

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

### EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Analyses biologiques et biochimiques

Présenté par :

*MEZIANI Ahlem*

### *Thème*

**Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle  
des feuilles de l'oranger amère (*Citrus aurantium*) seule et  
combinée avec la vitamine E**

Soutenu le : 29 / 06/ 2017

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Etablissement</i>	
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. ADRAR Nabil</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M. CHERGUI Achour</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinateur</i>

Année Universitaire : 2016/2017

## *Remerciement*

*Je voudrai remercier du fond de mon cœur monsieur ADRAR Nabil pour l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail en acceptant de m'encadrer, pour sa gentillesse et sa disponibilité, ses orientations et ses remarques, son aide précieux, sa rigueur scientifique, pour les précieuses informations qu'il m'a prodiguées, mais aussi et surtout pour ces qualité humaines, Qu'il trouve ici mes profonde gratitude.*

*Je profite cette occasion pour remercier le chef de département MR DAHMOUNE Farid pour son aide, sa gentillesse.*

*Je voudrais remercier aussi mon coussin Mr MEZIANI Karim ingénieur d'état en informatique pour sa disponibilité sa gentillesse et surtout pour son aide.*

*Je tiens à remercier également du fond de mon cœur Monsieur AARAB Ammar pour sa gentillesse, sa disponibilité, pour son aide, son encouragement durant Les temps difficiles et surtout pour ses précieux conseille qui valent de l'or.*

*Je voudrais remercier Monsieur KADRI, Monsieur CHERGUI, Madame MADBOUAA, Madame BENSMAIL et tous les enseignants de la faculté de SNV pour les informations qu'ils nous ont donné même si pour et les efforts qu'ils ont faits pour nous.*

*Je tien à remercier Mr BARRA et Mr REMINI de nous avoir appris l'utilisation un logiciel très important qui facilite la rédaction des références (endnote).*

*Je tien a remercier aussi notre enseignant jusqu'a à l' infini Mr BOURNINE Lamine pour sa gentillesse, son aide et surtout pour son encouragement durant Les moments difficiles.*

*Je remercie également mes chers parents, vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute...Tous les mots ne suffiraient pas...Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour.*

*Comme je profite cet espace a fin d'exprimer mon remerciements a mes amis (es) et tous ceux qui ont participe a l'élaboration de ce travail.*

## *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail

À la prunelle et la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère

A l'amour de ma vie mon père

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller  
A la plus belle et la meilleure personne connue de l'humanité ma grande mère baya

Aux battements de mon cœur mes frères : Zako, Foufou, Aymoun, Karoum,

A mes tendre et chères belles sœurs : Hizo, Amma et Fifi

A mes belles fleur mes nièces Racha, Hibat Arrahmane, Malak

A mon beau oiseau, mon neveu, zinou

Au mari de ma sœur Kamal

A l'épouse de mon frère Houria

A mes chères cousins Imado ,Karkour, Moha, Hssino

A mes jolies cousines Imo, Hanane, Faiza

A mes intimes et fideles amies Norhane, Sousou, Manel, Lamia, Razika, Rbiha

A mes oncles, mes tante et à tous les individus de ma famille en particulier ma tante Nacira  
et Naima

A moi-même

MEZIANI Ahlem

## Liste des abréviations

% : pourcentage.

AFNOR : Association française de normalisation reconnue.

BHA : hydroxyanisole butylé (antioxydant synthétique).

BHT : hydroxytoluène butylé (antioxydant synthétique ).

°C : degré Celsius.

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

cm : centimètre.

CO<sub>2</sub> : dioxyde de Carbone.

DPPH : 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazyl.

EAM : Extraction assistée par micro-ondes.

EAU : Extraction assistée par ultrason.

Etc : etcetera.

Ex : exemple.

Fe<sup>2+</sup> : fer ferreux.

Fe<sup>3+</sup> : fer ferrique.

FIC : Concentration inhibitrice fractionnaire.

FRA : Ferric reducing-antioxidant power.

GHZ : [Gigahertz](#).

GPX : glutathion peroxydase.

HE : huile essentielle.

IC<sub>50</sub> : concentration d'inhibition de 50% de radicaux libres.



$K_3Fe(CN)_6$  : solution de ferricyanure de potassium.

m : mètre.

mg : milligramme.

MHZ : mégahertz.

mg/ml : milligramme sur millilitre.

min : minute.

ml : millilitre.

ml/ min : millilitre par minute.

m/s : mètre par seconde.

NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé.

nm : nanomètre.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NBT : Tétrazolium nitro-bleu.

pH : potentiel hydrogène.

RDL : radicale libre.

RLO : radicaux libres oxygénés.

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais réactive oxygen species).

rpm : Révolutions par minute.

Sec : seconde.

SOD : superoxyde dismutase.

μl : microlitre

UV-VIS spectrophotomètre : Spectroscopie ultraviolet-visible.

## Liste des figures

Numéro	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Exemple des composés mono terpéniques rencontrés dans une HE	04
<b>Figure2</b>	Exemple des composés sesquiterpènes rencontrés dans une HE	05
<b>Figure3</b>	La vanilline	05
<b>Figure4</b>	Schéma d'un dispositif de l'hydrodistillation	09
<b>Figure 5</b>	Montage de la distillation à la vapeur saturée	10
<b>Figure 6</b>	Montage de la distillation à la vapeur directe	10
<b>Figure 7</b>	Génération des bulles de cavitation par ultrason	11
<b>Figure 8</b>	<i>Plante botanique de Citrus aurantium</i>	13
<b>Figure 9</b>	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	19
<b>Figure 10</b>	Montage utilisé pour l'hydrodistillation	22
<b>Figure 11</b>	Illustration d'un isobogramme typique	24
<b>Figure 12</b>	L'huile essentielle des feuilles séchées de <i>Citrus aurantium</i>	26
<b>Figure 13</b>	L'huile essentielle des feuilles fraîches de <i>Citrus aurantium</i>	26
<b>Figure 14</b>	IC50 des différents échantillons	28
<b>Figure 15</b>	Graphique représentant les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations	30
<b>Figure 16</b>	Isobogramme de l'HE du l'orange amère combinée avec la vitamine E	31

### Liste des tableaux

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	Classification botanique de <i>citrus aurantium</i>	14
<b>Tableau II</b>	Caractères organoleptiques des huiles essentielles des feuilles fraîches et séchées.	26
<b>Tableau III</b>	rendement en huiles essentielles des feuilles fraîches et séchées du <i>Citrus aurantium</i>	27
<b>Tableau IV</b>	FIC50 et FIC50 Index de la combinaison de la vitamine E et l'huile essentielle de l'orange amère	31

## **Table des matières**

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction. .... 1

### **Partie I : Recherche bibliographique**

#### **Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles**

I-1 Définition.....3

I-2 Répartition et Localisation.....3

I-3 Composition chimique des huiles essentielles.....4

I-3-1 Groupe des terpénoïdes.....4

I-3-2 Groupe des composants aromatiques.....5

I-3-3 Composés d'origine diverse.....6

I-4 Fonctions biologiques et écologique des huiles essentielles.....6

I-5 Principaux domaines d'application des huiles essentielles.....6

I-6 Activité biologique des huiles essentielles.....6

I-6-1 Propriété antibactérienne.....6

I-6-2 Propriété antifongique.....7

I-6-3 Propriété antihelminthique.....7

I-6-4 Propriété antioxydante.....7

I-6-5 Propriété pesticide.....7

I-7 Méthodes d'extractions.....8

I-7-1 L'enfleurage.....8

I-7-1-1 L'enfleurage à froid.....8

I-7-1-2 L'enfleurage à chaud.....	8
I-7-2 Expression à froid.....	8
I-7-3 Distillations.....	8
I-7-3-1 Hydro distillation.....	8
I-7-3-2 Distillation à la vapeur saturée.....	9
I-7-3-3 Distillation à la vapeur directe .....	10
I-7-4 Extraction par solvants.....	11
I-7-5 Extraction assistée par ultrasons.....	11
I-7-6 Extraction assistée par micro-ondes.....	12
<b>Chapitre II : Monographie de la plante testé.....</b>	<b>13</b>
II-1 <i>L'oranger amère</i> .....	13
II-1-1 Répartition géographique.....	13
II-1-2 Description botanique.....	13
II-1-3 Classification botanique.....	14
II-1-4 Compositions chimiques de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> ....	14
II-1-5 Activités biologique de l'HE de <i>Citrus aurantium</i> .....	14
<b>Chapitre III : Le stress oxydatif... ..</b>	<b>15</b>
III-1 Définition des radicaux libres.....	15
III-2 Sources des radicaux libres.....	15
III-3 Stress oxydatif et ses conséquences.....	15
III- 4 Les moyennes de défense contre les radicaux libres.....	17
III-4-1 Défense enzymatique.....	17
III-4-2 Défense non enzymatique.....	18

III-5 Quelques Méthodes d'évaluations de l'activité antioxydante.....	18
III-5-1 La méthode l'inhibition du 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH).....	18
III-5-2 La méthode de la capacité de réduction antioxydante du fer (FRA).....	19
III-5-3 Piégeage du radical superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	19
III-5-4 4 Piégeage du radical hydroxyle.....	20
III-5-5 Test de blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	20

## **Partie II : Etude expérimentale**

I : Matériels et méthodes .....	21
I-Matériels.....	21
I-1- Matériels biologique.....	21
I-1-1-Matériels végétale.....	21
II- Méthodes.....	21
II-1 Extraction de l'huile essentielle de la plante à étudiée (citrus aurantium).....	21
II-1-1 Récolte et séchage.....	21
II-1-2 Extraction.....	21
II-1-3 Calcule du rendement.....	22
II-2 L'activité antioxydant.....	23
II-2-1 Protocole.....	23
II-2-3 Détermination du pourcentage d'inhibition du DPPH.....	23
II-3 Évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de citrus aurantium et la vitamine E en association.....	24
II-3-1 Principe de l'isobologramme.....	24

II-3-2 Le protocole.....	25
<b>II : Résultats et discussions.....</b>	<b>26</b>
I-Caractères organoleptique.....	26
II-Rendement en huiles essentielles.....	27
III-Activité antioxydant.....	28
III-1 Détermination des IC50.....	28
III-2 pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et la vitamine E.....	29
III-3 Activité antioxydant de la combinaison de la vitamine E et l'huile essentielle.....	30
<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>

## **Références bibliographiques**

### **Annexe**

### **Résumé**

### **Glossaire**

# Introduction



## Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (HE) (*Bouzouita et al., 2008*).

Beaucoup des végétaux renferment des HE, mais seulement en toute petite quantité, ne permettant pas l'extraction ou en rendant le prix excessivement cher. Seules les plantes dites « aromatiques » produisent des quantités suffisantes d'HE (*Velé, 2015*).

La définition du terme « aromatique » indique que ces plantes contiennent des substances odoriférantes, possèdent toutes un feuillage odorant ou des fleurs au parfum intense (*Boudassou, 2014*).

les huiles essentielles s'agit des mélanges de composés lipophiles, volatiles et souvent liquides synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés, les HE sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante, ils sont produits dans le cytoplasme des cellules sécrétrices (*Teuscher et al., 2005*). Souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (*Bruneton, 2009*). Obtenue à partir de matière végétale botaniquement définie soit par entraînement à la vapeur (le plus fréquent) soit par procédés mécaniques sans chauffage des agrumes (uniquement pour le genre citrus) (*Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2013*).

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées, concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie agroalimentaire. En effet, la peroxydation des lipides produits au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) conduit à des modifications de goût, d'odeur, et de couleur et par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides se sont avérés responsables d'effets indésirables. En effet l'hydroxyanisole butylé (BHA), et l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont suspectés avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur. Ainsi, les huiles essentielles commencent à

avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielles de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation (*Bouhdid et al., 2006*).

Ce mémoire présente deux parties, La première partie est consacré à la recherche bibliographique est comporte trois chapitres. Le premier chapitre s'intéresse aux huiles essentielles d'une manière générale. Le second est une monographie du l'orange amère (*citrus aurantium*). Le dernier Chapitre est consacré au stress oxydatif.

La deuxième partie est consacrée au travail du laboratoire comportant deux chapitres le premier rassemble les matériels utilisés, la démarche expérimentale et la méthode employée pour l'appréciation de l'activité antioxydante de l'HE de l'orange amère. Le second chapitre relève les résultats obtenus, ainsi que leur discussion.

# **Partie I : Recherche bibliographique**

# **Chapitre I : Généralité sur les huiles essentielles**

## **I-1 Définitions**

La norme AFNOR définit une huile essentielle comme étant l'extrait obtenu à partir d'une matière végétale, par entraînement à la vapeur d'eau, par distillation sèche ou par expression des épicarpes de *Citrus* (Samet, 2002).

Cette définition par procédé d'obtention est restrictive, elle exclut les produits obtenus par tout autre procédé d'extraction (solvants organiques, corps gras, Etc.) (Samet, 2002).

Les huiles essentielles sont les substances actives des plantes, très volatiles, et qui nous percevons par l'odorat. Le parfum de la plus part des huiles essentielles est classé comme agréables, mais certaines fragrances le sont moins (Germann and Germann, 2014).

Ce sont des substances odorantes, huileuses, généralement incolores ou jaunâtres, inflammables, Elles sont aussi ordinairement liquides à la température ambiante (Diridi, 2005).

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible de l'ordre de 1% (Taleb-Toudert, 2015).

## **I-2 Répartition et localisation**

### **I-2-1 Répartition**

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, ex : Apiaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Poaceae, Rutaceae, etc (Bruneton, 2009).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamote, tubéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et, bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal) des racines (Vétiver) des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits et des graines (muscade) (Bruneton, 2009).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (Bruneton, 2009).

## I-2-2 Localisation

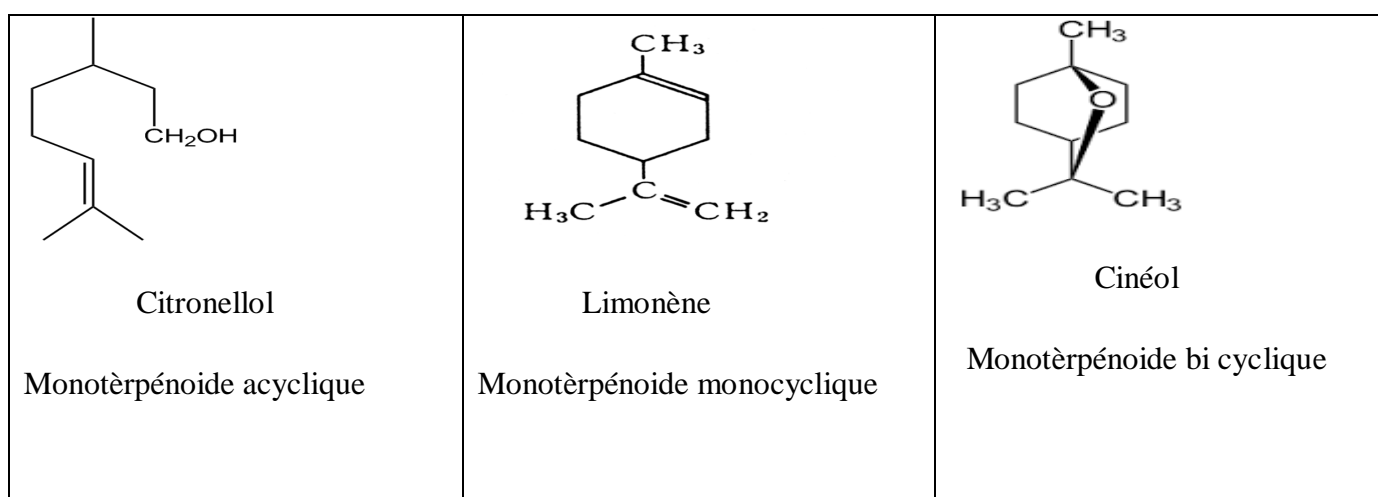
La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associés à la présence de structures histologiques spécialisée, souvent localisées sur ou à proximité de la Surface de la plante : cellules à huile essentielles des Lauracea, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteracea (Bruneton, 2009).

## I-3 Composition chimique des huiles essentielles

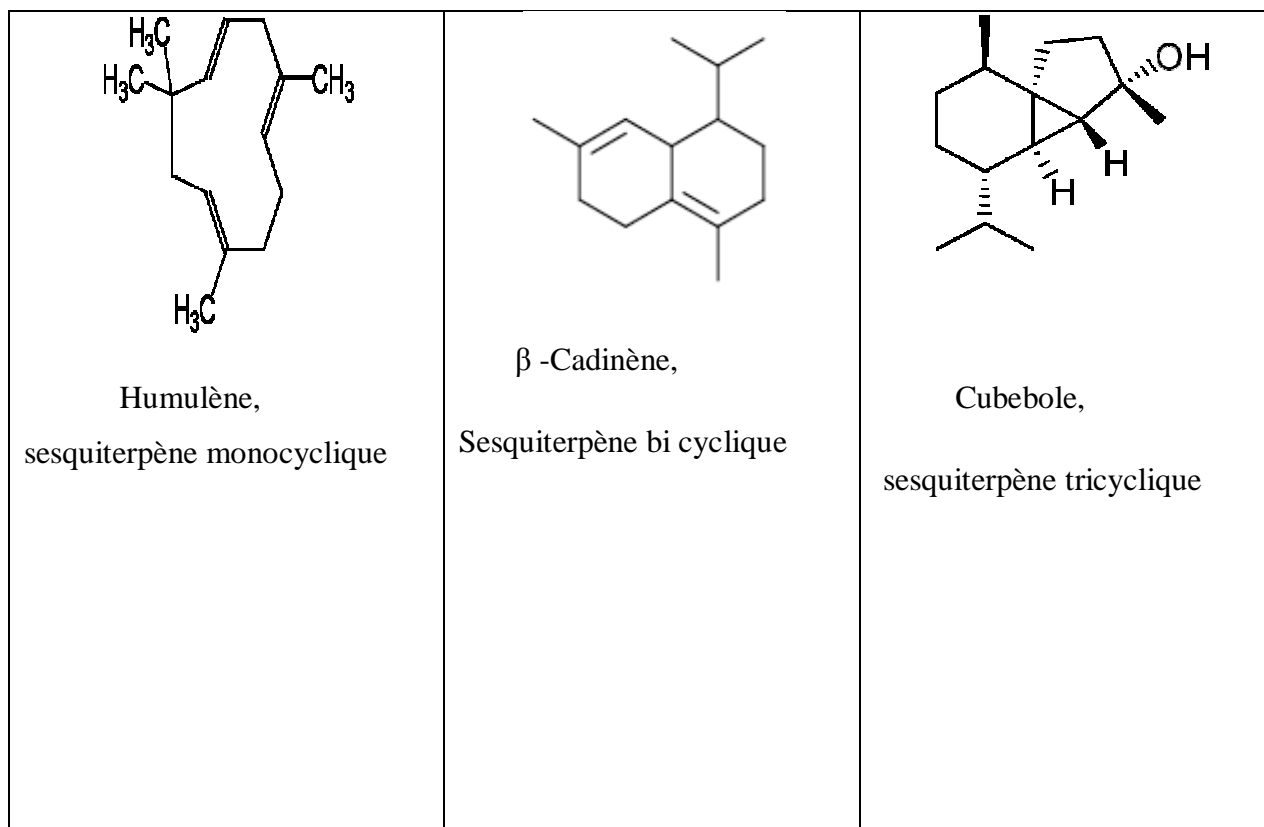
Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : groupe des terpénoïdes d'une part et celui des composés aromatiques dérivés de phénylpropane d'autre part , beaucoup moins fréquents (Bruneton, 2009).

### I-3-1 Groupe des terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatiles, c'est à dire ceux dans la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono- et sesquiterpènes (Bruneton, 2009), Ce sont des hydrocarbures ayant respectivement dix et quinze atomes de carbone Ils peuvent être , acycliques, monocycliques, bi cycliques ou polycycliques ( figure 1 et 2 ) (Samet, 2002). À partir de ces molécules hydrocarbonées, le végétal aromatique élabore, des composés aromatiques aux fonctions biochimiques variées: alcools, phénols, aldéhydes, cétones, oxydes et esters (Mailhebiau, 2017).



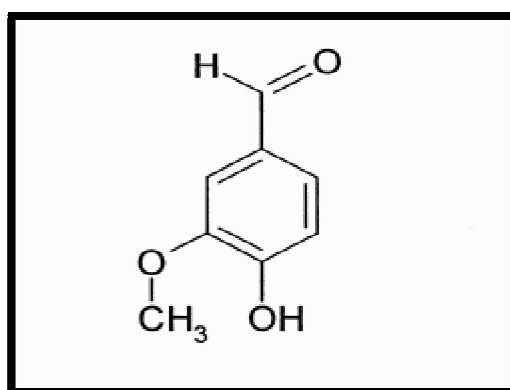
**Figure 1** : Exemple des composés mono terpéniques rencontrés dans une HE (Nait Achour, 2012).



**Figure 2 :** Exemple des composés sesquiterpènes rencontrés dans une *HE* (Nait Achour, 2012).

### I-3-2 Groupe des composants aromatiques

Les dérivés de phénylpropane ( $C_6.C_3$ ), ce sont très souvent des allyles et propénylphénols parfois des aldéhydes caractérisés de certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil) mais aussi de celles de girofle, de la muscade, des cannelles, etc. par exemple , eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhydes, ...) (Bruneton, 2009).



**Figure 3 :** La vanilline (Ouis, 2015)

### I-3-3 Composés d'origine diverse

les composés d'origine varie En générale de faible masse moléculaires entraînables lors de hydro distillation, sont des hydrocarbures aliphatique a chaines linéaire ou ramifié porteurs de différents fonctions (*Ouis, 2015*).

#### **I-4 Fonction biologique et écologique des huiles essentielles**

Ce sont des substances que les plantes fabriquant pour se défendre contre des bactéries, des virus, des champignons, des insectes ou d'autre prédateurs, pour communiquer entre elles ou avec des insectes ou animaux, pour attirer tout ce qui peut servir à leur survie ou reproduction, pour facilites des réactions chimiques à l'intérieure d'elles ou pour améliorer leur échange gazeux, hydriques ou nutritifs (*Bohning and Seigenthaler, 2008*).

Elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation (*Riyaha, 2013* ). Et protège la plante contre la lumière soit par diminution ou concentration (*Ouis, 2015* ).

#### **I-5 Principaux domaine d'application des HE**

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique, parfumerie technique, alimentation et médecine (douce et pharmaceutique), l'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le gout, aromatiser et colorer les aliments, elles sont utilisé comme agent naturel de conservation des aliments (*Kehal, 2017*).

Les huiles essentielles sont utilisées comme matière première de base dans la fabrication des parfums et d'autres produits cosmétiques (*Bessah and Benyoussef, 2015*). Dans le domaine pharmaceutique Les huiles essentielles sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusions (menthe, verveine, thym) et sous la forme de préparation galénique, plus de 40 % de médicament sont à base de composant active des plantes (*Ouis, 2015*).

#### **I-6 Activité biologique des huiles essentielles**

##### **4 I-6-1 Propriété antibactérienne**

Des études antécédentes ont démontré que la majorité des huiles essentielles teste pour leur propriétés antibactériennes ont un effet plus prononcé contre les Gram+, La résistance des Gram<sup>-</sup> est attribue a leur membrane externe hydrophobe. Qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible (*Bencheqroun et al., 2012*).

*Les HE d'Inula Viscosa, Salvia officinalis et Laurus nobilis ont montré un effet*



inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Kheyar et al., 2014)

### **I-6-2 Propriété antifongique**

L'HE de *Melaleuca alternifolia* est active *in vitro* sur les champignons responsables de mycoses (Oliva et al., 2003).

Des études ont démontrées que Les huiles essentielles du thym et menthe sont un effet antifongique contre différentes espèces de dermatophytes isolées de diverses dermatophyties dont *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*.....etc.(Ouraini et al., 2007).

### **I-6-3 Propriété antihelminthique**

Le chénopode (*Chenopodium ambrosioides* L.) est connu depuis longtemps en Amérique centrale, pour son action vermifuge. Sa huile essentielle est également un excellent vermifuge surtout utilisé en médecine vétérinaire, elle est efficace contre les ascaris et les ankylostomes, le principe actif de l'essence est très toxique pour les animaux à sang froid, il paralyse et tue les vers parasites (Samet, 2002).

Les HE d'*Artemisia herba-alba* et *thymus capitatus* sont connu aussi pour leurs actions vermifuges (Akrouit et al., 2004).

### **I-6-4 Propriété antioxydante**

Des nombreuses HE présentent une propriété antioxydante En particulier, les HE de thym et d'origan, et dans une moindre mesure l'HE de romarin, présentent les activités anti oxydantes les plus importantes parmi les plantes aromatiques du pourtour méditerranéen (Gabriel et al., 2013).

### **I-6-5 Propriété pesticide**

les HE des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) sont évolués des pourcentages des mortalités cumulées et corrigées par rapport au témoin des adultes d'*A. obtectus* (Ndomo et al., 2009).

*L'HE de Mentha rotundifolia* rencontre en tant que des bonne pesticides (El Arch et al., 2003).

## **I-7 Méthodes d'extraction des HE**

### **I-7-1 L'enfleurage :**

Il consiste à extraire naturellement le parfum des fleurs grâce à l'absorption

effectuée par les corps gras. Il existe deux type de l'enfleurage : à chaud et à froid selon la résistance de des fleurs à la chaleur (*Benabdallah, 2015*).

#### **I-7-1-1 L'enfleurage à froid**

Une plaque de verre revêtue d'un film de graisse est semée de fleur et garder plus de douze heures à froid et dans l'obscurité ; le processus est répété jusque trente six fois avec de nouvelles fleurs les HE passent progressivement et son ensuite récupère à laide d'une solution d'alcool : une fois celle-ci évaporée, on obtient des huiles très odorante (*Germann and Germann, 2014*).

#### **I-7-1-2 L'enfleurage à chaud**

Il s'agit d'une variante de la technique précédente, réservée aux fleurs un peu moins fragiles, comme la rose centifolia, la violette, la fleur d'oranger et la cassie. Cette technique consiste à faire fondre de la graisse dans de grandes marmites, chauffées au bain-marie, dans lesquelles est plongée la matière première. Le mélange est laissé à refroidir pendant une à deux heures, puis à nouveau chauffé afin d'être filtré par un tamis métallique pour séparer la graisse parfumée de la matière première épuisée. La même charge de graisse est employée jusqu'à sa saturation en molécules odorantes (*Besombes, 2008*).

Cette technique est réservée aux fleurs, organe le plus fragile d'une plante (*Diridi, 2005*). Elle est très couteuse (*Germann and Germann, 2014*).

#### **I-7-2 Expression à froid**

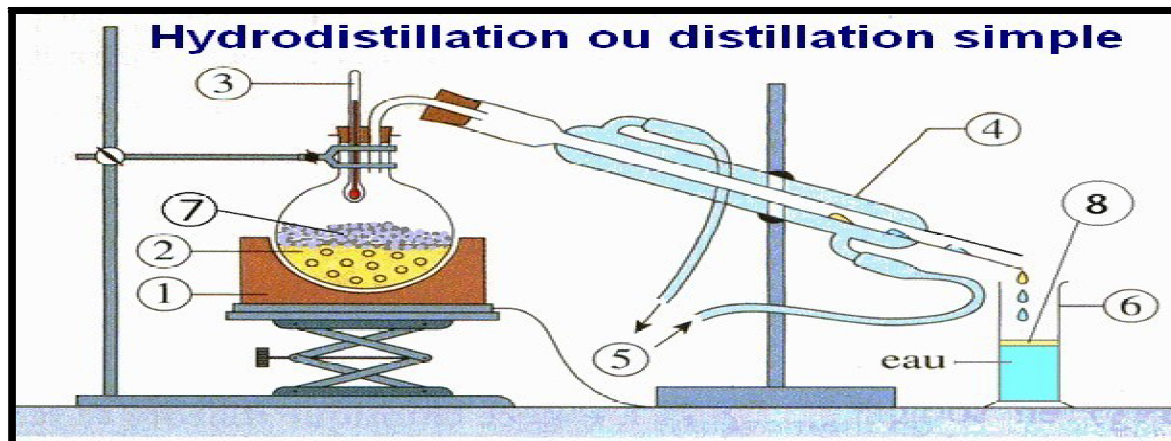
Les huiles essentielles d'agrumes sont les seuls à être extraites par le procédé d'extraction à froid, qui est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères ; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froid. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation (*Ferhat et al., 2010*).

#### **I-7-3 Distillations**

##### **I-7-3-1 Hydro distillation**

Cette technique consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite apporté à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement de lieu de sécrétion et la libération des molécules odorantes

contenue dans les cellules végétales (figure 3). Ces molécules forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique (Ferhat et al., 2010).



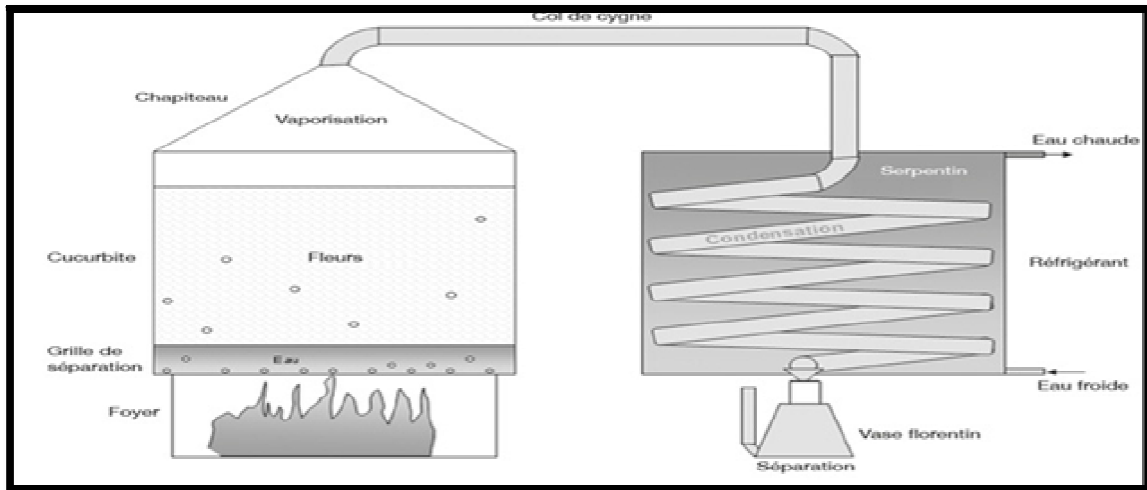
**Figure 4 :** Schéma d'un dispositif de l'hydrodistillation (Jouault, 2012).

1: Chauffe-ballon 2:Eau bouillante 3:Thermomètre 4:Réfrigérant à eau 5:Arrivée d'eau froide et Sortie d'eau tiédie 6:Essencier 7:Végétal 8:Huile Essentielle (Jouault, 2012).

Cette technique présente l'avantage d'éviter l'agglutination des charges végétales comme le fait l'injection de vapeur (Bousbia, 2011) et de ce fait l'hydrolat a une odeur très agréable que celle des huiles concentrées, possèdent de fortes vertus curatives (Germann and Germann, 2014). Cependant, elle peut apporter de nombreux artefacts. En effet, l'eau et la température du milieu peuvent induire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, d'oxydation, d'isomérisation, etc. (Samet, 2002). Ainsi que les molécules non solubles dans l'eau ne se trouvent pas dans l'hydrolat : c'est le cas des mono terpènes et des sesquiterpènes, il convient des hydrolats c'est leur faible durée de conservation liée à leur proportion de ses huiles (Germann and Germann, 2014).

#### **I-7-3-2 Distillation à la vapeur saturée**

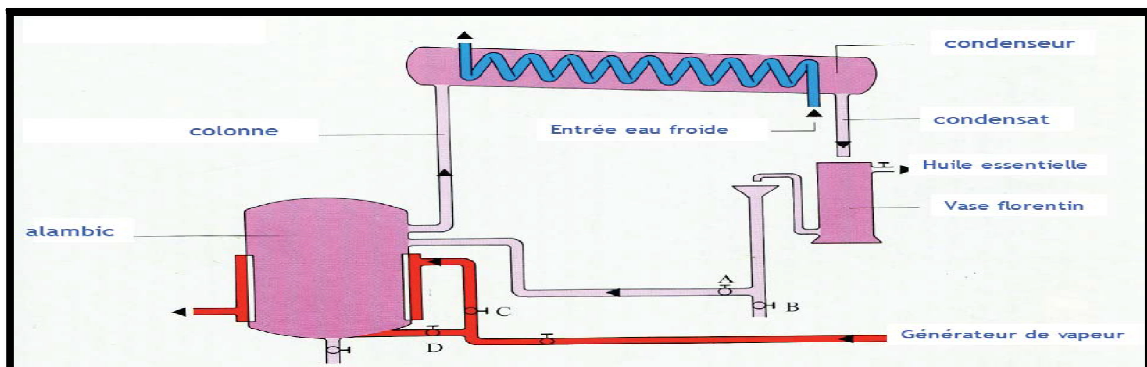
Le végétal est supporté dans l'alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau. Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante (Bousbia, 2011).



**Figure 5** : montage de la distillation à la vapeur saturée (Beneteaud, 2011).

### I-7-3-3 Distillation à la vapeur directe

La distillation à la vapeur directe, est identique à la précédente, sans eau dans le fond de l'alambic, la vapeur étant introduite au-dessous de la charge végétale (ou en dessus dans le système d'hydro diffusion (figure 6), Technique la plus utilisée actuellement, elle évite le contact prolongé du végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artefacts (Bousbia, 2011). La technique de l'hydro diffusion présente des avantages parmi lesquels nous pouvons citer: l'allègement du travail grâce à une mécanisation télécommandée, l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie de temps, de vapeur d'eau, d'énergie, etc. (Samet, 2002).



**Figure 6** : montage de la distillation à la vapeur directe (Bousbia, 2011).

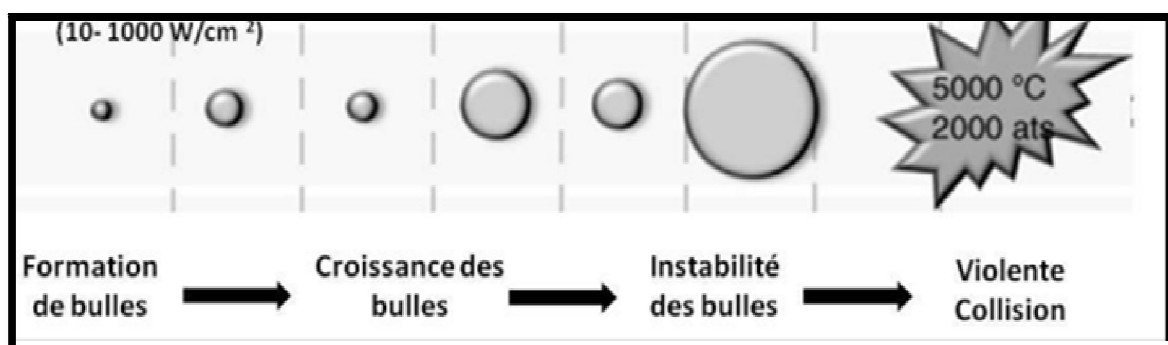
### II--4 Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont

solubles dans la plupart des solvants organiques. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (Kabera, 2004).

### I-7-5- Extraction assistée par ultrasons (EAU)

La propagation des ondes sonores dans les liquides soumis aux ultrasons à hautes intensités, induit des cycles de haute pression et de basse pression, avec des vitesses qui dépendent de la fréquence utilisée. Au cours du cycle de basse pression, les ondes ultrasonores de haute intensité créent de petites bulles de vide dans le liquide. Lorsque ces bulles atteignent un volume pour lequel elles ne peuvent plus absorber d'énergie, elles éclatent violemment au cours d'un cycle de haute pression (figure 7). Ce phénomène est appelé cavitation. L'implosion des bulles de cavitation provoquent également des jets de liquides qui peuvent atteindre la vitesse de 280 m/s. Les forces de cisaillement résultant détruisent l'enveloppe des cellules mécaniquement et améliorent le transfert de masse de la cellule au solvant (Royer et al., 2010).



**Figure 7 :** Génération des bulles de cavitation par ultrason(El Darra, 2013).

### I-7-6 Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction par micro-ondes consiste à chauffer l'extracteur (eau ou solvant organique) mis en contact avec la plante sous l'énergie microonde ce qui permet un chauffage homogène, ce nouveau procédé d'extraction permet des gains de temps et

d'énergie considérablement (*Ouis, 2015*).

cette technique nécessite de maîtriser parfaitement le temps de chauffage par les micro-ondes, et elle ne peut pas être utilisée pour les composés thermosensibles (*Galvan D'Alessandro, 2013*).

## **Chapitre II : Monographie de la plante testé**

## II-1 L'oranger amère

L'oranger amer appartient à la famille des *Rutaceae*, genre *Citrus*. Il est aussi appelé oranger de Séville ou bigaradier, il pousse sous un climat subtropical (Deterre, 2012).



*Figure 8* : feuille, fleurs, fruites de *Citrus aurantium* (Ghédira and Goetz, 2015)

### II-1-1 Répartition géographique

Le bigaradier est passé de la Chine vers l'Inde, l'Arabie et enfin l'Égypte. Il est introduit en Europe grâce aux arabes qui l'introduisirent en Sicile au XI<sup>ème</sup> siècle. Il est cultivé en Amérique centrale et en Amérique du sud ainsi que dans le bassin méditerranéen (Ferhat et al., 2010).

### II-1-2 Description botanique

L'oranger amère est un grand arbre atteignant de 5 à 8 m de haut, avec des feuilles vertes toujours vert et brillant, les fleurs blancs très purs, d'odeur agréable possèdent 5 à 8 pétale (Ghédira and Goetz, 2015). Le fruit fait environ 7 cm de diamètre avec une écorce dure et une pulpe très acide. Il est très résistant au froid, à l'excès d'eau et à quelques maladies (Deterre, 2012).

### II-1-3 Classification botanique



**Tableau I : classification botanique de citrus aurantium (Ghédira and Goetz, 2015)..**

<b>Règne</b>	Plantea
<b>Super division</b>	Embryophyta
<b>Division</b>	Magnoliophyta (Tracheophyta)
<b>Subdivision</b>	Spermatophytina
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Super ordre</b>	Rosanae
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famil</b>	Rutaceae
<b>Genre</b>	Citrus
<b>Espèce</b>	Citrus aurantium L.

#### **II-1-4 Composition chimique de l'HE du *citrus aurantium***

La composition chimique des huiles essentielles des différents organes de l'oranger amère diffère, sachant que des études précédentes ont démontrées que l'huile essentielle des feuilles de l'oranger amère est constituée de myrcène (2,3%), linalool (36,8%), acétate de linalyl (22,1%), Alpha-terpinéol (11,7%) et acétate de neryle (3,2%) tandis que Les principaux composants de l'huile de néroli (fleur) étaient le linalool (34,4%), l'acétate de linalyl (11,3%), le limonène (10,9%), alpha -terpinéol (6,6%), beta-pinène (5,2%), géraniol (4,2%) et sabinène (4,1%). Les principaux composants de l'huile de petit-grain étaient le linalool (36,8%), le linalyl Acétate (22,1%), beta-terpinéol (11,7%), géraniol (7,1%) et acétate de géraniol (6%) (Boussaada and Chemli, 2006).

#### **II-1-5 Activités biologiques de l'huile essentielle de *Citrus aurantium***

Des études antécédentes démontrent que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a plusieurs activités biologiques elle est considéré comme anti infectieuse, analgésique, anesthésiant local, cicatrisante, bactéricide, et antiseptique (Ghédira and Goetz, 2015), elle est utilisé aussi en tant que des bonne pesticide (insecticide) parce qu' elle est efficace contre Maringouin domestique (*Culex pipiens*) (EL-Akhal et al., 2014).

## **Chapitre III : Stresse oxydatif**

### **III-1 Définition des radicaux libres**

Le radical libre (RDL) est une molécule ou un atome qui possède un ou plusieurs électrons non appariés ou célibataires au niveau de ses orbitales externes, il réagit spontanément avec d'autres atomes ou molécules pour former un nouveau radical provoquant ainsi une réaction en chaîne qui n'est interrompue que lorsque deux RDL réagissent entre eux. Les radicaux libres sont des espèces instables, très réactives, et qui possèdent un temps de demi-vie extrêmement court :  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  secs (Thiebault et Sprumont, 1997).

### **III-2 Sources des radicaux libres**

La première source des radicaux libres est tout à fait normale et naturelle, elle est produite par l'activité même que déploient nos cellules pour nous apporter de l'énergie : chaque fois que nos cellules utilisent de l'oxygène des radicaux libres se forment (Causse, 2004).

Des RDL sont aussi produits au cours des inflammations (Causse, 2004). Car dans certaines cellules, comme les polynucléaires, constituent une source importante de radicaux libres car elles possèdent de forte concentration en oxydase. A l'état basal, cette activité enzymatique est latente et les cellules ne consomment que très peu d'oxygène. En revanche elle peut être rapidement activée par divers stimuli inflammatoires, ce qui implique une accélération de la consommation d'oxygène et une production simultanée des radicaux libres oxygénés (RLO). Les stimuli biologiques qui activent cette explosion oxydative sont multiples : il peut s'agir d'un complexe immunitaire, de lectine ou de produits des métabolismes de l'acide arachidonique (Lacolley et al., 2007).

La deuxième source de RDL est externe. Des RDL apparaissent lorsqu'on s'expose au soleil, lorsqu'on avale des légumes traités par des pesticides, lorsqu'on fume (Causse, 2004).

### **II-3 Stresse oxydatif et ses conséquences**

Le stress oxydant est un état qui résulte d'un déséquilibre au sein d'un individu entre la production d'éléments oxydants et de mécanismes de défense antioxydante (Morena et al., 2002).

Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique comme, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome

d'oxygène. Ceci leur confère la dénomination de radicaux libres (centrés) sur l'oxygène. Les oxyradicaux ou espèces radicalaires dérivées de l'oxygène peuvent avoir différentes structures dont les formules sont les suivantes : (*Delattre et al., 2005*).

$O_2^-$  = radical superoxyde

$HO_2^-$  = radical perhydroxyle

$\cdot OH$  = radical hydroxyle

$RO_2^-$  = radical peroxyde

$RO^-$  = radical alkoxyde

Ces entités radicalaires et moléculaires sont produites d'une manière accrue. Ce qui se traduit par de nombreuses dégradations oxydatives au niveau des macromolécules biologiques telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides (*Delattre et al., 2005*).

Dans le cas d'attaque d'ADN les radicaux libres soit oxydent directement les bases qui composent l'ADN en particulier la guanine qui va engendrer un grand nombre de bases modifiées, soit attaquent la liaison entre la base et le désoxyribose créant un site abasique, soit attaquent le sucre lui-même créant une coupure en chaîne simple brin (*Favier, 2003*).

Ces phénomènes vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases qui causent une mutation ponctuelle dans le génome. Les protéines sont aussi sensibles à l'attaque des radicaux libres surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). Comme de nombreux enzymes cellulaires et protéines de transports qui sont oxydés et inactivés par l'action des radicaux libres, ces derniers sont aussi soumis à des coupures en cas d'agression forte. Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent très sensibles à l'action des protéases, l'accumulation des protéines oxydées due à la formation des amas anormaux dans ou autour des cellules, ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuscines caractéristiques des tissus des sujets âgés (*Favier, 2003*).

Le stress oxydant donc sera la principale initiatrice de plusieurs maladies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, et les maladies cardiovasculaires (infarctus de myocarde et accident vasculaire cérébral) même si il accélère le vieillissement .....etc. (*Favier, 2003*).

### III- 4 Les moyennes de défense contre les radicaux libres

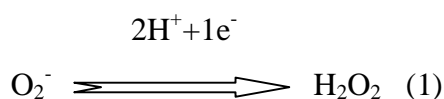
Pour protéger nos cellules et nos tissus nous disposons des systèmes de défense anti radicalaire, nos capacités à gérer le stress oxydant dépendent à la fois de nos gènes et de notre alimentation (*Riché and Chos, 2008*).

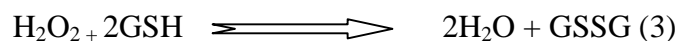
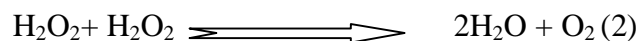
#### III-4-1 Défense enzymatique

Le premier rideau défensif, est constitué d'enzymes spécialisées, fabriquées par nos cellules. Rappelons que ces enzymes sont des protéines dans la synthèse se trouve sous la gouvernance de gènes. On les nomme « enzymes antioxydants » ils sont : « glutathion peroxydase » (GPX), « superoxyde dismutase ». La SOD, et encore la catalase. Ces enzymes qui neutralisent les radicaux libres à mesure qu'ils apparaissent dans les cellules, ont besoin des cofacteurs, c'est -à- dire d'adjoints, qui sont fournis par notre ration. La SOD par exemple, fait appel au cuivre et au zinc lorsqu'elle se trouve dans le cytoplasme, et au cuivre et au manganèse lorsqu'elle agit dans les mitochondries. La GPX, pour sa part a besoin de sélénium. C'est ce qui explique que celui-ci, le zinc, le cuivre, et le manganèse sont considérés comme des antioxydants (*Riché and Chos, 2008*).

Ces enzymes sont génétiquement programmées et inductibles, cela signifie que leur nombre et leur activité peuvent augmenter rapidement, suite à une action au niveau du gène, par une réponse adaptative à la présence des radicaux libres, mais ces enzymes, après leur synthèse, ne seront efficaces que si elles disposent de leurs cofacteurs spécifiques. (*Riché and Chos, 2008*).

La SOD accélère la vitesse de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (réaction (1)), Le peroxyde d'hydrogène produit par ce dernier doit être rapidement métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase pour que la protection apportée par la SOD soit effective (*Nzengue, 2008* ). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (2)), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction(3)) (*Gardès-Albert et al., 2003*).





### III-4-2 Défense non enzymatique

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques, Parmi les antioxydants non enzymatiques, on retrouve principalement le glutathion réduit (GSH), l'acide urique, les caroténoïdes, les flavonoïdes, la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique) ou encore la bilirubine (*Morena et al., 2002*).

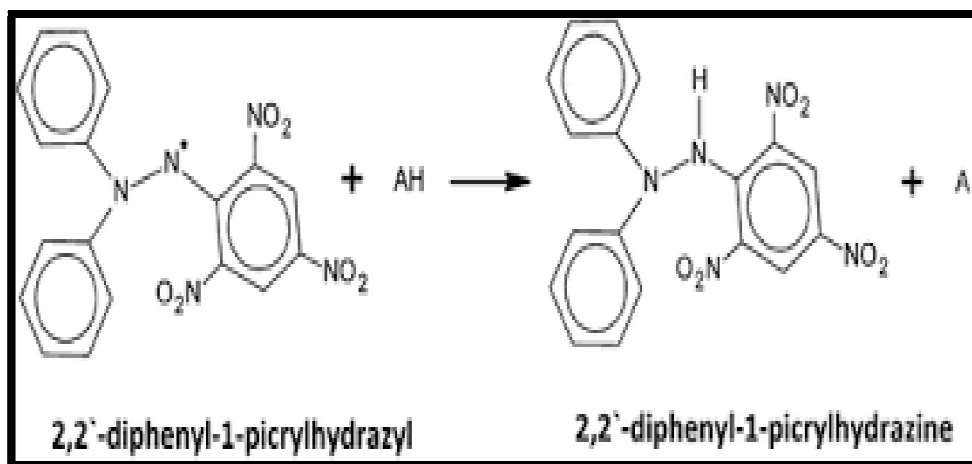
La vitamine E agit comme antioxydant au niveau des radicaux hydro peroxyde, et Les caroténoïdes ont un effet antioxydant lié principalement à une réaction avec les radicaux pyroxylés. Tandis que la vitamine C est un réducteur susceptible d'influencer la peroxydation lipidique (*Piquet and Hebuterne, 2007*).

### III-5 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant

#### III-5-1 La méthode l'inhibition 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)

##### Principe

Le DPPH est un radical relativement stable peut être obtenu sous forme d'un solide cristallisé, paramagnétique (à cause de l'électron libre) qui se dissout dans les solvant organique en réagissent rapidement sur les autres radicaux présents (Roth, 1968). Le principe de cette méthode est basée sur le changement de couleur du DPPH du violet au jaune, cette modification est la conséquence de la capacité de réduction des antioxydants envers le radical DPPH stable (En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl -1- picryl hydrazine de couleur jaune figure 10) mesurable à 517 nm (*Miguel, 2010*).



**Figure 09** : Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl-1-picryl hydrazyl) (*Medjoujda and Benlifa, 2013*).

### III-5-2 La méthode de la capacité de réduction antioxydante du fer (FRA)

#### Principe

Dans ce procédé, on utilise comme agent oxydant un sel ferrique (*Miguel, 2010*). L'activité réductrice du fer des extraits préparés, basée sur la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en  $\text{Fe}^{2+}$  (*Toure, 2015*).

### III-5-3 Piégeage du radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

#### Principe

Cette méthode évalue la capacité d'un produit à capter le radical libre (l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Sachant que la génération de cette anion se fait in vitro par La xanthine oxydase qui désigne comme une enzyme déshydrogénase qui transfère des électrons vers le Nicotinamide adénine dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ), et le réduisant à NADH et oxydant la xanthine ou l'hypoxanthine en acide urique, mais dans des conditions de stress la déshydrogénase est convertie en une enzyme oxydase qui réduit le dioxygène en anion superoxyde et en hydrogène peroxyde au lieu de réduire le  $\text{NAD}^+$  (*Miguel, 2010*).

Donc dans cette méthode l'anion de superoxyde réduit le nitro-bleu de tétrazolium (NBT) en formazan. Ainsi un composé antioxydant capable de capter l'anion superoxyde et empêchera la formation du bleu de formazan est la solution restera jaune (*Miguel, 2010*).

### III-5-4 Piégeage du radical hydroxyle

Il existe plusieurs façons pour déterminer la capacité de formation des radicaux hydroxyles (c'est-à-dire le désoxyribose tester). Cette méthode comprend un mélange de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) et de l'acide éthylène diamine-tétra-acétique (EDTA) et l'acide ascorbique, en présence de ces trois derniers on aura la formation de  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA et le radicale ascorbique (*Miguel, 2010*).

Après l'addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  on aura la formation de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA et  $\text{HO}^\bullet$ , c'est la réaction de fenton qui génère le radical hydroxyle hautement réactif ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$ ), les radicaux libres hydroxyles attaquent le désoxyribose et le dégrade en plusieurs fragments. Certaines de ces fragments réagissent avec l'acide thiobarbiturique après chauffage et dans un pH acide cette réaction due à l'apparition d'un pigment rose qui peut être quantifié par spectrophotométrie et on présence des antioxydants qui réduisant le radicale hydroxyle et au même temps Inhibent la formation du chromogène (*Miguel, 2010*).

### III-5-5 Test de blanchiment de $\beta$ -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

Le principe de cette méthode basé sur le fait que l'acide linoléique, qui est un acide gras insaturé, s'oxyde en présence des espèces réactives de l'oxygène produit par l'eau oxygéné

Le produit formé causé l'oxydation de  $\beta$ -carotène et conduit a sa décoloration, les agent antioxydants à rester inhibent la décoloration du beta-carotène (*Alam et al., 2013*).



## **Partie II : Etude expérimentale**

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Notre objectif était d'évaluer l'activité antioxydante d'huile essentielle des feuilles fraîches de l'oranger amère et la comparer avec un antioxydant standard (vitamine E). Et d'évaluer la nature d'interaction entre l'HE des feuilles fraîches et la vitamine E.

Le stage était effectué au niveau du laboratoire 4 de département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie de pole universitaire de Bouira.

### **I- Matériels**

#### **I-1- Matériels biologique**

##### **I-1-1 Matériel végétal**

Une seul plante à utilisée, il s'agit de l'oranger amère, les feuilles de l'oranger amère ont été récolté en mois d'avril ont été récolté puis lavé par l'eau de robinet et laissé à sécher à l'air libre pendant quelque jour pour les utilisées après le séchage, tandis que les feuilles ont été récolté en mois de mars ont été lavé puis utilisées directement (fraîches).

### **II-Méthodes**

#### **II-1Extraction de l'huile essentielle de la plante à étudiée (Citrus aurantium).**

##### **II-1-1Récolte et séchage**

Les feuilles de l'orange amère ont été récolte en mois de mars d'un jardin du commun de Kadiria, wilaya de Bouira. Les feuilles ont été séchées dans un endroit aéré, à l'ombre, à labri de la lumière et à température ambiante pendant quelques jours. Une partie des feuilles ont été utilisées fraîche.

##### **II-1-2 Extraction**

Nous avons utilisé la technique d'hydrodistillation pour l'extraction d'huile essentielle des feuilles séchées et fraîches de l'orange amère. Le montage utilisé est montré sur la figure 11.



**Figure 10** : montage utilisé pour l'hydrodistillation

Pour les feuilles séchées, 70 g de ces dernières coupées en petits morceaux à l'aide de ciseaux a fait l'objet d'une ébullition de 1 heure et 30 minutes avec 800 ml d'eau distillée. Le tout introduit dans un ballon de 1000 ml, relié à un réfrigérant à l'aide d'un coude (male /male), une pompe fait circuler une eau froide pour permettre la condensation des vapeurs. Donc les vapeurs d'eau chargées de huile essentielle, en traversant le réfrigérant se condensent et chutent dans un Erlenmeyer puis le distillat obtenue était versé dans une ampoule à décanter et a chaque fois, que cette dernière remplis on élimine de l'hydrolat.

Pour les feuilles fraîches nous avons introduis 130g dans chaque ballon avec 800ml d'eau distillée les autre étapes sont les mêmes.

A l'aide d'une ampoule à décanter le mélange précédent a séparé en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, en général plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant l'HE situé au-dessus.

L'huile essentielle obtenue était conservée dans un flacon en verre enveloppé de papier aluminium à une température compris entre 4 et 6 °C pour éviter toute dégradation de l'huile essentielle.

### **II-1-3 Calcule du rendement**

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre le poids de l'huile obtenue et le poids sec de la plante.

Le rendement, exprime en pourcentage, est calculé par la formule suivant : (*Laghoutre et al., 2015*).

$$\text{Rendement (\%)} = \text{poids de l'huile essentielle / poids de la plante} \times 100$$

## II-2 L'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'HE des feuilles fraîches de l'oranger amère ainsi que celle de standard (Vitamine E), a été évaluée par la mesure de la capacité de réduction d'un radical libre synthétique : le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•).

### II-2-1 Protocole

L'activité anti-radicalaire a été évaluée suivant le protocole de (*Wu and Ng, 2008*).

1.5 ml de différentes dilutions d'huile essentielle des feuilles fraîches de l'orange amère ou vitamine E ont été mélangés avec 0.5 ml de la solution de méthanol de DPPH• 0.1mmol/l dans des tubes à essai secs Le mélange a ensuite été vortexé vigoureusement. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm. Pour le blanc réactif 1.5 ml de méthanol sont mélangées avec 0.5 ml de la solution de DPPH.

### II-2-3 Détermination du pourcentage d'inhibition du DPPH

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage est calculée de la manière suivante :(*Barkat and Laib, 2011*).

$$\text{Activité anti radicalaire} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}$$

Avec :

$A_{\text{blanc}}$  : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai) (DPPH + méthanol).

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance du DPPH en présence du composé d'essai.

Les IC50 (concentrations donnant 50 % d'inhibition) de chaque échantillon ont été calculées à partir des graphes présentant les pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations. On a utilisé Le logiciel (*Origine Pro 8*).

Chaque test a été réalisé trois fois et les résultats sont exprimés en tant que la moyenne de chacun des trois tests plus ou moins l'écart type.

## II-3 Évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* et la vitamine E en association

### II-3-1 Principe de l'isobogramme

Pour évaluer l'interaction entre l'huile essentielle et la vitamine E on a utilisé la méthode de l'isobogramme qui a été décrite par (Tallarida, 2001), c'est 'un graphe qui présente deux paires de concentrations efficaces, qui donnent un effet particulier (ici une IC50) (Tallarida, 2001).

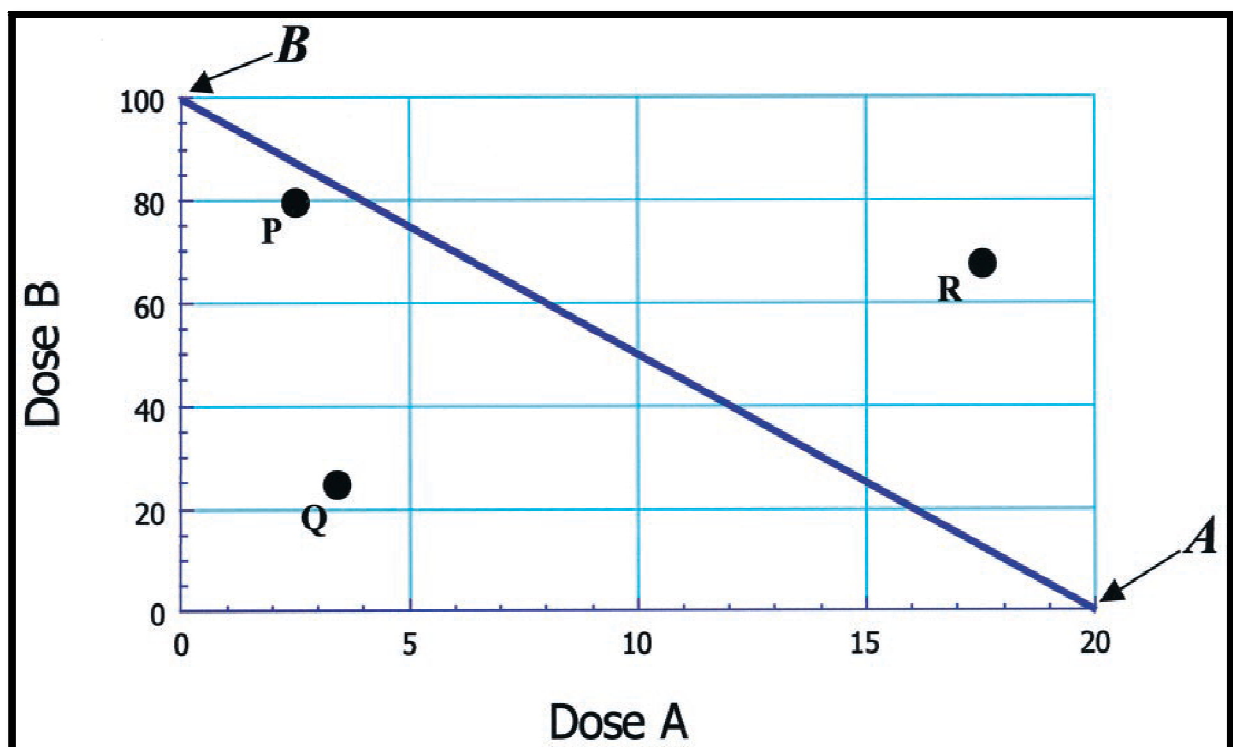


Figure 11 : Illustration d'un isobogramme typique (Tallarida, 2001).

Dans cet exemple les points A et B représentent les doses efficaces (ICI50) des composés A et B séparément. La droite qui relie ces deux points sert à comparer les paires de concentrations de A et B (points Q, P et R) qui donnent le même effet étudié (ICI50).

Si les points sont en dessous de la droite. Donc c'est 'une synergie

Si les points sont au-dessus de la droite, c'est un effet antagoniste

Si les points sont sur la droite, c'est 'un effet indifférent

### II-3-2 Le protocole

le protocole utilisé est le même que pour l'évaluation de l'activité antioxydant de l'huile essentielle et la vitamine E seule (*Wu and Ng, 2008*) sauf que dans la combinaison l'échantillon à teste se compose de 750ul de la vitamine E et 750 ul de l'huile essentielle.

A fin d'avoir deux points sur l'isobologramme, il faut avoir deux paires de concentration différents qui donnent 50 % . D'inhibition du DPPH (annexe 7).

Pour confirmer les résultats en calculant la concentration inhibitrice fractionnaire FIC50 indice (FIC50I) :

$FIC50I = FIC50 (A) + FIC50 (B)$  avec:

$FIC50 (A) = IC50 (A \text{ en présence de } B) / IC50 (A \text{ seule})$

$FIC50 (B) = IC50 (B \text{ en présence de } A) / IC50 (B \text{ seule})$  (*Adrar et al., 2016*).

Une combinaison est considérée synergique si elle présente une  $FIC50I < 0,9$  ; Indifférente si  $0,9 < FIC50I < 1,1$  et antagoniste si la  $FIC50I > 1,1$  (*Adrar et al., 2016; Santiesteban-López et al., 2007*).

## RÉULTATS ET DISCUSSION

### I- Caractères organoleptiques

Après l'extraction, nous avons déterminé les caractères organoleptiques des nos huiles essentielles. Les résultats sont exprime dans le tableau.

**Tableau II :** Caractères organoleptiques des huiles essentielles des feuilles fraiches et séchées.

Caractères organoleptiques	Couleur	Aspect	Odeur
Huile essentielle des feuilles séchées	Jaune foncé (figure 12)	Liquide visqueux	Odeur caractéristique, fraîche, aromatique
Huile essentielle des feuilles fraiches	Jaune claire (figure 13)	Liquide visqueux	Odeur caractéristique, fraîche, aromatique



**Figure 12 :** HE des feuilles séchés



**Figure 13 :** HE des feuilles

### II- Rendement en huile essentielle.

**Tableau III** : rendement en huiles essentielles des feuilles fraîches et séchées du *Citrus aurantium*

feuilles utilisées	Quantité des feuilles (en gramme)	Quantité d'huile essentielle obtenue (en gramme)	Le rendement en %
Les feuilles séchées	1157 g	0.8 g	0.06 %
Les feuilles fraîches	1157 g	3 g	0.2 %

Le rendement en huile essentielle extraite à partir des feuilles fraîches de *Citrus aurantium* est de 0.2 %, Celle de l'HE extraite à partir des feuilles séchées de la même plante est de 0.06 %. Le rendement en huile essentielle des feuilles fraîches est plus important que celui de feuilles séchées, plusieurs travaux démontrées que le séchage de la plante à des effets très nets sur le rendement qui commence à augmenter jusqu'à atteindre un maximum puis il baisse régulièrement. Sachant que la plante après sa récolte continue à vivre et son activité de biosynthèse des terpènes et dérivés s'accroît parce qu'elle est considérée comme un moyen de défense contre le stress hydrique, C'est ce qui explique l'augmentation des rendements en huiles essentielles à l'état frais. Après le séchage la plante meurt définitivement et ces activités de biosynthèse s'arrêtent et les huiles essentielles se perdent par évaporation, C'est ce qui explique la baisse de rendement (*Bencheikh et al., 2015*).

Le rendement en huiles essentielles des feuilles fraîches est plus important que celui des feuilles séchées, ce phénomène a été trouvé dans plusieurs autres espèces aromatiques telles que *Tetradlinis articulata* (*Bourkhiss et al., 2009*), *Ocimum basilicum* L. (*Dabire et al., 2011*), *Mentha piperit* (*Goudjl et al., 2015*). Donc chez la plupart des plantes la biosynthèse des huiles essentielles continue et s'accroît après la récolte du matériel végétal en réponse au stress hydrique c'est pour on obtient un rendement plus important de l'ordre de 0.2 % à l'état frais que celui à l'état séché (0.06). Cette baisse de rendement est due à la fois à la mort des cellules et l'arrêt de la biosynthèse des composés aromatiques, et parallèlement à une évaporation de l'huile essentielle (*Bourkhiss et al., 2009*).

Le rendement en huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium* peut-être aussi due à la forte humidité qui caractérise la région de Kadiria, à la localisation géographique, la période de récolte, le stade de récolte (meilleur rendement obtenu durant la période de la floraison) (*Laghuitre et al., 2015*).

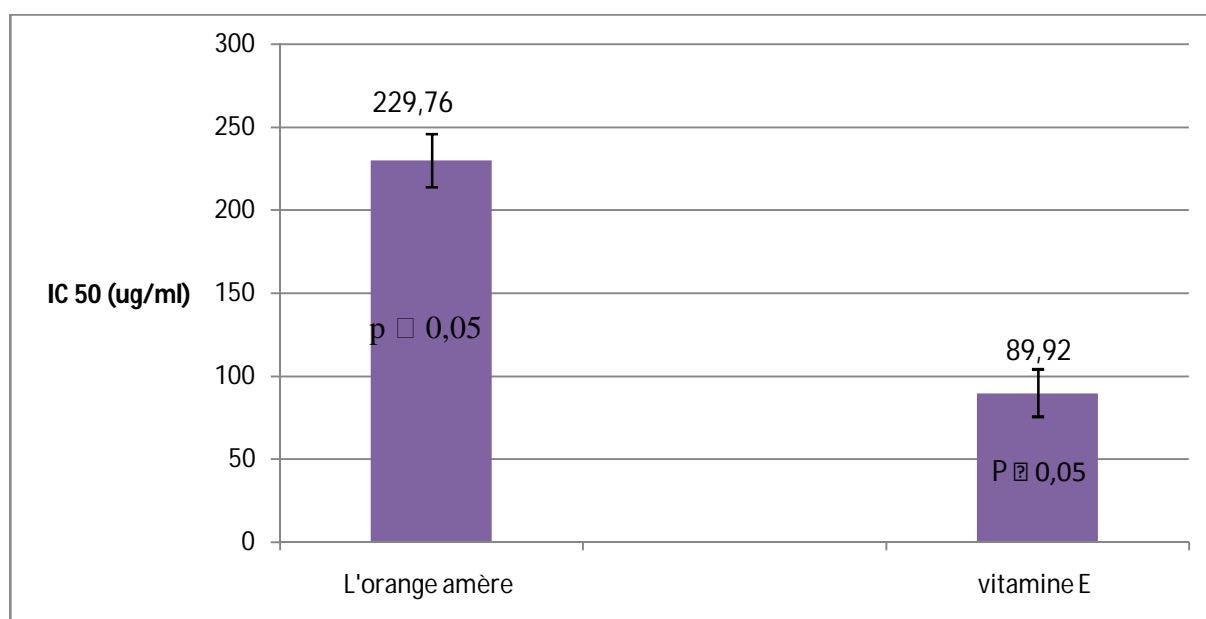


### III-Activité antioxydant

L'activité antioxydant de l'huile essentielle de l'orange amère de la région de Kadiria a été évaluée par la méthode de réduction de DPPH• en le comparant par la vitamine E comme antioxydant de référence.

#### III-1 Détermination des IC50

L'IC 50 c'est la concentration qui réduit 50 % du radical libre. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Barkat and Laib, 2011). Les valeurs des IC50 sont indiquées sur la figure 15.



**Figure 14 :** IC50 des différents échantillons

Dans la présente étude la vitamine E, l'huile essentielle de *Citrus aurantium* ont pu réduire le radicale libre DPPH• avec des concentrations respectivement de l'ordre de (89.92 ± 41.84) et (229.76 ± 17.78).

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* réduit le radicale libre DPPH avec une IC50 de 229.76 ± 17.54 ug/ml montrant une activité antioxydante inférieure à celle de la vitamine E. qui réduit le radicale libre DPPH avec une IC50 de 89.92 ± 41.70 µg/ml.

Cependant, tenant compte des écartypes, l'étude statistique (Annexe I) démontre qu'il n'y a pas une différence significative entre l'activité antioxydante de l'HE et celle de la vitamine E.

l'huile essentielle de *Citrus aurantium* à une activité de nombreux travaux sur cette activité confirmer que ces propriétés sont en relation avec la composition chimique des HE et

ont rapporté que les activités anti oxydantes sont dues à la présence de composés qui comportent le groupement hydroxyle (Bouzouita et al., 2008) Cette activité due à la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle, en présence du radical libre DPPH, l'atome d'hydrogène est transféré sur lui et le transforme en une molécule stable DPPH (Laib, 2012).

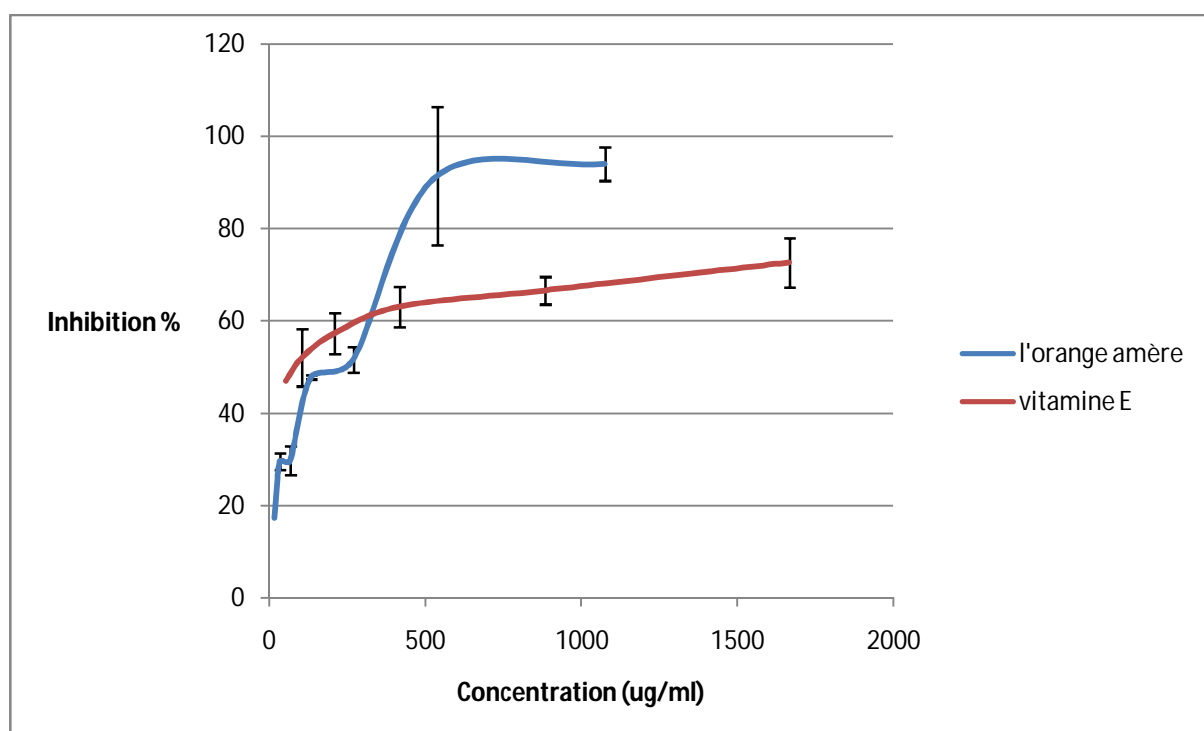
Donc on peut dire que l'activité antioxydant de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* peut être due à la présence des plusieurs composés qui comportent le groupement hydroxyle telle que linalol (36,8%), et alpha terpinéol (11,7%) (EL-Akhal et al., 2014)

Qui sont des composés majoritaires de l'huile essentielle étudiée et qui possèdent une forte activité antioxydante.

### III-2 pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et la vitamine E

La mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe qui représente la variation du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle et la vitamine E. (figure 16)



**Figure 15 :** Graphique représentant les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations

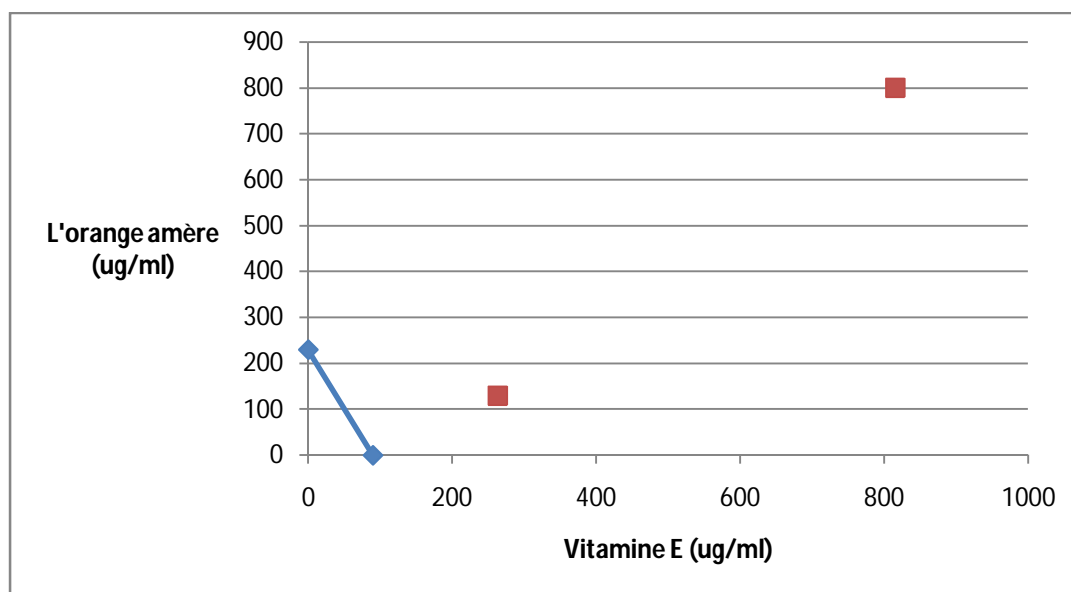
Le graphe montre que le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle est inférieure à celle de la vitamine en premier temps jusqu'à une concentration où les deux composés testés ont le même pourcentage d'inhibition (60%). Au-delà de cette concentration, l'HE permet d'attendre des pourcentages d'inhibitions plus élevés que ceux de la vitamine E aux mêmes concentrations.

L'HE a atteint un pourcentage d'inhibition □ 90% tandis que la vitamine E n'a pas atteint le 80% même avec des concentrations plus élevées que celles de l'HE du *Citrus aurantium*.

### III-3 Activité antioxydant de la combinaison de la vitamine E et l'huile essentielle

La figure 17 représente l'isobologramme de la combinaison d'HE et la vitamine E

Le but de cette combinaison est de déterminer si les deux échantillon sont capables de produire des effets antioxydants synergiques( qui donnent un effet antioxydant supérieure à la somme des effets antioxydants individuels) (*Liu et al., 2008*).



**Figure 16 :** Isobogramme de l'HE du l'orange amère combinée avec la vitamine

Les deux points sont en dessous de la droite, donc notre résultat est négatif et l'effet est antagoniste, cela veut dire que il n'ya pas un effet synergique entre ces deux antioxydants, donc dans notre expérience les concentrations combinées des antioxydants (HE et vitamine E).étaient moins efficaces que ces deux derniers seules (*Liu et al., 2008*).

On a calculé aussi le FIC 50 pour confirmer les résultats obtenus (tableau V).

**Tableau IV :** FIC50 et FIC50 Indice de la combinaison de la vitamine E et l'huile essentielle de l'orange amère

Combinaison		IC50 (µg/ml)	IC50c (µg/ml)	FIC50	FIC50I	FIC50I moyenne
1	L'orange amère	226.14	263.3	1.16	15.6	11 ± 6.50
	Vitamine E	56.48	815.8	14.44		
2	L'orange amère	214.30	129	0.60	6.4	
	Vitamine E	136.65	799.2	5.84		

Selon les résultats obtenus la FIC50 indice = 11 ± 6.50

La FIC50indice  $\square$  1.1 donc selon l'effet est antagoniste Ce résultat est en corrélation avec la figure 16.

ont démontré que certains composés ( telle que l'HE de *Tymus numidicus* et la vitamine E, Extrait de romarin au méthanol et BHT) peuvent agir en synergie sur l'inhibition des radicaux libres.

Notre résultat est peut être du à une composition chimique de l'HE de *Citrus aurantium* qui ne permet pas une action synergique avec la vitamine E.

## **Conclusion et perspective**

## Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous nous sommes intéressés d'étudier l'effet de séchage sur le rendement en huile essentielle de l'oranger amère et pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles fraîches de cette plante et de celle de la vitamine E, et rechercher un effet synergique entre ces deux dérivés.

Le rendement des feuilles fraîches est plus important que celui des feuilles séchées donc, on conclut que le séchage baisse le rendement en huile essentielle parce qu'il cause la mort des cellules suite à une forte déshydratation et à cause de l'évaporation de l'HE.

L'huile essentielle de l'oranger amère a montré une activité antioxydante très élevée en réduisant le DPPH d'une manière comparable à la vitamine E.

La combinaison n'a pas montré l'effet recherché (synergie), c'est pour ça il est nécessaire d'étudier d'autres combinaisons en associant notre huile essentielle avec d'autres antioxydants synthétiques tels que BHA et BHT pour obtenir l'effet synergique. Il est également possible d'obtenir un effet synergique entre la vitamine E et d'autres HE, il est donc intéressant de tester d'autres HE.

L'activité antioxydante de *Citrus aurantium* peut être évaluée à l'aide d'autres techniques telles que l'inhibition du blanchissement de beta-carotène afin de confirmer son potentiel antioxydant.

Il est également possible d'évaluer d'autres activités de cette HE telles que l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse.

Il serait aussi intéressant de tester d'autres extraits de *Citrus aurantium* autres qu'HE.

## **Références bibliographique**

## Références bibliographique

Adrar, N., Oukil, N., Bedjou, F., 2016b. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products* 88, 112-119.

Akrout, A., Chemli, R., Chreif, I., Hammami, M., 2004. Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). *Cahiers Options Méditerranéennes* 62, 289-292.

Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 143-152.

Barkat, M., Laib, I., 2011. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. *Revue de génie industriel* 6, 46-54.

Benabdallah, H., 2015. Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Université Ferhat Abbas de Sétif, p. 77.

Bencheikh, S.E., Goudjil, M.B., Zighmi, S., Ladjel, S., 2015. Effet du séchage sur le rendement des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp. *aurasianum* Labiatae. *Annales des Sciences et Technologie* 7, 67-71.

Bencheqroun, H.K., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Chaouch, A., 2012. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la société Royale des sciences de Liège* 81, 21-24.

Beneteaud, E., 2011. Les techniques d'extraction Document ressource. Comité Français du Parfum, p. 7.

Besombes, C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Génie des Procédés Industriels. Université La Rochelle de France p. 289.



Bessah, R., Benyoussef, E.-H., 2015. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables* 18, 513-528.

Bohning, M.I., Seigenthaler, P., 2008. *Ces plates qui soignent les sportifs*, Favre SA . Lausanne ed.

Boudassou, B., 2014. *plantes aromatiques* Anne le Meur avec Anne fragoanard- le Guen ed.

Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N., Abrini, J., 2006. Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et Environnement Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc*, 9-12.

Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch, A., Satrani, B., 2009. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions* 20, 44-48.

Bousbia, N., 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires, sciences des procédés ' sciences des aliments Université d'Avignon; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie), p. 127.

Boussaada, O., Chemli, R., 2006. Chemical composition of essential oils from flowers, leaves and peel of *Citrus aurantium* L. var. *amara* from Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 9, 133-139.

Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., Chaabouni, M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunis* 10, 119-125.

Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* Paris : Éd. Tec & doc ; Cachan : Éd. médicales internationales, 2009 ed. Lavoisier.

Causse, C., 2004. *Les secrets de santé des antioxydants: plus jeune, plus longtemps avec les antioxydants*. Alpen éd.

Dabire, C., Nebie, R., Belanger, A., Nacro, M., Sib, F., 2011. Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l'huile essentielle et l'activité antioxydante d'extraits de *Ocimum basilicum* L. *International Journal des sciences biologique et chimique* 5, 1083-1095.

Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., 2005. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques, Tec & Doc Lavoisier ed.

Deterre, S., 2012. Influence des étapes de production du parfum issu des écorces d'orange amère (*Citrus aurantium* L. ssp *amara*) sur la qualité aromatique. *L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement AgroParisTech*, p. 211.

Diridi, F., 2005. extraction et analyse des huiles essentielles de cumin formulation d'un pommade decongestionnante, *Chimie Université M'hend Bougerra de Boumerdès* p. 132.

EL-Akhal, F., Guemmouh, R., Greche, H., Lalami, A.E.O., 2014. 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). 5, 2319-2324

El Arch, M., Satrani, B., Farah, A., Bennani, L., Boriky, D., Fechtal, M., Blaghen, M., Talbi, M., 2003. Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc. *Acta botanica gallica* 150, 267-274.

El Darra, N., 2013. Les composés phénoliques des raisins: étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction, *Téchnologie Université de Technologie Compiègne de France* p. 344.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2010. *Citrus* D'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions *Office des publications universitaires* ed.

Gabriel, I., Alleman, F., Dufourcq, V., Perrin, F., Gabarrou, J., 2013. Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Prod. Anim* 26, 13-24.

Galvan D'Alessandro, L., 2013. Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits, Sciences et Technologie université Lille 1 de France p. 169

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. L'actualité chimique, 91-96.

Germann, G., Germann, P., 2014. plantes d'aromathérapie Delachaux et Niestlé ed.

Ghédira, K., Goetz, P., 2015. Citrus aurantium L. var. amara Link. Phytothérapie 13, 320-327.

Goudji, M.B., Ladjel, S., Bencheikh, S.E., Zihgmi, S., 2015. Influence du séchage sur le rendement de l'extraction des huiles essentielles de Mentha piperita.

Jouault, S., 2012. La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité, Pharmacie Université de Lorraine, p. 137.

Kabera, n., 2004. Caractérisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques : Hyptis Spicigera, Pluchea Ovalis et Laggera Aurita, disponible sur <http://www.memoireonline.com/12/09/2969/Caracterisation-des-huiles-essentielles-de-trois-plantes-aromatiques--Hyptis-Spicigera-Pluchea-Ov.html>. consulter le 18-02-2017.

Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F., 2013. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer Science & Business Media, ed.

Kehal, F., 2017. Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche, Technologies Alimentaires Université Constantine 1 p. 77.

Kheyar, N., Meridja, D., Belhamel, K., 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'Inula viscosa, Salvia officinalis et Laurus nobilis de la région de Bejaia. Algerian J. Nat. Prod 2, 18-26.

Kuate, J., Boyom, F.F., Ducelier, D., Damesse, F., Menut, C., Bessiere, J.M., 2002. Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. *Fruits* 57, 95-104.

Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F., Samuel, J.-L., 2007. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*, John Libbey Eurotext ed.

Laghoutre, O., Gherib, A., Laghouiter, H., 2015. Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de certaines menthes cultivées dans la région de Ghardaïa. *Revue EIWahat pour les Recherches et les Etudes* Vol 8, 84-93.

Laib, I., 2012. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs. *Nature et Technologie* 44-52.

Liu, D., Shi, J., Ibarra, A.C., Kakuda, Y., Xue, S.J., 2008b. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Science and Technology* 41, 1344-1349.

Mailhebiau, P., 2017. molécules aromatiques disponible sur <https://sites.google.com/a/nouvellearoma.com/philippemailhebiau/normes-nouvelles-HEBBD-EOBBD/composants-biochimiques/structures-biochimiques/molecules-aromatiques>. consulter le 07-03-2017.

Medjoujda, O., Benlifa, A., 2013. Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales, sciences biologique Université Kasdi Merbah de Ouargla p. 62.

Miguel, M.G., 2010b. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 291-312.

Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J., Canaud, B., 2002. Stress oxydant, hémocompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie* 23, 201-208.

Nait Achour, K., 2012. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'Eucalyptus poussant la région de Tizi Ouzou chimie université Mouloud Mameri de Tizi Ouzou p. 112

Ndomo, A.F., Tapondjou, A., Tendonkeng, F., Tchouanguép, F.M., 2009. Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera; Bruchidae). *Tropicultura* 27, 137-114.

Nzengue, Y., 2008 Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, de cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53 Biologie université Joseph Fourier Grenoble 1, p. 297.

Oliva, B., Piccirilli, E., Ceddia, T., Pontieri, E., Aureli, P., Ferrini, A., 2003. Activité antimycotique de l'huile essentielle *Melaleuca alternifolia* et ses principaux composants. *Lettres en microbiologie appliquée* 37, 185-187.

Ouis, N., 2015. étude chimique et biologique des huiles essentielles de Coriandre , Fenouille et de Persile, chimie université Ahmad Ben Balla Oran, p. 223.

Ourâini, D., Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M., Belabbas, M., 2007. Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie* 5, 6-14.

Piquet , M.A., Hebuterne, X., 2007. Nutrition en pathologie digestive. Wolters Kluwer France.

Riché, D., Chos, D., 2008. Micronutrition, santé et performance: Comprendre ce qu'est vraiment la micronutrition, De Boeck Université ed.

Riyaha, H., 2013 Valorisation des plantes aromatiques et médicinales: étude du potentiel chimique et antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (sauvage et domestiqué), *Science de la vie Gestion & Conservation de La Biodiversité*, p. 33.

Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A., Moreno, S., 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food chemistry* 115, 456-461.

Roth, É., 1968. Chimie nucléaire appliquée. Masson et Cie.

Royer, M., Houde, R., Stevanovic, T., 2010. Volet 2: Technologies de Conversion, sciences du bois et de la forêt, CRB,. Université Laval de Canada p. 118.

Samet, A.D., 2002. Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites des plantes aromatiques de la zone Soljdanienne du Burkina faso: valorisation Sciences physiques 'Université de Ouagadougou p. 264.

Santiesteban-López, A., Palou, E., López-Malo, A., 2007. Susceptibility of food -borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. Journal of applied microbiology 102, 486-497.

Taleb-Toudert, K., 2015. extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de kabylie (Nord Algérien).Evaluation de leur effet sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* ( Coleopetra:Bruchidea), Biologie Animale et Végétale Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, p. 160.

Tallarida, R.J., 2001. Drug synergism: its detection and applications. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 298, 865-872.

Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A., 2005. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec & Doc Lavoisier ed.

Toure, D., 2015. Études chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire, Biologie Humaine Tropicale. Université Felix Houphoeut Boigny, Côte d'Ivoire, p. 94.

Velé, H., 2015. Valorisation officinale des huiles essentielles autorisées dans les phytomédicaments, UFC Sciences pharmaceutique et ingénierie de la santé université Angers de France p. 253.

Wu, S.-J., Ng, L.-T., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. LWT-Food Science and Technology 41, 323-330.

## **Annexe**

## Annexe I : Etude statistique (khi deux)

### I-1 Test de l'hypothèse de la vitamine E et l'huile essentielle

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The categories of V1 occur with equal probabilities.	One-Sample Chi-Square Test	1.000	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of IC50_S is normal with mean 158.25 and standard deviation 78.75.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	.949	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of IC50c_C is normal with mean 501.75 and standard deviation 357.33.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	.871	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of FIC50_S is normal with mean 5.50 and standard deviation 6.14.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	.936	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

### Conclusion

Selon le tableau la valeur de signification est égale 1 donc la valeur de p ou Signification est supérieure à 0,05 donc on accepte l'hypothèse nulle (H0) et on conclut qu'il n'y a pas de différence significative entre la vitamine E et l'huile essentielle

### I-2 Test khi deux de la vitamine E et l'huile essentielle (Probabilité critique ou P-valeur).

	ORG_A	Vit E
Chi-Square	.000 <sup>a</sup>	.000 <sup>a</sup>
df	2	2
Asymp. Sig.	1.000	1.000

### Conclusion

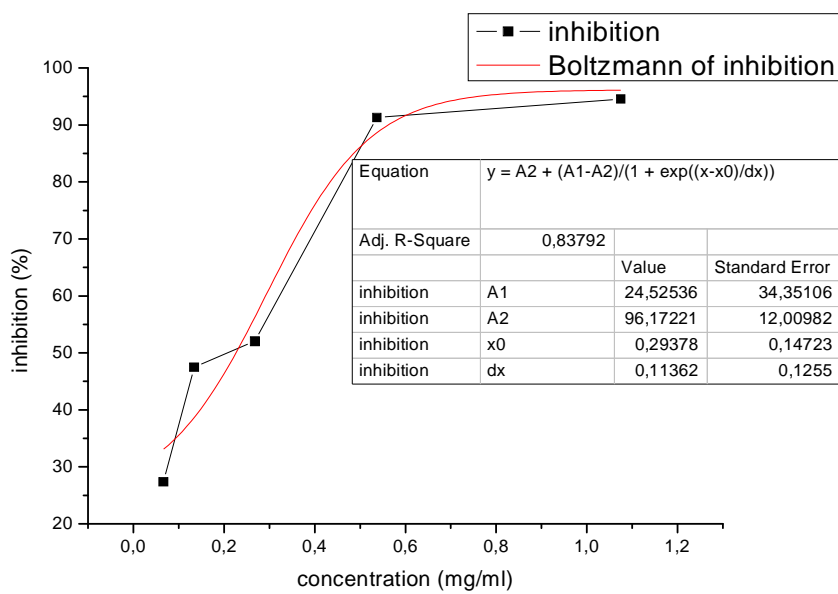
Selon le tableau P = 1 donc pas de signification c'est à dire les données sont séparées cela veut dire que la vitamine E et l'huile essentielle ont presque la même activité antioxydante



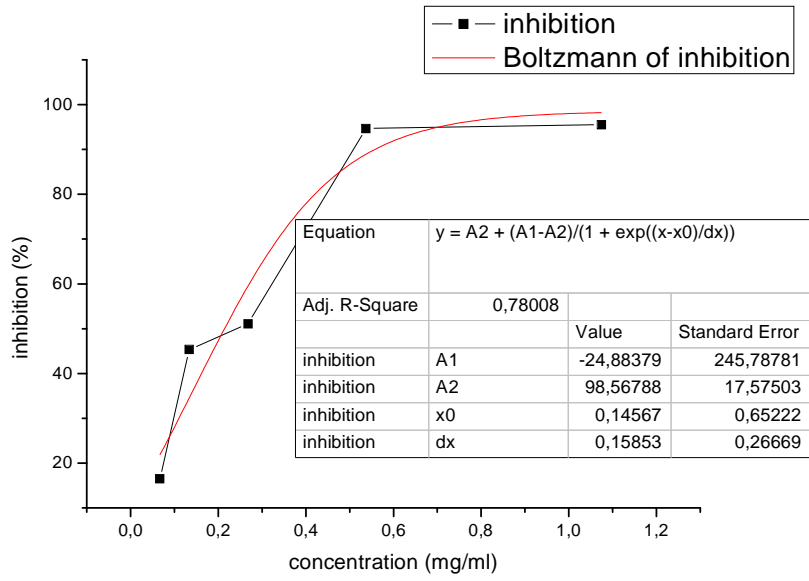
## Annexe II : Détermination des IC50 avec le logiciel Origin

### II-1 Echantillon seule

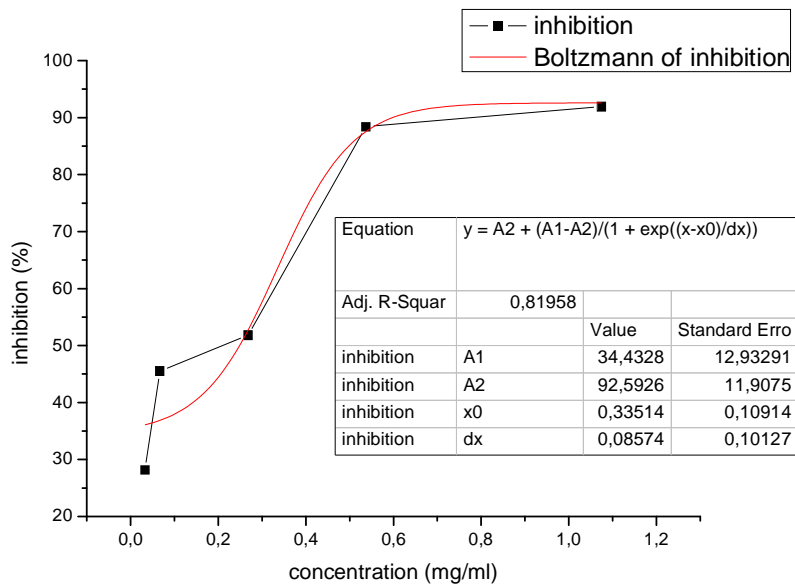
#### II-1-1 l'orange amère (essai 1,2 et 3)



IC50 = 226.14 ug/ml

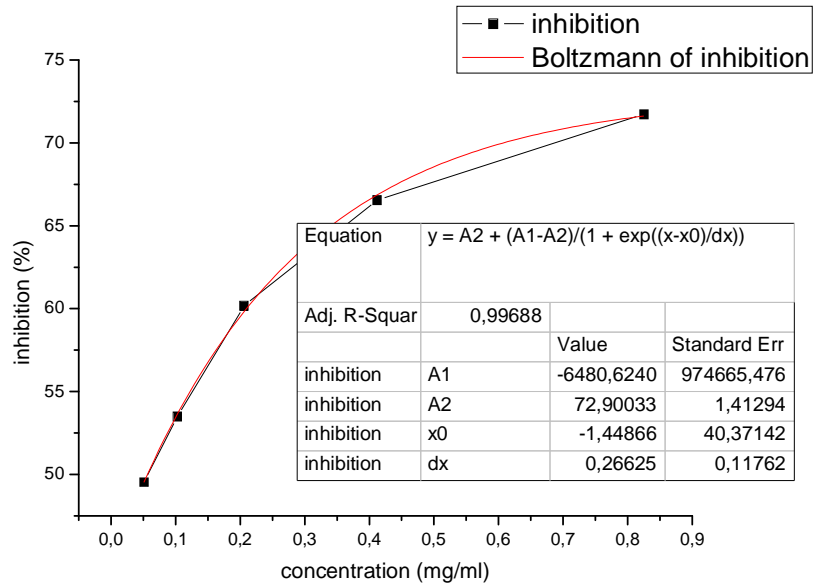


IC50 = 214.31 ug/ml

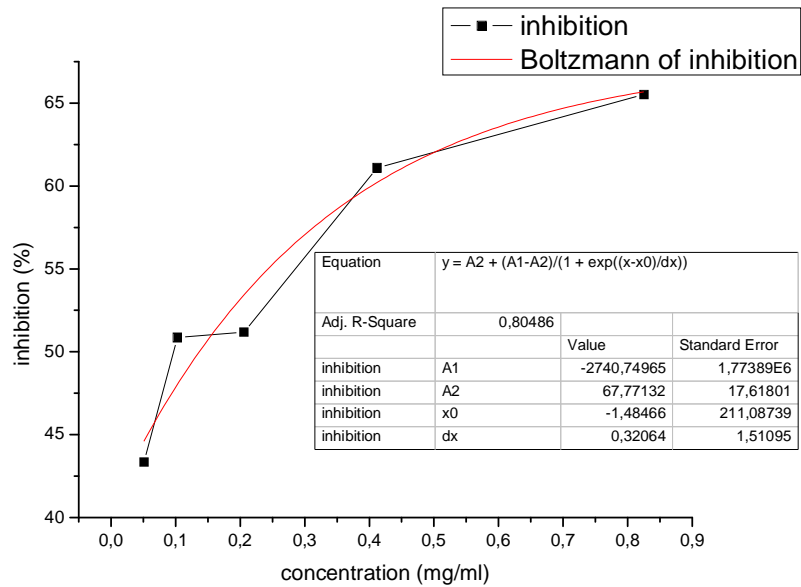


IC50 = 248.84 ug/ml

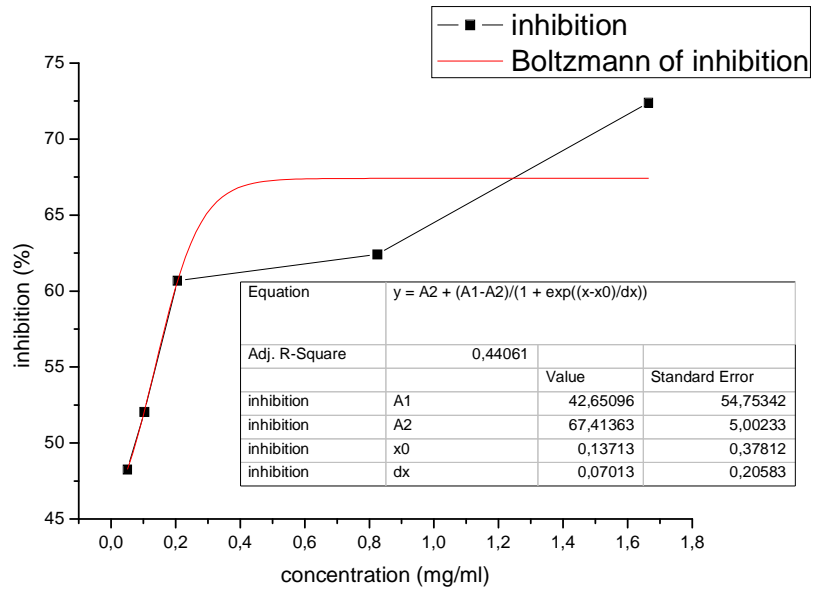
## II-2 La vitamine E (essais 1, 2 et 3)



IC50 = 56.48 ug/ml

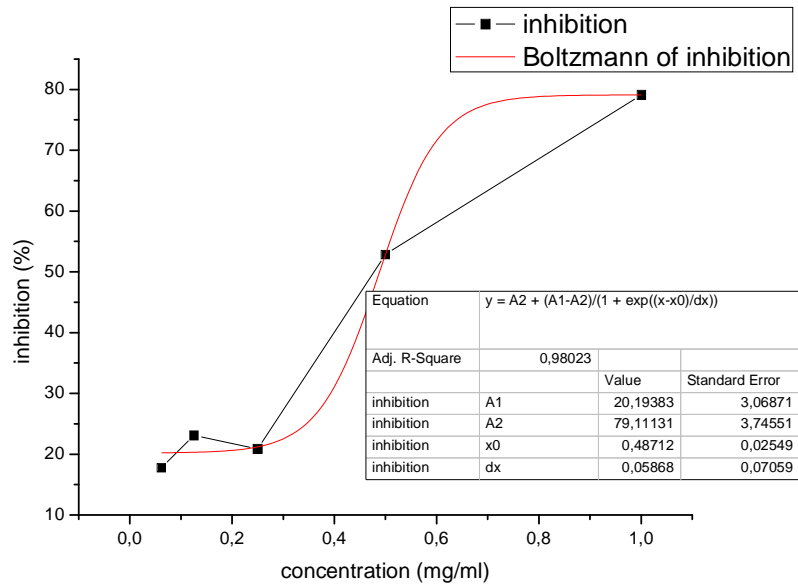


136.64 ug/ml

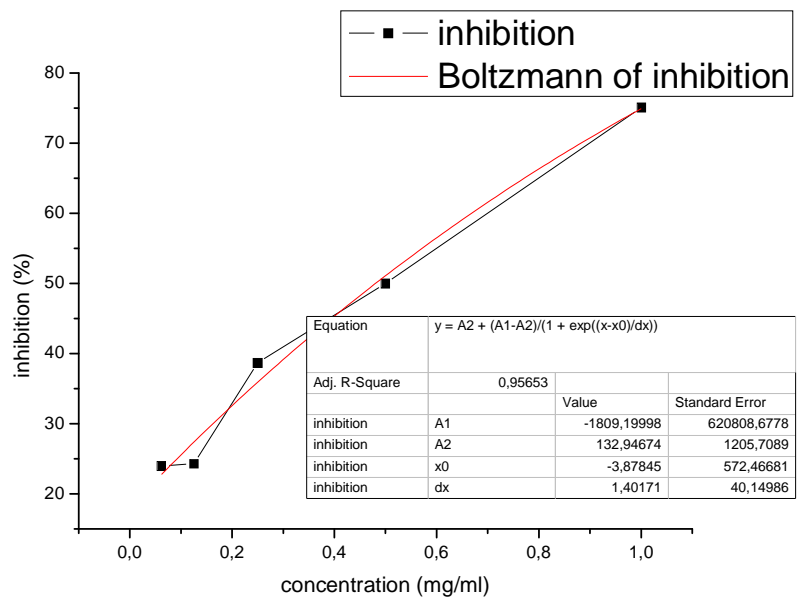


IC50 = 76.83 ug/ml

### II-3 Echantillon en association (la vitamine E et l'orange amère teste 1 et 2)



IC 50 = 129 ug/ml (L'orange amère) + 399.6 ug/ml (vitamine E)



IC50 = 399.6 ug/ml (vitamine E) + 64.32 ug/ml (l'orange amère)

## **Annexe III : Matériels non biologique**

### **III-1 Appareillage**

- Chauffe ballon
- Pompe à eau
- Support élévateur
- Spectrophotomètre (OPTIZEN 3220UV)
- Vortex mixer (Nahita).

### **III-2Verrerie**

- Ballon de 1000 ml
- coude male-male et coude male-femelle
- Réfrigérant
- Erlenmeyer
- eau glacée
- Bassin
- Becher
- Ampoule à décanter
- Flacon
- Micro pipette réglable
- Tubes secs
- Portoir des tubes
- Spatule
- Micro spatule
- Une cuve
- eau distillée
- Ciseaux
- Graisse à rodage
- DPPH

- méthanol (99.6% Germany)

#### **Annexe IV : Préparation de solution de DPPH**

- [DPPH] = 0.1 mmol/l
- La masse molaire de DPPH = 394.32g/mol

On doit chercher la quantité de DPPH dans un 0.1 mmol

Cela veut dire qu'on a : 394.32g de DPPH  $\rightleftharpoons$  1 mol ou (1000 mmol)

X g<sub>1</sub> de DPPH  $\rightleftharpoons$  0.1 mmol

$$Xg \text{ de DPPH} = (0.1 \text{ mmol} * 394.32) / 1000\text{mmol} = 0.039432g$$

Donc pour avoir 0.1mmol/l de DPPH il faut dissoudre 0.039432g dans un litre de méthanol

A chaque fois on a préparé 50 ml de DPPH

#### **Annexe V : Préparation des dilutions de l'huile essentielles de l'orange amère**

##### **Calcule de la concentration de l'huile essentielle pure en mg/ ml**

Le poids (g) d'1ml de l'HE représente la concentration de cette dernière en g/ml

On conclut que la concentration de huile essentielles pure [HE pure] = 860g/ml

A partir de cette huile essentielle une solution mère été préparé sa concentration est 'égale 1.075 mg/ml (dilution 1/800).

Cela veut dire que : 1 volume d'HE + 799 volume de méthanol

Exemple : 5 ul d'HE + 3995 ul de méthanol

A partir de la solution mère on a préparé une série des dilutions successive 1/2,1/4,1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 par méthanol.

#### **Annexe VI : Préparation des dilutions de la vitamine E**

A partir d'une solution de 10 mg/ml de vitamine E, une solution mère qui représente 1/3 de cette concentration a été préparée ce qui revient à une solution mère de 3.33 mg/ml

A partir de la solution mère on prépare une série des dilutions successives 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128.

## **Annexe VII : combinaison de la vitamine E et l'huile essentielle**

### **7-1 Première combinaison effectuée**

<b>La vitamine E</b>	<b>L'huile essentielle</b>
Solution mère	Solution mère
Dilution 1/2	Dilution 1/2
Dilution 1/4	Dilution 1/4
Dilution 1/8	Dilution 1/8
Dilution 1/16	Dilution 1/16
Dilution 1/32	Dilution 1/32
Dilution 1/64	Dilution 1/64

### **7-2 deuxièmes combinaisons effectuées**

Dans ce cas on a éliminé la solution mère de l'huile essentielle



<b>Vitamine E</b>	<b>L'huile essentielle</b>
Solution mère	Dilution 1/2
Dilution 1/2	Dilution 1/4
Dilution 1/4	Dilution 1/8
Dilution 1/8	Dilution 1/16
Dilution 1/16	Dilution 1/32
Dilution 1/32	Dilution 1/64

## Glossaire

**Aromatique** : Caractérise une odeur agréable provenant de certaines espèces végétales.

**Artéfact** ou **artefact** est un effet (*lat. factum*) artificiel (*lat. ars, artis*). Le terme désigne à l'origine un phénomène créé de toutes pièces par les conditions expérimentales, un effet indésirable, un parasite. Le mot désigne aussi de manière générale un produit ayant subi une transformation, même minime, par l'homme et qui se distingue ainsi d'un autre provoqué par un phénomène naturel.

**Fragrance** : Par opposition à l'odeur qui peut être agréable ou désagréable, ce mot français d'origine latine traduit l'odeur plaisante d'un produit parfumé

**Hydrolyse** : (du grec *hydro* : eau et *lyein* : briser) est une réaction chimique dans laquelle une liaison covalente est rompue par action d'une molécule d'eau.

**Isomérisation** : il s'agit de Transfer de groupement fonctionnel à l'intérieure d'une molécule donnant une forme isomère

**Médecines douces** : sont celles qui n'utilisent pas des médicaments et des molécules chimiques ni de chirurgie il base ses traitement sur l'utilisation des moyennes naturelles.

**Mélange azéotropique** : c'est Un mélange azéotropique est un mélange qui présente, pour une composition particulière, une phase vapeur ayant la même composition que la phase liquide avec laquelle elle est en équilibre.

**Réarrangement** : forment une classe de réactions organiques dans les quelles le squelette carboné d'une molécule subit un réarrangement pour donner un isomère de constitution.

## Résumé

Le but de ce travail était d'étudier l'effet de séchage sur le rendement en huile essentielle et d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile obtenue des feuilles fraîches de l'oranger amère et la vitamine E seules, et d'étudier l'interaction entre ces deux dernières. L'extraction a été faite à l'aide de l'hydrodistillation, et l'activité antioxydante a été évaluée par la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Cette étude a démontré que le séchage baisse le rendement en huile essentielle. Et pour l'activité antioxydante des échantillons seuls ont démontré que la vitamine E et l'HE possède une activité comparable. La combinaison entre les deux échantillons a été antagoniste.

**Mots clés :** *citrus aurantium*, huile essentielle, séchage, vitamine E, DPPH, antioxydant, isobologramme, synergie

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير التجفيف على مردود الزيوت المستخلصة و لتقييم نشاط مضاد الاكسدة للزيت المستخلصة المتحصل عليها من الاوراق الطازجة للبرتقال المر و كذلك الفيتامين ه كل على حدى. و لدراسة التفاعل بين هاتين الاخيرتين. الاستخراج تم عن طريق الايدغودستيلاسيو و نشاط الاكسدة قيم عن طريق القدرة على استرجاع الجذر . هته الدراسة اظهرت بان التجفيف ينقص من مردود الزيوت المستخلصة و من اجل نشاط الاكسدة للعينات كل على DPPH اظهرت الدراسة بان الفيتامين و الزيت المستخلصة لهما نشاط متقاربة . اما الجمع بين العينتين فقد كان خصم.

Abstract

The Object of this work is to study the effect of drying on the yield of oil essentielle and to evaluate the antioxidant activity of the oil essentielle obtained from the fresh leaves of bitter orange and vitamin E separately. And to study the interaction between the two latter. The extraction was done by hydrodistillation, and The antioxidant activity was determined By the capability of trapping the free radical DPPH. This study has shown that drying lowers the yield of essential oil. And for the antioxidant activity of the samples alone have demonstrated that vitamin E and HE has comparable activity. The combination between the two samples was antagonistic.

Keywords : *Citrus aurantium*. Oil essentielle, drying, vitamine E, DPPH, antioxydant, Isobologramme, synergy