de vert ou de jaune [72].

L'huile essentielle d'orange amère est connue pour agir positivement sur l'équilibre nerveux et psychique, et à aider à l'endormissement. Elle appartient à la note cœur-fond et se marie bien aux notes florales, à la menthe, à la coriandre et aux agrumes [73]. L'huile essentielle de néroli appelée fleurs d'oranger ou néroli bigarade est une anti-crise de nerfs, rééquilibrante nerveuse et lutte contre la dépression nerveuse [74].

Chapitre III
RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie A : Etude de la composition chimique des quatre agrumes

III.1. *Citrus limon*

III.1.1. Préparation de l'échantillon et composition chimique des huiles essentielles de *Citrus limon*

Les échantillons de *Citrus limon* ont été prélevés dans 10 stations de la wilaya de Tlemcen. Les huiles essentielles ont été obtenues avec une forte odeur de citron avec des rendements varient selon la provenance, allant de **0,18** à **0,82 %** (Tableau 2).

Tableau 2 : Répartition géographique et composition chimique des dix échantillons de *C. limon*

Zones	Régions	Dates de récoltes	Altitudes (m)	Rendements (%)	Composés majoritaires (%)	Climats
S1	Ghazaouet	18/02/2018	31	0,28	Myrcène : 1,8 Limonène : 58,2 Géranial : 7,7	Humide
S2	Beni-saf	23/03/2018	90	0,18	Myrcène : 1,8 Limonène : 58,2 Géranial : 7,7	Humide
S3	Remchi	04/03/2018	119	0,36	Myrcène : 8,4 Limonène : 52,5 Géranial : 10,4	Chaud
S4	Sekkak	26/12/2017	195	0,61	Myrcène : 10,8 Limonène : 63,2 Géranial : 7,2	Chaud
S5	Oulhaça	03/03/2018	252	0,45	Myrcène : 10,8 Limonène : 65,7 Géranial : 6,3	Humide
S6	Maghnia	24/12/2017	410	0,75	Myrcène : 10,8 Limonène : 70,1 Géranial : 4,2	Chaud
S7	Bensekrane	19/02/2018	471	0,82	Myrcène : 8,1 Limonène : 75,2 Géranial : 1,2	Chaud
S8	Ouled Mimoun	14/01/2018	717	0,47	Myrcène : 7,3 Limonène : 60,1 Géranial : 6,8	Semi-aride Sec-froid
S9	Ben Badis	03/03/2018	747	0,29	Myrcène : 13,3 Limonène : 67,1 Géranial : 3,7	Chaud
S10	Sebdou	08/03/2018	951	0,27	Myrcène : 10,5 Limonène : 55,1 Géranial : 7,7	Semi-aride, sec-froid

Les rendements les plus élevés (**0,82, 0,75 et 0,61%**) ont été obtenus, respectivement depuis les régions de Bensekrane, Maghnia et Sekkak (climat chaud), tandis que les plus faibles rendements (**0,18-0,47%**) ont été obtenus depuis les sites de Beni saf, Sebdou, Ghazaouet, Ben Badis, Remchi, Oulhaça et Ouled Mimoun (climats Humide et semi-arides).

Certaines informations concernant les lieux de récolte sont présentées dans le tableau 2. Il est à noter que tous les composants ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux de composés purs (Tableau 2). Les principaux composés des huiles essentielles sont le limonène (**52,5-75,2%**), myrcène (**1,8-13,3%**) et le géranial (**1,2-10,4%**).

Cette différence de composition chimique des huiles essentielles pourrait s'expliquer par l'effet variétal, la période de récolte, la technique d'extraction et les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraicheur), Le taux d'humidité aussi peut avoir une influence sur le rendement d'extraction des huiles essentielles [63, 75].

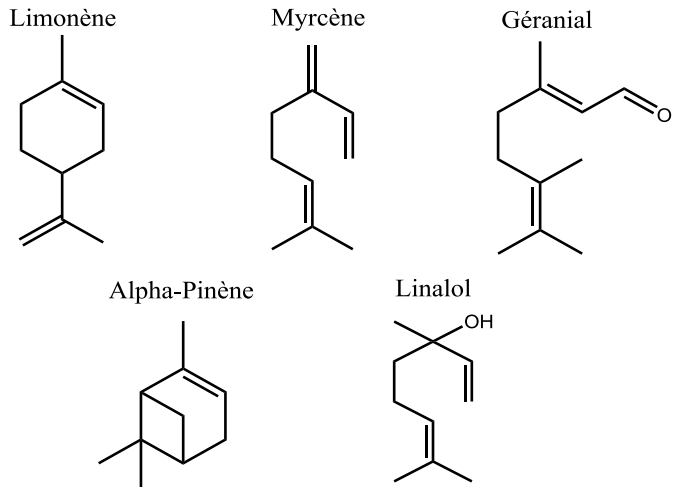


Figure 8 : Les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Citrus.*

III.2. *Citrus clementina*

III.2.1. Préparation de l'échantillon et composition chimique des huiles essentielles

Les fruits de *C. clementina* étaient recueillis dans la région de Hennaya, les fruits ont été complètement débarrassé de feuilles et des pédoncules est râpé en zestes. 1800 g de zeste ont été soumis à une hydrodistillation pendant 5h en utilisant un appareil de type Clevenger donnant un rendement de **1,23%.**

Tableau 3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus clémentina.*

N°	Composés	Tr	%
01	α-Pinène	2,6	10,7
02	Myrcène[2]	3,2	2,6
03	Limonène	9.8	85,2
% d'identification			98,5

Au total, 3 composés représentant **98,5%** de l'huile essentielle totale ont été identifiés (tableau 3). Tous les composants ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de composés purs. La composition chimique de l'huile essentielle de *C. clementina* est constituée principalement par des monoterpènes hydrocarbonés. Les principaux constituants étaient le limonène (**85,2%**), α-pinène (**10,7%**) et le myrcène (**2,6%**).

III.3. Fractionnement et isolement du limonène de l'huile essentielle du *Citrus clementina*

Afin d'isoler le composé majoritaire le limonène pour étudier son activité antioxydante, nous avons soumis 1g d'huile essentielle à un fractionnement sur colonne ouverte à gel de silice fine avec du pentane comme éluant, ce qui a conduit à une fraction hydrocarbonée. Le schéma du fractionnement est donné à la figure 9.

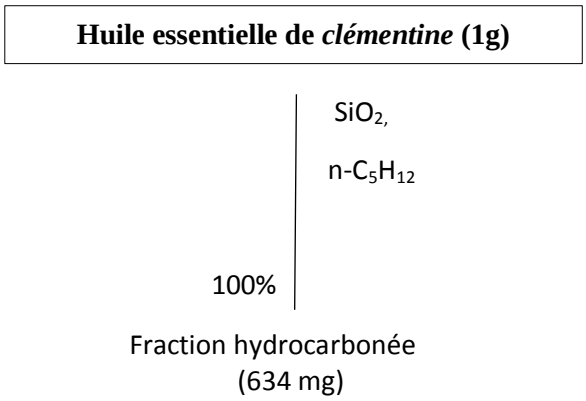


Figure.9 : Schéma de fractionnement de l'huile de *Citrus clementina* sur colonne de gel de silice.

L'analyse de la fraction selon la séquence habituelle CPG a permis d'identifier le limonène avec un pourcentage de **97,6 %,** et un temps de rétention de 9,8 mn.

III.4. Citrus sinensis

III.4.1. Extraction des huiles essentielles et composition chimique

Le matériel végétal (Zeste) a été récolté durant les périodes de janvier à mars 2018. Il a été hydrodistillé durant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger. Les échantillons cultivés ont été recueillis dans neuf régions de l'ouest de l'Algérie.

Le tableau 4 montre les rendements quantitatifs moyens, exprimées en pourcentage du poids frais. D'après le tableau 4, les endroits autour de Remchi, Sekkak et Maghnia avec de moyennes altitudes (119-252 m) et un climat chaud présentent les rendements les plus élevés (**0,48, 0,54 et 0,82%**, respectivement). En revanche, des rendements plus faibles (**0,17 et 0.26 %**) ont été observés dans les régions de Beni ghenam et Beni-saf, caractérisées par des faibles altitudes (31 à 90 m, respectivement) et un climat humide.

D'autre part, il est à noter que les régions de Hennaya, Ain el Houtz, Ouled Mimoun et Sebdou, des régions de haute altitude (440-951 m) et un climat semi-aride sec et froid sont caractérisées par des huiles essentielles de faible rendement (Tableau 4).

Les huiles essentielles des différents échantillons sont constituées par 3 principaux composés, représentant environ **47,1- 87,6%** de la composition des huiles. L'identification des 03 composants a été effectuée en comparant leurs temps de rétention avec ceux des composés purs. Les principaux composés des différents échantillons sont le limonène (**36,1-86,5%**), myrcène (**0,1-10,8%**) et le linalol (**0,5-6,2%**).

Tableau 4 : Répartition géographique et composition chimique des neuf échantillons de *Citrus sinensis.*

Zones	Régions	Date de récolte	Altitudes (m)	Rendements (%)	Composés majoritaires (%)	Climats
S1	Beni ghenam	15/01/2018	31	0,26	Myrcène : 1,8 Limonène : 82,1 Linalol : 3,7	Humide
S2	Beni-saf	27/03/2018	90	0,17	Myrcène : 1,2 Limonène : 70,9 Linalol : 1,2	Humide
S3	Remchi	19/02/2018	119	0,48	Myrcène : 0,1 Limonène : 45,1 Linalol : 1,9	Chaud
S4	Sekkak	31/12/2017	195	0,54	Myrcène : 0,9 Limonène : 86,5 Linalol : 2,1	Semi-aride sec et chaud
S6	Maghnia	09/01/2018	252	0,82	Myrcène : 10,8 Limonène : 36,1 Linalol : 6,2	Chaud
S6	Hennaya	18/01/2018	440	0,13	Myrcène : 1,0 Limonène : 75,1 Linalol : 0,7	Semi-aride sec et froid
S7	Ain el Houtz	31/12/2017	521	0,21	Myrcène : 0,7 Limonène : 81,8 Linalol : 0,5	Semi-aride sec et froid
S8	Ouled Mimoun	14/01/2018	717	0,30	Myrcène : 0,2 Limonène : 51,7 Linalol : 1,6	Semi-aride sec et froid
S9	Sebdou	15/03/2018	951	0,36	Myrcène : 0,1 Limonène : 48,5 Linalol : 1,2	Semi-aride sec et froid

III.5. *Citrus aurantium*

III.5.1. Extraction des huiles essentielles et composition chimique

Le matériel végétal a été récolté durant la période de mois de mars 2018. Les échantillons cultivés ont été recueillies dans quatre régions de l'ouest d'Algérie. Le tableau 5 montre les rendements quantitatifs moyens, exprimés en pourcentage du poids frais. D'après ce tableau, le rendement (**0.29%**) le plus élevé a été obtenu dans la région de Kalâa avec une altitude de 855 m, alors que le plus faible rendement a été obtenu dans la région d'Ouzidane caractérisée par une faible altitude 487m.

Les huiles essentielles des différents échantillons d'huiles essentielles sont représentées par 2 principaux composés, représentant environ **84,1- 92%** de la composition chimique des huiles essentielles. L'identification des 02 composants a été effectuée en comparant leur temps de rétention avec ceux des composés purs. Les principaux composés sont le myrcène (**6,1-37.5%**) et le limonène (**53.2-83.0%**).

Tableau 5: Répartition géographique et composition chimique des quatre échantillons de *Citrus aurantium*

Echantillons	Altitudes (m)	Rendements (%)	Composés majoritaires (%)	Climats
Ouzidane	487	0.16	Myrcène : 6,1 Limonène : 83.0	Semi-aride sec et froid
Ain hout	521	0.26	Myrcène : 16.4 Limonène : 75.6	Semi-aride sec et froid
Boujlida	590	0.27	Myrcène : 37.5 Limonène : 53.2	Semi-aride sec et froid
Kalaa Tlemcen	855	0.29	Myrcène : 6.1 Limonène : 78.0	Semi-aride sec et froid

Discussion

Le rendement en huiles essentielles des *Citrus* a montré une variabilité significative. Les résultats ont révélé des corrélations positives entre les rendements en huile essentielle, les proportions en limonène et les habitats des spécimens étudiés (lieux de récolte et conditions climatiques). Nous avons identifié 03 constituants représentant plus de **84%** de la composition chimique de l'huile essentielle. La composition chimique des huiles essentielles est largement dominée par la composante le limonène qui variait de **36,1** jusqu'à **92%**. Le plus grand rendement de l'huile essentielle a été obtenu dans les régions à climat chaud.

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, les études menées sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus limon* que ce soit en Espagne, Portugal, Italie, France, Tunisie ou en Maroc sont caractérisées par des teneurs élevés en limonène (56,99-71,87%), myrcène (0,9-1,47%) et le géranial (0,1-5,43%) [6, 76-82]. En Italie par exemple les principaux composés de l'huile essentielle de *Citrus clementina* sont le limonène (95,46%), α-pinène (0,43%) et le myrcène (1,82%)[83].

La composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* du Canada, Espagne, France, Italie, Maroc et Tunisie, est caractérisée par un pourcentage très élevé en limonène dépassant les 90%, myrcène (0,05-3,77%) et le linalol (0,04-0,9%)[5, 80, 82, 83, 85, 86] ;en revanche les principaux composés de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* en Amérique, Tunisie, Maroc et Canada sont le myrcène (0,04-2,05%) et le limonène (78,43-95,49%)[80, 82, 84, 86].

Chapitre III
RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie B : Activités antioxydantes des huiles essentielles et leurs effets synergiques

III.6. Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle des quatre *Citrus* par la méthode DPPH

L'évaluation des propriétés antioxydantes des huiles essentielles des quatre *Citrus* ont été évaluées en utilisant deux méthodes différentes : l'activité de piégeage radical (DPPH) et le pouvoir réducteur du fer (FRAP), en utilisant le BHT et l'acide ascorbique comme témoins positifs. Les résultats ont été rapportés comme la moyenne de trois répétitions.

III.6.1. *Citrus limon*

III.6.1.1. Activité anti radicalaire par DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres des huiles essentielles, mesurée par le dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), est indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition (I%) du DPPH en fonction de différentes concentrations des huiles essentielles de *C. limon.*

N	Stations	C (mg/ml)	I% du DPPH	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%
S1	Oulhaça	0	0	50	25,93	100	33,88	150	/	200	64,72
S2	Béni saf	0	0	50	24,31	100	33,73	150	/	200	59,87
S3	Remchi	0	0	50	13,51	100	31,75	150	42,27	200	58,44
S4	Sekkak	0	0	50	24,14	100	32,18	150	40,46	200	53,79
S5	Sebdou	0	0	50	13,79	100	16,61	150	22,19	200	43,44
S6	O.Mimoun	0	0	50	9,41	100	18,82	150	/	200	41,18
S7	Maghnia	0	0	40	4,01	115	11,02	200	28,06	342	77,15
S8	Bensekrane	0	0	50	11,16	100	22,99	150	29,69	200	39,51
AA	Témoin	0,005	4,88	0,02	14,98	0,05	19,86	0,1	39,37	0,2	74,91
BHT	Témoin	0,5	30,6	0,8	33,91	1	36,69	2	47,65	3	56,52

Le tableau 6 montre que la plus faible activité de piégeage des radicaux de l'huile essentielle de citron est de 28,06% pour la région de Maghnia, alors que l'activité la plus forte est celle d'Oulhaça avec 64,72% à la concentration de 200 mg/ml.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle était proportionnelle aux concentrations et les valeurs CI_{50} inférieure reflétaient une plus grande action protectrice (Figure 10). Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre CI_{50}. Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration de l'échantillon à tester qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH°. Les huiles essentielles du citron ont réduit le radical libre stable 2,2-diphényl-1- picrylhydrazyle (DPPH) de couleur violette en diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune avec des CI_{50} allant de 148,61 à 255,88 mg/ml. D'un point de vu comparatif, l'huile essentielle de la région d'Oulhaça a montré la plus grande activité

antioxydante avec une CI_{50} de 148,61 mg/ml alors que celle de Maghnia a été la plus faible (255,88 mg/ml) (Figure 10).

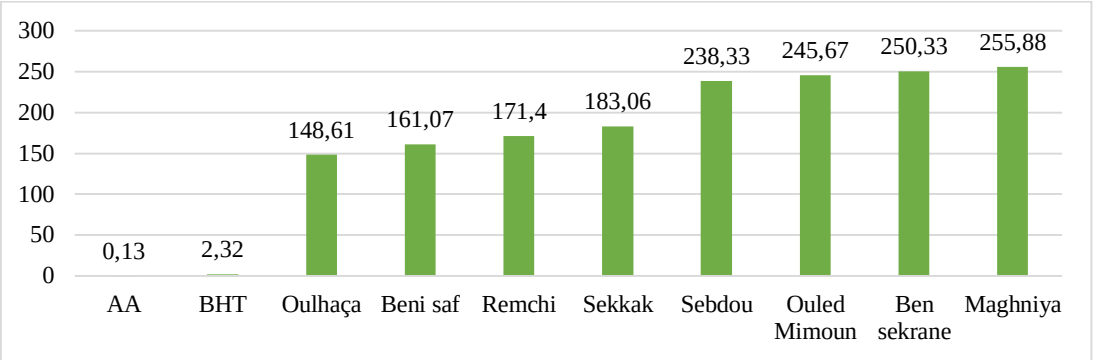


Figure 10. Comparaison entre les CI_{50} des huiles essentielles et les deux témoins (AA et BHT)

D'après les résultats obtenus, on peut en conclure que l'activité antioxydante des huiles essentielles des différentes stations étudiées est particulièrement faible comparativement aux deux témoins, l'acide ascorbique et le BHT qui sont caractérisés respectivement par des CI_{50} de 0,13 et 2,32 mg/ml.

III.6.1.2 Etude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et sa composante majoritaire le limonène

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH des différents échantillons et de la composante pure le limonène sont présentés dans la Figure 11.

Les résultats obtenus des CI_{50}, ont montré que toutes les huiles essentielles de *C. limon* possèdent un pouvoir de piégeage du radical DPPH° plus important que la composante principale, le limonène (valeur de la CI_{50} = 258,74 mg/ml).

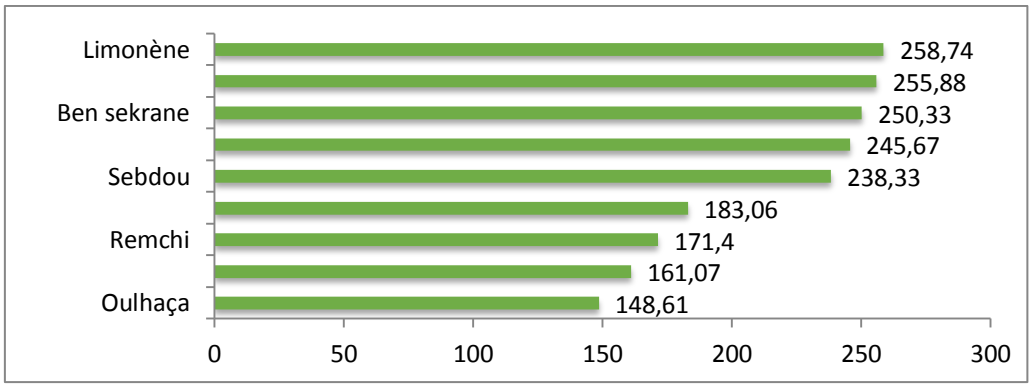


Figure 11 : Evaluation de l'activité antioxydante (CI_{50}) des huiles essentielles et du limonène.

La comparaison de l'activité de balayage du DPPH• des huiles essentielles de tous les échantillons et du limonène avec ceux exprimés par le BHT ont montré que tous les échantillons examinés ont des effets antioxydants très faible avec des CI_{50} allant de 148,61 à 255,88 mg/ml pour les huiles essentielles et 258,74 mg/ml pour le limonène.

III.6.2. *Citrus clementina*

III.6.2.1. Activité anti radicalaire par DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de *C. clementina* et des deux témoins (AA, BHT), mesurée par le test du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), est indiquée dans le tableau 7.

Tableau 7: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *C. clementina.*

Pourcentage d'inhibition (I%)	
C (mg/ml)	I%
90	8,4
288	19,8
432	23,5
700	38,2
1000	51,3

D'après les résultats du tableau 7 ci-dessus, on observe que l'huile essentielle de *C. clementina* possède une très faible activité antioxydante (51,3% à la concentration 1000 mg/ml) par rapport aux deux témoins (acide ascorbique 74,91% à 0,2 mg/ml et BHT (56,52% à 3 mg/ml) et les huiles essentielles du citron. La concentration d'huile essentielle de *C. clementina* nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH est de 955,36 mg/ml qui est largement supérieure aux deux témoins (BHT: 2,31% ; AA: 0,13%) (Figure 12).

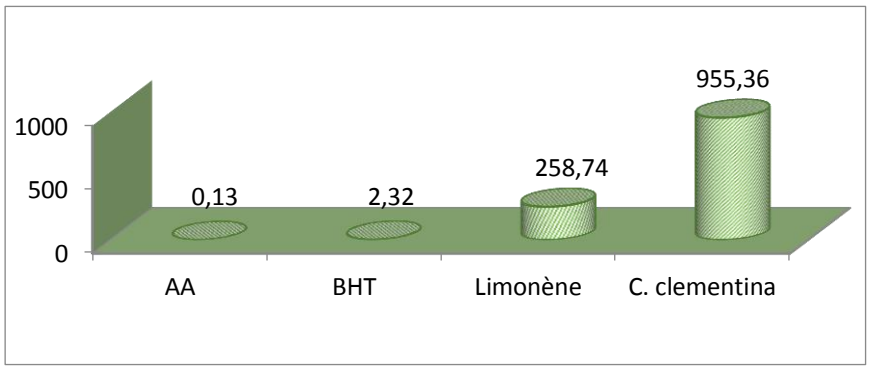


Figure 12. Comparaison entre les CI_{50} des huiles essentielles, le limonène et les deux témoins (AA et BHT)

En comparant les résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de clémentine avec celle du limonène, l'huile essentielle de *C. clementina* (CI_{50} de 955.36 mg/ml) possède une très faible activité par rapport à celle du limonène (258,74 mg/ml).

III.6.3. *Citrus sinensis*

III.6.3.1. Activité anti radicalaire par DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de *C. sinensis* et des deux témoins (AA, BHT), mesurée par le dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), est indiquée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

N	Stations	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%	C (mg/ml)	I%
S1	Beni ghenam	0	0	5	36,83	40	61,13	80	92,68	100	94,18
S2	Béni saf	0	0	30	31,81	50	50,84	90	80,00	100	86,99
S3	Remchi	0	0	30	17,61	50	22,7	90	32,71	100	34,91
S4	Sekkak	0	0	2.0	15,09	3.0	16,58	4.0	23,62	50	79,21
S5	Sebdou	0	0	30	31,85	50	36,55	90	71,54	100	72,85
S6	O.Mimoun	0	0	30	15,09	50	26,42	90	45,55	100	47,17
S7	Maghnia	0	0	30	16,7	50	30,31	90	55,26	100	61,24
S8	Ain hout	0	0	5	3,25	10	7,4	15	10,65	100	72,10
AA	Témoin	0,005	4,88	0,02	14,98	0,05	19,86	0,1	39,37	0,2	74,91
BHT	Témoin	0,5	30,6	0,8	33,91	1.0	36,69	2.0	47,65	3.0	56,52

Le **Tableau 8** montre que l'huile essentielle de Sekkak présente un pouvoir anti-radicalaire plus important que les huiles essentielles des autres régions. A la concentration de 50 mg/ml, l'huile essentielle de Sekkak présente un pourcentage de 79.21%. Alors que, les huiles essentielles de autres stations présentent des pourcentages d'inhibitions plus faibles. D'autre part, l'huile essentielle de Remchi présente la plus faible activité 34.91% à la concentration de 100 mg/ml.

Si nous classons nos extraits selon les CI_{50} et par rapport aux deux témoins, nous obtiendrons l'ordre suivant : Acide ascorbique > BHT > HE Beni ghenam > HE Sekkak> HE Beni Saf>HE Sebdou> HE Ain Houtz>HE Maghnia>HE O/Mimoun> HE Remchi (Figure 13).

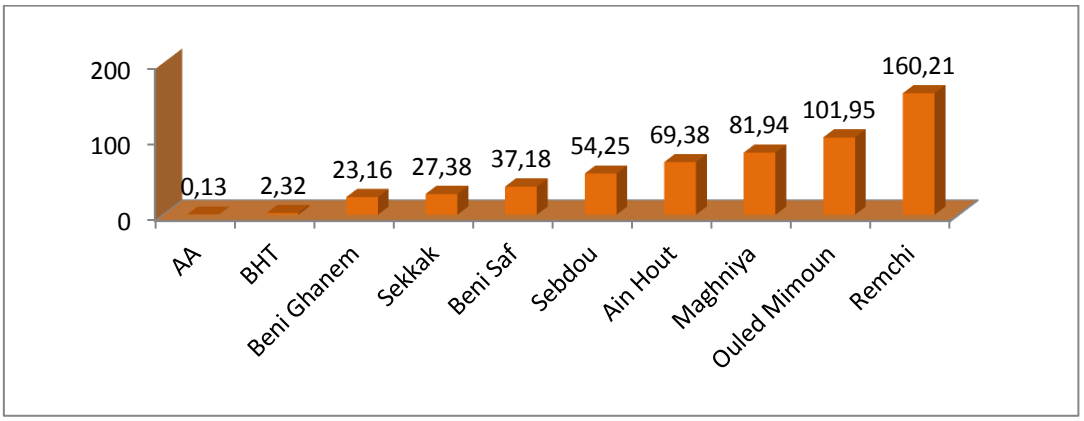


Figure 13. Comparaison entre les CI_{50} des huiles essentielles et les deux témoins (Acide ascorbique et BHT)

D'autre part, les résultats obtenus des CI_{50}, ont montré que tous les échantillons d'orange douce possèdent un pouvoir de piégeage du radical DPPH° plus important que la composante majoritaire le limonène (CI_{50} = 258,74 mg/ml) (Figure 14).

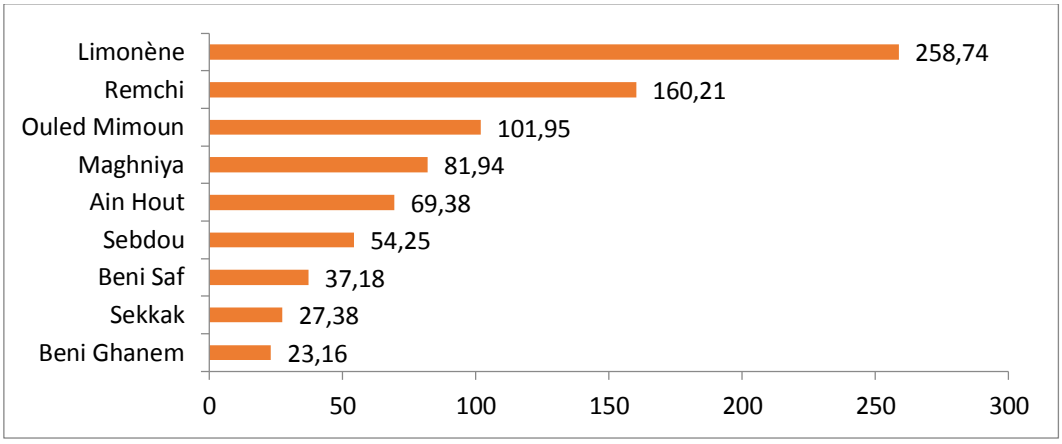


Figure 14 : Evaluation de l'activité antioxydante (CI50) des huiles essentielles et du limonène.

III.6.4. *Citrus aurantium*

III.6.4.1. Activité anti radicalaire par DPPH

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* et des deux témoins (AA, BHT), testée par la mesure du dosage du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), est indiquée dans la figure 15.

La figure 15 ci-dessous montre que la plus forte activité antioxydante a été caractérisée par l'huile essentielle de *C. aurantium* de la région de Boujlida avec une CI_{50} de 32,9 mg/ml, alors que l'activité la plus faible a été exprimée par celle d'Ouzidane avec une CI_{50} de 59.55 mg/ml.

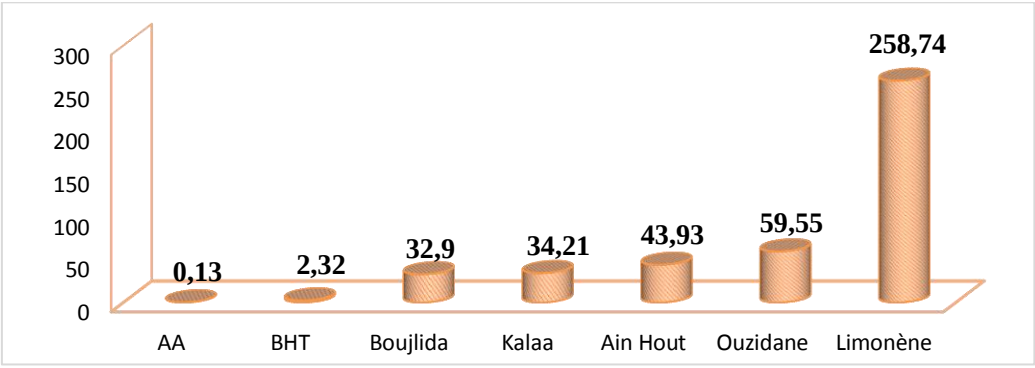


Figure 15. Comparaison entre les CI_{50} des huiles essentielles, le limonène et les deux témoins (AA et BHT).

Les résultats obtenus des CI_{50}, ont montré que tous les échantillons de *C. aurantium* possèdent un pouvoir antioxydant important par rapport au limonène (CI_{50} de 258,74 mg/ml).

III.7. Activité antioxydante des mélanges d'huiles essentielles

L'effet synergique possible produit par la combinaison d'huiles essentielles de plantes a été considéré comme une stratégie efficace pour combattre le processus naturel d'oxydation des aliments. Les huiles essentielles et leurs composants commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour la protection des aliments contre l'oxydation. Sans aucun doute, les conservateurs alimentaires chimiques ou synthétiques font partie de la panoplie des techniques et des moyens qui permettent d'assurer la sécurité du consommateur, d'allonger la durée de vie des produits alimentaires et de limiter leurs altérations par l'oxydation. Cependant, la recherche de nouvelles molécules s'est avérée nécessaire car, ces substances synthétiques ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation ; elles sont avérées responsables d'effets indésirables. En effet, le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) sont suspectés avoir des effets carcinogènes.

Les nombreuses propriétés naturelles des huiles essentielles en font des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie alimentaire. Dans le but d'avoir une meilleure activité des quatre huiles essentielles, le principal objectif de ce travail consiste à déterminer le pouvoir antioxydant de l'effet synergique ou antagonisme entre les 04 huiles essentielles par la méthode de DPPH.

III.8. Evaluation de l'activité antioxydante des mélanges d'huiles essentielles

III.8.1. Mélange de l'huile essentielle de *C. clementina* et *C. limon*

Une activité antioxydante synergique a été observée après le mélange des deux huiles essentielles. L'huile du *C. limon* associé à l'huile de *C. clementina* présente une activité (CI_{50} = 154,77 mg/ml) plus importante que les huiles essentielles individuelles ((IC_{50} = 250.33 mg/ml pour l'huile du *C. limon* et 955.36 mg/ml pour l'huile de *C. clementina*) (Figure 16).

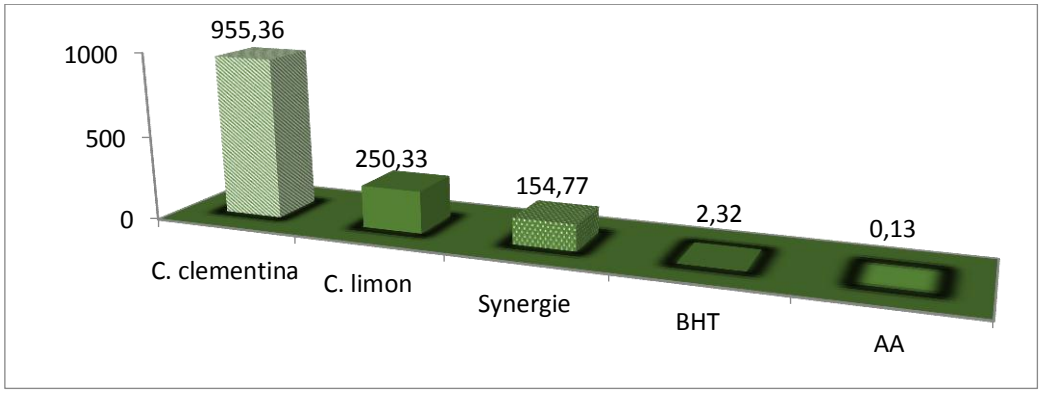


Figure 16 : CI_{50} des HEs de *C. clementina*, *C. Limon* et leur mélange.

III.8.2. Mélange de l'huile essentielle de *C. sinensis* et *C. aurantium*

Un effet synergique a été observé après le mélange des huiles essentielles de l'orange douce et amère. L'huile essentielle de *C. sinensis* associé à l'huile de *C. aurantium* présente une activité antioxydante plus importante (CI_{50} = 41.1 mg/ml) que les deux huiles essentielles individuelles (CI_{50} = 54.25 mg/ml pour *C. sinensis* et CI_{50} = 52.11 mg/ml pour *C. aurantium*) (Figure 17).

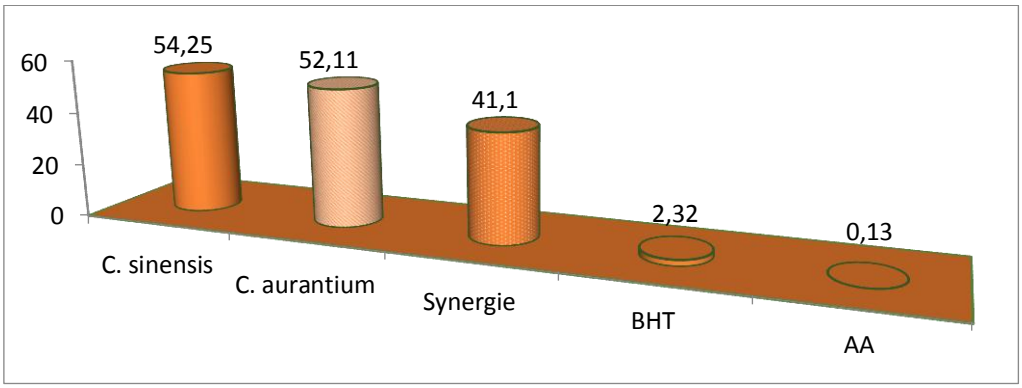


Figure 17 : Comparaison des CI_{50} de la synergie entre l'huile essentielle de *C. sinensis* et *C. aurantium.*

III.9. Méthode de réduction des ions ferreux FRAP de l'HE des 4 *Citrus* étudiés

Dans le test du pouvoir réducteur, la présence d'antioxydant dans l'échantillon aurait pour résultats la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} en donnant un électron, la quantité du complexe Fe^{2+} peut ensuite être contrôlée par la mesure de la formation du bleu de Perl a 700 nm ainsi l'augmentation de l'absorbance (DO) indique une augmentation de la capacité réductrice.

III.9.1. *Citrus limon*

Les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles de tous les échantillons sont nettement inférieures à ceux des références (acide ascorbique et BHT) (Figure 18).

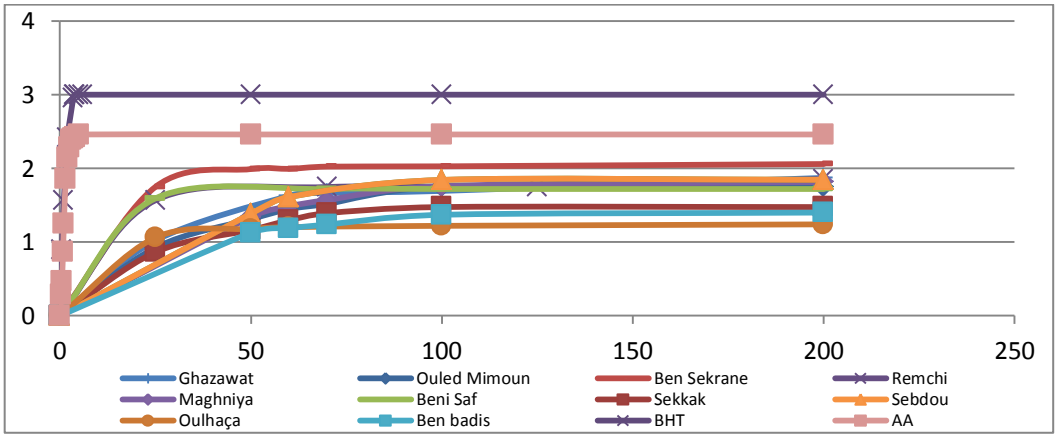


Figure 18 : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'huile essentielle de C. limon.

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles des dix échantillons, déterminés selon la méthode de réduction du ferricyanure de potassium, a augmenté avec des concentrations croissantes. En comparant les résultats de *Citrus limon* avec l'acide ascorbique et BHT, on remarque que les huiles essentielles présentent de bonnes activités antioxydantes avec le test FRAP mais qui restent largement inférieures à ceux des deux témoins. A la concentration de 200 mg/ml, le pouvoir réducteur de l'huile essentielle du citron de Bensekrane est largement supérieur (DO= 2.059), contrairement à l'huile de Oulhaça qui a une absorbance de 1.24, mais qui reste nettement inférieur à celui du BHT et l'acide ascorbique (DO= 3 et 2,46 respectivement).

III.9.2. *Citrus Clementina*

D'après le résultat obtenu par le test FRAP, on constate que l'huile essentielle de clémentine possède une très faible activité antioxydante (DO : 1,212) par rapport aux 2 témoins l'acide ascorbique et le BHT (Figure 19).

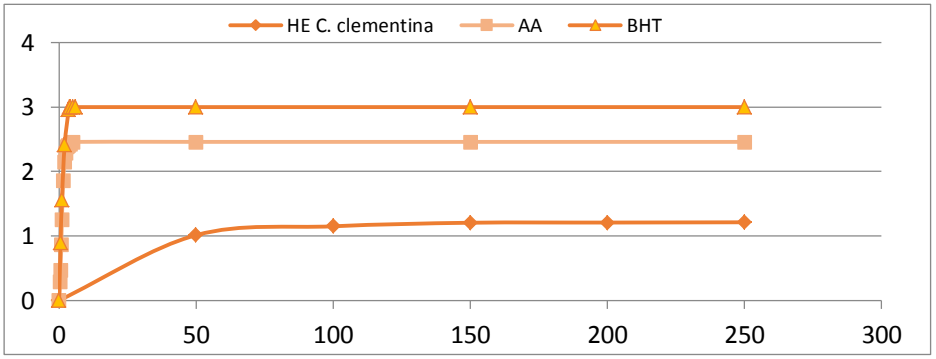


Figure 19: Résultat du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP pour *C. clementina.*

III.9.3. *Citrus sinensis*

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP, montre que l'huile essentielle de Beni ghenam possède une bonne activité par rapports aux autres stations et qui est proche de l'acide ascorbique (DO=2.256) (Figure 20).

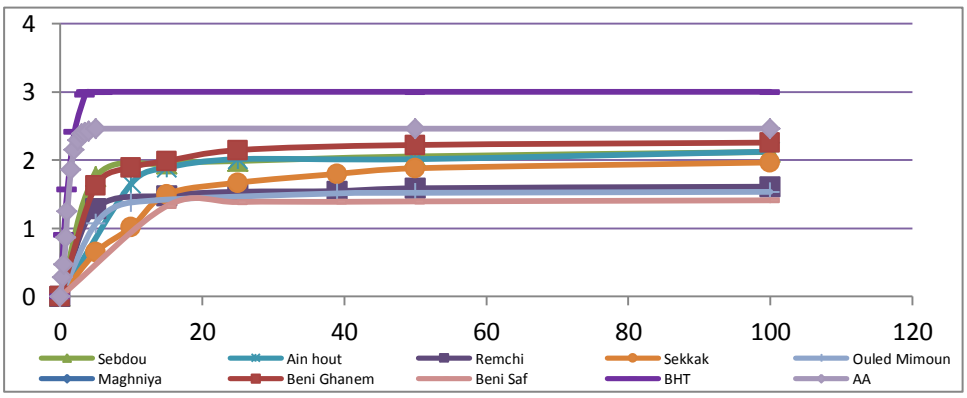


Figure 20: Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'huile essentielle de *C. sinensis*.

III.9.4. *Citrus aurantium*

Les résultats de l'activité antioxydante par la méthode FRAP montrent que l'huile essentielle de la station de Boujlida présente une meilleure activité antioxydante (2,204 mg/ml) que les huiles provenant de la station d'Ouzidane, Kalaa Tlemcen et Ain hout (1,616 ; 1,504 ; 1,369 mg/ml, respectivement) mais qui restent très faible par rapport aux deux témoins (Figure 21).

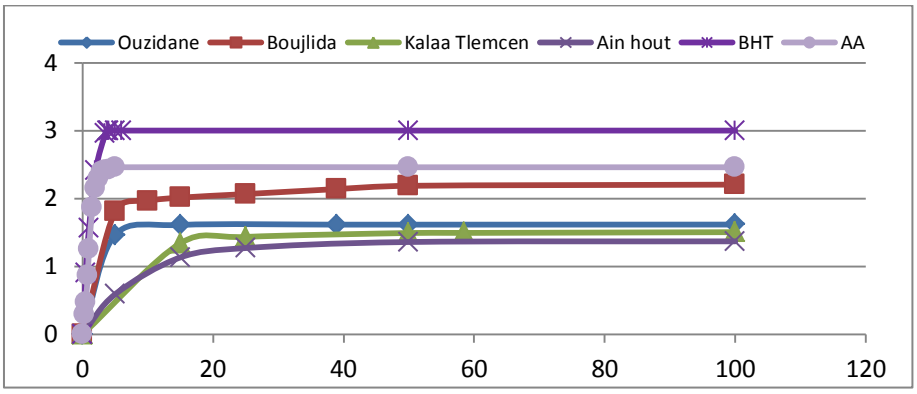


Figure 21: Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'huile essentielle de *C. aurantium.*

Discussion

Dans la présente étude, tous les échantillons étudiés ont montré une activité antioxydante en piégeant favorablement le radical DPPH$^{\bullet}$. Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* ont montré la meilleure activité antioxydante avec des CI_{50} allant de 32.9 à 59.55 mg/ml qui sont nettement inférieures à celles de *Citrus limon, Citrus Clementina* et *Citrus sinensis*. Les huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* présentent des activités antioxydantes modérées et les activités les plus faibles ont été observées pour les huiles essentielles de *Citrus clementina*. Signalons que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a montré une activité intéressante, ce résultat peut s'expliquer par le pourcentage appréciable en mycènes dont l'association au limonène semble efficace. En revanche, l'association myrcène/limonène/Géranial pour *Citrus limon* ou myrcène/limonène/linalol pour *Citrus sinensis* diminue considérablement le pouvoir antioxydant des huiles essentielles. Alors que la plus faible activité antioxydante de *C. clementina* pourrait aussi s'expliquer par l'association de l'α-pinène/myrcène/limonène. Ces propriétés antioxydantes sont probablement liées à leur profil chimique, ainsi qu'à l'effet de l'interaction des constituants présents dans les huiles, tant ceux en grandes proportions que ceux présents en quantités mineures. De plus nos résultats montrent que les huiles essentielles des quatre Citrus peuvent être utilisées comme conservateurs naturels en parfumeries.

CHAPITRE IV

MATERIELS ET METHODES

IV.1. Matériel végétal

La matière végétale des quatre *Citrus* a été identifiée conjointement avec le Professeur BENABADJI Noury du Laboratoire de botanique d'Ecologie et gestion des écosystèmes de l'Université de Tlemcen et le Docteur HASSANI Choukri du laboratoire de botanique, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.

Pour chaque espèce étudiée, le matériel végétal a été prélevé sur plusieurs localités réparties dans la wilaya de Tlemcen. Les campagnes d'échantillonnage se sont déroulées sur diverses périodes de l'année en fonction de l'état végétatif.

- ***Citrus limon***

Le matériel végétal de *Citrus limon* a été récupéré dans 10 stations de la région de Tlemcen, depuis le mois de décembre jusqu'au mois de mars, partagé entre plusieurs zones, correspond particulièrement aux espaces littoraux et montagneux.

Les coordonnées GPS des différentes stations sont les suivantes : Ghazaouet [35°01'36''N;1°07'48''O] (S1), Beni saf [35.305509, -1.355522] (S2), Remchi [35.058712, -1.425444] (S3), Sekkak [35°01'45''N, 1°19'06''W] (S4), Oulhaça [35°16'30''N,1°30'13''W] (S5), Maghnia [34° 51' 12.419" N 1° 44' 5.878" W] (S6), Bensekrane [35.072642, -1.228297] (S7), Ouled mimoun [34°54'16.99"N, 1°2'2.18"W] (S8), Ben badis [34.936906, -0.904143], Sebdou [34°87'78''N; 1°.23'36''O] (S10).

- ***Citrus clémentina***

Le matériel végétal de *Citrus clémentina* a été récolté dans la zone de Hennaya [34°54'11"N; 1°12'47"O] à environ 10 km de Tlemcen.

- ***Citrus sinensis***

Le matériel végétal a été récolté pendant le mois de décembre à mars dans 09 stations différentes : Beni ghenam [34°38'35"N; 1°33'41"O] (S1), Beni saf [35.305509, -1.355522] (S2), Remchi [35.058712, -1.425444] (S3), Sekkak [35°01'45''N, 1°19'06''W] (S4), Maghnia [34° 51' 12.419" N 1° 44' 5.878" W] (S5), Hennaya [34°54'11"N; 1°12'47"O] (S6), Ain hout [34°55'59" N, 1°19'32" W] (S7), Ouled mimoun [34°54'16.99"N, 1°2'2.18"W] (S8), Sebdou [34°87'78''N; 1°.23'36''O] (S9).

- ***Citrus aurantium***

Le matériel végétal a été récolté pendant le mois de Mars dans 04 stations différentes : Ouzidane [34.945348, -1.284564] (S1), Ain hout [34°55'59" N, 1°19'32" W] (S2), Boujlida [34.918715, -1.346147] (S3), Kalaa Tlemcen [34.876765, -1.311874] (S4).

IV.2. Extraction des huiles essentielles

Pour chaque prélèvement végétal, (500 g) ont été hydrodistillées pendant 5h à l'aide d'un appareil de type Clevenger dans le respect du procédé validé par la pharmacopée européenne.





Figure 22. Montage d'hydrodistillation type Clevenger.

Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré (figure 22) à une température de 4°C.

IV.3. Rendement

Le rendement en huile essentielle est défini par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé. Il est exprimé en pourcentage (%), et calculé selon la formule suivante :

$$Rdt\ (\%) = [(P1 - P2)/P3] \times 100$$ (AFNOR 1986).

P1: poids du ballon après évaporation;

P2: poids du ballon avant évaporation (vide);

P3: poids de la matière végétale de départ.

IV.4. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont analysées par CPG.

Conditions CPG (LASNABIO) :

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatogramme de marque 6500 Autosystem GC équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composants, d'un injecteur diviseur, et d'une colonne capillaire en silice fondu apolaire de type TRB-5 (…) qui dispose les caractéristiques suivantes (longueur : 30 m, diamètre interne : 0.32mm, épaisseur du film : 0.1µm).



Figure 23. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Les gaz vecteurs sont : l'hydrogène, l'azote et l'air, le débit est de 1 ml/mn avec une pression de colonne de 7psi. La température de l'injecteur est de 300° C et celle du détecteur de 280° C. La température du four est programmée de 60°C à 280°C à raison d'une montée de 10.0 C/min et ensuite maintenue à 250°C pendant 64 mn. Les échantillons ont été injectés via le mode split (1/20), le volume d'injection est de 0.2µl.

IV.5. Identification des composés

L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison des temps de rétention apolaire avec ceux de composés standards (composés purs).

IV.6. Chromatographie sur colonne de silice de l'huile essentielle de *Citrus clementina*

Dans le but de concentrer la composante principale (limonène) de l'huile essentielle de *Citrus clementina* nous avons soumis cette huile à une chromatographie sur colonne. La fraction hydrocarbonée a été obtenue en utilisant le pentane. Des plaques CCM (Chromatographie sur couche mince) ont été utilisées pour vérifier les taches sous UV-visible. Cette opération est répétée jusqu'à épuisement de la fraction hydrocarbonée.

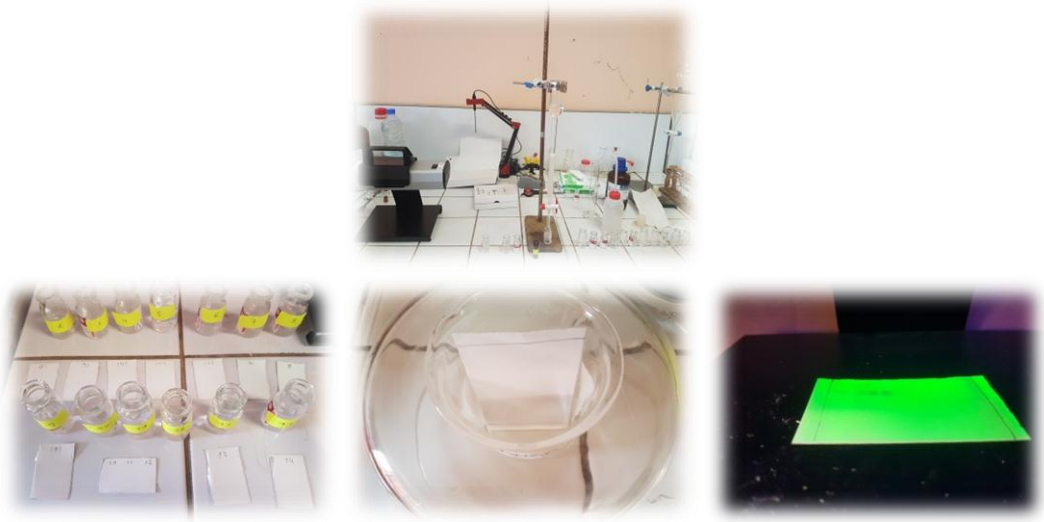


Figure 24 : Différentes étapes de la chromatographie sur colonne.

IV.7. Activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite a été évaluée par deux méthodes : la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH° et la réduction de fer FRAP

IV.7.1. Méthode DPPH

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est réalisé en utilisant la méthode décrite par (Ammar et al., 2009) [87]. Le DPPH est un radical libre stable violet en solution lorsqu'il est piégé par les antioxydants et change de couleur rapidement en virant au jaune lorsqu'il se réduit en diphenyl picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire (un donneur de proton H+). Cependant l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu « comme le cas des huiles essentielles » à inhiber le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) par la donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons. [88]

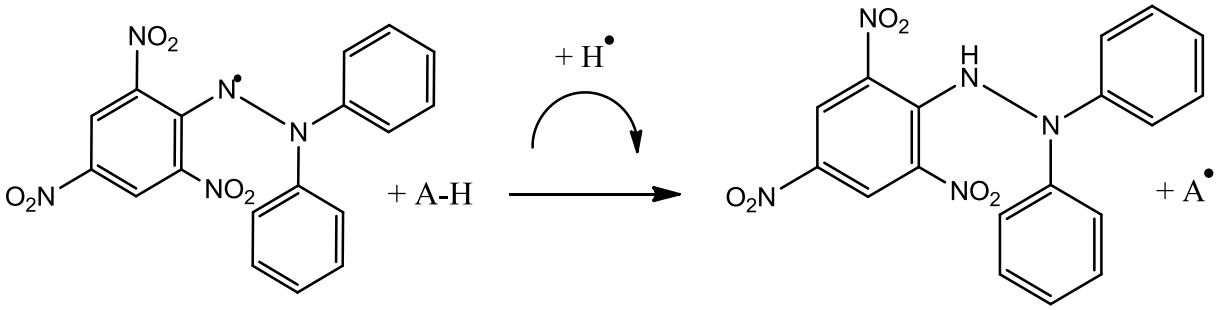


Figure 25 : Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH.

IV.7.1.1. Mode opératoire :

La solution de DPPH est préparée par la solubilisation de 3 mg de DPPH° dans 100 ml d'éthanol. 1ml de chaque dilution des huiles essentielles à tester à différentes concentrations sont ajoutés à 1ml de la solution de DPPH° dans des tubes à essai, le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante. Après 30 min, on remarque une décoloration des mélanges par rapport au contrôle négatif contenant uniquement 1ml de la solution de DPPH° avec 1ml d'éthanol. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur (control négatif).

Nous procédons de la même manière en remplaçant les extraits par les antioxydants de références, acide ascorbique et BHT.



Figure 26 : Spectrophotomètre.

IV.7.2. Synergie entre les huiles essentielles

IV.7.2.1. Mode opératoire :

Nous avons utilisé un mélange entre l'huile essentielle de *Citrus clementina* et *Citrus limon, p*roportion 1-1, à la même concentration 250mg/ml ; de même pour l'huile essentielle de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* à une concentration de 130 mg/ml.



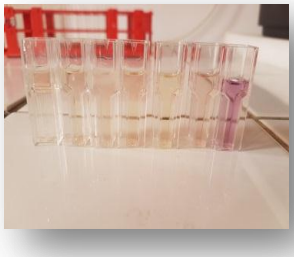


Figure 27: Changement de couleur de nos échantillons, témoin et synergie.

L'inhibition des radicaux libres (DPPH°) en pourcentages (I %) a été calculée par la formule ci-dessous :

I%= ((Abs517 contrôle négatif – Abs517 échantillon)/ Abs517contrôle négatif)*100

D'où: Abs_{517} : Absorbance lue à 517 nm

Abs517 contrôle négatif : Absorbance du contrôle en absence de l'huile essentielle.

Abs517 échantillon : Absorbance de l'échantillon effectué en présence de l'huile essentielle.

NB: Le contrôle négatif contient l'éthanol à la place d'huile essentielle. Le control positif ne contient que la solution du DPPH.

IV.7.3. Réduction du pouvoir antioxydant ferrique (FRAP)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de ce dernier est déterminée en utilisant la technique [89] qui basée sur la capacité que possède un antioxydant à réduire les ions ferriques Fe^{3+} contenant une couleur jaune présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ aux ions ferreux Fe^{2+} de couleur bleu et par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm.

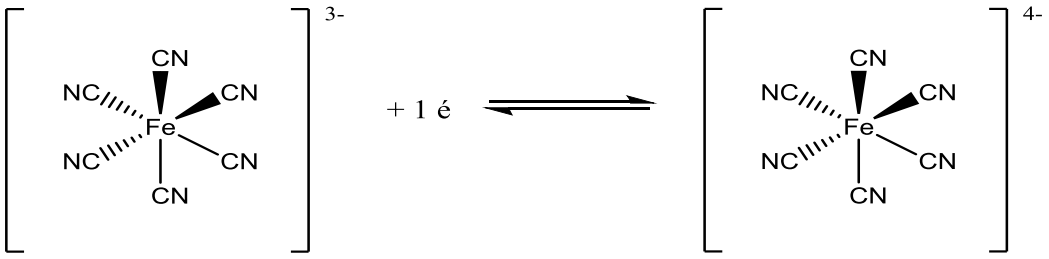


Figure 28 : Réaction de réduction du complexe ferricyanure de potassium par un antioxydant.

IV.7.3.1 Mode opératoire :

Les différentes concentrations des extraits dans l'éthanol (1 ml) sont mélangées avec 0,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 0,5 ml de ferricyanure de potassium [K_3 Fe(CN)$_6$] (1%). L'ensemble est incubé à 50°C pendant 20 min.

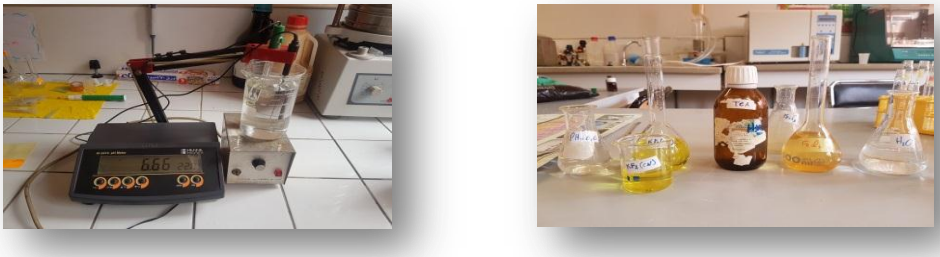


Figure 29 : pH-mètre et solutions utilisées.

Ensuite 0,5 ml d'acide trichloracétique à une solution de 10% est ajoutée pour stopper la réaction et pour finir, 1 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec : 1ml d'eau distillée et 0.2 ml d'une solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$, 6H20) préparé à 0.1%.

L'absorbance est ainsi mesurée à 700 nm par un spectrophotomètre. L'augmentation de l'absorbance indique une augmentation de capacité réductrice.



Figure 30: Lecture par un spectrophotomètre et changement de couleur de nos échantillons et témoins.

CONCLUSION

La position géographique de l'Algérie lui confère une concentration de la biodiversité d'une valeur inestimable. Le bassin méditerranéen a un climat chaud dans lequel se trouve concentrée la biodiversité. L'objectif principal de ce travail était la caractérisation chimique et biologique de quatre variétés de *Citrus* à savoir *C. limon, C. sinensis, C. aurantium* et *C. clementina,* poussant dans différentes régions de Tlemcen afin de montrer une éventuelle valeur ajoutée qui peut réorienter ces espèces vers une voie de valorisation. L'aspect de valorisation est structuré autour des résultats de l'évaluation de la composition chimique et de l'activité antioxydante de nos huiles essentielles en vue d'une possibilité d'application dans des champs relatifs aux domaines de cosmétique ou d'agroalimentaire. Par ailleurs, nous avons développé l'approche de variabilité chimique sur plusieurs échantillons d'huile essentielle.

Les résultats de cette étude ont montré que les rendements des huiles essentielles des quatre *Citrus* se sont révélés très appréciables et que la majorité des échantillons récoltés dans des régions chaudes sont caractérisés par des rendements plus importants que ceux récoltés dans les régions humides et froides. La composante majoritaire de tous les échantillons des huiles essentielles étudiées a montré que la composante majoritaire des quatre *Citrus* est le limonène, qui varie en fonction des sites des récoltes, ainsi, nous avons montré que le rendement et la qualité des huiles essentielles sont dus à l'impact de la zone géographique.

L'activité antioxydante des huiles essentielles de quatre *Citrus* a été évaluée par deux méthodes: la méthode de réduction de radical libre DPPH et la méthode de réduction des ions ferreux FRAP. Pour la première méthode tous les échantillons étudiés de nos huiles essentielles ont montré une activité antioxydante en piégeant favorablement le radical DPPH. Au même titre, le pouvoir réducteur de nos essences a été remarquable par rapport à la première méthode mais qui restent inférieurs à ceux des deux témoins BHT et acide ascorbique. Dans le but d'avoir une meilleure activité de ces huiles essentielles, l'effet synergique produit par la combinaison d'huiles essentielles de *Citrus clementina* et *Citrus limon* ainsi qu'aux huiles essentielles *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* a été étudié. Un effet synergique important a été observé après le mélange des huiles essentielles.

L'huile essentielle de *C. sinensis* associé à l'huile de *C. aurantium* présente une activité antioxydante plus importante que les deux huiles essentielles individuelles. Ce qui en résulte probablement au pourcentage appréciable en myrcène. D'autre part, nous avons montré que l'association myrcène/limonène/Géranial pour *Citrus limon* ou myrcène/limonène/linalol pour *Citrus sinensis* augmente considérablement le pouvoir antioxydant des huiles essentielles ; alors que l'activité antioxydante diminue par l'association de l'α-pinène/myrcène/limonène dans le cas de *Citrus clementina*.

Références bibliographiques

1. Le Marchand, L., *Cancer preventive effects of flavonoids—a review.* Biomedicine & pharmacotherapy, 2002. **56**(6): p. 296-301.
2. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease.* Annual review of nutrition, 1996. **16**(1): p. 33-50.
3. RAO A.V. et RAO L.G., *Carotenoids and human health. Pharmacol. Res.* 2007. **55**: p. 207 – 216.
4. M. Krausz, *Huile essentielle: un marché mondial en croissance.* 2015(France).
5. Hosni, K., et al., *Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence.* Food Chemistry, 2010. **123**(4): p. 1098-1104.
6. Dupuy, A., *Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire: Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huile essentielle d'agrumes*. 2010, AgroParisTech.
7. Bousbia, N., *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires*. 2011, Université d'Avignon; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie).
8. *Mesures de développement des agrumes. Agriculture et développement rural durable.* 2007.
9. FAO, *La Situation Mondiale De L'alimentation Et De L'agriculture.* 2012.
10. Amiri, H., *Volatile constituents and antioxidant activity of flowers, stems and leaves of Nasturtium officinale R. Br.* Natural product research, 2012. **26**(2): p. 109-115.
11. Matthews, R. and R. Braddock, *Recovery and applications of essential oils from oranges.* Food technology (USA), 1987.
12. Lagha-Benamrouche, S., et al., *Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles.* Nature & Technology, 2018(18): p. 28-35.
13. Bustamante, J., et al., *Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste.* Journal of Cleaner Production, 2016. **137**: p. 598-605.
14. Ladanyia, M. and M. Ladaniya, *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*. 2010: Academic press.
15. Seif, A. and R. Hillocks, *Phaeoramularia fruit and leaf spot of citrus with special reference to Kenya.* International Journal of Pest Management, 1993. **39**(1): p. 44-50.
16. Kuaté, J., E. Fouré, and J.-Y. Rey, *Symptômes de la cercosporiose des agrumes due à# Phaeoramularia angolensis.* Fruits, 1994. **49**(1): p. 31-36.
17. ATTOU, A., *Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent.* 2011.
18. C, B., *Thède de doctorat, Génie chimique.* (Alger).
19. Bosson L., D.G., *"L'aromathérapie Energétique: Guérir avec l'Ame des Plantes".* 2004(Bruxelle).
20. Bruneton, J., *"Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales" Editions Tec & Doc,.* (, Editions Médicales Internationales): p. 1120.
21. Mailhebiau, P., *"La nouvelle Aromathérapie: Biochimie Aromatique et Influence Psychosensorielle des Odeurs" Lausanne, .* 1994. **635**.
22. *International Programme on Chemical Safety, Limonene. Concise International Chemical Assessment.* 1998(Genève : World Health Organization).
23. Australia, W., *NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME.* Transport (transport personnel are not expected to be exposed to the notified chemical as it is contained within a sealed container), 1991. **10**(2): p. 100.
24. Bégin, D.e.G., M., , *La substitution des solvants par le d-limonène. Bilans de connaissances* B-057., 1999(Montréal).
25. Karlberg, A. and B. Lindell, *Nordic Expert Group for Documentation of Occupational Exposure Limits 107. Limonene.* Arbete och Haelsa (Sweden), 1993.
26. Hard, G.C. and J. Whysner, *Risk assessment of d-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens.* Critical Reviews in Toxicology, 1994. **24**(3): p. 231-254.

27. Organization, W.H. and I.A.f.R.o. Cancer, *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.* IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1993. **56**.
28. *Orange Douce (citrus sinensis),.* 2016(Lucbor huile essentielle): p. 1.
29. A. Podşedek, M.S., et D. Kalemba, *« determination of antioxidant activity of essential oils ».* 2009. **13**: p. 2–5.
30. Lang, G. and G. Buchbauer, *A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review.* Flavour and Fragrance Journal, 2012. **27**(1): p. 13-39.
31. Jiang, Y., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary.* Environmental toxicology and pharmacology, 2011. **32**(1): p. 63-68.
32. Breitmaier, E., *Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis.* Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, 2006: p. 1-9.
33. Buchbauer, G., *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications.* 2010(, Second Edition. K. Husnu Can Baser).
34. Hüsnü, C.B. and G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications.* Handbook of essential oils: science, technology, and applications., 2015(Ed. 2).
35. *Les huiles essentielles, Marchés tropicaux.* **N° 2690**: p. 1205-1210.
36. Ragonese, C., et al., *Evaluation of a medium-polarity ionic liquid stationary phase in the analysis of flavor and fragrance compounds.* Analytical chemistry, 2011. **83**(20): p. 7947-7954.
37. SAMATE, A.D., *compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soljdanienne du burkina faso: valorisation.*
38. *Expert naturel en soin et beauté. Carnet Aroma Zone.* 2017: p. 6,10,11.
39. Kula, J., et al., *Chemical composition of carrot umbel oils from Daucus carota L. ssp. sativus cultivated in Poland.* Flavour and fragrance journal, 2006. **21**(4): p. 667-669.
40. Festy, D., *ma bible des huiles essentielles.* 2017(LEDUC.S): p. 21.
41. Rossi, P.-G., et al., *(E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of Daucus carota L. essential oil against Campylobacter jejuni.* Journal of agricultural and food chemistry, 2007. **55**(18): p. 7332-7336.
42. Staniszewska, M. and J. Kula, *Composition of the essential oil from wild carrot umbels (Daucus carota L. ssp. carota) growing in Poland.* Journal of Essential Oil Research, 2001. **13**(6): p. 439-441.
43. *E. Breitmaier, Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis, In John Wiley & Sons. Wiley, VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.* 2006.
44. Dib, M.E.A., et al., *Characterization of volatile compounds of Daucus crinitusDesf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation.* Chemistry Central Journal, 2010. **4**(1): p. 16.
45. Lanfranchi, D.-A., et al., *Bioactive phenylpropanoids from Daucus crinitus Desf. from Algeria.* Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(4): p. 2174-2179.
46. Marzouki, H., et al., *Essential oils of Daucus carota subsp. carota of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction.* Natural product communications, 2010. **5**(12): p. 1955-1958.
47. Sommerard, J., *Eaux florales, un nouvel art de vivre, L'Archipal. Paris, .* 2012.
48. Brattoli, M., et al., *Gas chromatography analysis with olfactometric detection (GC-O) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds.* Sensors, 2013. **13**(12): p. 16759-16800.
49. Zarkovic, N., *4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes.* Molecular aspects of medicine, 2003. **24**(4-5): p. 281-291.
50. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The antioxidants of human extracellular fluids.* Archives of biochemistry and biophysics, 1990. **280**(1): p. 1-8.

51. Millet, F., *Huiles essentielles et essence de citronnier (Citrus limon (L.) Burm. f.).* Phytothérapie, 2014. **12**(2): p. 89-97.
52. Débuigine G. et Couplan F., *Petit Larousse des plantes qui guérissent. .* 2008(Larousse, Paris.): p. 895.
53. Les arbres fruitiers. 2006(Rustica, Paris.): p. 91.
54. Kasraoui, M.F., *Le citronnier.* 2006.
55. Faucon, M., *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription.* 2015(Édition sang de la terre, Paris,): p. 39-455.
56. Bousbia, N., *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires*. 2011, Université d'Avignon; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie). p. 128.
57. Festy, D., *ma bible des huiles essentielles. .* 2017(LEDUC.S): p. 83.
58. *Aromaestro,guide des huiles essentielles.* p. 18.
59. *Arbres fruitiers des zones méditerranéennes et subtropicales. .* 2010: p. 88-89.
60. *Aroma Zone. Expert naturel en soin et beauté, guide des huiles essentielles «huile essentielle de clémentine ». .*
61. Bousbia, N., *Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique.* 2011: p. 35.
62. *Arbres fruitiers des zones méditerranéennes et subtropicales.* 2010: p. 160.
63. El-Akhal, F., et al., *Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de Citrus sinensis et Citrus aurantium cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of Citrus sinensis and Citrus aurantium cultivated in center of Morocco).* 2014.
64. Guillaume, F., *Fondation d'entreprise pour la protection et la valorisation du patrimoine végétal.* 2011(« Découvre le chemin des plantes » Guide des agrumes): p. 11.
65. Michel Krausz, *"Huiles essentielles : un marché mondial en croissance."France.* 2015.
66. Wilson, M., *Huiles essentielles pour la cuisine et le bien-être.* 2010: p. 173.
67. *Aromaestro, guide des huiles essentielles* p. 29.
68. Festy, D., *ma bible des huiles essentielles.* 2017(LEDUC.S): p. 122.
69. *Fiche technique, Huile essentielle d'Orange douce (zeste).*
70. Meziani, L. and S. Saidoune, *Activités antioxydantes et antimicrobiennes des différentes parties de la bigarade.* 2017.
71. Festy, D., *huiles essentielles* p. 86-87.
72. Guillaume, F., *Fondation d'entreprise pour la protection et la valorisation du patrimoine végétal.* 2011(Découvre le chemin des plantes. Guide des agrumes): p. 12.
73. Mélinda Wilson, *Huiles essentielles pour la cuisine et le bien-être.* 2010: p. 147,148.
74. Festy, D., *ma bible des huiles essentielles.* 2017(LEDUC.S): p. 121.
75. Olle, M., I. Bender, and R. Koppe, *The content of oils in umbelliferous crops and its formation.* Agronomy Research, 2010. **8**(3): p. 687-696.
76. Dongmo, P.M.J., et al., *Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de Phaeoramularia angolensis.* Fruits, 2002. **57**(2): p. 95-104.
77. Teixeira, B., et al., *Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils.* Industrial Crops and Products, 2013. **43**: p. 587-595.
78. Ruberto, G., et al., *Essential oil of the new citrus hybrid, Citrus clementina x C. limon.* Journal of Essential Oil Research, 1994. **6**(1): p. 1-8.
79. Mondello, L., et al., *Comparison of fast and conventional GC analysis for citrus essential oils.* Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(19): p. 5602-5606.
80. Bourgou, S., et al., *Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation.* The Scientific World Journal, 2012. **2012**.

81. Viuda-Martos, M., et al., *Chemical composition of mandarin (C. reticulata L.), grapefruit (C. paradisi L.), lemon (C. limon L.) and orange (C. sinensis L.) essential oils.* Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2009. **12**(2): p. 236-243.
82. Sayah, M., et al., *Valorisation des déchets industriels d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles Valuation of industrial citrus waste by essential oils extraction.*
83. Ruberto, G., et al., *Essential oil of two new pigmented citrus hybrids, Citrus clementina× Citrus sinensis.* Journal of agricultural and food chemistry, 1997. **45**(2): p. 467-471.
84. Shahidi, F. and Y. Zhong, *Citrus oils and essences.* Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2012.
85. Caccioni, D.R., et al., *Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and Penicillium italicum.* International Journal of Food Microbiology, 1998. **43**(1-2): p. 73-79.
86. Dugo, G. and L. Mondello, *Citrus oils: composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity*. 2010: CRC press.
87. Tepe, B., et al., *Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey.* Food Chemistry, 2006. **95**(2): p. 200-204.
88. Sanchez-Moreno, C., *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.* Food science and technology international, 2002. **8**(3): p. 121-137.
89. Oyaizu, M., *Studies on products of browning reaction.* The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 1986. **44**(6): p. 307-315.