



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ Abbès LAGHROUR DE KHENCHELA
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE



Département Sciences de la matière

N° de série :.....

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master (L.M.D)

Spécialité : *Chimie analytique.*

Option : *Chimie analytique et environnement.*

Extraction de l'huile essentielle de citron : étude des caractéristiques physico-chimiques et évaluation de l'activité antibactérienne

Réalisé par : - *Rekai chaima*
- *Lechkheb souhila*

Dirigé par : *Dr. BENALI .CHERIFE Rim*

Membres de jury :
Président : Takouachet redhouane
Examineur : Badis Zakaria

Présenté le : 15/07/2021

Remerciement

Tout d'abord je tiens de remercier ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, le courage, et la patience pour réaliser ce travail.

Ensuite je remercie mon encadrement Dr Benali-Cherif Rim pour toute ces effort exceptionnel pour sa patience, sa disponibilité, et ces précieux conseils qui ont contribués à la réalisation de ce travail.

Je tien de remercie également l'ingénieur de laboratoire LASPI²A Nedjwa Bouzidi et Sara l'ingénieure de laboratoire de Microbiologie 3 et aussi l'ingénieure à la faculté de génie des procédés, université Saleh Boubnider Constantine 3, pour ses compréhension, leur aides, ces encouragement afin de mener à bien le travail expérimentale.

Et enfin J'exprime mes plu sincères remerciements aux membres de jury d'avoir examiné et évalué notre modeste travail.

Chaima @Souhila

Dédicace

Je dédie ce travail avec un très grande honneur à mes proche de tout cœur et notamment

*Mes chers parents pour leur soutien dans toutes les étapes de ma vie,
Mercie de m'avoir toujours laissée faire mes choix,*

*À mes très chers frères : **Abederahim** et **Mouhamed Taha**.*

*À mon binôme **Lechkheb Souhila** pour son effort et son attention
bienveillants dans ce travail.*

*Spécial dédicace à toutes mes amies : **Narimane, Wafa, Zina, Wissem,
Nassima et Asma et Naouel**.*

*À toutes la famille **REKAI**, et **NAILI**.*

*Et enfin à toutes mes camarades de la promotion 2020-2021 chimie
analytique.*

Thaima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A celle qui s'est toujours dévouée et sacrifiée pour moi ; celle qui m'a aidée du mieux qu'elle pouvait pour réussir ; celle qui m'a accompagnée tout au long de ma vie; celle qui a toujours été là dans mes moments de détresse ma très chère mère.

A celui qui m'a toujours encouragée et soutenue moralement, à mon mari le plus cher Hassen a mes enfants Mahdi isshek et ma petite fille Imen, a toute ma famille et tous mes amis.

A toutes les personnes qui me connaissent de près ou de loin.

Souhila

Abstract

The various aspects developed in this dissertation on EOs in general and lemon essential oil specifically indicate that these diverse and multiple plant essences are of economic interest and play an important role in the food, pharmaceutical and cosmetics industries. These substances of chemical composition complex (terpene, aromatic and other compounds...), can be isolated from different plant organs (leaves, fruits, flowers, seeds, bark etc.) by traditional techniques or innovative processes.

In this job, lemon essential oil can be milked by the hydrodistillation method. The results are shown that drying the plant material has a positive effect on the yield of the extracted oil.

Extraction by innovative processes is inexpensive extraction but ultimately giving an unreliable, purer and healthier quality product.

Lemon essential oil has several components; limonene is the major compound in this essential oil.

As a continuation of this work, we studied the antibacterial activity. The results It was found that no zone of inhibition around the discs was observed against *Basillus* and *staphylococcus*. These bacteria have a very high resistance potential against the antibacterial action of lemon EO. In contrast, the strain of *E. coli* has shown relative resistance

Les figures

Figure1 : Le fruit de citron.....	1
Figure 2 : La plante de Citrus limon.	2
Figure 3 : La coupe transversale du citron.....	3
Figure 4 : Composition et propriétés de citron.....	4
Figure 5 : Variétés de citron.....	5
Figure 6 : Les huit pays premier producteurs de citron et lime au monde.	7
Figure 7 : la répartition des zones productives des agrumes en Algérie.....	7
Figure 8 : Structure de l'isomère (R)-limonène.....	10
Figure 9 : Huile essentielles de citron.	12
Figure 10 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (d'hydrodistillation).....	14
Figure 11 : Montage d'extraction par Soxhlet.....	15
Figure 12 : Schéma de l'extraction par expression à froid.....	16
Figure 13 : Montage de l'extraction assistée par micro-ondes.....	17
Figure 14 : Extraction assistée par ultrasons.....	18
Figure 15 : Schéma d'un extracteur par fluide supercritique.....	19
Figure 16 : pilote d'extracteur par CO ₂ supercritique.....	19
Figure 17: la décantation	21
Figure18 : Les différentes étapes.....	21
Figure 19: Méthode d'analyse de chromatographie	23
Figure 20 : Mesure de la valeur R _f	26
Figure 21 : Chromatographie sur colonne.....	29
Figure 22: Le chromatographes (chromatographie en phase gazeuse).....	31
Figure 23 : Le four a l'intérieur	33
Figure 24 : Système de détection du signal.....	33
Figure25: Montage de l'hydrodistillation.	39
Figure 26: les étapes d'extraction de l'huile essentielle de citron	42

Figure 28 : Huile essentielle de citron obtenue par l'expérience 2	45
Figure29: Mesure de la densité (photo prise au laboratoire LASPI²A pendant notre expérience)	47
Figure 30 : Masse de 0.2 ml de l'HE de citron	48
Figure31:La masse de 0.2 ml d'eau distillée	48
Figure 32 : Solution avant le titrage	49
Figure 33 : Solution après le titrage.....	49
Figure34 : Résultats des mesures expérimentales.	51
Figure35 : Masure du PH.	52
Figure 36 : Pilote d'extraction par CO2 supercritique.....	53
Figure37 :l'huile essentielle de gingembre extraite par le CO2 supercritique.....	54
Figure 38 : L'huile essentielle de gingembre extraite par HD	54
Figure39: La chromatographie sur couche mince	56
Figure 40 : les étapes de la chromatographie sur couche mince.....	58
Figure 41 : Les souches bactériennes.....	60
Figure.42 : Test antibactérien d'huile essentielle.....	62
Figure43 : Étude de l'activité antibactérienne.	65
Figure 44 : comparaison entre le rendement des deux expériences.	66
Figure 45: Chromatographie sur couche mince	68
Figure 46: L'effet de l'H.E de citron sur E.coli, staphylocoque, et Bacillus.....	70

Les tableaux

Tableau 1 : Composition biochimique moyenne de citron. [9]	4
Tableau 02 : Principaux Composants du citron [10]	5
Tableau 03 : Variétés de citronniers à cultiver en pleine terre ou en pot selon la région. [11]	6
Tableau 4: Compositions chimiques de l'HE du citron.....	11
Tableau 5: Compositions chimiques de l'HE du citron.....	69
Tableau 6: Résultat d'activité antibactérienne de HE sur les souches bactériennes.....	70

Liste des abréviations:

HE : huile essentielle.

EAM : extraction assisté par micro-ondes.

ESC : Extraction supercritique CO₂.

CCM : chromatographie sur couche mince.

U.V : ultras violet.

LASPI²A : Laboratoire des Structures Propriétés et Interactions Interatomiques.

Lim : limonène.

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

DIF : détecteur à ionisation de flamme.

SM : spectrométrie de masse.

GC/MS : chromatographie phase gazeuse couplé à la spectrophotométrie de masse

CMB : la concentration minimale bactéricide

CMI : la concentration minimale inhiber

IR : indice de rétention.

R_f : Facteur de rétention.

R% : Rendement.

d²⁰ : Densité à 20°C.

Ia : L'indice d'acide.

Is : Indice de saponification.

Ie : Indice d'ester.

PH : potentiel d'hydrogène.

HCl : Acide chlorhydrique.

KOH: Hydroxyde de potassium.

KMnO₄ : permanganate de potassium.

MH : Muller Hinton.

E-coli : Escherichia coli

M: Molaire (mol/l).

N: Normalité.

°C : Degré Celsius.

µl : micro litre.

ml : millilitre.

g : gramme

Kg : kilogramme

mm : millimètre

nm : nanomètre.

KHZ : kilohertz.

h : Heure.

min : minute.

Introduction générale

Chapitre I : Matière végétale et les huiles essentielles.

I- Matière végétale

Introduction.

- 1- Description du citron.
- 2- Composition du citron.
- 3- Principaux constituants du citron
- 4- Les principaux composés contenus dans le fruit de citron et son jus.
- 5- Variétés de citron.
- 6- Les bienfaits de citron.
- 7- Production de citron.
- 8- Production de citron

7-1- production mondiale.

7-2- production Algérienne.

II : Les huiles essentielles.

Introduction.

- 1- Définition des huiles.
- 2- Critère organoleptique d'une huile essentielle.
- 3- Propriétés physique d'une huile essentielle.
- 4- Propriétés chimique d'une huile essentielle.
- 5- Caractéristique d'huile essentielle du citron.
- 6- Composition chimique.
- 7- Utilisation d'huile essentielle.
- 8- Conclusion.

Chapitre II : Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

I-Différentes méthodes d'extraction.

I-1- Les méthodes conventionnelles (classique).

I-1-a- Hydrodistillation.

I-1-b- Extraction de Soxhlet.

I-1-c- Extraction par l'expression a froid.

I-2- Les méthodes d'innovation (nouvelles techniques).

I-2-a- Extraction consistée par micro-ondes.

I-2-b- Extraction par ultrasons.

I-2-c- Extraction par CO₂ supercritique (ESC).

3-Choix de la méthode d'extraction.

4- Principaux paramètre d'extraction.

5- La décantation.

II- La chromatographie.

II-1- La chromatographie sur couche mince.

II-b- Chromatographie sur colonne.

II-c- La chromatographie en phase gazeuse.

III- Activités biologiques des huiles essentielles.

1- Activités antioxydantes.

2- Activités antiacidités.

3- - Activité antimicrobienne.

4- Activités antibactérienne.

4-1- Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne.

4-1-a- Aromatogramme.

4-1-b- Micro-atmosphère.

4-1-c- Détermination des CMI et CMB.

Chapitre III : Matériels et méthodes expérimentale et discussions des résultats.

1^{ère} Partie : L'expérience et le montage.

- 1- Introduction.
- 2- L'extraction d'huile essentielle de citron

2^{ème} Partie : La décantation.

- 1- L'objectif et les étapes de décantation.
- 2- Calcule de rendement d'huile essentielle.

3^{ème} Partie : Caractérisation physicochimique de l'huile essentielle.

I-Propriété physicochimique.

- I-1- Détermination de la densité.
- I-2- Densité relative d^{20} .
- I-3-L'indice d'acide.
- I-4- Indice de saponification (Is).
- I-5- Indice d'ester (Ie).
- I-6- Mesure de pH.

4^{ème} Partie : Pilote d'extraction par CO₂ supercritique (université Saleh Bounider Constantine)

- 1- Description de pilote d'extraction par CO₂ supercritique
- 2- Circuit de CO₂
- 3- Conclusion

5^{ème} partie : La chromatographie sur couche mince.

- 1- Mode opératoire.
- 2- Le facteur de rétention .
- 3- la chromatographie sur couche mince.

6^{eme} Partie : Test de mesure du pouvoir antibactérien.

- 1- Origine et choix des souches bactériennes.
- 2- Test de l'activité antibactérienne par la méthode des aromatoigrammes.
- 3- Le matériel nécessaire.
- 5- Les résultats des expériences.

7^{eme} Partie : Résultats et discussions.

I- Introduction.

- 1- Calcule du rendement (%).
- 2- Résultat d'analyse physico-chimique de l'huile extraite.
 - 2-1- Propriétés organoleptiques.
 - 2-2- Propriétés physicochimiques.
 - 2-2-a- Résultat de mesure de la densité.
 - 2-2-b- Résultats de mesure de l'indice d'acide, de saponification, d'ester, et du pH.
- 3- Analyse de la composition chimique de l'HE par CCM.
- 4- L'activité antibactérienne.
- 5- Conclusion.

Conclusion générale.

Sommaire

Chapitre I	Matière végétale et huile essentielle
I- Introduction générale	1
1- Description des Citrons	2
2- Composition du citron	3
3- Principaux constituants du citron	4
4- les principaux composés contenus dans le fruit de citron et son jus :	4
5- Variété de citron.....	5
6- Les bienfaits du citron	6
7- Production du citron.....	7
7-1 Production mondiale	7
7-2 Production Algérienne	7
II- Les huiles essentielles.....	8
Introduction	8
1- Définition	8
2- Critères organoleptiques d'une huile essentielle	8
3- Propriétés physiques de l' HE	9
4- Propriétés chimiques	9
5- Caractéristiques d'HE du citron	9
6- Composition chimique	9
7- Utilisation des huiles essentielles	11
8- Conclusion	12
Chapitre II : Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.	
Introduction	13
I- Différentes méthodes d'extraction :.....	13

I-1- Les méthodes conventionnelles (classique) :	13
I-1-a Hydrodistillation (Entraînement à la vapeur d'eau) :	13
I-1-b- L'extraction de Soxhlet :	14
I-1-c- Extraction par « l'expression à froid »	15
I-2- Les méthodes d'innovation (nouvelles techniques)	16
I-2-a- Extraction assistée par micro-ondes	16
I-2-b- Extraction par ultrasons :	17
I-2-c- Extraction par CO₂ supercritique (ESC) :	18
3- Choix de la méthode d'extraction	19
4- Principaux paramètres d'extraction	20
5- La décantation:	20
5- Conclusion	21
II- La chromatographie	22
II-1- La chromatographie sur couche mince	23
II-b- Chromatographie sur colonne	26
❖ Techniques expérimentales	26
✓ Remplissage de la colonne	26
✓ Dépôt de produit a analysé	27
✓ Alimentation en solvant et développement du chromatogramme:	28
II-c- La chromatographie en phase gazeuse	29
III- Activités biologiques des huiles essentielles	33
1- Activités antioxydantes	33
2- Activités antiacidités	33
3- Activité antimicrobienne	33
4- Activités antibactérienne	34
❖ 4-1- Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne	34
4-1-a- Aromatogramme	34

4-1-b- Micro-atmosphère	34
4-1-c- Détermination des CMI et CMB	34
1^{ère} Partie : L'expérience et le Montage	36
1-Introduction.....	36
2- L'extraction d'huile essentielle de citron	36
1 ^{ère} partie : les étapes d'extraction de l'huile essentielle du citron	38
2 ^{ème} partie : La décantation	42
1-l'objectif et les étapes de la décantation	42
2-Calcul du rendement d'huile essentielle	45
3^{ème} Partie : Caractérisation physicochimique de l'huile essentielle.	46
I-Propriété physicochimique	46
I-1- Détermination de la densité	46
I-2- Densité relative d^{20}	47
I-3-L'indice d'acide.....	48
I-4- Indice de saponification (Is).....	49
I-5- Indice d'ester (Ie).....	50
I-6- Mesure de pH.....	51
4^{ème} Partie : Pilote d'extraction par CO2 supercritique (université Saleh Boubnider Constantine).....	52
1- Description de pilote d'extraction par CO2 supercritique	52
2- Circuit de CO2.....	53
3- Conclusion.....	54
5^{ème} partie : La chromatographie sur couche mince	55
1- Mode opératoire	55
2- Le facteur de rétention	56
3- la chromatographie sur couche mince	56
6^{ème} Partie : Test de mesure du pouvoir antibactérien	58

1- Origine et choix des souches bactériennes	58
2- Test de l'activité antibactérienne par la méthode des aromatoigrammes	58
3- Le matériel nécessaire	59
5- Les résultats des expériences	62
Chapitre III	Résultats et discussion
I- Introduction	65
1- Calcule du rendement (%)	65
2- Résultat d'analyse physico-chimique de l'huile extraite	66
2-1- Propriétés organoleptiques	66
2-2- Propriétés physicochimiques.....	66
2-2-a- Résultat de mesure de la densité.	66
2-2-b- Résultats de mesure de l'indice d'acide, de saponification, d'ester, et du pH..	66
3- Analyse de les composition chimique de l'HE par CCM	67
4- L'activité antibactérienne	68
5- Conclusion.....	69

Introduction générale

Introduction générale :

Déjà 40 000 ans avant J.C., les aborigènes australiens utilisaient les plantes aromatiques pour traiter les infections. En Chine, en Inde, les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis fort longtemps. Les pays arabes ont considérablement progressé l'aromathérapie. Mille ans avant J.C., les perses semblent avoir inventé la distillation, mais il faudra attendre 2000 ans pour que ce procédé soit sensiblement perfectionné. C'est Avicenne, médecin et philosophe, qui a produit la première huile essentielle pure extraite à partir de roses. (Zhiri, 2006)

Depuis les temps les plus reculés, le monde végétal offre les éléments nécessaires à la survie de l'espèce humaine. En effet, les plantes demeurent la principale source de principes actifs, les huiles essentielles, rencontrent depuis quelques années un succès raidissant dans différents secteurs d'activité aussi bien divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et l'agroalimentaire pour leurs propriété organoleptique et odorants ou encore prouvent être utilisées comme source d'isolat pour les héli synthèses

L'objectif de notre travail consiste à :

La valorisation de l'huile essentielle de citron par son extraction.

l'étude des caractéristiques physico-chimiques du l'huile extraite.

Étude des composants d'huile essentielle par la chromatographie sur couche mince.

Étude de l'activité biologique antibactérienne de l'huile essentielle extraite de citron.

Notre mémoire est structuré comme suit :

Le premier chapitre représente des généralités sur la matière végétale utilisée (le citron) et aussi un aperçu général sur les huiles essentielles, leurs propriétés physique et chimique, leurs compositions et leurs applications.

Le deuxième chapitre, expose des généralités sur les méthodes d'extraction et l'analyse d'huile essentielle par chromatographie sur couche mince, sur colonne , en phase gazeuse, et leur activité antibactérienne

Le troisième chapitre est consacré au matériel, et aux méthodes appliquées pour mener à bien l'ensemble de cette étude et aussi la discussion des résultats obtenus.

Enfin, notre travail est clôturé par une conclusion générale qui résume l'essentiel du travail réalisé.

Chapitre I

Matière végétale

&

Les huiles essentielles



INTRODUCTION

L'origine du citron reste peu connue. Certains prétendent que ce fruit serait né d'un croisement entre le pamplemousse, le cédrat et la lime (citron vert). Le citron est le fruit du citronnier. Parmi les raisons qui ont conféré au citron un poids économique sur la scène internationale figurent ses bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques [1]. Le fruit du a une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables des flavonoïdes, des poly phénols, des caroténoïdes, et les huiles essentielles [2]. Il est riche en sels minéraux, Potassium, en acides, Il est facilement associé à la confection de boissons pour lutter contre les refroidissements tels que le rhume et la grippe et on n'oublie pas leur bienfait sur la santé.

Bien que le fruit soit une source de composés aromatiques [3,4], de nombreux auteurs ont rapporté des propriétés anti oxydantes attribuées aux huiles essentielles extraites de ses écorces. [5]



Figure1 : Le fruit de citron.

1- Description des Citrons :

Le citron est le fruit du citronnier (*Citrus limon*) (Fig. 1), c'est un agrume appartenant à la famille des Rutacée .Son arbre d'une hauteur de 3 à 4 m, En culture, il est souvent taillé, d'une part pour limiter son encombrement, d'autre part optimiser son branchage.et d'une durée de vie d'environ 40 ans, supporte une température minimale de -2°C. Il produit de 30 à 40 t/ha. Les fruits sont juteux, acides et très parfumés. Les plus estimés sont dits « première fleur » (récolte d'octobre à décembre) et « seconde fleur » (mars, avril), Légèrement cireuse d'aspect, elle dégage un parfum très agréable. Ses feuilles sont persistantes, vert profond et luisantes, plus pâles sur leur revers. Elles ont une forme en fuseau, de 6 à 11 cm de long. Les feuilles sont alternes, dentelées et leur pétiole est parfois ailé. Les feuilles sont odorantes. Ils se conservent de 6 à 8 mois. [6]



Figure 2 : La plante de *Citrus limon*.

2- Composition du citron :

Tous les fruits des citrus cultivé ont presque la même structure et se composent de :

- ✓ L'écorce : partie non Comestible du citron.
- ✓ La pulpe : partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers peuvent varier de 5 à 18 [7]. A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du citron permet de distinguer les parties suivantes (Fig. 2)
- ✓ Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur jaune, plus connue sous le nom d'épicarpe, qui recouvre le citron et le protège des dommages. Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au citron son odeur caractéristique.
- ✓ Un mésocarpe (ou albedo) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.
- ✓ La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique. [8]

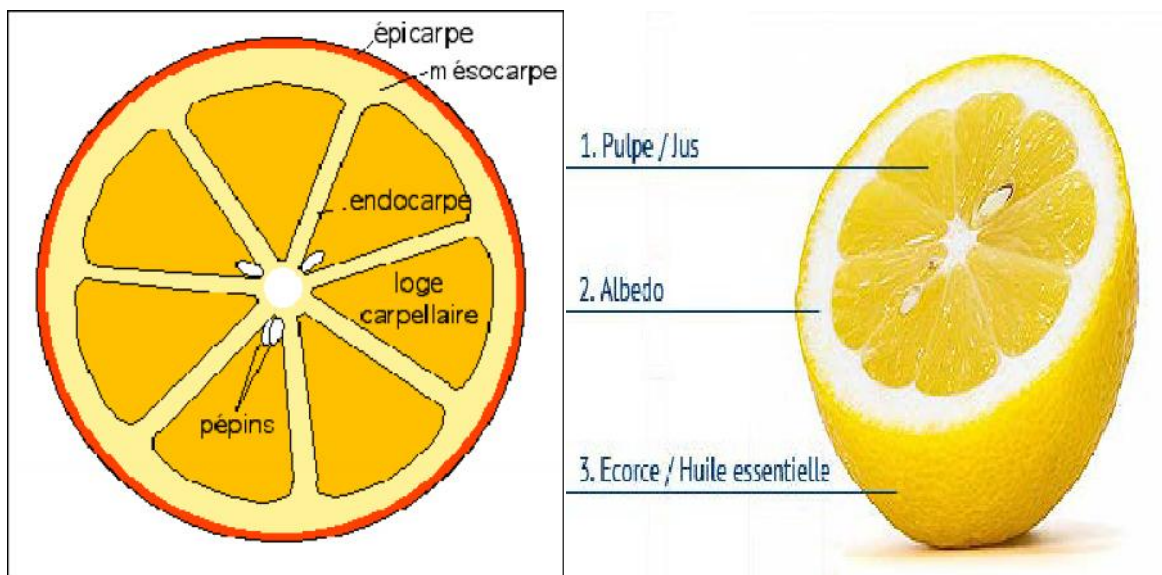


Figure 3 : La coupe transversale du citron.

3- Principaux constituants du citron :

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90 % d'eau, ce qui en

Le jus de citron contient essentiellement trois acides : malique, ascorbique et citrique.

Il contient aussi le phosphore, le fer, le cuivre et le magnésium. (Fig. 3,4)

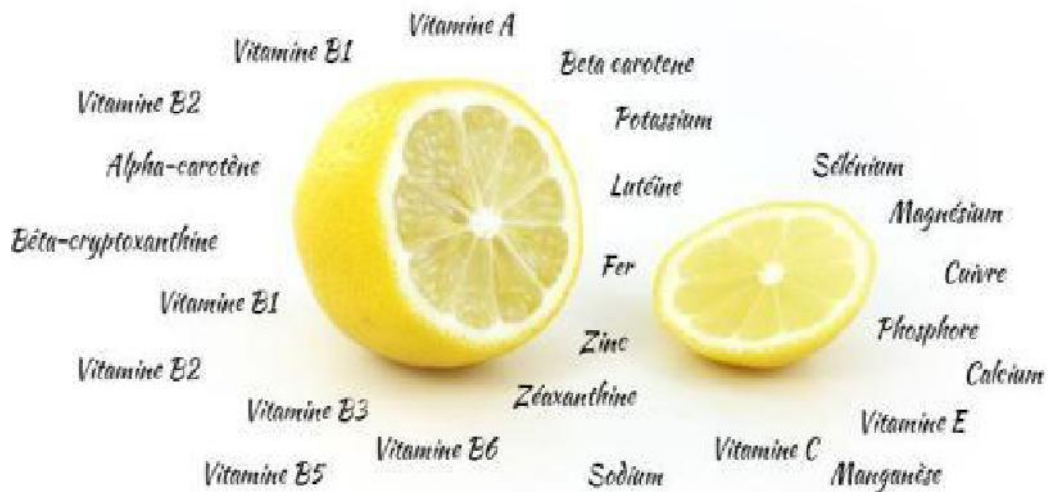


Figure 4 : Composition et propriétés de citron.

4- les principaux composés contenus dans le fruit de citron et son jus :

Le tableau ci-dessous représente les principaux composés contenus dans le fruit de citron et son jus.

Tableau 1 : Composition biochimique moyenne de citron.5 [9]

	Citron sans écorce (5,4 cm de diamètre)/60 g	Jus de citron frais, 63 ml (¼ tasse)/65 g
Calories	17	16
Protéines	0.6 g	0.3 g
Glucides	5.4 g	5.6 g
Lipides	0.2 g	0.0 g
Fibres alimentaires	1.6 g	0.3 g

Tableau 02 : Principaux Composants du citron [10]

Morphologie	Composition
Ecorce du fruit	-Huile essentielle (0.2 à 0.6% séchée, 1.2 à 1.5% fraîche) -Flavonoïdes : hespéridine, diosmine, ériocitrine.... -Caroténoïdes -Coumarines -Pectines -acide
Pulpe	-acide citrique (5 à 8%) -flavonoïdes : hespéridine et ériocitrine -Vitamine C
Graines	Limonoides
Fruit	-Régulation de l'appétit -stimulation de la digestion -citroflavonoïdes ; vagotoniques
Huiles essentielles	- Antibactérienne
Jus	-antioxydant bactéricide

5- Variété de citron.

Parmi les innombrables variétés de citron que nous pouvons trouver sur les marchés voici les plus courantes :



Citron Meyer

Citron caviar

Citronnier

Citronnier 4 saisons

Figure 5 : Variétés de citron

Tableau 03 : Variétés de citronniers à cultiver en pleine terre ou en pot selon la région. [11]

Nom	Caractères	Fructification	Rendement	Période de récolte
Citronnier 4 saisons (citrus Limon)	Jaunes juteux avec quelques pépins	8mois sur 12	Excellent	Janvier à décembre
Citron Meyer	Jaunes à la peau lisse jaunes-orangés, juteux avec quelques pépins	8 mois / 12	Excellent	Janvier à décembre
Citron caviar	verts offrant une chair de petites perles qui éclatent en bouche, au goût vif et citronné avec de légères notes de pamplemousse	8 mois / 12	Bon	Octobre à Février
Citron vert	citrons verts donnant un jus abondant, sans pépins, à la peau très fine	8mois/12	Moyen	De Janvier à Décembre

6- Les bienfaits du citron:

Plusieurs études ont démontré que la consommation d'agrumes, dont le citron et la lime, exerce un effet favorable contre certains types de cancers, Tel que le cancer de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer du côlon, de la bouche et du pharynx.

Ainsi qu'une consommation régulière de flavonoïdes provenant d'agrumes est associé à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires. [12]

Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes des agrumes avaient des propriétés anti-inflammatoires.

Les flavonoïdes et les limonoïdes des agrumes et de leurs jus pourraient avoir un potentiel de réduction de l'hypercholestérolémie. abaissaient le cholestérol sanguin. [13]

7- Production du citron :

7-1 Production mondiale :

La production et la consommation mondiale d'agrumes ont connu une période de forte croissance depuis le milieu des années 80. Les citrons sont généralement Produits sous des climats plus froids, tels que l'ouest des États-Unis, l'Espagne, l'Italie et l'Argentine. Ils sont également adaptés à des climats secs (Egypte, Iran, Inde, etc.). Selon l'organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture des Nations Unies (FAO), en 2015 le Mexique, l'Union Européenne et l'Argentine étaient les plus grands producteurs au monde des citrons et des limes. [14]

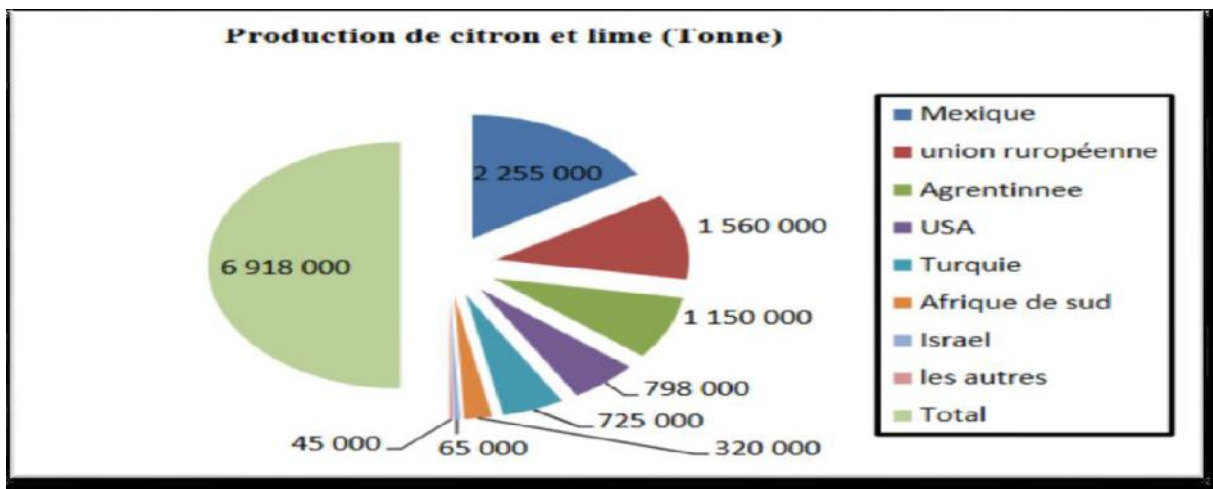


Figure 6 : Les huit pays premier producteurs de citron et lime au monde [14]

7-2 Production Algérienne :

En Algérie, la culture des agrumes représente un segment stratégique. Selon les dernières Statistiques [15], l'agrumiculture couvre actuellement une superficie totale de 64 323 ha, disposait d'une superficie de 4 365 Ha pour la culture de citron, la production obtenue durant la saison 2011-2012 est de 760 823 tonnes. [15]



Figure 7 : la répartition des zones productives des agrumes en Algérie

II- Les huiles essentielles**Introduction**

L'huile essentielle est assez universelle, son utilisation date de plus de 7000 ans (on trouve les premières traces chez les aborigènes d'Australie avec fumigation). [16]

Les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction. Les huiles conduisant à la plus grande production comprennent l'orange, le citron, le pamplemousse, la mandarine.

1- Définition :

On appelle huile essentielle, aussi appelée « essence » pour les agrumes, des molécules volatiles odorantes et hydrophobes des composés aromatiques obtenues à partir d'une matière végétale botaniquement définie (soit à partir de racines, d'écorce, de feuilles, de fleurs ou de tubercules), soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par extraction mécanique appropriée sans chauffage. [17]

Selon la Norme française AFNOR NF T75-006 une huile essentielle est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

Selon l'association française de normalisation [18] : définit une huile essentielle comme étant une substance volatile et odoriférante sécrétée par les plantes aromatiques.

2- Critères organoleptiques d'une huile essentielle :

Les critères organoleptiques sont définis comme les caractéristiques perceptibles par les organes des sens. Dans le cas d'une HE, ces critères peuvent varier d'une origine géographique à une autre.

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques communes comme le fait d'être liquides à température ambiante, d'être volatiles et entraînables à la vapeur d'eau.

Elles sont aussi très odorantes et incolores ou jaune pâle sauf pour l'huile essentielle de cannelle, girofle, camomille matricaire, vétiver et bouleau où la couleur est relativement foncée. [19]

3- Propriétés physiques de l' HE :

Les huiles essentielles ont aussi des propriétés physiques communes. Elles ne sont pas solubles dans l'eau mais en revanche elles le sont dans les solvants organiques et huiles végétales. Leurs densités sont inférieures à « 1 » sauf les huiles essentielles de cannelle, girofle, et ail. Elles sont sensibles à l'oxydation, conservation limitée, à la lumière et à la chaleur. Les huiles essentielles ont des indices de réfraction élevés et des pouvoirs rotatoires. [20]

4- Propriétés chimiques

Les caractéristiques chimiques des huiles essentielles sont magiques. Il en résulte que les HE constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses, aboutissement de ces biosynthèses, en particulier celle des isoprénoides (Monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, caroténoïdes). [21]

5- Caractéristiques d'HE du citron :

Essence et huile essentielle présentent les mêmes propriétés et précautions à l'exception de la photosensibilisation qui existe uniquement pour l'essence.

Nom botanique : Citrus limon.

Famille botanique : Rutacées.

Origine : Italie.

Procédé d'obtention : Expression à froid de la partie externe de l'écorce.

Partie utilisée: zestes.

Couleur: jaune pâle.

Odeur : fraîche, agréable, douce et citronnée.

Aspect : liquide mobile limpide. Peut troubler légèrement.

Parfum : agrume, frais et délicat.

6- Composition chimique

La composition chimique de nombreuses huiles essentielles a été décrite. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte.

Les huiles volatiles sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$, les composés oxygénés

dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones et des phénols [22].

La norme ISO : NF T 75-335 (1995) a donné la composition de l'huile essentielle extraite par expression de l'écorce du citron avec un rendement de 1,2 à 1,5%. Les principaux constituants sont le limonène (65 à 70%), le citral (1 à 5%), le bêta-pinène (4 à 9%), le gamaterpène (9 à 12%), le linalol (1,5%), le cinéole, d'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l'alpha-terpinéol, le camphène et l'alpha-bisabolène.

Le limonène est un hydrocarbure aliphatique liquide incolore classé comme monoterpène cyclique (Fig.7) et est le principal composant de l'huile d'écorces d'agrumes. L'isomère D, présent plus couramment dans la nature sous forme de parfum d'orange, est un agent aromatisant dans la fabrication des aliments. Le **limonène**, LIM, de formule brute $C_{10}H_{16}$. Il est présent dans de nombreuses huiles essentielles à partir desquelles il peut être obtenu par distillation. À température ambiante, c'est un liquide incolore à odeur brillante, fraîche et propre d'orange, caractéristique des agrumes.

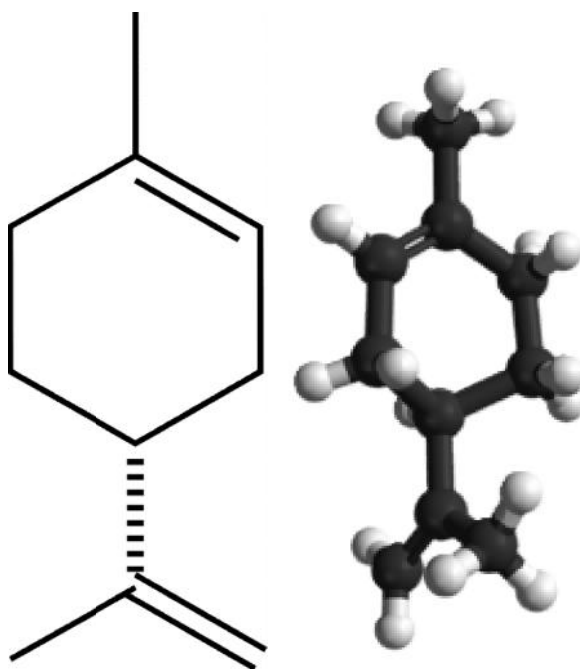


Figure 8 : Structure de l'isomère (R)-limonène

Le tableau suivant présente les compositions chimiques de l'HE de citron.

Tableau 4: Compositions chimiques de l'HE du citron.

N°	composants	%
1	Limonène	51.40
2	-Pinene	17.04
3	-Terpinene	13.46
4	-Pinene	3.07
5	Geraniol	2.43
6	-Myrcene	2.37
7	Nerol	1.50
8	Isocaryophyllene	1.23
9	Neryle acétate	1.05

7- Utilisation des huiles essentielles :

Depuis plusieurs années, les huiles essentielles ont envahies de nombreux produits de la vie courante. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, ou tout doit être beau et sentir bon même pour masquer les odeurs des produits purs souvent désagréables. Comme dans le secteur des produits ménagers. Et les arômes alimentaires. [23]

Les huiles essentielles ont été utilisées aussi comme une source majeure de médicaments et produit de base dans les industries pharmaceutiques et la médecine douce grâce à leurs richesses en métabolites secondaires. Les huiles essentielles peuvent également être ajoutées dans les produits cosmétiques, et principalement la cosmétique bio, est également un secteur

qui utilise de plus en plus d'huiles essentielles. On les retrouve dans de nombreux produits comme : savons, shampoings, gel-douches, crèmes des soins.

Les H.E de citron (Fig 8) sont utilisées pour la préparation des parfums, désodorisant, les bougies parfumées et les savons. Couramment utilisée pour ses propriétés blanchissantes et purifiantes, en industries alimentaires comme aromatisants, en confiseries, pâtisseries, les glaces. En aromathérapie avec les essences d'HE de Citrus, il est recommandé pour traiter : insomnies, anxiété, calme les palpitations, antirides, vasodilatatrice. [24]

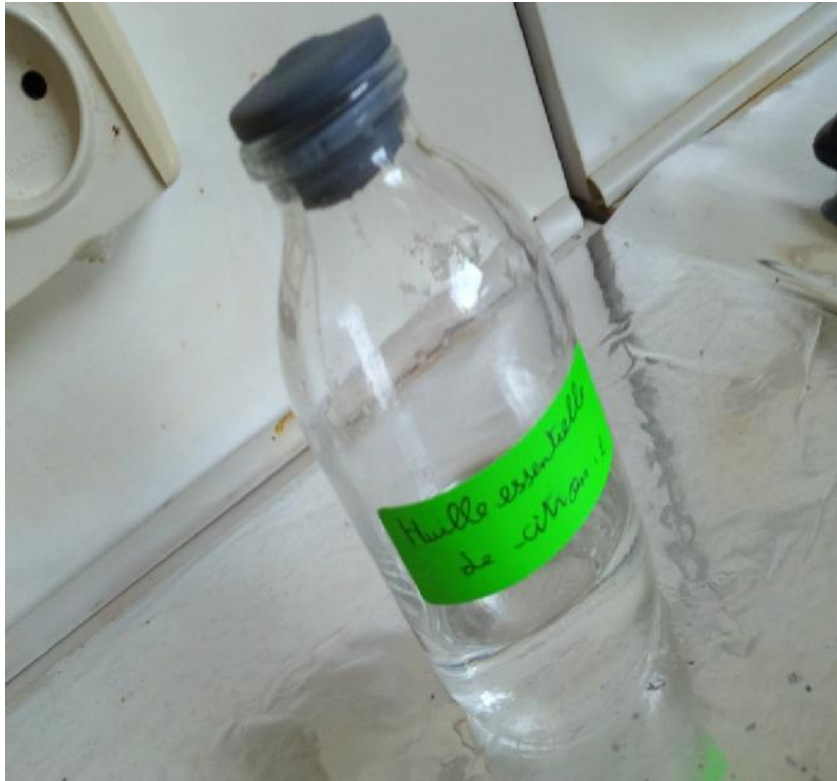


Figure 9 : Huile essentielles de citron.

8- Conclusion :

Les différents aspects développés dans cette étude sur les HE indiquent que ces essences végétales divers et multiples représentent un intérêt économique jouent un rôle important dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétologique. Ces substances de composition chimique complexe (composés terpéniques, aromatiques et autres...), peuvent être isolées à partir des différents organes de plantes (feuilles, fruits, fleurs, graines, etc.)

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

Introduction :

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un, ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant. L'extraction des huiles à partir des substances végétales est une opération complexe et délicate, qui s'est développée considérablement, et qui trouve une large application dans de nombreux processus de fabrication des différents domaines industriels : pharmaceutique, cosmétique, parfumerie et alimentaire. Elle a pour but, en effet, de capter et recueillir les produits les plus volatils, subtils et les plus fragiles qu'élabore le végétal, et cela sans en altérer la qualité. La complexité de la structure du matériel végétal ainsi que la grande variété de composés à extraire (poids moléculaires différents, polarité, lien avec la structure, ont conduit à l'apparition d'une grande variété de technologies d'extraction. Ces technologies peuvent être classifiées en deux catégories conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et innovantes (développées plus récemment).

I- Différentes méthodes d'extraction :

Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales telles que les méthodes conventionnelles (utilisées depuis longtemps) qui sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Et les méthodes d'innovation (développées plus récemment).

I-1- Les méthodes conventionnelles (classique) :

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve :

I-1-a Hydrodistillation (Entraînement à la vapeur d'eau) :

C'est une technique plus ancienne largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange (eau + huiles essentielles) et l'huile essentielle est séparée de la

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

phase aqueuse par différence de densité (Fig.9) [25] L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur Décomposition. [26]

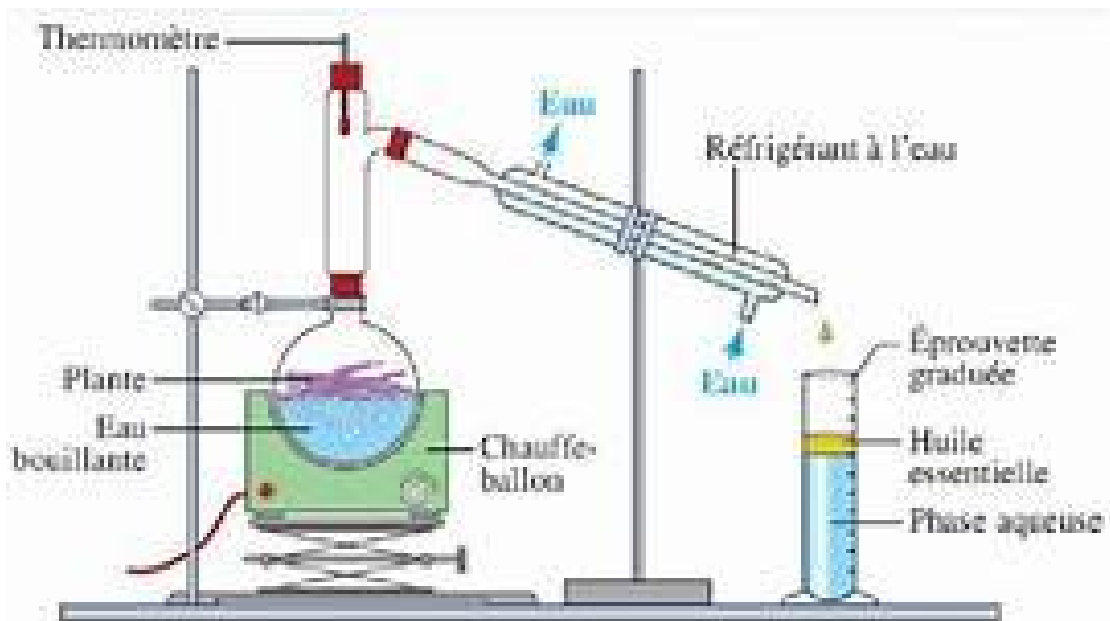


Figure 10 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (d'hydrodistillation).

I-1-b- L'extraction de Soxhlet :

Est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction [27] Le principe (Fig.10) consiste à placée la matière végétale dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée.

Les diverses applications, la bonne reproductibilité, l'efficacité et l'aisance avec laquelle les extraits sont manipulés, sont les avantages spécifiques de l'extraction par Soxhlet. Et parmi les inconvénients de cette méthode on a :

- Le temps d'extraction est long.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

- Une grande quantité de solvant est nécessaire.
- Il est impossible d'accélérer le processus par agitation.
- La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation.

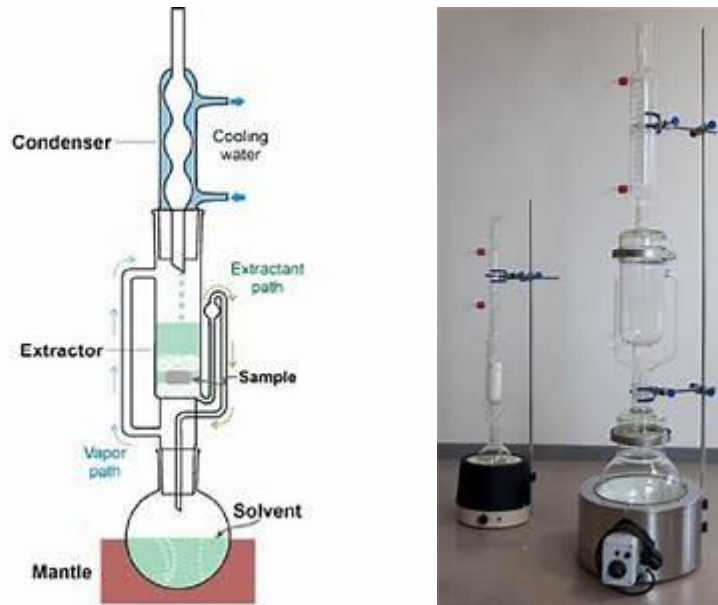


Figure 11 : Montage d'extraction par Soxhlet

I-1-c- Extraction par « l'expression à froid »

Il s'agit d'une méthode d'extraction sans chauffage (Fig.11) utilisée pour certaines variétés de fruits ou plantes comme par exemple les agrumes (citron, orange...etc). Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. [28] L'écorce ou les fruits des plantes sont pressés à froid, la pulpe et l'H.E sont séparées à la centrifugeuse, les zestes d'agrumes sont séparés des fruits, les croûtes sont broyées ou hachées puis pressées pour extraire l'huile qui est séparée de la phase aqueuse par différence de densité. [29]



Figure 12 : Schéma de l'extraction par expression à froid

I-2- Les méthodes d'innovation (nouvelles techniques)

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

Parmi les nouvelles techniques, on trouve :

I-2-a- Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes(Fig.12) est devenue une méthode très répandue et appliquée dans le domaine d'extraction à partir des substances végétales. Cette technique se base sur la capacité de certaines molécules, comme l'eau, à convertir l'énergie des ondes en chaleur. Le principe de l'extraction assistée par Micro-ondes (EAM) basé sur le transfert rapide d'énergie et le chauffage simultané de l'ensemble «solvant et matrice végétale solide ». En absorbant l'énergie des micro-ondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction [30]

L'EAM a été considérée en tant qu'alternative à l'extraction solide-liquide traditionnelle des métabolites pour plusieurs raisons :

- La réduction du temps d'extraction,
- La réduction de la quantité de solvant utilisée,
- L'amélioration du rendement d'extraction.

L'EAM présente les avantages suivants :

- La simplicité d'utilisation.
- N'est pas coûteuse.
- Elle est considérablement rapide.

Et parmi les inconvénients de cette méthode on a :

- La température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150°C) ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. [31,32]
- Le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires. [33]
- Le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait. [34]

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

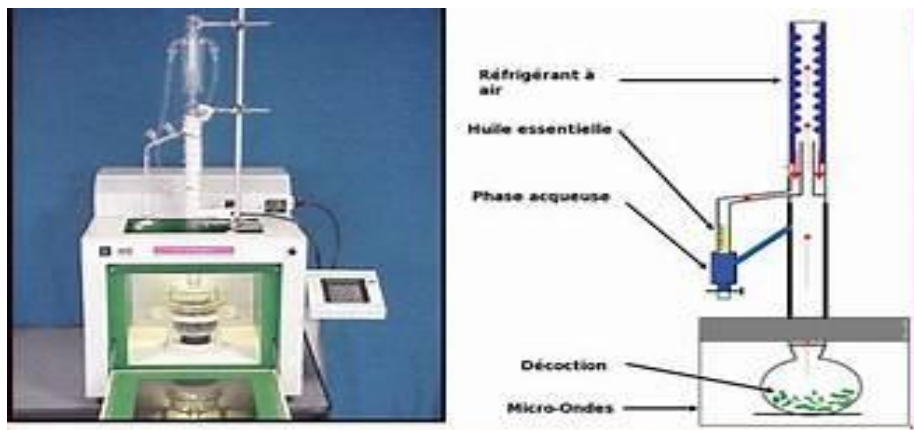


Figure 13 : Montage de l'extraction assistée par micro-ondes

I-2-b- Extraction par ultrasons :

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons (Fig.13) (20–100kHz), est une nouvelle méthode, émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique. Le principe de l'extraction par ultrasons consiste à immerger la matière première dans l'eau, ou dans une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques :

- Les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion
- Le contenu des cellules peut être « lessivé » après destruction des parois cellulaires, afin de récupérer l'ensemble des composés d'intérêt.
- Les principaux avantages de l'utilisation des ultrasons dans l'extraction de solide-liquide sont :
 - L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction
 - La Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles.
 - Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes.
 - Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.
 - Simple et facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie. [35]

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.



Figure 14 : Extraction assistée par ultrasons

I-2-c- Extraction par CO₂ supercritique (ESC) :

C'est une nouvelle technologie utilisée industriellement qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. Cette technique d'extraction se rapproche énormément de l'extraction par solvants, le CO₂ supercritique servant de solvant pour ce procédé. L'état supercritique représente un des états de la matière obtenue en menant le gaz au-dessus de sa température critique (T_c) ou en comprimant le liquide au-delà de sa pression critique (P_c). Le CO₂ atteint son état supercritique lors d'une exposition à 31,1°C et 73,8 bars. Tous les solvants à l'état supercritique peuvent servir de solvant pour cette méthode. Mais le CO₂ demeure un bon choix de solvant car sa faible température critique facilite son obtention. Ainsi, le CO₂ possède un coût relativement faible et contrairement à d'autres solvants comme l'hexane, le CO₂ ne présente aucun risque d'inflammation lors de sa manipulation.[35] [36] [37] L'extraction par CO₂ supercritique consiste à broyer préalablement le végétal puis de l'introduire dans un extracteur. Le CO₂ subit une compression ainsi qu'un chauffage afin d'atteindre son état supercritique. Le CO₂ supercritique circule dans l'extracteur, au contact du végétal. L'HE se dissout dans le CO₂, puis ce dernier retrouve son état gazeux, permettant sa séparation avec l'HE. (Fig. 14,15) Le CO₂ supercritique fonctionne en circuit fermé, il peut en effet servir à un nombre infini d'extractions.[35] [36] [37] [38].L'extraction aux fluides supercritiques présente les avantages suivants :

- permet d'extraire des substances odorantes peu volatiles et plus particulièrement les matières sèches qui sont récalcitrantes aux méthodes d'extraction traditionnelles.

ce gaz ne pollue pas et est inoffensif car il est recyclé à l'intérieur du système.

- Les huiles essentielles extraites de cette manière ont l'avantage d'éviter la dégradation thermique associée à la distillation à pression atmosphérique.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

- L'extrait récupéré ne contient aucune trace de solvant résiduelle.
- Cette méthode n'a donc pas d'impact néfaste sur l'environnement.

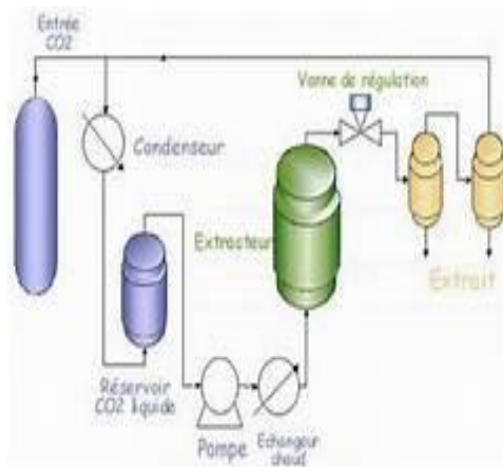


Figure 15: Schéma d'un extracteur par fluide supercritique (Wang and Weller 2006).



Figure16 : Pilote d'extraction par CO2 Supercritique

3- Choix de la méthode d'extraction

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte [39]

4- Principaux paramètres d'extraction

Les principaux paramètres à prendre en compte dans les opérations fondamentales

D'extraction de matières premières naturelles aromatiques sont :

- La volatilité
- La solubilité
- La taille et la forme des molécules constitutives
- L'adsorption.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

5-La décantation:

Cette opération permet de séparer deux phases; (phase organique et phase aqueuse) ayant des densités différentes.

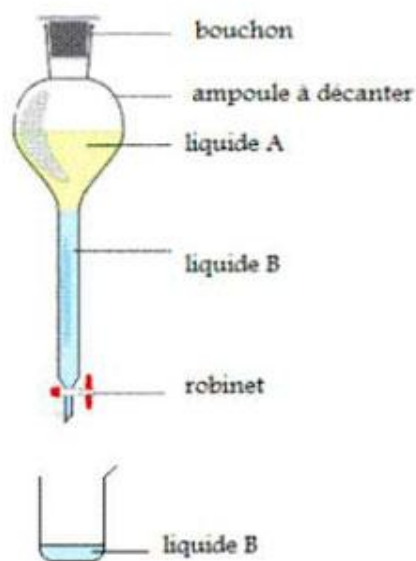
Le principe de la séparation se base sur la différence de la solubilité d'une substance dans deux solvants différents.

L'isolement d'une substance, naturelle ou synthétique. Nécessite souvent une extraction avec un solvant et des lavages destinés à l'élimination des impuretés

Ces opérations se terminent toujours par une décantation.

La décantation est la procédé permettant la séparation de deux phases liquides non miscibles s'effectue sous l'action de la pesanteur, en les laissant reposer, et se séparer conformément à leur densité [40].

Cette opération est réalisée dans le laboratoire en utilisant une ampoule à décanter.



LA DECANTATION

La décantation consiste à séparer 2 liquides **non miscibles** (qui ne se mélangent pas) entre eux.

Le liquide **le moins dense** (A) reste en surface.

Le liquide **le plus dense** (B) se retrouve en bas. Il pourra être retiré par le bas en ouvrant le bouchon (appel d'air)

Figure 17: la décantation.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

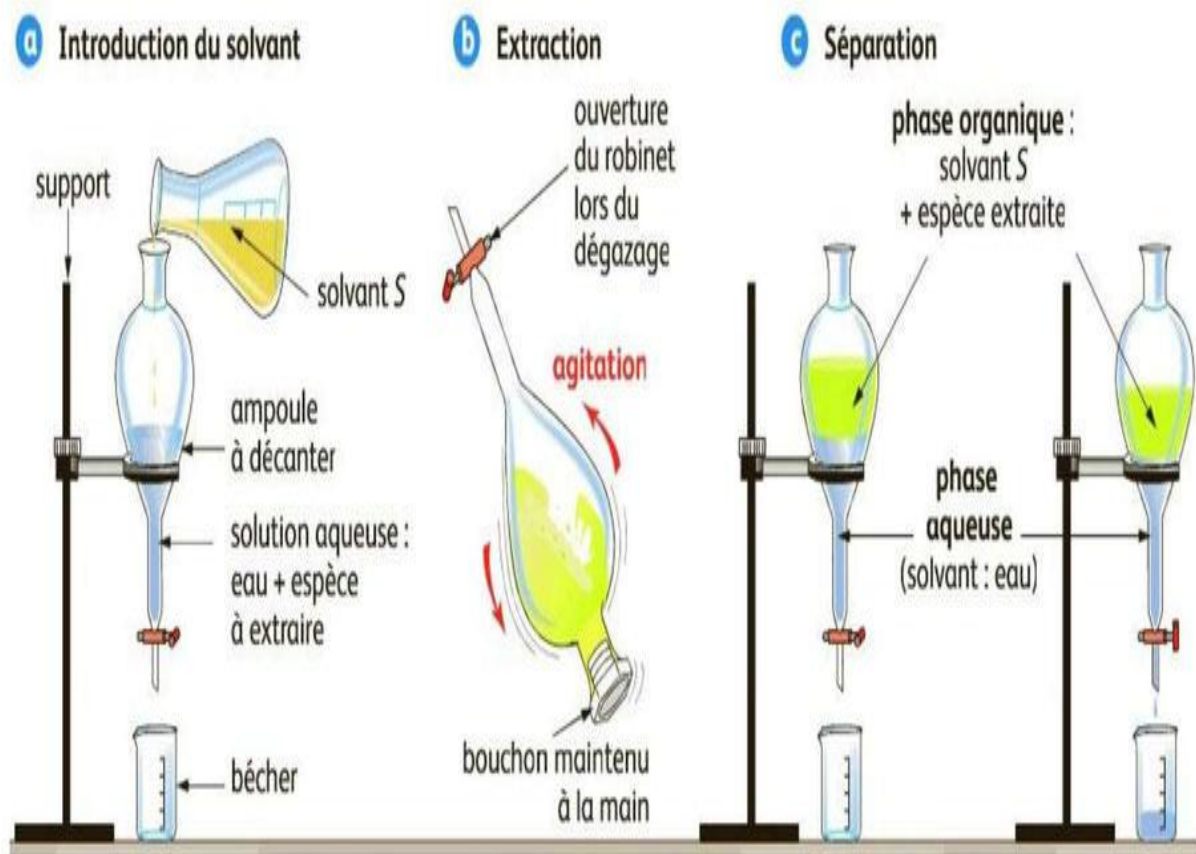


Figure18 : Les différentes étapes.

5- Conclusion

On conclue que :

- L'extraction des HE par des techniques traditionnelles ou des procédés innovants. Il a été montré que les nouvelles méthodes sont beaucoup plus rentables d'un point de vue coût, rendement et temps d'extraction.
- La méthode la plus adaptée reste celle de l'hydrodistillation car elle est facile à réaliser, peu coûteuse et le rendement des huiles essentielles très élevé. De plus, l'huile essentielle obtenue est on de bonne qualité et la plus naturelle possible. D'ailleurs, c'est cette méthode qui est la plus utilisée dans les usines pour extraire des huiles essentielles

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

II- La chromatographie:

La chromatographie est une méthode d'analyse chimique consiste à séparer les constituants d'un mélange. Elle est universellement employée au laboratoire comme dans l'industrie. Autant pour l'analyse proprement dite que pour la séparation ou l'isolement des corps pure.

Il existe plusieurs méthodes ont en commun l'utilisation simultanée d'une phase stationnaire et d'une phase mobile [41].

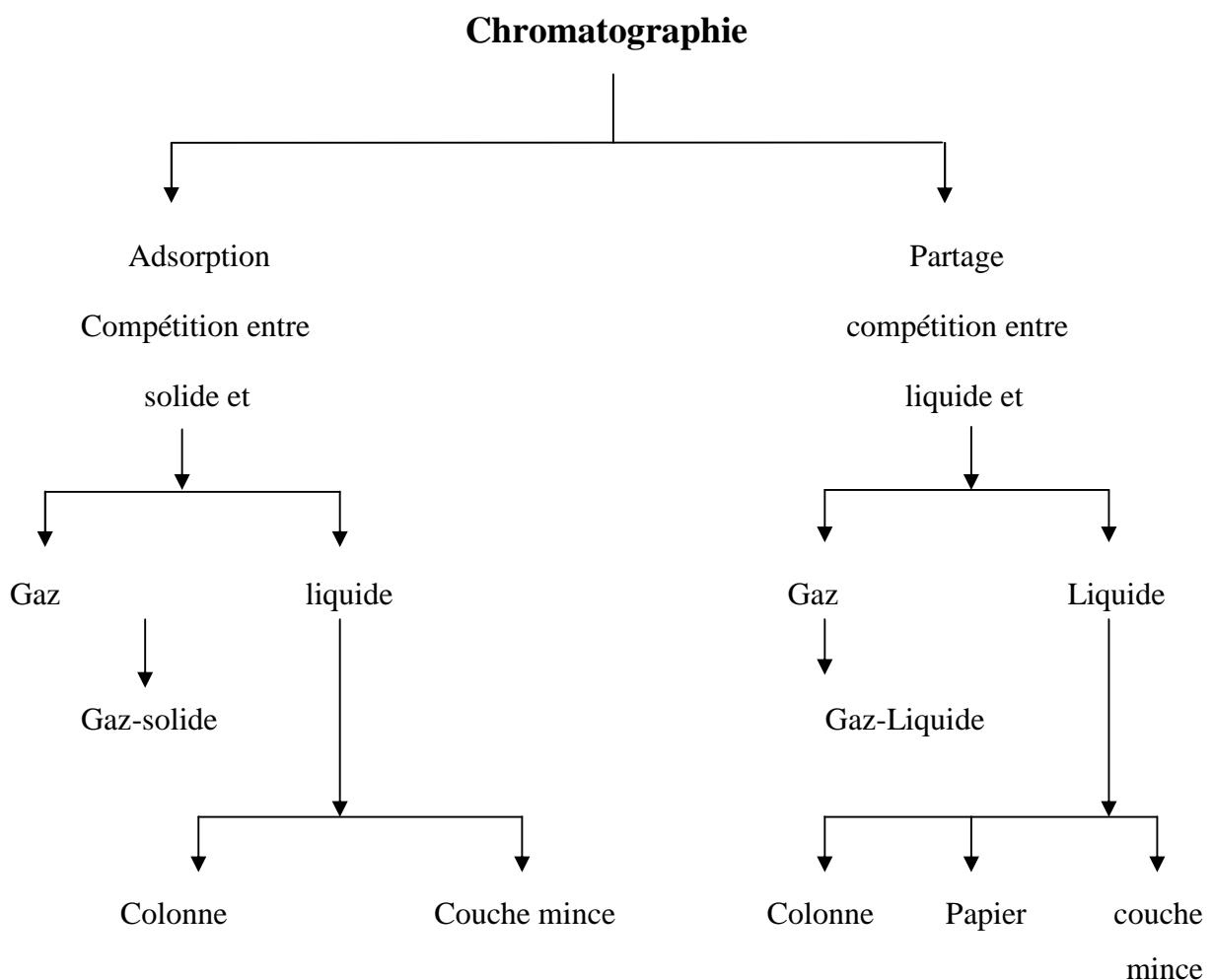


Figure 19: Méthode d'analyse de chromatographie

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

II-1- La chromatographie sur couche mince:

La chromatographie sur couche mince doit être préférée aux chromatographies sur papier, sur colonne ou en phase gazeuse pour la séparation des composants d'un mélange. En effet, l'appareillage est généralement très compact et aussi moins coûteux que celui de la chromatographie en phase gazeuse, les séparations sont beaucoup plus rapides et souvent meilleures qu'en chromatographie sur papier ou sur colonne. Les plaques permettent par ailleurs l'emploi de réactifs corrosifs qui attaquaient les chromatogrammes sur papier.

Enfin, les adsorbants minéraux non fluorescents donnent des taches plus contrastées que le papier et la multiplicité des adsorbants utilisables augmente la souplesse de la méthode.

La chromatographie sur couche mince est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la détermination de la pureté des produits [42].

Elle est également très utilisable dans les laboratoires d'analyse médicale.

En général les séparations sur couche mince s'effectuent sur une plaque en verre recouverte d'une couche mince et adhérente de particules finement divisées; cette couche constitue la phase stationnaire.

Les particules sont semblables à celles qui sont utilisées en chromatographie sur colonne que ce soit d'adsorption ou de partage en mode normal ou en mode inverse par échange d'ions ou exclusion.

- **Techniques expérimentales:**

On prépare une plaque de chromatographie sur couche mince en étalant une suspension aqueuse semi-liquide du solide finement divisé sur la surface propre d'une plaque en verre ou en plastique, ou d'une lame-porte objet pour microscope. Un liant est souvent incorporé à la suspension à fin d'améliorer l'adhésion des particules solides sur la surface et entre elles.

On laisse ensuite reposer la plaque jusqu'à ce que la couche soit sèche et adhère convenablement à la surface dans certains cas, on la chauffe dans un four pendant plusieurs heures.

Les plaques doivent être nettoyées avec un détergent et rincées à l'eau chaude, avant d'être séchées dans un linge. On peut activer les couches de gel de silice, soit en les abandonnant à la

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

température ambiante pendant une nuit, soit en les chauffant 30 à 60 minutes à 105°C - 880 °C pour chasser l'eau.

On dissout les composés dans un solvant organique non polaire et suffisamment volatil pour être éliminé après application.

A l'aide d'un tube capillaire ou micropipette on dépose les échantillons sur le trait de l'origine.

Après le dépôt des échantillons, on place la plaque dans une cuve contenant l'éluant.

On ferme la cuve et on laisse le système quelques minutes ou l'éluant se déplace le long de la plaque par capillarité jusqu'au front.

Les substances de faible polarité migrent plus rapidement que celles qui sont polaires.

Pour la visualisation des plaques on distingue deux méthodes:

- 1- La plaque est exposée à la radiation U.V: de nombreux composés sont détectables par adsorption U.V autour de 254 μm ; d'autres forment des complexes fluorescents au voisinage de 366 μm .
- 2- La plaque est exposée aux vapeurs d'iode « I₂ qui réagit avec un grand nombre de composés organiques formant ainsi des complexes bruns ou jaunes facilement détectables.
- 3- La plaque est immergée dans une solution de K₂MnO₄ jusqu'au front, les

On peut ainsi calculer le facteur de rétention R_f.

Ce dernier définit la position d'un composé sur une plaque ; il est défini par le rapport [44].

$$R_f = \frac{\text{Distance (origine-composé)}}{\text{Distance (origine-front de solvant)}} = h/H$$

La distance parcourue par le composé étant mesurée au centre de tache.

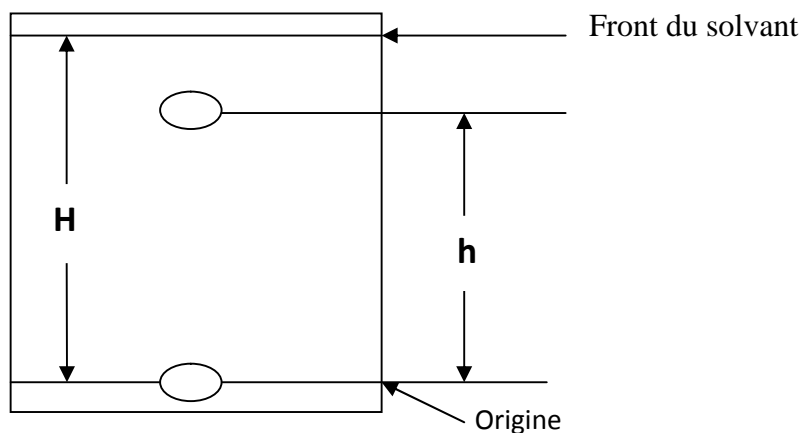


Figure 20 : Mesure de la valeur R_f

II-b- Chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne se base sur des phénomènes d'adsorptions.

La phase stationnaire est alors un solide, comme l'aluminium ou le gel de silice, la phase mobile peut être gaz mais plus fréquemment un liquide. Il y a séparation lorsque l'un des deux composants d'un mélange est plus fortement adsorbé par le solide. Puisque l'adsorption correspond essentiellement à un phénomène de surface, il est évident que le degré de séparation dépend de la surface développée de l'adsorbant. Pour permettre l'élution et recueillir les substances chromatographiées, on choisit un solide ayant une certaine affinité vis-à-vis des substances à chromatographier. Le liquide constituant la phase mobile doit être suffisamment désorbant pour que les substances puissent se déplacer dans la colonne [43].

❖ Techniques expérimentales:

✓ Remplissage de la colonne:

L'opération la plus délicate en chromatographie sur colonne est son remplissage qui doit être le plus homogène que possible et totalement exempt de toute bulle d'air.

Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. Ces conditions sont absolument nécessaires pour éviter que les zones se déforment pendant le développement du chromatogramme.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

Le remplissage de la colonne avec l'adsorbant peut s'effectuer comme suite: on prépare d'abord (dans un bêcher, par exemple) un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des deux solvants employés pour le développement. Ce mélange doit former une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement. La préparation du mélange doit se faire on ajoutant par petites quantités à la fois l'adsorbant dans le solvant. Il ne faut pas faire l'inverse, c'est-à-dire verser le solvant sur l'adsorbant, car la chaleur libérée risque de faire bouillir le solvant et de provoquer la formation de grumeaux dans le mélange. A l'aide d'une entonnoir on verse suffisamment de bouillie dans la colonne pour que l'adsorbant qui se dépose.

Progressivement forme une couche d'environ deux centimètres. Pendant que les particules de l'adsorbant en suspension se déposent lentement, on frappe les parois de la colonne pour favoriser le tassement maximum. On ouvre alors le robinet pour que le solvant coule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée, par portions successives, tout en frappant les parois de la colonne. Lorsque tout l'adsorbant est introduit on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide, qui surnage soit limpide. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau du solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant [44].

✓ Dépôt de produit à analyser :

Le dépôt des produits constitue également une manipulation délicate, car ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne s'il s'agit d'un liquide, il est déposé tel que, dans le cas d'un solide on le dissout dans un solvant.

On ajuste le niveau du solvant pour qu'il soit très légèrement au dessous de celui de l'adsorbant et le sable, ensuite, à l'aide d'une pipette de pasteur on coule l'échantillon au sommet de la colonne en prenant soin de distribuer le liquide le plus également possible sur toute la section et de ne pas brasser la couche superficielle de l'adsorbant et le sable si nécessaire, on ajuste de nouveau le niveau de liquide de la colonne pour qu'il soit un peu au-dessus de celui de sable et l'adsorbant ; cette opération à l'échantillons d'être adsorbé uniformément au sommet de la colonne.

✓ Alimentation en solvant et développement du chromatogramme:

Lorsque l'alimentation en solvant débute, on règle le débit d'écoulement à l'aide du robinet de la colonne.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

Si l'on doit modifier la composition du solvant en cours d'élution, on effectue le changement au moment où son niveau dans la colonne atteint la surface supérieure ou le sable. Le volume de chaque fraction recueillie dépend de la hauteur de la colonne et du développement du chromatogramme. Lorsque les composés qui se séparent forment des zones colorées dans la colonne ou sont fortement fluorescent en U.V, il est facile de les repérer soit directement sur la colonne. Soit dans les fractions recueillies.

La récupération s'effectue alors simplement en réunissant les fractions appropriées et évaporant le solvant.

Lorsque l'analyse des fractions est terminée, on réunit celle qui correspond à des produits identiques.

Les substances obtenues de cette façon sont généralement d'une très grande pureté.

Pour obtenir une bonne séparation il faut suivre certains critères :

- ✓ Le choix de l'éluant (en fonction de polarité des solutés).
- ✓ Le choix de la phase stationnaire (gel de silice, polyamides...).
- ✓ Le choix de la taille de la colonne (longueur et diamètre en fonction de la quantité de produit à purifier).
- ✓ La vitesse d'élution (la plus constante possible et pas trop lente).

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

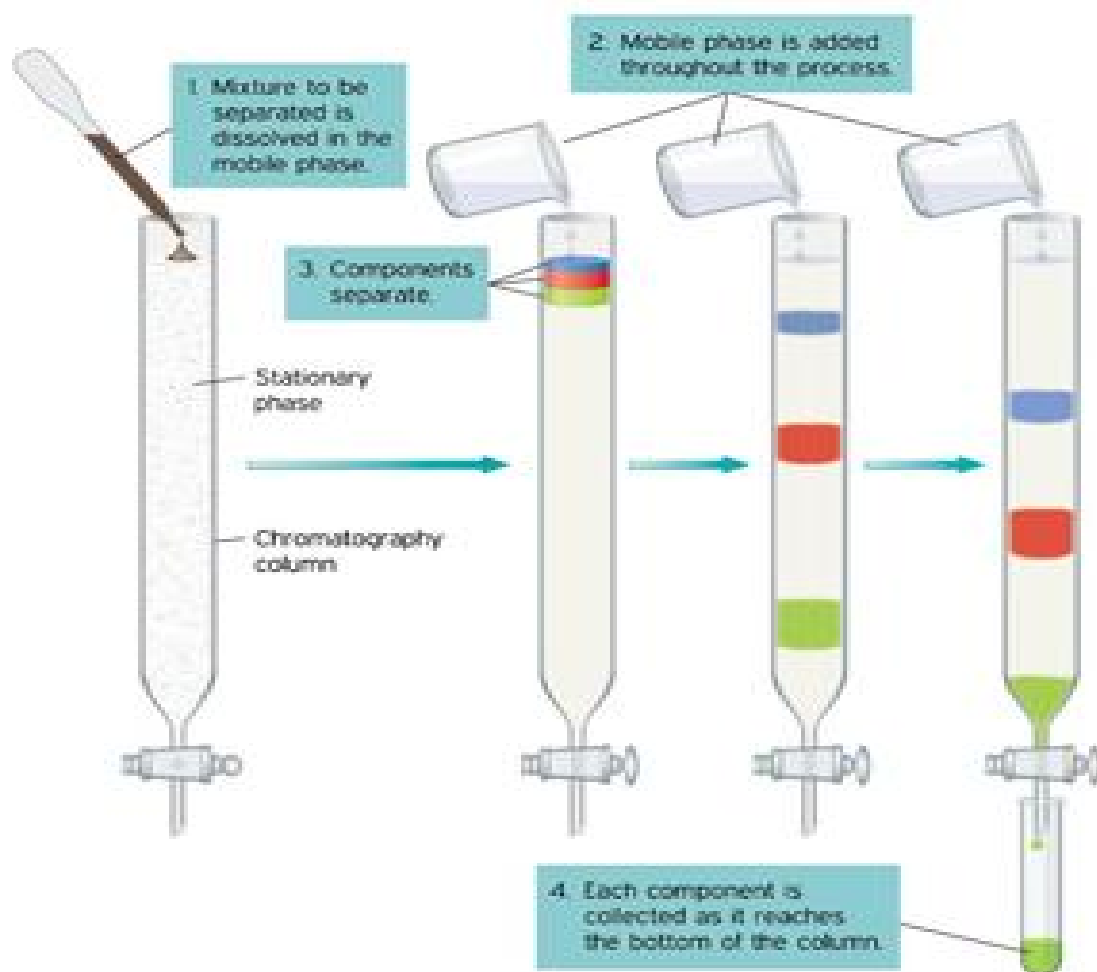


Figure 21 : Chromatographie sur colonne.

II-c- La chromatographie en phase gazeuse :

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) [45]. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) représente l'une des techniques clés de l'identification pour de nombreux composés volatils contenus dans les huiles essentielles. Son pouvoir de séparation élevé dans une combinaison avec une large gamme de détecteurs est un outil important dans la détermination des différents constituants des huiles essentielles.

Le principe de la CPG (Figure : 1) est basé sur la répartition des constituants à séparer entre deux phases non miscibles : l'une des deux est une phase stationnaire tandis que l'autre est une phase mobile qui passe à travers la phase stationnaire. Dans l'analyse CPG, les composés à analyser sont vaporisés, ensuite élués par la phase mobile à travers la colonne. A la sortie de la colonne, les analytes sont séparés dans le temps en fonction de leurs pressions relatives de

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

vapeur (volatilité) et de leurs affinités pour la phase stationnaire. Lorsque les analytes arrivent au niveau du détecteur (détecteur à ionisation de flamme DIF), un signal est enregistré générant un chromatogramme sous forme de pics qui sont caractérisés par un temps de rétention (Bouchonnet, 2009). Etant donné que l'analyse CPG, utilisant un détecteur DIF, ne fournit pas d'informations structurales des molécules analysées, les indices de rétention plus précis sont utilisés comme le principal critère pour l'attribution des pics. Le système de l'indice de rétention est fondé sur le fait que chaque analyte est classé en fonction de sa position entre les deux n-paraffines. En outre, le calcul de l'indice est basé sur une interpolation linéaire de la longueur de la chaîne de carbone de ces paraffines. Ces indices calculés sont appelés dans la littérature indice de rétention (IR). Dans la caractérisation des composés volatils, la série de référence la plus communément appliquée est celle des n-alcanes (Tranchant, 2004). La spectrométrie de masse (SM) permet l'identification des analytes. Elle peut être définie comme l'étude des systèmes par la formation d'ions gazeux, avec ou sans fragmentation, qui sont ensuite caractérisés par leur rapport masse sur charge et l'abondance relative.

L'analyte peut être ionisé par voie thermique, par un champ électrique ou par un impact énergétique d'électrons, des ions ou des photons. En outre, le potentiel de la CPG couplée à la SM est bien connu pour la détermination des composés volatils contenus dans les huiles essentielles. Le procédé d'identification le plus fréquent en GC/MS consiste à comparer les spectres de masse inconnus avec ceux contenus dans la librairie SM de référence (Mc Nair et Miller, 1997). Les indices de rétention en combinaison avec les informations structurales fournies par la GC/MS sont utilisés pour confirmer l'identité des composés [46].

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.



Figure 22: Le chromatographes (chromatographie en phase gazeuse)

Les appareils de chromatographie gazeuse sont appelés **chromatographes**. Ils sont principalement composés:

- d'un **four** (type chaleur tournante) qui permet une programmation de température ajustable de 20 °C (–100 °C pour certains systèmes) à 450 °C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide;
- d'un **système d'injection**, qui va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser. L'injection peut se faire d'une manière manuelle ou automatique à l'aide d'un échantillonneur;
- d'une **colonne** (*capillaire ou remplie*) qui peut faire plus de 50 mètres, sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire;
- d'un **système de détection**, qui va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier. Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur, des logiciels sur PC remplacent avantageusement les enregistreurs analogiques sur papier.
- D'un système de détendeur-régulateur pour les gaz utilisés (hélium, dihydrogène, diazote et air comprimé). Sur les chromatographes modernes, on

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

trouve des systèmes électroniques pour la régulation des gaz qui sont également purifiés par des cartouches filtrantes.

Il existe des chromatographes de différentes tailles. Cela va du portable (env. 10 kg) conçu pour les analyses *sur le terrain*, à ceux utilisés dans la purification des gaz rares.

Il existe trois sortes de chromatographes :

- Chromatographe industriel, utilisé pour la purification des produits, c'est ainsi qu'Air Liquide a conçu et fabriqué un chromatographe de grande taille pour la purification du krypton et du xénon.
- Chromatographe à colonne, utilise un produit (phase stationnaire) imprégné ou greffé sur un support solide inerte à forte capillarité
- Chromatographe capillaire, ou la phase stationnaire est fixée directement sur la surface interne du tube capillaire creux, dont le diamètre interne est de l'ordre du demi ou quart de millimètre.

La chromatographie de type gaz-liquide, largement utilisée de nos jours par rapport à celle de type gaz-solide, se fonde sur le partage du soluté entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide immobilisée sur un support inerte.



Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

Figure 23 : Le four a l'intérieur



Figure 24 : Système de détection du signal.

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

III- Activités biologiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens et donc comme conservateur naturel qui préserve l'aliment des différentes altérations oxydatives ou microbiennes [47].

Les études sur la composition chimique des huiles essentielles en relation avec leurs activités biologiques sont abondantes. Nous mentionnerons ce qui suit :

1- Activités antioxydantes :

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué. Les résultats montrent que les huiles essentielles de Citrus limon constituent une bonne source d'antioxydants naturels recherchés pour leur innocuité relative. Le pouvoir antioxydant, de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire.

Les huiles essentielles des Citrus. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes responsables de l'activité antioxydant. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir [48].

2- Activités antiacidités :

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué, Les résultats montrent que les huiles essentielles de Citrus limon constituent une bonne source d'antacidité naturels recherchés pour leur innocuité relative. Le pouvoir antiacidités, de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire [49].

Les huiles essentielles des Citrus. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes responsables de l'activité antiacidité.

3- Activité antimicrobienne :

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles ont été reconnues depuis des siècles et avec la demande croissante de changements dans la législation, les tendances de consommation et l'isolement croissant des pathogènes résistants aux antibiotiques, alternatives aux produits chimiques des bactéricides doivent être trouvés [50].

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

Les huiles essentielles sont utilisées pour leur propriété antiseptique contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne dont beaucoup de ces huiles ont des activités antibactériennes remarquables contre un large spectre [51]. Elles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire. Il existe cependant quelques exceptions [52].

4- Activités antibactérienne :

Les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leurs propriétés antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de microorganisme, ces propriétés sont utiles pour les infections chez les humains.

La méthode de diffusion en disques (Aromatogramme) sur milieu gélosé, nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Citrus limon* (Lisbon) vis-à-vis des souches bactériennes testées, la sensibilité des souches est classée selon l'échelle de **Ponce et al .**

4-1- Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne :

4-1-a- Aromatogramme :

C'est une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore des disques [52] (**Pibiri, 2006**). Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries [53].

4-1-b- Micro-atmosphère :

C'est une technique dérivée de la méthode précédente. Le protocole des Micro atmosphère est techniquement proche de celle des aromatogrammes, la différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés [54].

Chapitre II Méthodes d'extraction et analyse d'huile essentielle par chromatographie et ses activités biologiques.

4-1-c- Détermination des CMI et CMB :

Il est nécessaire de définir, pour caractériser l'activité antimicrobienne d'un composé, des paramètres simples. Pour l'activité antibactérienne, le plus courant est la « Concentration Minimale Inhibitrice » (CMI), elle correspond à la concentration nécessaire pour inhiber totalement la croissance d'un nombre déterminé de germes après un temps d'incubation donné [56]. Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricides et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre : la concentration minimale bactéricide (CMB), elle correspond à la concentration en agent inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps bien déterminer [57].

Chapitre III

Partie expérimentale



1^{ère} Partie : L'expérience et le Montage

1-Introduction

Cette partie de travail a été effectuée au niveau du laboratoire LASPI²A (Laboratoire des Structures Propriétés et Interactions Interatomiques) et au niveau du laboratoire de Microbiologie 3, de l'université Abbes Laghrour de Khenchela. Dans ce chapitre on va exposer en détail la méthodologie expérimentale adoptée au cours de cette étude en présentant tout le matériel et les produits utilisés et les modes opératoires réalisées.

2- L'extraction d'huile essentielle de citron :

Cette partie pratique a pour objectifs de valoriser le zeste de citron (écorce) pour l'extraction de son huile essentielle, l'écorce du citron est connue par sa richesse en huile essentielle par rapport aux autres parties du fruit. L'huile est extraite par la méthode d'hydrodistillation puis on a récupéré l'huile par la décantation en ajoutant le cyclohexane.

Ensuite on a fait la chromatographie sur couche mince pour séparer les composants de l'huile. On a également étudiées les propriétés physiques et chimiques de l'huile extraite tel que :

1/ L'indice d'acide

2/ Le PH

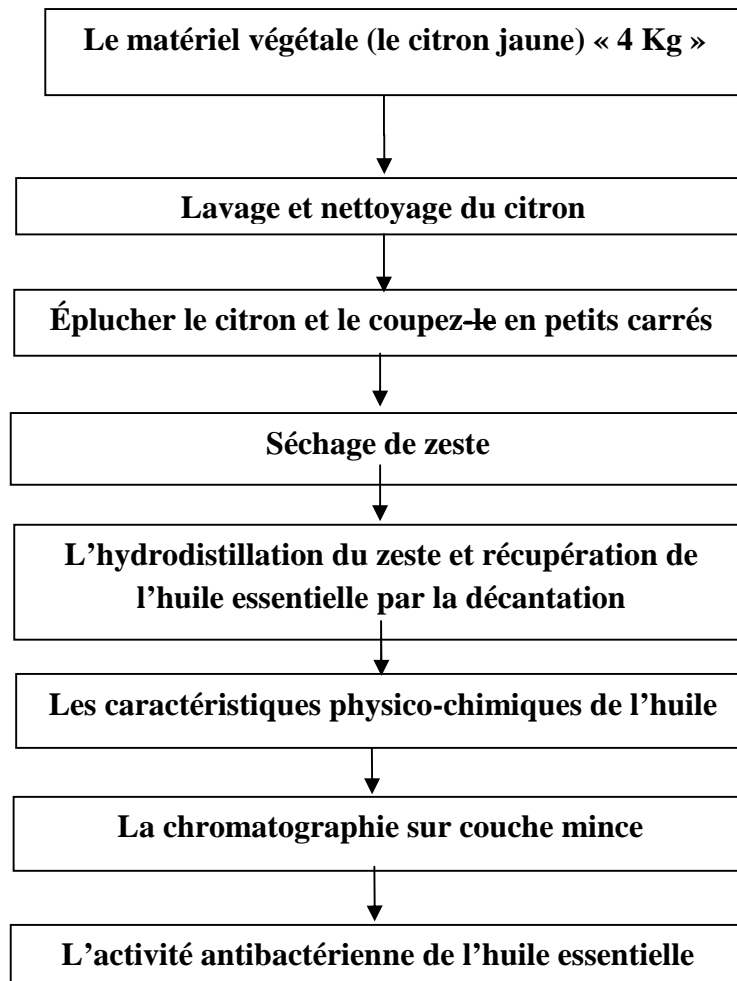
3/ La densité relative

4/ L'indice de saponification

5/ L'indice d'ester.

Et finalement l'activité antibactérienne.

La méthodologie du présent travail est décrite dans l'organigramme suivant :



Pour réaliser le montage de l'hydrodistillation on a besoin du matériel suivant :

1. Un chauffe ballon.
2. Ballon 500 ml a deux colles.
3. Tête de distillation.
4. Thermomètre.
5. Réfrigérant à eau.
6. Entrée sortie d'eau pour le refroidissement.
7. sortie d'eau pour le refroidissement
8. Erlenmeyr

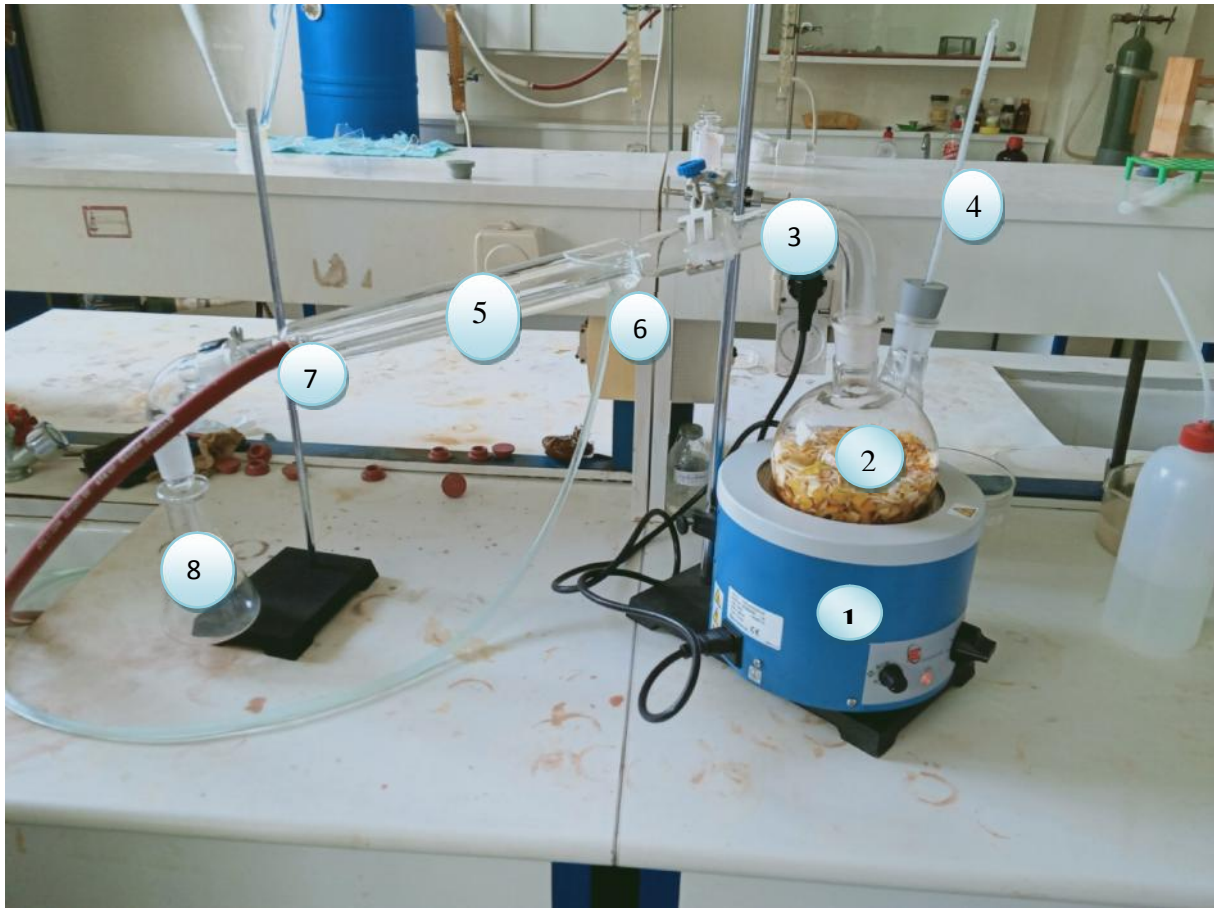


Figure25: Montage de l'hydrodistillation.

1^{ère} partie : les étapes d'extraction de l'huile essentielle du citron :

La première partie est représentée en détails dans la (fig.1).

On commence par l'étape 1, le lavage de citron.



Etape1 : Lavage du citron



Etape 2 : Éplucher le citron pour récupérer l'écorce



Etape 3 : Couper l'écorce en petits carrés



Etape 4 : Le séchage du zeste.



Etape 5 : La pesée du zeste après le séchage.



Etape 6 : Déposer tout le zeste dans le ballon avec **700 ml** d'eau distillée
ainsi que **2 grains** de pierre ponce

Après les étapes précédente, on place le ballon dans le montage ensuite on allume le chauffe ballon, ainsi le robinet d'eau afin de laisser passer l'eau à travers le réfrigérant.



Etape 7 : Le montage finale d'hydrodistillation.

Nous avons commencé l'expérience à **10h27** min, la première goutte de distillat est apparues à **12h44** min à une température égale à **87 C⁰**.

On a obtenu 530 ml de distillat (eau + huile essentielle).



Etape 9 : la première goutte de distillats.

Figure 26: les étapes d'extraction de l'huile essentielle de citron

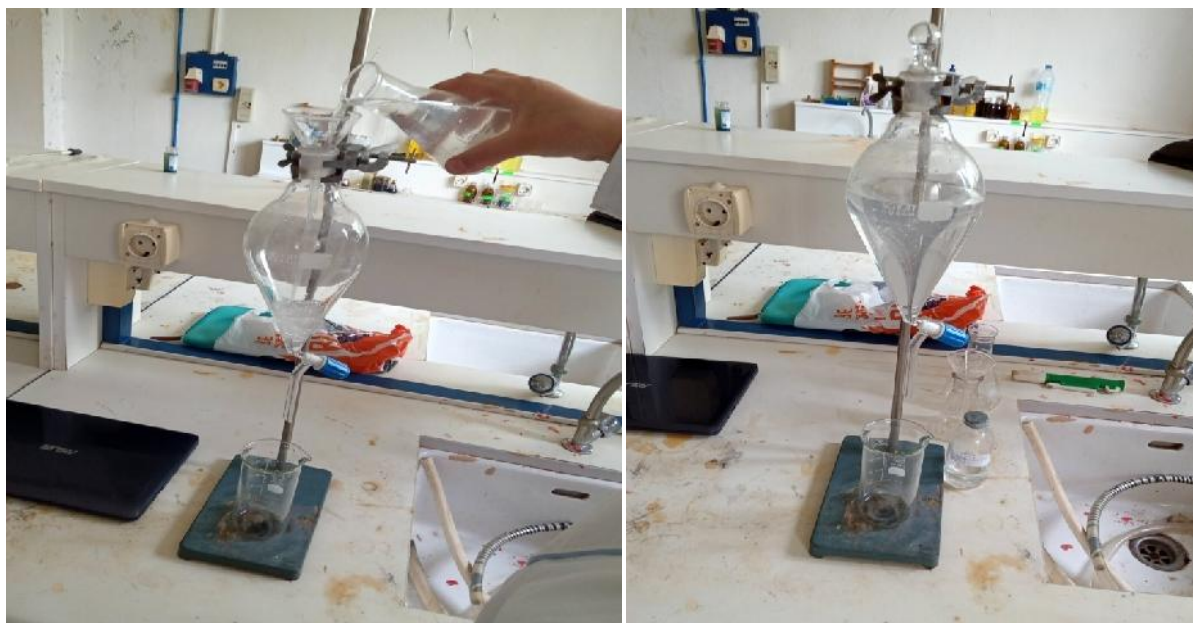
2^{ème} partie : La décantation

1-l'objectif et les étapes de la décantation

L'objectif de cette partie est la séparation de l'huile essentielle de citron de la phase aqueuse.

Pour extraire l'huile essentielle on va passer par les étapes suivantes :

1/ On place l'ampoule à décanter sur le support, un erlenmeyer sous l'ampoule, On distillat à l'intérieure de l'ampoule



Etape 1 : Montage de décantation.

2/ On ajoute 10 ml de cyclohexane puis on ferme l'ampoule, on l'agite pour la dégazification afin de rééquilibrer la pression à l'intérieur de l'ampoule.



Etape 2 : la séparation de l'huile à l'aide du cyclohexane.

3/On place l'ampoule sur le support et on laisse reposer pendant 1h.



Etape 3 : La séparation des deux phases.

4/Récupération de la phase aqueuse dans un bécher et l'huile dans un flacon.



Etape 4 : Récupération de l'huile de citron.

On va répéter la décantation 3 fois pour récupérer le maximum d'huile essentielle.

Enfin on a obtenu 30 ml (30 g) d'huile essentielle de citron.



Etape5: Huile essentielle de citron obtenue par l'expérience 1.

Figure27. la décantation de l'huile essentielle de citron.

On a répété les mêmes étapes pour 65 g de zeste de citron. On a obtenus 36 ml d'huile essentielle de citron, soit 36 g.



Figure 28 : Huile essentielle de citron obtenue par l'expérience 2

2-Calcul du rendement d'huile essentielle :

Le rendement des huiles essentielles (R%), est défini comme étant le rapport entre la masse des huiles essentielles obtenues après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$\mathbf{R\% = (M' / M) \times 100}$$

Avec :

R%: est le rendement des huiles essentielles en pourcentage (%).

M': est la masse des huiles essentielles obtenues en g.

M: est la masse de zeste du citron en g.

*Caractérisation physico-chimique de
l'huile essentielle extraite de la peau de
citron*



3^{ème} Partie : Caractérisation physicochimique de l'huile essentielle.

Aujourd'hui la caractérisation des huiles essentielles est d'une grande importance pour évaluer et déterminer la qualité de ces dernières. Dans notre étude on à réaliser certaines analyses physico-chimiques selon la disponibilité des produits chimiques dans le laboratoire. Toutes les photos présentent dans cette partie ont été prisés au laboratoire LASPI²A pendant nos expériences

I-Propriété physicochimique :**I-1- Détermination de la densité :**

Pour définir la densité ou la masse volumique on a deux méthodes :

On va calculer le rapport entre un certain volume d'huile essentielle et la masse de ce même volume. La densité est ainsi obtenue par (g/cm^3) par la relation suivant :

$$d = m / V$$

d : la densité par (g/cm^3).

m : masse d'huile en (g).

V : volume d'huile en (cm^3).

Ou bien la méthode que nous avons utilisée au laboratoire à l'aide d'une appareil densimètre (Fig.28)

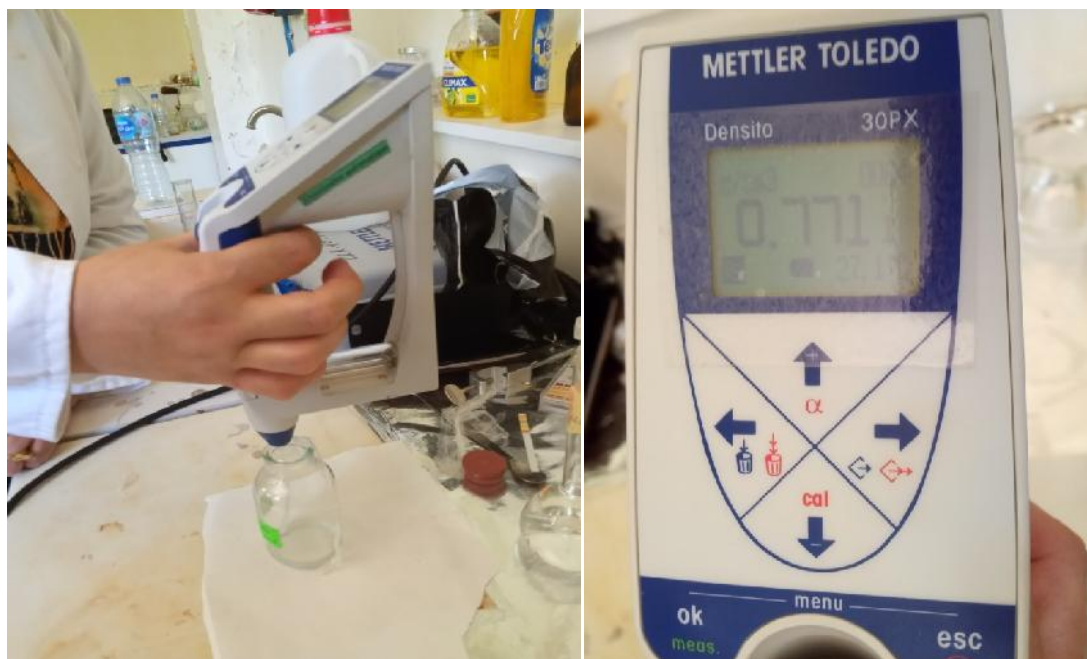


Figure29: Mesure de la densité (photo prise au laboratoire LASPI²A pendant notre expérience)

I-2- Densité relative d^{20}

C'est le rapport du poids d'un certain volume d'huile au poids du même volume d'eau distillée à une température 20°C La densité relative noté « d^{20} » est déterminé par la formule suivante [50] :

$$d^{20} = d_{\theta} + 0.00068 \times (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

Où :

- d^{20} : Densité à 20°C.
- d_{θ} : Densité à la température de mesure.
- θ : Température de mesure.

Principe :

Pour déterminer la densité relative on a la pesée de 0.2ml de l'huile essentielle à l'aide d'une balance électronique de précision à une température bien défini (Fig.29 et30)

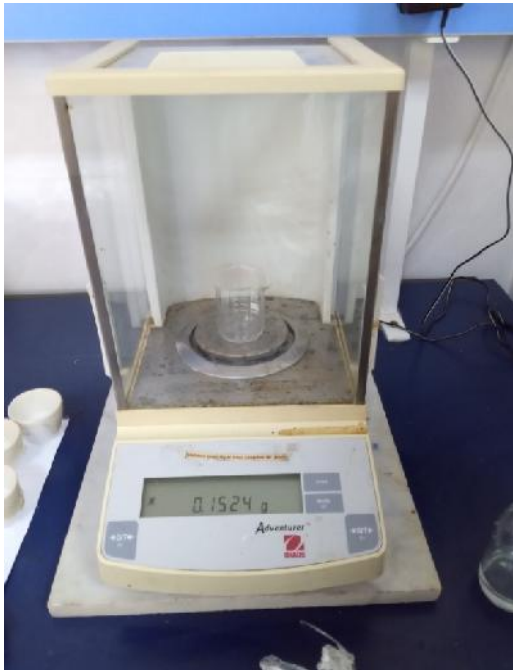


Figure 30 : Masse de 0.2 ml de l'HE de citron



Figure31:La masse de 0.2 ml d'eau distillée

I-3-L'indice d'acide

L'indice d'acide noté « I_a » est le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres renfermés dans un gramme d'huile. L'indice d'acide « I_a » est déterminé par la relation suivant [51]

$$I_a = (56.1 \times V \times C) / m$$

Avec :

- V : Volume en ml de la solution de KOH utilisée pour le titrage.
- C : Concentration en mol/l de solution de KOH.
- m : Masse de l'huile en « g ».

Principe :

Pour mesurer l'indice d'acide on a appliqué le mode opératoire suivant :

- Préparer une solution d'hydroxyde de potassium KOH (0.1N) par la dissolution de 0.561g de KOH dans 100 ml d'éthanol.
- Introduire 1g de l'échantillon (huile essentielle) dans 5ml de l'éthanol, avec l'ajoute de 5 gouttes de phénolphtaléine.
- Après homogénéisation du mélange, commencer le titrage (avec l'agitation en même temps).
- Une fois le virage de la couleur observé la couleur rose apparait, arrêter le titrage et noter le volume de KOH consommé.



Figure 32 : Solution avant le titrage

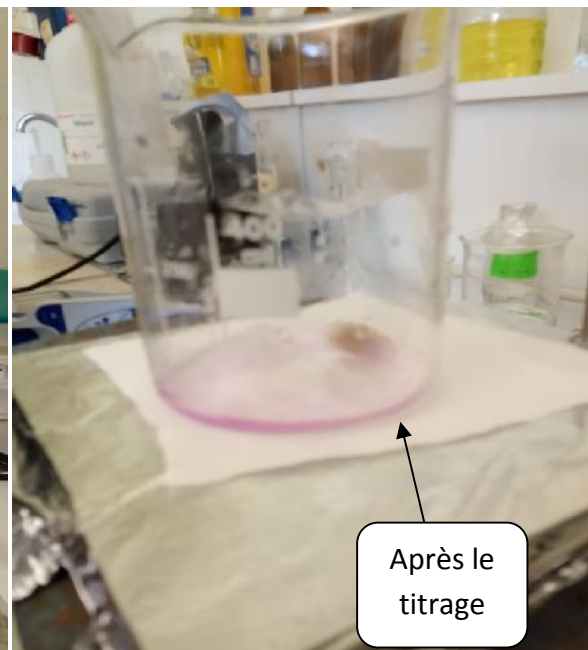


Figure 33 : Solution après le titrage

-4- Indice de saponification (Is)

L'indice de saponification(Is) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans 1gramme de substance.

L'indice de saponification est calculé par l'équation suivant [52] :

$$Is = (V' - V) \times C_{HCl} \times M_{KOH} / m$$

Avec :

- V' : Volume en ml de la solution d'HCl (0.5 M) nécessaire pour la neutralisation de la solution témoin ;
- V : Volume en ml de la solution d'HCl à (0.5M) nécessaire pour la neutralisation de la solution contenant l'huile ;
- C_{HCl} : Concentration de la solution chlorhydrique (0.5M) ;
- M_{KOH} : masse molaire de KOH (56.1 g /mol) ;
- m : masse de l'huile analysée.

Principe

Pour mesurer l'indice de saponification, on a suivi les étapes suivantes :

- Dans un erlenmeyer de 250 ml, peser 1.6g d'huile, et noter la masse pesée avec précision puis ajouter 20 ml de la solution éthanolique de KOH (0.5 M).
- Fermer l'erlenmeyer et chauffer le contenu dans un bain marie pendant 60 min à partir de l'ébullition.
- Lorsque le temps est terminé, laisser le contenu refroidir puis ajouter quelques gouttes de phénolphaléine et titrer par la solution aqueuse chlorhydrique HCl (0.5M), à l'équivalence la solution devient incolore ;
- Noter avec précision le volume d'HCl utilisé lors du titrage.

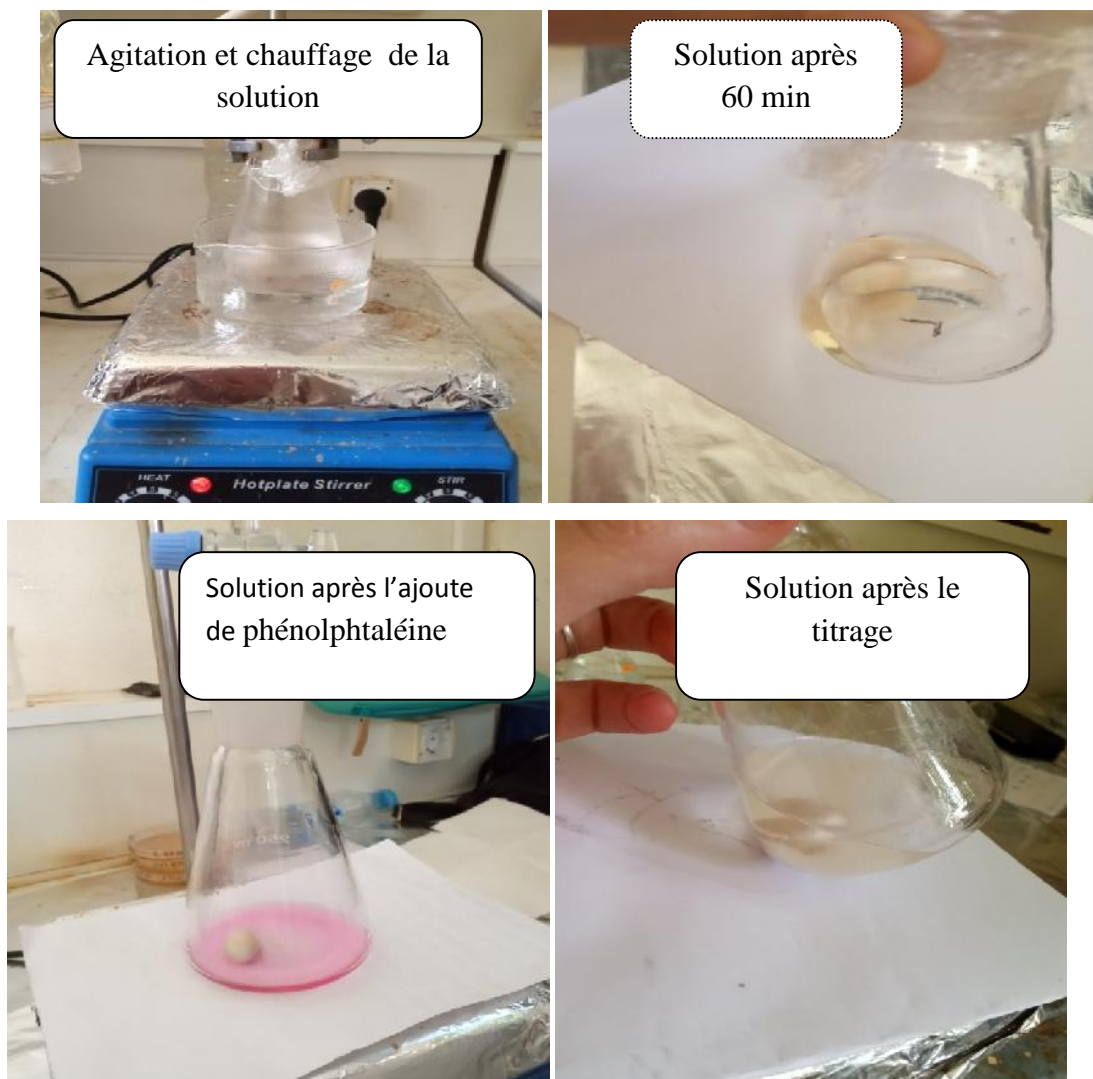


Figure34 : Résultats des mesures expérimentales.

I-5- Indice d'ester (I_e)

L'indice d'ester est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique des esters contenus dans 1g d'huile essentielle [53]. L'indice d'ester c'est la différence entre l'indice de saponification noté « I_s , et l'indice d'acide noté « I_a ». est exprimé par la relation suivant :

$$I_e = I_s - I_a$$

Avec :

- I_e : l'indice d'ester.
- I_s : l'indice de saponification.
- I_a : l'indice d'acide.

I-6- Mesure de pH

Le **pH** est le coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre. Cette dernière est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, et basique s'il est supérieur à 7. [54]

Principe

Pour la mesure du pH des huiles extraites, on a utilisé du papier pH .après immersion du papier pH dans le flacon de l'huile, on note un changement de la couleur du papier, cette couleur sera comparée avec une gamme de couleurs indiquées sur la boîte, d'où on peut en déduire la valeur du pH correspondante.



Figure35 : Mesure du PH.

*Pilote d'extraction par CO₂
supercritique*



4^{ème} Partie : Pilote d'extraction par CO₂ supercritique (université Saleh Boubnider Constantine)

On à visiter le laboratoire de l'université de Constantine 3, département de génie des procédés pour voir l'appareille d'extraction par CO₂ supercritique (fig. 35). Les expériences d'extraction ont été réalisées dans une installation pilote construite par la société SEPAREX chimie fine, France (série 4343 type SF2).



Figure 36 : Pilote d'extraction par CO₂ supercritique.

1. Description de pilote d'extraction par CO₂ supercritique

L'installation comprend les équipements suivants (fig. 36) :

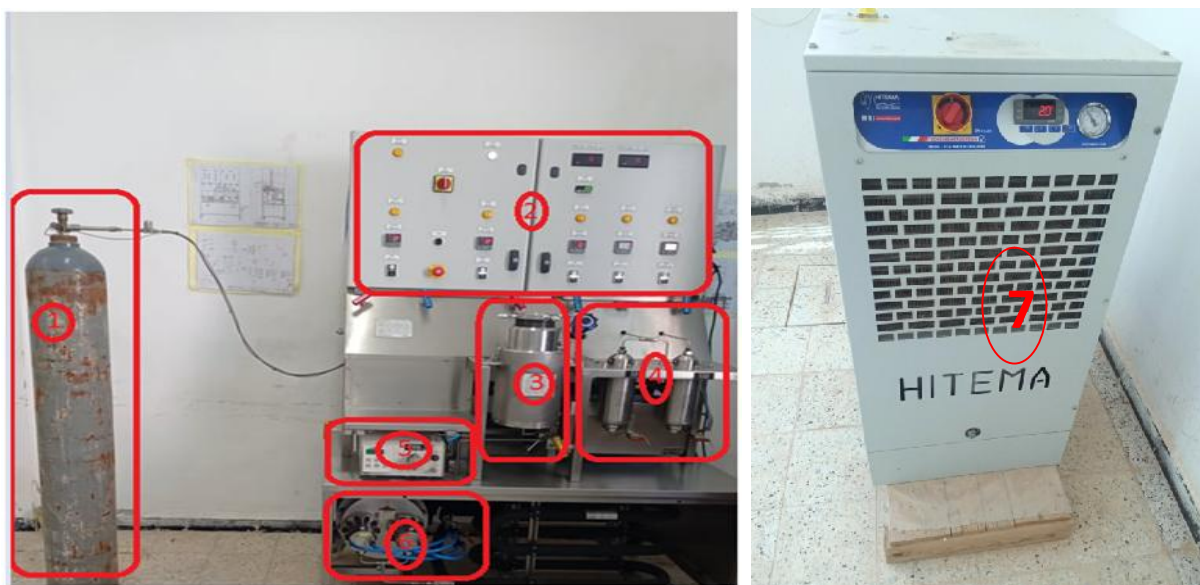


Figure 36 : Composants de pilote d'extraction par CO₂ supercritique

1. Bouteille du CO₂ liquide.
2. panneau d'affichage.
3. Un extracteur cylindrique.
4. Deux séparateurs.
5. Pompe pour le Co-solvant.
6. Une pompe à haute pression.
7. Groupe de refroidissement.

2. Circuit de CO₂

- 1) Le CO₂ sortant de la bouteille se forme d'un gaz puis il refroidit par un refroidisseur qui assure son liquéfaction.
- 2) En suite le CO₂ liquide pompé et arrivée à l'extracteur qui Contenant la matière végétale.
- 3) Le CO₂ passe à l'état supercritique où l'extraction débute.
- 4) Après un certain temps de contact le mélange (CO₂SC –huile) est séparé par une simple détente au niveau des séparateurs.
- 5) Enfin, le CO₂ est recyclé et l'huile est prête à être récupérer.

Malheureusement on n'a pas eu la chance pour faire l'extraction de l'huile essentielle de citron par le CO₂ supercritique, parce que l'appareil été occupée mais on à vu un exemple d'extraction de l'huile essentielle de gingembre par le CO₂ supercritique(Fig.37) et par hydrodistillation (Fig.38)

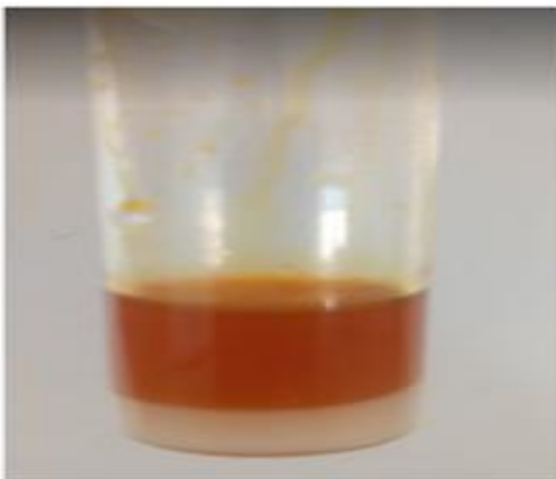


Figure37 :.l'huile essentielle de gingembre extraite
Par le CO₂ supercritique



Figure 38 : L'huile essentielle de
gingembre extraite par HD

Le tableau suivant présente une Comparaison entre l'huile essentielle de gingembre extraite par l'hydrodistillation et par le CO₂ supercritique :

Propriétés	Aspect	Couleur	Odeur
CO ₂ -SC	Liquide huileux	marron	très épicée
HD	Liquide mobile	Limpide	Légèrement épicée

Conclusion

L'extraction par CO₂ supercritique est une méthode peu coûteuse mais donnant au final un produit peu fiable, plus pure et saine de qualité.

La chromatographie sur couche mince



5^{ème} partie : La chromatographie sur couche mince :

1-Mode opératoire :

La première étape c'est la préparation de la plaque CCM, on la coupe sous forme d'un rectangle et on trace la ligne d'origine et le front à l'aide du crayon noir et une règle (étape 1), puis on va mettre une goutte de l'huile essentielle de citron extraire à l'aide d'une micropipette on dépose la goutte sur le trait de l'origine, au même temps dans une cuve on prépare un éluant qui se compose de **9ml** de cyclohexane et **1ml** d'Acétone au but de séparé les composants de l'huile

Ensuite on va mettre la plaque CCM dans la cuve d'une façon incliné et la ferme pour éviter l'évaporation d'éluant, et on laisse le système quelques minutes ou l'éluant se déplace le long de la plaque par capillarité jusqu'au front (étape2).

Les substances de faible polarité migrant plus rapidement que celle qui est polaires.

Après on laisse à sécher pendant quelques minutes, Pour la visualisation de plaque on distingue deux méthodes:

- 1- La plaque est exposé au radiation U.V sous une longueur d'onde égale autour de 254 nm, on observe deux tache successive fluorescent et très claire, on les entoure avec le crayon noir (étape3).

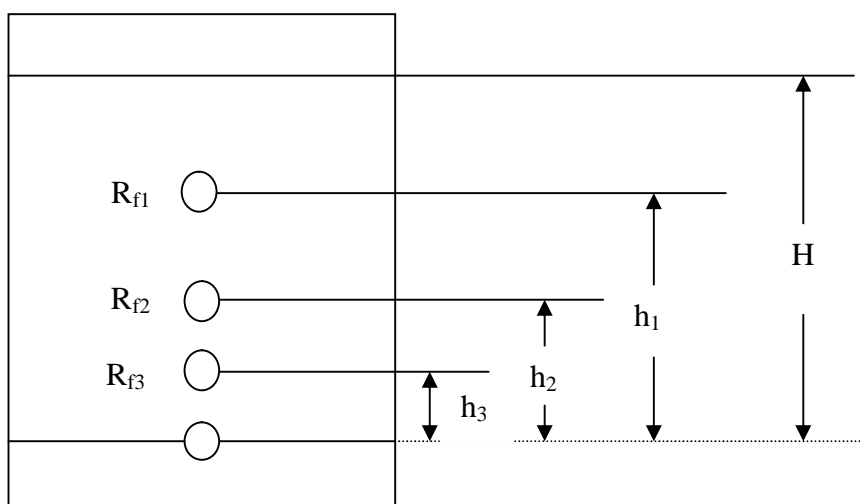


Figure39: La chromatographie sur couche mince

2-Pour plus de clareté on l'immergée la plaque dans la solution de permanganate de potassium (KMnO_4) jusqu'au front de plaque, on la pose sur un papier pour sécher après un moment on observe une apparence d'une troisième taches très claire, pas comme le cas quand on a la mètre sous l'UV (etape4).

2-Le facteur de rétention :

Le rapport frontal (R_f) ou facteur de rétention d'un composé est le rapport de la distance linge de dépôt-composé sur la distance linge de dépôt-front de solvant. Il est compris entre 0 et 1, et est caractéristique du composé, du matériau de la plaque et du système d'éluant.

$$R_f = h/H$$

Avec :

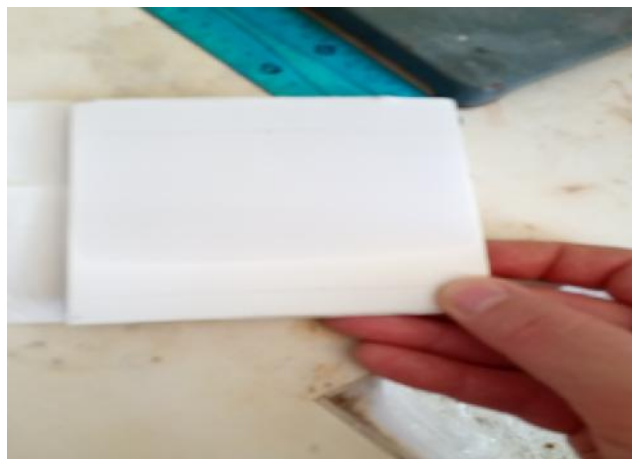
R_f : facteur de rétention

h : la distance (origine-composé)

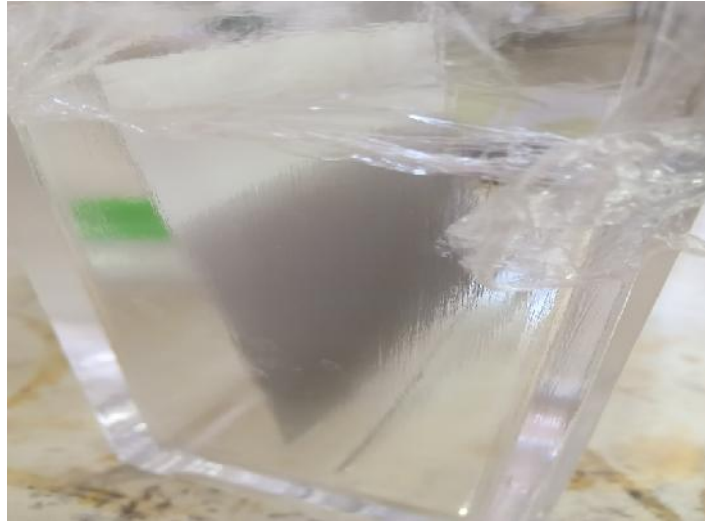
H : distance (origine-front de solvant)

3-la chromatographie sur couche mince :

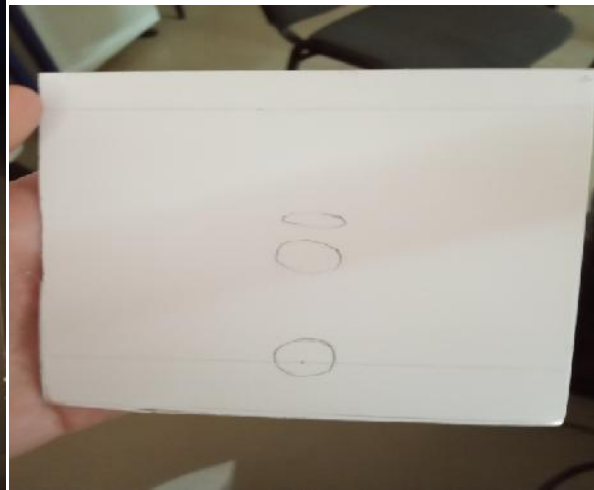
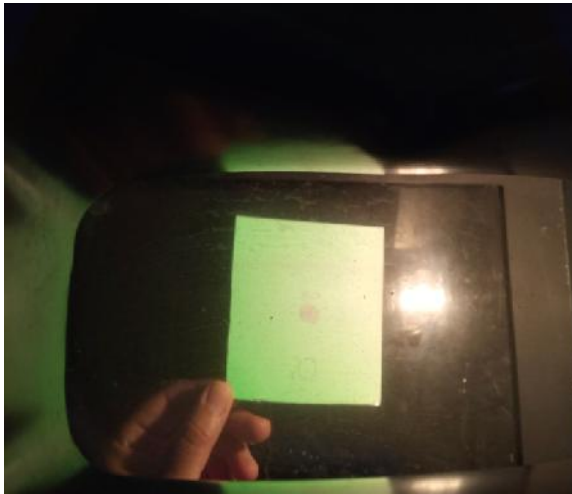
Les étapes de la chromatographie sur couche mince au laboratoire est représenter dans la (fig. 40).



Etape 1 : la préparation de la plaque CCM



Etape 2: on met la plaque dans la cuve



Etape 3: Révélation de la plaque CCM sous l'U.V

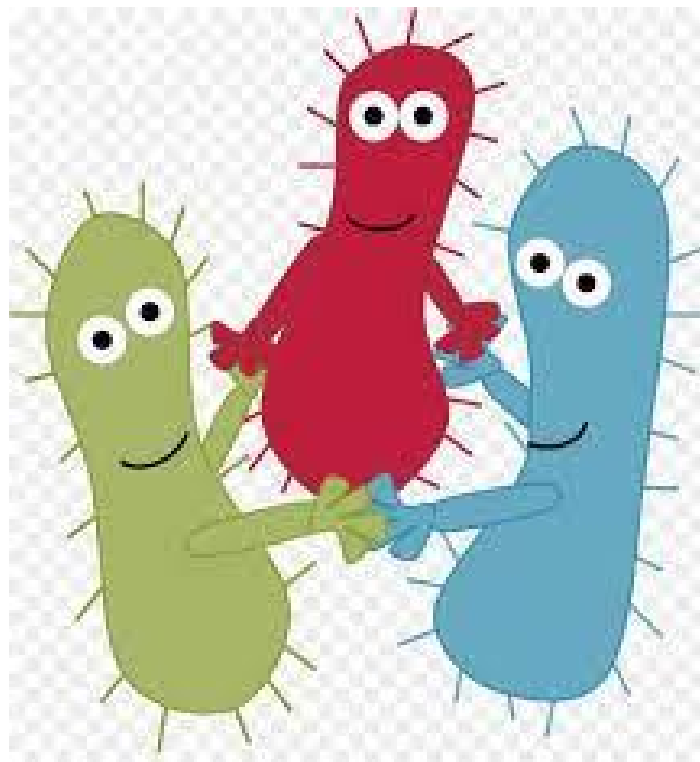


La
nouvelle
tache

Etape 4: On immergée la plaque dans la solution de KMnO_4 .

Figure 40 : les étapes de la chromatographie sur couche mince.

*Activité antibactérienne de l'huile
essentielle de l'écorce de citron*



6^{ème} Partie : Test de mesure du pouvoir antibactérien :

1- Origine et choix des souches bactériennes :

Les souches bactériennes choisies sont impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires, nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

- Bactéries à Gram négatif (-) : Escherichia coli abrégée en E. coli est une bactérie intestinale des mammifère, en forme de bâtonnet, très commune chez l'être humain.
- Bactéries à Gram positif (+) :

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire privé ETTAOUFIK de DR Benbouhia toufik.

2- Test de l'activité antibactérienne par la méthode des aromatogrammes :

La méthode de diffusion des disques appliquée sur milieu gélosé est celle décrite par Mayachiew et Devahastin (2008) [8]. Le principe de la méthode repose sur l'inhibition de la croissance microbienne dans la boîte de Pétri après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. En surfusion, 20ml de l'agar de Muller Hinton sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, **100µl** de la suspension bactérienne à tester sont étalés en surface. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman **40 (6mm)** de diamètre) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par 5µl d'huile essentielle à tester. Les boîtes sont maintenues à **4°C** pendant 1h pour que l'huile essentielle puisse diffuser puis incubées à **37°C** pendant **24h**.

L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de **8 à 14mm** ; très sensible (++) pour des diamètres de **15 à 19mm** et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de **20mm**.

3- Le matériel nécessaire :

Les souches bactérienne, les boîte de pétrie, le gel, une pipette de 0.5 μ l, un bec bunzen, une once de platine, papier wattman ou papier filtre stérilisé,

4- Les étapes de travail au laboratoire :

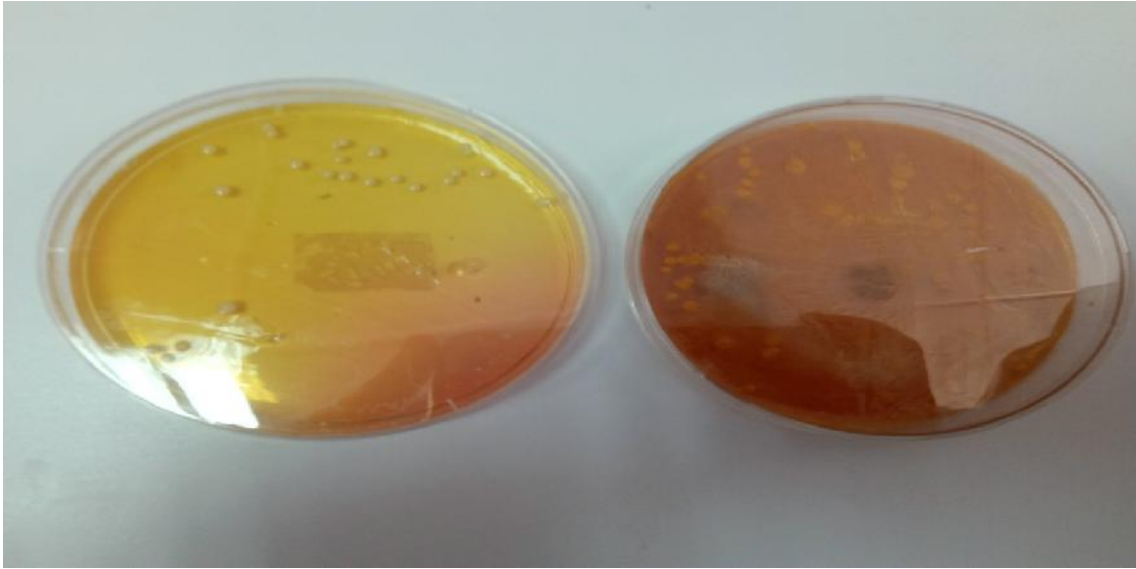
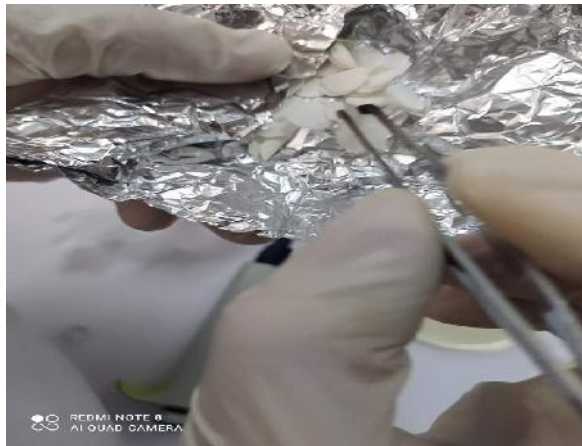


Figure 41 : Les souches bactériennes



Etape 1 : le repiquage des bactéries sur le gel. On laisse pendant 24h



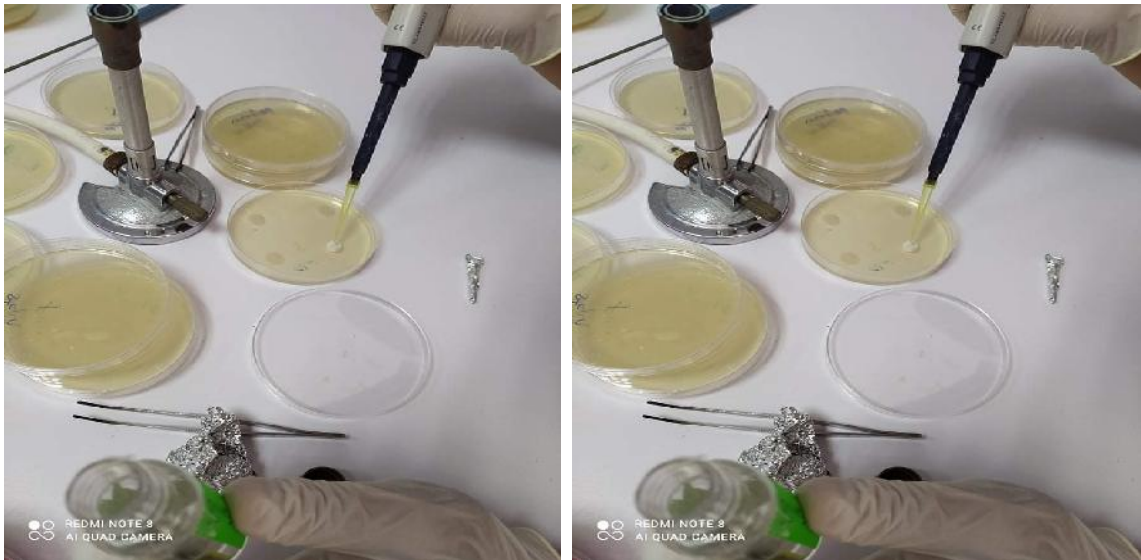
Etape 2 : On place le papier wattman sur les souches bactériennes



Etape 3 : Notre souche est prête pour tenir l'effet antibactérien d'huile essentielle de citron



Etape 5 : A l'aide d'une pipette on prendre 0.5 µl d'huiles essentielle de citron



Etape 6 : On pose l'huile sur les disques de wattman



Etape 7 : placée les boîte de pétrie dans l'étuve sous une température de 37 C⁰

Pendant 24 h

Figure.42 : Test antibactérien d'huile essentielle

5- Les résultats des expériences :

Après 24h on a consulté nos résultats, et on a observe que les résultats sont négatif.

Nous avons réessayé l'expérience pour la quatrième fois et on suivi les étapes suivants :

1/ Préparation des suspensions bactérienne :

A l'aide d'une anse de platine, on prend quelques colonies dans 5 ml de bouillon nutritive on agite en vortex pendant quelques seconds. La suspension bactérienne est bien homogénéisée.

Les souches bactérienne étudiées sont : Escherichia coli, staphylocoque, Bacillus

**Etape 1 : Préparation de la suspension bactérienne**

2/ Nous avons coulé aseptiquement le milieu de culture gélosé Muller Hinton 20 ml dans les boites de pétrie. Après solidification du milieu de culture, nous avons étalé 1ml de chaque suspension bactérienne à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

**Etape2 : Collage et ensemencement de milieu**

3/ A l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen, on place les disques stérilisés sur la surface de la gélose, ensuite on pose 1ml d'huile essentielle sur chaque disque.



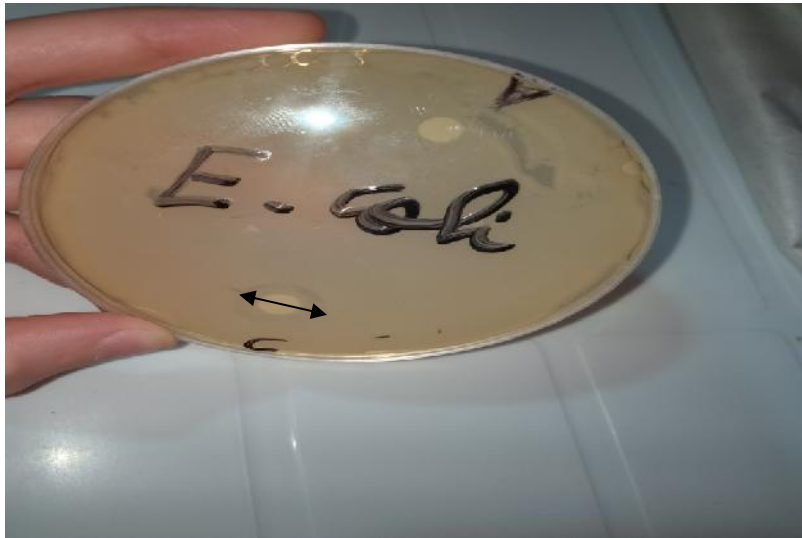
Etape3 : On pose l'huile sur les disques

4/ Les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37° C pendant 24 h.



Etape 4 : Les boîtes dans l'étuve.

5/ Après 24 h on a obtenu les résultats suivants.



Etape 5 : résultats obtenue

Figure43 : Étude de l'activité antibactérienne.

On observe une zone autour des disques dans la souche bactérienne E. coli. Qui montre que l'huile a une activité antibactérienne.

Résultats et discussions



I- Introduction

Dans cette partie, nous discutons les résultats que nous avons obtenu à partir des expériences que nous avons réalisé au laboratoire LASPI²A.

1- Calcule du rendement (%)

	La masse de l'écorce sèche (g)	Masse de l'huile extraite (g)	Rendement %
Expérience 1	96	30	31.25
Expérience 2	65	36	55.38

Pour mieux illustrer la relation entre la quantité des écorces séchées et la quantité de l'huile extraite on a fait recours à la représentation graphique montrée sur la figure (1), qui indique clairement la bonne quantité dans la deuxième expérience à cause de le bon séchage des écorces par rapport à l'expérience 1.

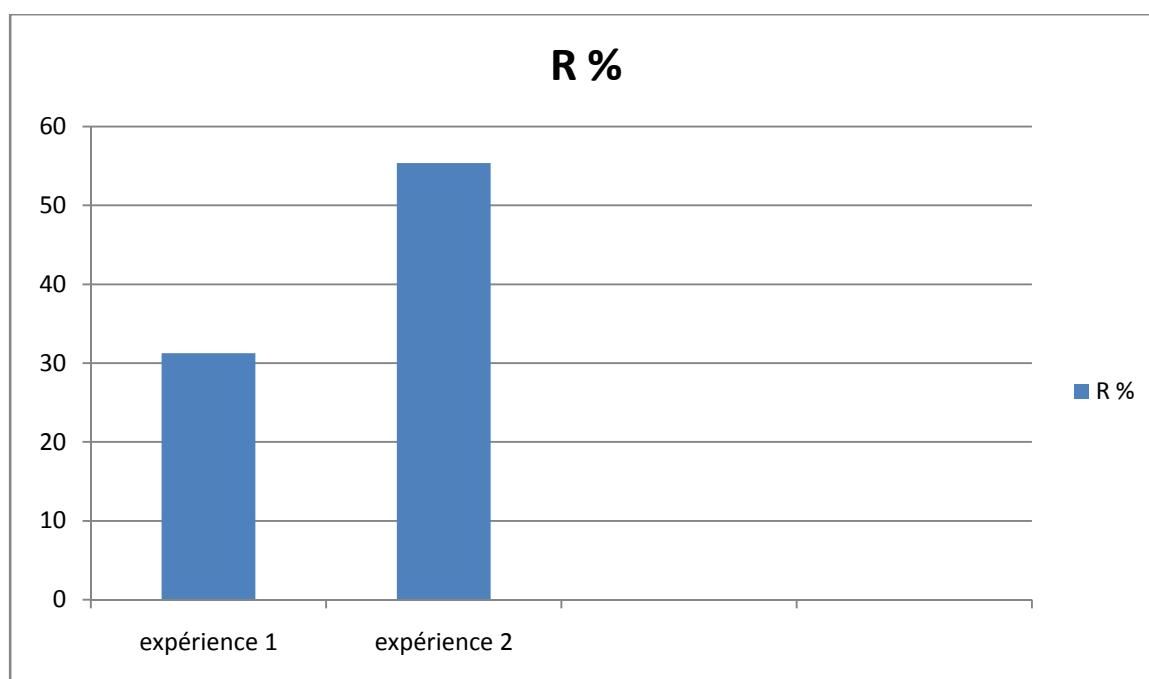


Figure 44 : comparaison entre le rendement des deux expériences.

2- Résultat d'analyse physico-chimique de l'huile extraite

2-1- Propriétés organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) l'huile extraite sont résumées dans le tableau suivant :

Propriétés	Aspect	couleur	Odeur
Hydrodistillation	Liquide mobile	Limpide	Citronnée

2-2- Propriétés physicochimiques:

2-2-a- Résultat de mesure de la densité:

Procédé	V _{eau} (ml)	V _{huile} (ml)	m (eau) (g)	m d'HE (g)	(°C)	d	d ₂₀
Hydrodistillation	0.2	0.2	0.2191	0.1524	26,6	0.6955	0.6999

2-2-b- Résultats de mesure de l'indice d'acide, de saponification, d'ester, et du pH :

Procédé	Volume de KOH (ml)	Indice d'acide (Ia)	Volume de Hcl (ml)	Indice de Saponification (Is)	Indice d'ester (Ie)	PH
Hydrodistillation	0.8	4.48	0,7	5,259	0,779	6

Conclusion : on peut dire que les résultats des indices physico- chimiques de l'huile sont en bon accord avec ceux rapportés dans la littérature.

3- Analyse de les composition chimique de l'HE par CCM

L'analyse par CCM à montrer la présence de 3 taches (Fig.45)



Figure 45: Chromatographie sur couche mince

On calcule le facteur de rétention pour chaque tache.

$$R_{f1} = h_1 / H = 4.2 / 7.4 = 0.56$$

$$R_{f2} = h_2 / H = 3.2 / 7.4 = 0.43$$

$$R_{f3} = h_3 / H = 1.3 / 7.4 = 0.17$$

Donc l'HE est un mélange de nombreuses molécules chimiques présentes dans le tableau suivant :

Tableau 5: Compositions chimiques de l'HE du citron.

composants	%
Limonène	51.40
-Pinene	17.04
-Terpinene	13.46
-Pinene	3.07
Geraniol	2.43
-Myrcene	2.37
Nerol	1.50
Isocaryophylene	1.23
Neryle acétate	1.05

4- L'activité antibactérienne :

Les observations effectuées sur l'effet de l'HE de citron sur la croissance des souches bactériennes testées : *Escherichia coli*, *Staphylocoque* et *Bacillus* sont représentés dans la (Fig.46).

A partir des expériences qu'on a fait sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de citron sur les bactéries, et que on la fait 4 fois au laboratoire de microbiologie.

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour évaluer l'activité antibactérienne de l'HE de citron. Pour cela 3 souches bactériennes ont été testées.

A cet effet, une échelle de mesure de l'activité antibactérienne a été mise par (Ponce et al., 2003) répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 4 classes :

Non sensible ou résistante(-) : diamètre < 8 mm

Sensible (+) : diamètre entre 8 et 14 mm

Très sensible (++) : diamètre entre 14 et 19 mm

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 19 mm

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de Citrus limon sur les souches testées sont résumées dans le tableau suivant et illustrées dans la (fig.46).



Figure 46: L'effet de l'H.E de citron sur E.coli, staphylocoque, et Bacillus

Tableau 6: Résultat d'activité antibactérienne de HE sur les souches bactériennes.

Souche bactériennes	HE du citron	Activité antibactérienne
Escherichia coli	13 mm	sensible
Staphylococcus	/	non sensible
Bacillus	/	non sensible

5- Conclusion :

Grâce à nos expériences pour prouver que l'huile essentielle extraite du citron a une activité antibactérienne. Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de Bacillus et staphylocoque. Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.E de citron. En revanche la souche d'E.coli a manifesté une résistance relative.

conclusion

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les différents aspects développés dans ce mémoire sur les HE de manière générale et l'huile essentielle de citron de manière spécifique indiquent que ces essences végétales divers et multiples représentent un intérêt économique et jouent un rôle important dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétologique. Ces substances de composition chimique complexe (composés terpéniques, aromatiques et autres...), peuvent être isolées à partir de différents organes de plantes (feuilles, fruits, fleurs, graines, écorce etc.) par des techniques traditionnelles ou des procédés innovants.

Dans ce travail, on peut traire l'huile essentielle de citron par la méthode d'hydrodistillation. Les résultats sont montrés que le séchage de la matière végétale à un effet positive sur le rendement de l'huile extraite.

L'extraction par les procédés innovants est une extraction peu coûteuse mais donnant au final un produit peu fiable, plus pure et sain de qualité.

L'huile essentielle de citron comporte plusieurs composants; le limonène est le composé majoritaire dans cette huile essentielle.

Dans la continuité de ce travail on a étudié l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Basillus* et *staphylocoque*. Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des H.E de citron. En revanche la souche d'*E. coli* a manifesté une résistance relative

Références bibliographiques

Les références

- [1] Marchand L., 2002: Cancer preventive effects of flavonoids – a review.
Biomed.Pharmacother. Vol. 56, pp: 296–301.COTTIN, R, 2002. Citrus of the World.
A Citrus Directory. SRA INRA-CIRAD (éd), France.
- [2] VALNET, J. 2001. La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot.
France, 411.
- [3] Minh Tu N.T., Thanh L.X., Une A., Ukeda H. et Sawamura M., 2002 :
Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils.
Flavour Fragrance J. Vol. 17, pp : 169 – 174.
- [4] Chutia M., Bhuyan D.P., Pathak M.G., Sarma T.C. et Boruah P., 2009 :
Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil
against phytopathogens from North East India. LWT Vol. 42, pp: 777–780.
- [5] Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. et Radice
M., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional
antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem. 91, 621–632.
- [6] *Citrus limon* (L.) Burm f.
- [7] (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996)
- [8] (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et al., 2010)
- [9] Santé Canada. Fichier canadien sur les éléments nutritifs, 2010.
- [10] (Mouton, 2012). Morphologie
- [11] (Cano et al . 2008).
- [12] (BENAVENTE-GARCIA et CASTILLO, 2008)
- [13] (KAWAGUCHI et al., 1997; BOK et al., 1999; KUROWSKA et al., 2000).

- [14]FAO. (2015).Food Agriculture Organization. Data base results; FAO ST:
(<http://www.faostatFao.org>).
- [15] OMS, Organisation mondiale de la Santé, 2006.
- [16] Yuerdon,M. la médecine naturelle au service de vitre beauté et santé,2-3,Edition suisse.
(2004).
- [17] BOUKABACHE Merièm, BOUDJEFDJOUF Fatima Zohra, 2016: Extraction.
- [18] AFNOR, 2000. Association Française de Normalisation. Normes françaises : huiles essentielles. AFNOR, Paris.
- [19] Franchomme P. et Pénoël D. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois Éditeur, France, 1990.
- [20] Seenivasan Prabuseenivasan, Manickkam Jayakumar et Savarimuthu Ignacimuthu, In vitro antibacterial activity of some plant essential oils, Complementary and Alternative Medicine, 2006, 6:39
- [21] Stashenko, E.E.; Jaramillo, B.E.; Martínez, J.R., Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae, Rev. Acad. Colomb. Cienc.Exactas Fis. Nat., 2003, 27, 105, 579-597.
- [22] Svoboda K.P. et Hampson J.B. (1999) Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- [23] Robert A. et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- [24] BARDEAU F. (2009). Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editions Lenore, 315.
- [25] Peyron, 1992 ; Crouzet, 1996
- [26] A. P. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse, L. Ricoux and J. L. Lamaison, The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea, Pharmaceutica Acta Helvetiae, 72 (5) (1998), 301-305.
- [27] Luque de Castro and Garcia-Ayuso 1998.
- [28] Kimball, 1999 ; Dugo et Giacomo, 2002
- [29] BRUNTETON, 1999 ; WERNER, 2002.

- [30] (Kaufmann, Christen et al. 2001).
- [31] D. Grigonis, P.R. Venskutonis, B. Sivik, M. Sandahl and C.S. Eskilsson, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*), *The Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3) (2005) 223-233.
- [32] T. S. Reighard and S. V. Olesik, Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26 (2&3) (2006), 1-39.
- [33] L. Wang and C. L. Waller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (2006) 300 – 312.
- [34] Chemat et *al.*, 2008
- [35] E. Miles. *Les huiles essentielles pour les nuls*. Editions First-Gründ ; Paris ; 2013
- [36] P. de Bonneval et F. Dubus. *Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien*. Editions Désiris ; Paris ; 2014
- [37] D. Festy. *Ma bible des huiles essentielles*. Editions Quotidien Malin ; Paris ; 2008
- [38] D. Whichello Brown. *Le guide de l'aromathérapie*. Editions Larousse de poche ; Paris ; 2014
- [39] Fernandez et Cabrol-Bass, 2007.
- [40]-Chymol N. ;Hoff M. ;*La microchimi, Technique et expérience* , Paris (1999), 35, 39, 45, 127 , 128, 130.
- [41]- Browning D.R. ; *Chromatographie* , Ed. Masson et CIE, (1971), 6-20.
- [42]- Roberts J. D., *Chimie Organique moderne*, Paris S. A, (1979), 701-704 .
- [43]- Chavanne M., Beaudoin G. J, Jullien A., Flamand E., *Chimie Organique Expérimentale*, Paris, (1986), 294-350.
- [40]- Chymol N. ;Hoff M. ;*La microchimi, Technique et expérience* , Paris (1999), 111-131.

[44]- Andrew, S, Clayton. H. H, Introduction a la chimie organique, Per face. Derek Barton pour l'édition française, (1986), 285-268.

[45] (Salzer, 1977).

[46] (Mc Nair et Miller, 1997 ; Tranchant, 2004).

[47] Dung N.T., Kim J.M. et Kang S.C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* 46: (2008).3632-3639.

[48] Mayachiew P. et Devahastin S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41 (2008) 1153-1159.

[49] (Fisher et Phillips,2008).

[50] (De Billerberck, 2007, Pirbalouti et al., 2010).

[51](Daouda, 2015).

[52] (Pibiri, 2006).

[53] (Bouguerra *et al*, 2014)

[54] (Pibiri, 2005).

[56] (Hulin *et al*. 1998).

[57] (Davidson et Parish, 1989).

[58] YAACOUB Rahma et TLIDJANE Imane,«Caractérisation physico-chimiques et analyses biologiques de l'huile essentielle des grains de *Cuminum cyminum* L. et de *Foeniculum vulgare* Mill . extraite par hydrodistillation et CO2 supercritique.Etud comparative»,Mémoire de Magister, Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

[59] SEDDIK Miloud,«Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'*Ammoides Verticillata* de la région d'Adrar. Etude de son activité biologique et anti-oxydante»,Mémoire de Magister, Université D'oran Es-Senia,2010.

[60] R. Alloune, A. Liazid et M. Tazerout,« Etudes comparatives de deux plantes oléagineuses locales pour la production du biodiesel en Algérie», *Revue des Energies Renouvelables*, 2012, p. 19-22.

[61] OUIS Naouel,«Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre,de fenouil et de persil», Thèse de doctorat,Université d'oran 1. 2015.

[62] HAMADOU Faiza et TOUKI Soumia, «Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices : Girofle, Poivre Noir», Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah Ouargla. 2017.