

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique

# Mémoire

Présenté par

M<sup>elle</sup> BOUHALI Halima

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Ingénierie Biochimique et Biotechnologies

Thème

**Caractérisation des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et étude de leur activité antioxydante : étude comparative entre l'huile essentielle des écorces sèches et fraîches**

Soutenu le : 15/01/2015

Devant le Jury composé de :

**Nom et Prénom**

**Grade**

Mme. BEDJOU F.

Professeur

Univ. de Béjaïa

Président

Mme. BENABDESSELAM F.

Professeur

Univ. de Béjaïa

Rapporteur

Mr. TOUATI A.

Professeur

Univ. de Béjaïa

Examineur

Mr. OUCHEMOUKH S.

MCA

Univ. de Béjaïa

Examineur

Année Universitaire : 2014/2015

# *Remerciements*

En tout premier lieu, je tiens à remercier Mme. le Professeur F. BENABDESSELAM, de m'avoir guidée et soutenue durant ce travail avec rigueur et tolérance à la fois ainsi que pour ses conseils.

Je tiens à remercier Mme. le Professeur F. BEDJOU de m'avoir faite l'honneur de présider le jury, Mr. le Professeur A. TOUATI et Mr. le Docteur S. OUCHEMOUKH, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Aussi, je remercie Mr. le Docteur A. ADJAOUD, de m'avoir aidée durant la phase d'extraction des huiles essentielles et pour ses conseils, ainsi que Mr. le Docteur L. BESSAOU, phyto-aromathérapeute, pour m'avoir fournie de la documentation nécessaire et pour ses qualités humaines.

J'exprime ma gratitude envers mes parents, mes frères et sœurs ainsi que toute ma famille, pour leur affection, soutien et encouragements incessants et déterminants dans ce travail.

J'exprime mes remerciements à tous mes collègues, particulièrement Mlle. L. GALI, pour leur aide et encouragements durant les années que nous avons passées ensemble.

Je remercie tous ceux qui m'ont encouragée et aidée, de près ou de loin.

*Je dédie ce travail...*  
*à mes très chers parents...*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

## *Synthèse bibliographique*

**Chapitre I : *Stress oxydant et antioxydants*** ..... 3

**1. Stress oxydant** ..... 3

1.1. Définition ..... 3

1.2. Origine du stress..... 4

1.3. Formes des radicaux libres..... 5

1.4. Cibles de radicaux libres ..... 5

**2. Systèmes antioxydants** ..... 7

2.1. Définition ..... 7

2.2. Systèmes antioxydants ..... 7

2.2.1. Systèmes enzymatiques..... 8

2.2.2. Systèmes non enzymatiques..... 9

**Chapitre II : *Huiles essentielles*** ..... 11

**2.1. Définition** ..... 11

**2.2. Localisation et biosynthèse** ..... 11

**2.3. Propriétés physicochimiques** ..... 14

**2.4. Rôles physiologiques** ..... 14

**2.5. Composition chimique** ..... 15

**2.6. Facteurs influençant la composition chimique** ..... 17

**2.7. Méthodes d'extraction des HEs** ..... 17

2.7.1. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau..... 17

2.7.2. Hydrodistillation ..... 18

2.7.3. Expression à froid.....	18
2.7.4. Autres méthodes d'extraction.....	19
<b>2.8.Toxicité des HEs</b> .....	20
<b>2.9.Méthodes de caractérisation des HEs</b> .....	20
<b>2.10. Effets biologiques</b> .....	23
<b>Chapitre III : <i>Le genre Citrus</i></b> .....	24
3.1. Classification botanique .....	24
3.2.Etude botanique .....	24
3.3.L'espèce <i>Citrus sinensis</i> et ses variétés .....	25
3.4.Les huiles essentielles de <i>Citrus</i> et leur synthèse.....	26

## *Partie expérimentale*

<b>Chapitre I : <i>Matériel et méthodes</i></b> .....	27
1.1. Matériel.....	27
1.1.1. Matériel végétal.....	27
1.2. Méthodes.....	29
1.2.1. Extraction des HEs .....	29
1.2.1.1. Calcul du taux d'humidité.....	30
1.2.1.2. Calcul des rendements .....	31
1.2.2. Caractérisation des HEs.....	31
1.2.2.1. Caractéristiques organoleptiques .....	31
1.2.2.2. Indices physiques .....	31
1.2.2.3. Analyse de la composition chimique des HEs par CG/SM .....	32
1.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante .....	33
1.2.3.1. Activité scavenger du DPPH .....	33
1.2.3.2. Pouvoir réducteur.....	34
1.2.3.3. Activité scavenger à l'égard du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
1.2.4. Analyses statistique .....	35

<b>Chapitre II : Résultats et discussion</b> .....	36
<b>2.1. Le taux d'humidité</b> .....	36
<b>2.2. Calcul du rendement</b> .....	36
<b>2.3. Caractérisation des HEs</b> .....	37
2.3.1. Caractéristiques organoleptiques .....	37
2.3.2. Indices physiques .....	37
2.3.3. Analyse chimique par CG/SM .....	38
<b>2.4. Activité antioxydante</b> .....	41
2.4.1. Activité scavenger du radical DPPH .....	41
2.4.2. Pouvoir réducteur .....	44
2.4.3. Activité scavenger du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	46
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	50
<b>Références bibliographiques</b>	

## **Annexes**

## Liste des abréviations

**Abs** : absorbance

**Ac.Asc** : Acide ascorbique

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**BHA** : Butylhydroxyanisol

**C.** : *Citrus*

**CG/SM (ou GC/MS)** : chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (ou gas chromatography/ mass spectrometry)

**d** : densité

**DMAPP** : diméthyl-allyl-pyrophosphate

**DPPH** : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

**ERN** : espèces réactives de l'azote

**ERO** : espèces réactives de l'oxygène

**FPP** : farnésyl-lpyrophosphate

**GPP** : géranyl-pyrophosphate

**HE** : huile essentielle

**I**: indice de réfraction

**IC50**: Concentration inhibitrice à 50%

**IPP** : l'isopentényl-diphosphate

**L.** : Linné

**ROS**: Reactive oxygen Species.

**Rt** : retention time

**TCA** : acide trichloroacétique

**Val** : Valencia

**ZeFr** : zeste frais

**ZeSe** : zeste sec

## Liste des figures

Numéro de figure	Titres	page
1	équilibre entre les antioxydants et les espèces réactives <i>in vivo</i>	3
2	Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO/ERN	4
3	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs co-facteurs métalliques	9
4	Mode d'élongation des processus terpéniques à partir de l'IPP	13
5 (a et b)	Structure chimique des composés isolés des HEs ; (a) : les terpènes. (b) : les phénylpropanoïdes	16
6	Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante	18
7	photo du montage de l'expression à froid	19
8	Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse	22
9	Coupes transversale et longitudinale du fruit d'oranger	25
10	Micrographie photonique d'une coupe de péricarpe du fruit de <i>Citrus sp</i>	26
11 (a et b)	Photographies des écorces fraîches (A) et sèches (B) de <i>Citrus sinensis</i>	27
12	Photographie d'une coupe longitudinale et transversale du fruit de <i>Citrus sinensis</i> variété Valencia late.	28
13	Dispositif d'hydrodistillation, type Clevenger	30
14	Schéma des éléments de la CG/SM	32
15 (a et b)	Formes du DPPH , (a) radicalaire et (b) réduite	33
16	Rendements des HEs extraites	35
17	Structure du limonène	37
18	Structure du 1,8-Nonadièn-3-ol	38
19	Chromatographie de l'huile essentielle du zeste frais	39
20	Chromatographie de l'huile essentielle du zeste sec	39
21	Activité scavenger du DPPH des HEs	41
22	Activité scavenger du DPPH de l'acide ascorbique	41
23	Activité scavenger du DPPH du BHA	42
24	Changement de coloration de la solution du jaune vers le bleu, test du pouvoir réducteur (le standard).	43
25	Pouvoir réducteur des huiles essentielles du zeste de <i>Citrus sinensis</i> à l'état sec et frais.	44
26	Pouvoir réducteur du BHA	44
27	L'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) des standards à différentes concentrations.	47
28	L'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) des huiles essentielles à différentes concentrations	47

# **Introduction**

**Introduction :**

Pendant des millénaires, les végétaux ont constitué non seulement une source de nourriture pour l'Homme, mais aussi un moyen de lutter contre les maladies. L'intérêt que suscitent les extraits de plantes ne cesse de croître et leur usage est sorti du traditionnel et hypothétique vers la recherche scientifique et expérimentale.

Le stress oxydant, défini comme un déséquilibre entre les éléments oxydants et antioxydants dans l'organisme, fait de plus en plus l'objet de plusieurs recherches (Bonfond-Rousselot et *al.*, 2002 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

Actuellement, on met en évidence le rôle néfaste des processus oxydatifs impliqués dans plusieurs maladies plus ou moins graves (Hennebelle, 2004).

Jusqu'à nos jours, en dépit des progrès considérables de la chimie, de l'industrie pharmaceutique et de la médecine, les plantes médicinales n'ont rien perdu de leur importance (Stary et Jirasek, 1973).

En effet, le développement des techniques d'analyses chimiques a permis de révéler qu'une espèce végétale peut synthétiser des milliers de constituants chimiques différents des intermédiaires des métabolismes primaire et secondaire (Witchl et Anton, 1999).

Aujourd'hui, Il est ainsi admis que ces substances de par leurs propriétés physicochimiques contribuent à une protection efficace contre le phénomène oxydatif (Karou et *al.*, 2005a). Par ailleurs, les sources de ces substances sont aussi diverses et variées que le règne végétal lui-même et des travaux de recherche scientifique ne cessent de nous enrichir par la découverte de nouvelles molécules et de nouveaux effets biologiques.

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

Ainsi, nous allons tenter de répondre à la question principale suivante :

- Quelle sera la différence entre les caractéristiques des huiles essentielles issues des écorces fraîches et sèches et quelle sera l'importance de leur activité antioxydante ?

Pour répondre à cette question, il nous semble judicieux de procéder d'abord à une recherche bibliographique qui nous permettrait de cerner les concepts de base ainsi que les connaissances actuelles en relation avec notre thème. En outre, cette étape nous donnerait les outils nécessaires pour passer à l'étape suivante, en l'occurrence la phase expérimentale. Cette dernière sera abordée de façon plus ou moins classique, c'est-à-dire que nous commencerons par l'extraction puis la caractérisation des huiles essentielles que nous utiliserons dans l'étude de l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus seraient ainsi analysés et commentés

# Synthèse bibliographique

# Chapitre I

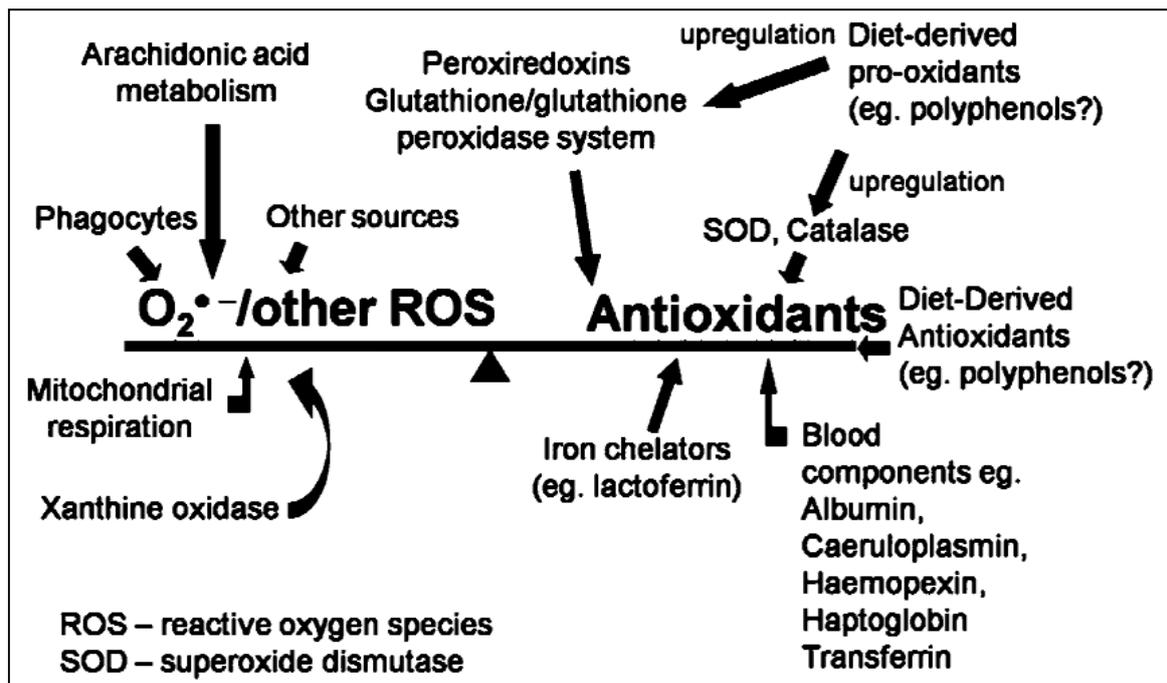
## Stress oxydant et antioxydants

## 1. Stress oxydant

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par le concept du Stress oxydant (Favier, 2003) dont le rôle néfaste a été mis en évidence induisant un grand nombre de maladies (vieillesse, athérosclérose, maladie neurodégénératives), (Hennebelle, 2004).

### 1.1. Définition

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydants au profit des premiers (**fig. 1**), il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Bonfont-Rousselot et al., 2002 ; De Moffarts et al., 2005).

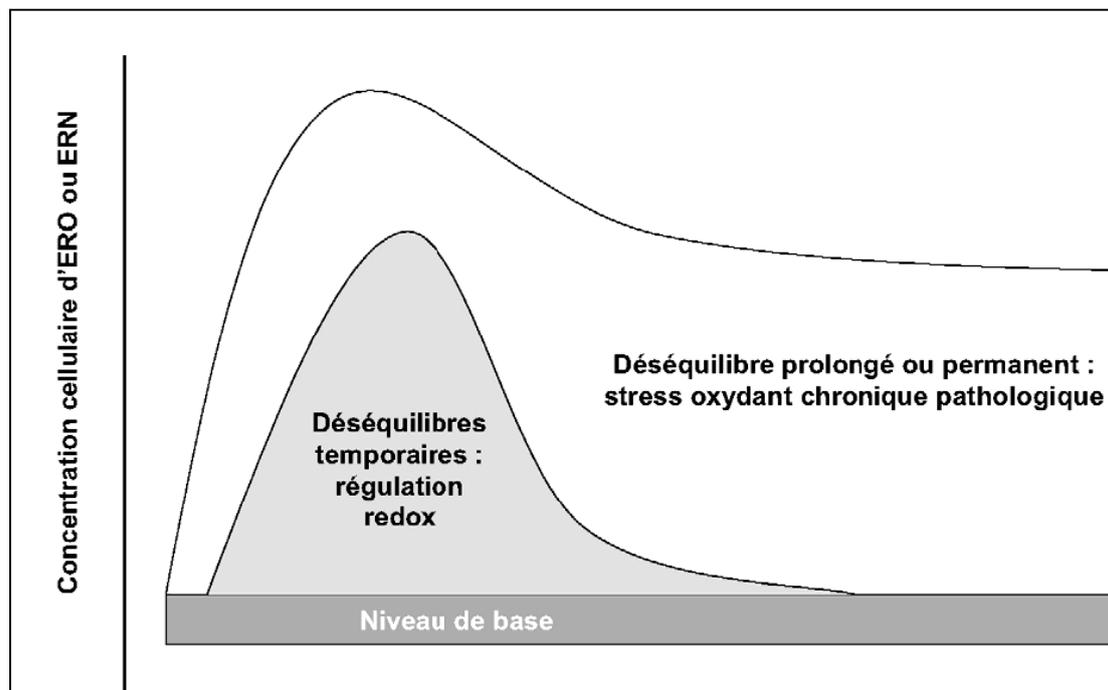


**Figure 1** : équilibre entre les antioxydants et les espèces réactives *in vivo* (Halliwell, 2008).

Dans l'organisme humain le rôle des différents antioxydants est de contrôler le niveau des espèces réactives réalisant ainsi un équilibre antioxydants/pro-oxydants (**fig. 1**) qui permet un bon fonctionnement de l'organisme tout en minimisant les dommages oxydatifs (Halliwell, 2008). Le stress oxydant apparaît dans une cellule lorsque cet équilibre est rompu en faveur de l'état pro-oxydant (Goudable et Favier, 1997) en raison d'une production excessive et prolongée des espèces réactives favorisée par plusieurs facteurs comme l'âge (Sarikurkcu et *al.*, 2008), les maladies infectieuses (Halliwell, 1991), l'exposition aux radiations UV, les polluants de l'environnement, la fumée, les pesticides, etc. (Abdel- Hameed, 2009).

## 1.2. Origine du stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par le système de défense, la balance antioxydant/pro-oxydante est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une production énorme de radicaux (Favier, 2003), cela induit une situation d'un stress oxydatif profond (**fig. 2**).



**Figure 2 :** Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aiguë ou chronique des ERO/ERN

(Beaudeau et *al.*, 2006).

### 1.3. Formes des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable: il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), (Goudable et Favier, 1997 ; André, 1998 ; Afonso *et al.*, 2007) soit en céder un (agissant comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux, ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (Cheeseman et Slater, 1993, Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'oxygène ( $O_2$ ) est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitales externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), puis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) (Sies, 1993 ; De Leiris, 2003).

L'oxygène est un élément essentiel à la vie aérobie, mais à forte concentration il est toxique. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) contenant de l'oxygène sont des molécules chimiquement réactives du fait de la présence des électrons impairs (Bursal *et al.*, 2013). Ils comprennent des espèces radicalaires et d'autres non radicalaires pouvant donner naissance à des radicaux libres (Oktay *et al.*, 2003). Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) est le plus réactif en raison de sa demi-vie très courte (Elmastaş *et al.*, 2006). D'autres radicaux peuvent dériver de l'azote, du chlore (Halliwell, 2008), du fer, du cuivre, et du soufre (Halliwell, 2011). En terme de nocivité pour les tissus, les principaux ERO sont respectivement le radical hydroxyle et l'anion superoxyde (Mantle *et al.*, 1998).

### 1.4. Cibles des radicaux libres

#### 1.4.1. Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée *peroxydation lipidique* forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde ainsi formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué avec ainsi des réactions en chaîne (Beckman et Ames, 1998; Lee *et al.*, 2004 ; Ré *et al.*, 2005 ; Valko *et al.*, 2006). L'attaque des lipides peut concerner les

lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, et l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

#### **1.4.2. Protéines**

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (Beckman et Ames, 1998). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine, ou subir des coupures en cas d'agression forte, ou encore avoir des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment à la protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales (Favier, 2003).

#### **1.4.3. L'ADN**

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il reste une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation (Valko et *al.*, 2006).

Les ROS peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Certains affectent les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et *al.*, 2005). Ils modifient la sécrétion d'insuline et changent les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines (Pincemail et *al.*, 1998).

Cette attaque de l'ADN est quotidienne puisque le nombre de lésions se formant chaque jour dans une cellule est estimé à 104. Les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, ou une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par l'apoptose (Favier, 2003).

#### **1.4.4. Glucides**

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage (Favier, 2003). Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes,  $H_2O_2$  et  $OH\cdot$ , lesquels entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE (Ogino et Wang, 2007). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

## **2. Systèmes antioxydants**

### **2.1. Définition**

Un antioxydant est toute substance capable d'inhiber ou de retarder l'oxydation d'un substrat tout en étant présente à une faible concentration par rapport à la concentration du substrat oxydable. Ces antioxydants peuvent avoir plusieurs origines, ils peuvent être produits dans l'organisme ou apportés par l'alimentation ou bien sont issus d'une synthèse chimique (Al-Mamary et *al.*, 2002 ; Karou et *al.*, 2005b ; Berger, 2006).

Les agents antioxydants peuvent retarder l'oxydation par deux moyens ; soit en piégeant directement les radicaux libres, et dans ce premier cas le composé est appelé antioxydant primaire ou par d'autres mécanismes indirectes, incluant la fixation des ions métalliques, la conversion des hydroperoxydes en espèces non radicalaires. Dans ce deuxième cas, le composé est appelé antioxydant secondaire (Pokorny et *al.*, 2001).

### **2.2. Systèmes antioxydants**

L'organisme à l'état naturel contient des systèmes de lutte contre les espèces oxydantes qui permettent de sauvegarder les molécules tant structurelles que fonctionnelles. Ces systèmes de défense restent efficaces tant que les espèces oxydantes ne sont pas présentes à des taux dépassant le potentiel de lutte intrinsèque. Ci-dessous nous allons développer les différents antioxydants.

## 2.2.1. Systèmes enzymatiques

### 2.2.1.1. Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) contient des métaux redox dans le centre catalytique et transforme le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène (**fig. 3**). Trois isoformes différents de la SOD ont été identifiées : la SOD mitochondriale à manganèse (MnSOD, SOD2), la SOD cytosolique à cuivre/zinc (Cu/ZnSOD, SOD1) et la SOD extracellulaire (ecSOD, SOD3), qui est également une enzyme à cuivre/zinc (Young et Woodside, 2001; Wassmann *et al.*, 2004; Menvielle-Bourg, 2005; Valko *et al.*, 2006; Afonso *et al.*, 2007).

### 2.2.1.2. Glutathion peroxydase (GPx)

C'est l'enzyme clé de la dégradation de la plupart des hydroperoxydes (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène, produit par la dismutation par la SOD de l'anion superoxyde (Afonso *et al.*, 2007) (**fig. 3**). L'activité de cette enzyme dépend de la présence de Sélénium comme cofacteur, de la glutathion réductase qui réduit le glutathion oxydé en glutathion réduit (GSH) et du NADPH provenant de la voie des pentoses (Gamain *et al.*, 1996). Elle élimine également les peroxynitrites qui sont des oxydants très puissants. Dans la cellule, elle est localisée au niveau du cytoplasme de la mitochondrie et des membranes. Une GPx intestinale a été identifiée. Elle éliminerait les hydroperoxydes provenant des aliments oxydés (Cillard et Cillard, 2006).

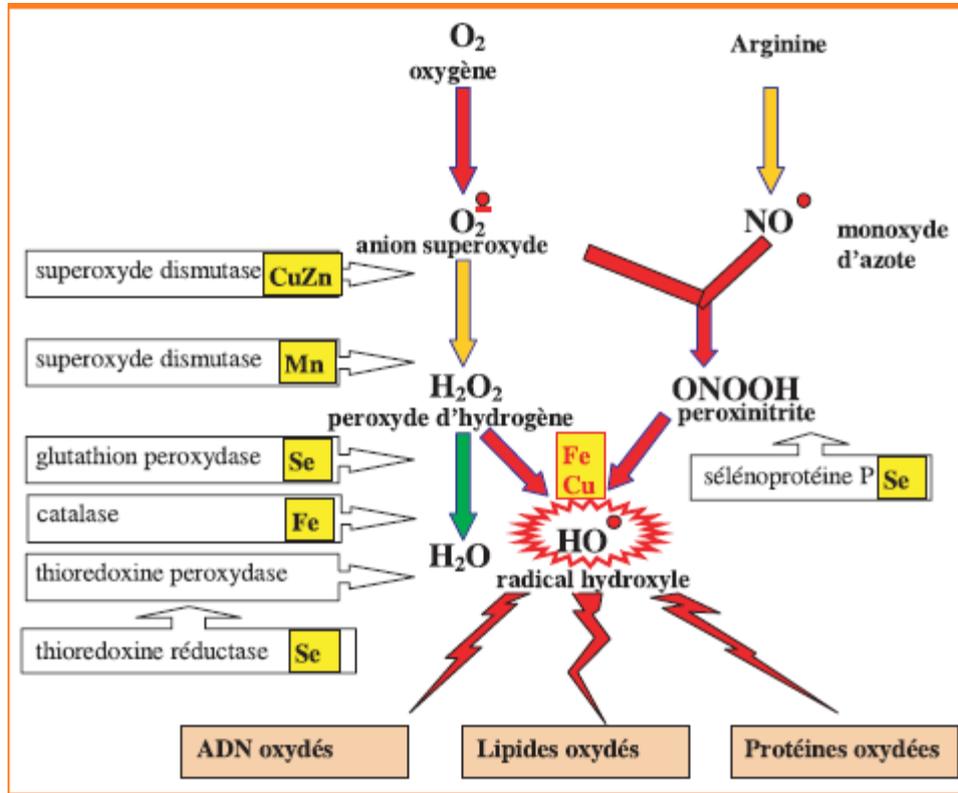
### 2.2.1.3. Catalase (CAT)

Elle catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour donner l'eau et l'oxygène moléculaire (Goudable et Favier, 1997) (**fig. 3**). L'inconvénient de cette enzyme est qu'elle est localisée uniquement dans les peroxysomes et ne peut donc pas agir dans les autres compartiments cellulaires (cytoplasme, mitochondrie, lysosome, noyau) où le peroxyde d'hydrogène est également présent. Ce dernier diffuse très facilement à travers les membranes et peut donc agir à distance de son lieu de production (Cillard et Cillard, 2006).

### 2.2.1.4. Thiorédoxine réductase

La thiorédoxine réductase (TRx R) est une enzyme antioxydante qui intervient dans les processus cellulaires réducteurs thiol-dépendants (**fig. 3**). Cette enzyme régénère la thiorédoxine réduite, qui sert d'équivalent réducteur, et peut également réduire directement les hydroperoxydes lipidiques. De plus, la thiorédoxine et la glutarédoxine sont des réducteurs pour la GPx plasmatique. Il a été démontré que la thiorédoxine stimule l'expression de la

MnSOD. Le système thiorédoxine peut efficacement régénérer les protéines qui ont été inactivées par le stress oxydant (Wassmann et *al.*, 2004).



**Figure 3 :** Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

### 2.2.2. Systèmes non enzymatiques

De nombreuses métalloprotéines telles que la transferrine et l'albumine permettent de chélater les métaux (Fe, Cu, etc) impliqués dans la formation des radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Fenton et d'Haber-Weiss (De Moffarts et *al.*, 2005).

En plus des substances propres à l'organisme, la définition d'antioxydant englobe ainsi toutes les substances chimiques qui, plus spécifiquement, prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation telles que le rancissement des matières grasses et le brunissement enzymatiques (Andrian et *al.*, 2003).

Des molécules endogènes peuvent exercer en plus de leurs rôles physiologiques un rôle antioxydant (Matkowski, 2008). Il s'agit de la mélatonine, l'acide urique, (Turkoglu et *al.*, 2006 ; Borchardt et *al.*, 2008), la bilirubine, les composés avec des groupements thiols (le

glutathion (GSH), N-acétylcystéine) (Halliwell, 1991 ; Goudable et Favier, 1997), et le coenzyme Q (Carrière et *al.*, 2006). Ces molécules peuvent agir en piégeant les radicaux libres, en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes (la mélatonine) (Marshall et *al.*, 1996), en réparant les dommages oxydatifs (glutathion) (Carrière et *al.*, 2006), ou encore en séquestrant les ions de transition (les protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine sont capables de séquestrer le fer, et la céruloplasmine, l'albumine sont capables de séquestrer le cuivre) empêchant ainsi la formation des radicaux libres (Cillard et Cillard, 2006).

Des antioxydants exogènes peuvent être apportés par le régime alimentaire (fruits et légumes) et l'utilisation de certaines plantes (plantes médicinales, aromatiques, etc.). Ces antioxydants sont de nature très variée. Il s'agit des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, quinones, coumarines, lignanes, stilbenes, tannins), des composés azotés (alcaloïdes, amines, bétalains) (Cai et *al.*, 2004 ; Erkan et *al.*, 2008), des vitamines (Vitamine C et E), et des caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) (Goudable et Favier, 1997).

# Chapitre II

## Les huiles essentielles

## Chapitre 2 huiles essentielles

### 2.1. Définition

Selon AFNOR : les huiles essentielles (HEs) sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de *Citrus* par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (Garnero, 1996).

Selon Bruneton (1999), les HEs sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les HEs ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie.

### 2.2. Localisation et biosynthèse

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y a environ 500 000 plantes sur terre, 10 000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales (Encyclopédie, 2001).

Les HEs peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles et bien que cela soit moins habituel, dans des écorces, des bois, des racines, des rhizomes, des fruits, des graines (Burt, 2004; Celiktas et al., 2006; Skocibusic et al., 2006; Behkechi et Abdelouahid, 2010).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon la localisation. Ainsi dans le cas de l'oranger amer (*C. aurantium* L. subsp. *Aurantium*, Rutacées), le « zeste », c'est-à-dire le péricarpe frais du fruit, fournit l'huile essentielle d'orange amère ou « essence de Curaçao », la fleur fournit « l'essence de Néroli » et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à « l'essence de petit grain bigaradier ». La composition de ces trois huiles essentielles est différente (Bruneton, 1999). Le tableau I suivant résume la composition des huiles essentielles extraites à partir de trois parties différentes de l'oranger amer *C. aurantium* L. (écorces, fleurs et feuilles)

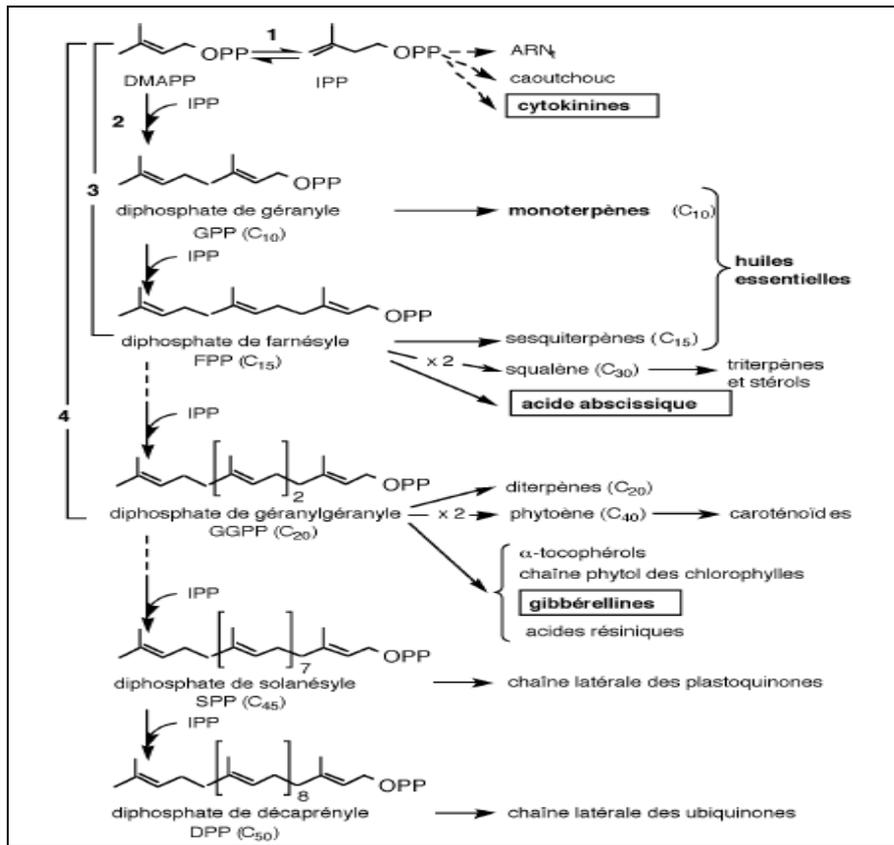
**Tableau I :** composition des 3 HEs de *C. aurantium* L. extraites de 3 parties différentes de la plante (Sarrou et *al.*, 2013).

Essence de Curaçao (écorce)		Essence deNéroli (fleurs)		Essence de Petit grain (feuilles)	
constituant	%	constituant	%	constituant	%
Linalool	29,14	Limonène	94,67	Linalool	58,21
$\beta$ - pinène	19,08	Myrcène	2,00	$\alpha$ -terpinéol	7,11
limonène	12,04	Linalool	0,76	géranyl acétate	4,49
trans $\beta$ -ocimène	6,06	$\beta$ - pinène	0,62	néryl acétate	2,18
E- farnésol	5,14	$\alpha$ - pinène	0,53	trans $\beta$ -ocimène	4,08

Comme il sera expliqué dans le paragraphe « composition chimique », les HEs sont constituées principalement de terpènes ainsi que de dérivés du phénylpropane.

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils c'est-à-dire ceux dont le poids moléculaire est faible : monoterpènes et sesquiterpènes (Bruneton, 1987).

Chez la plupart des plantes étudiées, il existe deux voies différentes de biosynthèse de l'IPP, précurseur des terpènes : une voie cytoplasmique qui conduit aux sesquiterpènes, et une voie plastidiale conduisant aux mono- et diterpènes. (**fig. 4**) (Caissard et Baudino, 2012).



**Figure 4:** Mode d'élongation des processus terpéniques à partir de l'IPP (Lamarti et *al.*, 1994)

Les HEs sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans une cellule transformée en cellule à essence, ou dans des poils glandulaires, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs voire des papilles (Teuscher et *al.*, 2005).

L'isoprène IPP issu de l'acide mévalonique est converti en son isomère DMAPP, l'isoprène activé (Lee et *al.*, 2004).

La construction des squelettes hydrocarbonés se déroule de la même manière par juxtaposition « tête à queue » d'unités isopréniques, unités pentacarbonées ramifiées (IPP et IsoIPP autrement dit le DMAPP) assemblées enzymatiquement. Ainsi, trouve-t-on des squelettes hydrocarbonés (terpènes réguliers) à dix carbones (monoterpènes) puis à quinze carbones (sesquiterpènes) et, plus rarement, à vingt carbones (diterpènes). La juxtaposition « tête-à-tête » de deux IsoIPP conduit aux terpènes irréguliers (Franchomme et Pénoel, 1990).

L'IPP et DMAPP sont associés en GPP (C<sub>10</sub>) qui est à l'origine de formation des monoterpènes. La combinaison du GPP et l'IPP forme un composé sesquiterpénique (C<sub>15</sub>) : le FPP (Lee et *al.*, 2004).

La phénylalanine, produit de la voie shikimate, est précurseur des dérivés du phénylpropane tels que l'acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique. (Lee et *al.*, 2004 ; Bakkali et *al.*, 2008 ; Piochon, 2008).

### 2.3. Propriétés physicochimiques

D'une façon générale, les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles sont variables selon beaucoup de facteurs (lieu de provenance, climat et ses diverses modifications, période de grandes pluies ou de sécheresses prolongées, époque et moyens de récolte, procédés d'extraction, etc.). Ceci explique la marge, souvent assez grande, laissée dans les constantes et pourcentage des composantes (Valnet, 1984).

- Ce sont généralement des liquides à la température ordinaire ;
- elles sont volatiles contrairement aux huiles fixes ;
- elles sont généralement incolores ;
- Leur densité est inférieure à 1, sauf pour trois huiles : la cannelle, le girofle et le saffran ;
- Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et un pouvoir rotatoire ;
- Elles sont peu solubles dans l'eau, sont solubles dans les alcools, les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (Paris et Hurabielle, 1981).

### 2.4. Rôles physiologiques

Le rôle des huiles essentielles n'a pas pu être clairement démontré. En effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme. Toutefois, certains auteurs pensent que les huiles essentielles peuvent avoir un rôle aussi bien dans les interactions végétales (agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination) que dans les interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs (Bruneton, 1993 ; Bekhechi et Abdelouahid, 2010).

D'autres considèrent que les HEs facilitent certaines réactions chimiques et conservent l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (Belaïche, 1979).

## 2.5. Composition chimique

Sur le plan chimique, les HEs sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 85% de l'huile, tandis que d'autres composants sont présents seulement comme trace (Burt *et al.*, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008).

Une HE contient principalement deux groupes de composés différents : les terpènes issus de la voie métabolique de l'acide mévalonique et qui sont prépondérants dans la plupart des essences, et les dérivés du phénylpropane issus de la voie de l'acide shikimique. Elle peut aussi contenir des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Bruneton, 1987,1999 ; Svoboda et Hampson, 1999 ; Bakkali *et al.*, 2008 ; Franchomme et Pénoel, 1990).

Les constituants des HEs possèdent un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou encore aromatique. Ils peuvent posséder toutes les grandes fonctions de la chimie organique : alcools, composés carbonylés (principalement aldéhydes et cétones), esters, phénols et, dans une moindre mesure, dérivés azotés et soufrés. Néanmoins, les terpènes et terpénoïdes sont de loin les plus abondants (Golebiowski et Fernandez, 2012).

Les **terpènes** sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en : monoterpènes ( $C_{10}$ ) qui peuvent être linéaires (myrcène), monocycliques (limonène) bicycliques (pinène) ; sesquiterpènes ( $C_{15}$ ) plus diversifiés, comme par exemple  $\beta$ -caryophyllène,  $\beta$ -bisabolène,  $\alpha$ -humulène,  $\alpha$ - bisabolol, farnesol. Le processus de formation des terpènes par juxtaposition d'unités isopréniques peut se poursuivre, mais dans des buts autres que la synthèse des essences ; en particulier celle de sesterterpènes ( $C_{25}$ ), et des triterpènes ( $C_{30}$ ) et stéroïdes ( $C_{28}$ ) ; les caroténoïdes ( $C_{40}$ ), quant à eux, sont synthétisés dans d'autres types cellulaires, etc. Les plus longues chaînes hydrocarbonés connues dans la nature : les polyterpènes des latex ( $C_{4000}$  !), ont emprunté cette même voie. (Lamarti *et al.*, 1994, Johnston *et al.*, 2006 ; Franchomme et Pénoel, 1990).

Les dérivés du phénylpropane, issus de la voie de l'acide shikimique, sont moins abondants que les terpénoïdes et sont généralement des composés odorants. Exemples : eugénol, trans-cinnamaldéhyde, safrol, la vanilline, l'estragol, l'anéthol, les principes piquants, etc. (Bruneton, 1999 ; Lee *et al.*,2004; Piochon, 2008). La **figure 5 (a et b)** suivante montre quelques terpènes et phénylpropanoïdes (Bakkali *et al.*, 2008).

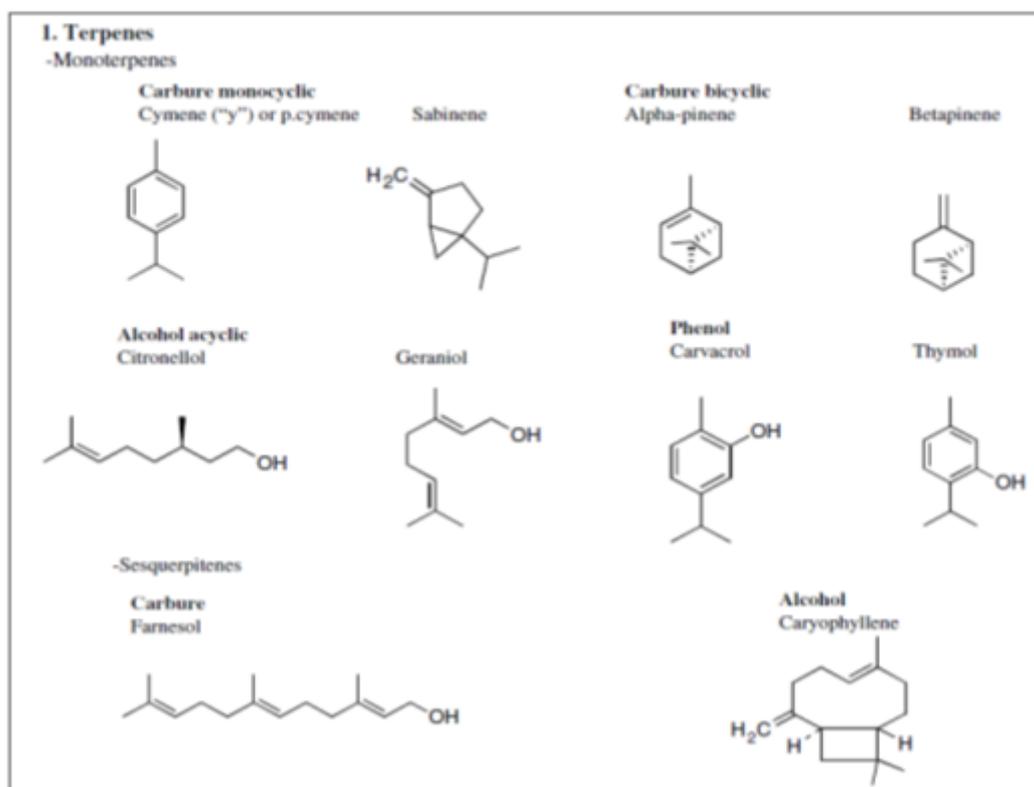


Figure 5 (a)

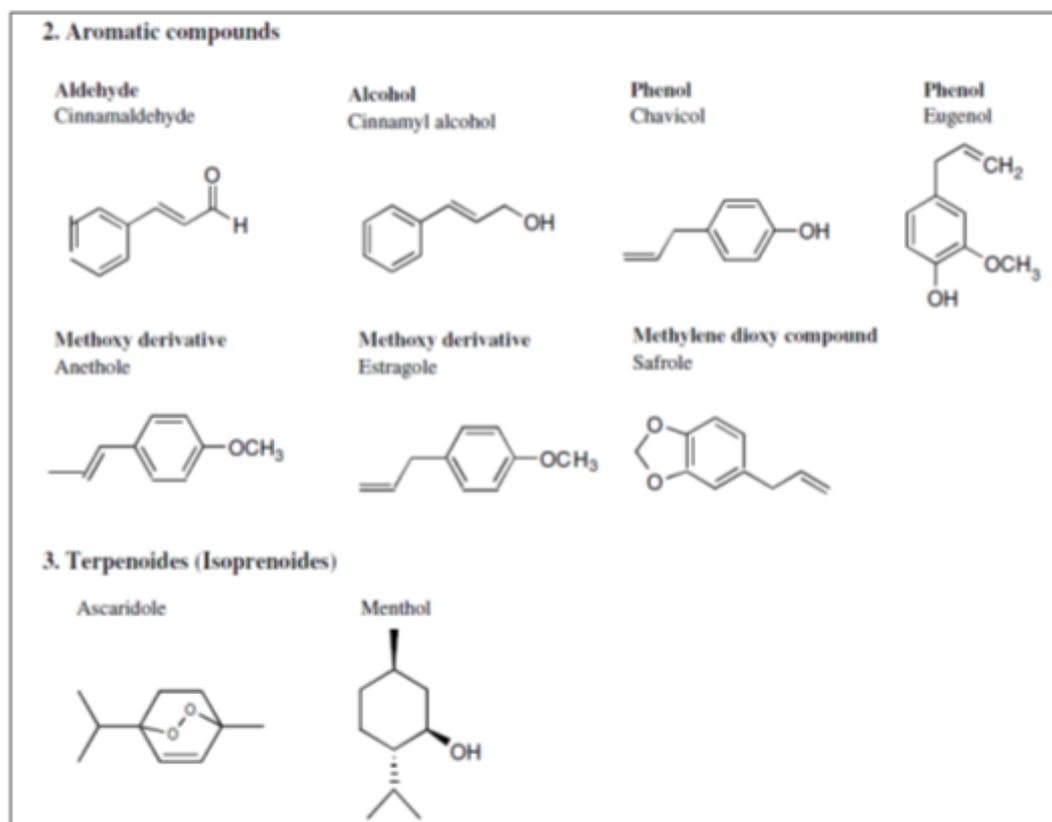


Figure 5 (b)

**Figure 5 :** Structure chimique des composés isolés des HEs ; **(a)** : les terpènes. **(b)** : les phénylpropanoïdes (Bakkali *et al.*, 2008).

## 2.6. Facteurs influençant la composition chimique des HEs

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant divers facteurs : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes la partie utilisée de la plante, méthode d'extraction (Bruneton, 1999 ; Svoboda et Hampson, 1999).

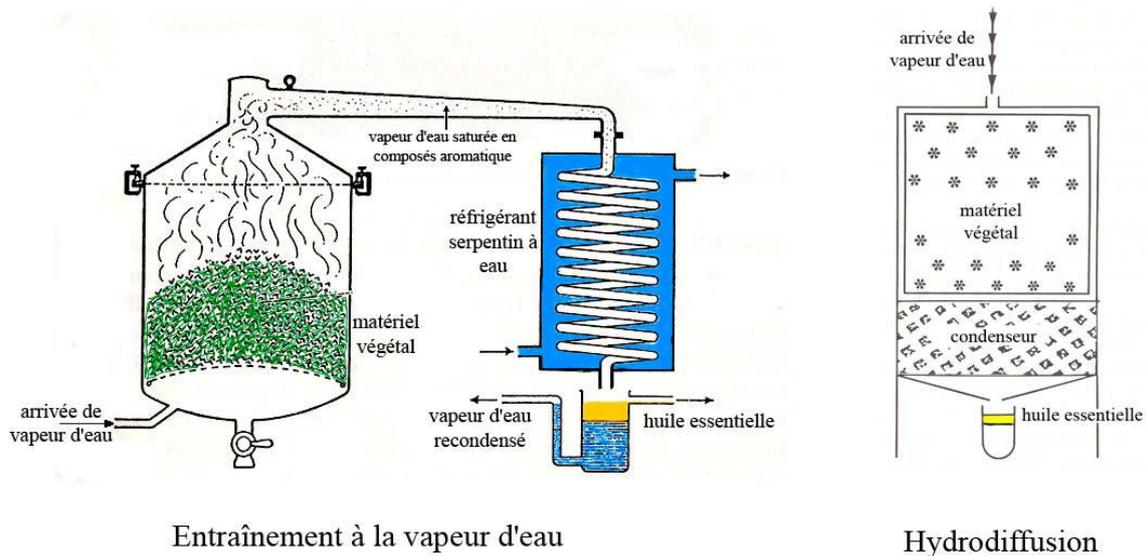
## 2.7. Méthodes d'extraction

Il est important aussi bien de faire la distinction entre le terme « huile essentielle », réservé au produit aromatique issu de la distillation, et le terme « essence » issu de l'extraction par expression à froid ( Franchomme et Pénéol, 1990 ; Cocorin et Guerin, 2003). Cette dernière est chimiquement identique à l'essence naturelle contenue dans les poches oléifères de l'écorce du fruits, tandis que l'HE est l'essence transformée par la chaleur du procédé de distillation et est basée sur le principe que la plupart des composés volatils odorants sont susceptibles d'être entraînés par des aérosols de vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe (Cocorin et Guerin, 2003)

### 2.7.1. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (**fig. 6**).

- **L'hydrodiffusion**, rarement utilisé est une variante de la distillation par entraînement à la vapeur. Son principe repose sur l'action descendante de la vapeur d'eau (**fig. 6**) (Meyer et Warnod, 1984).



**Figure 6 :** Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Lucchesi, 2005).

### 2.7.2. Hydrodistillation

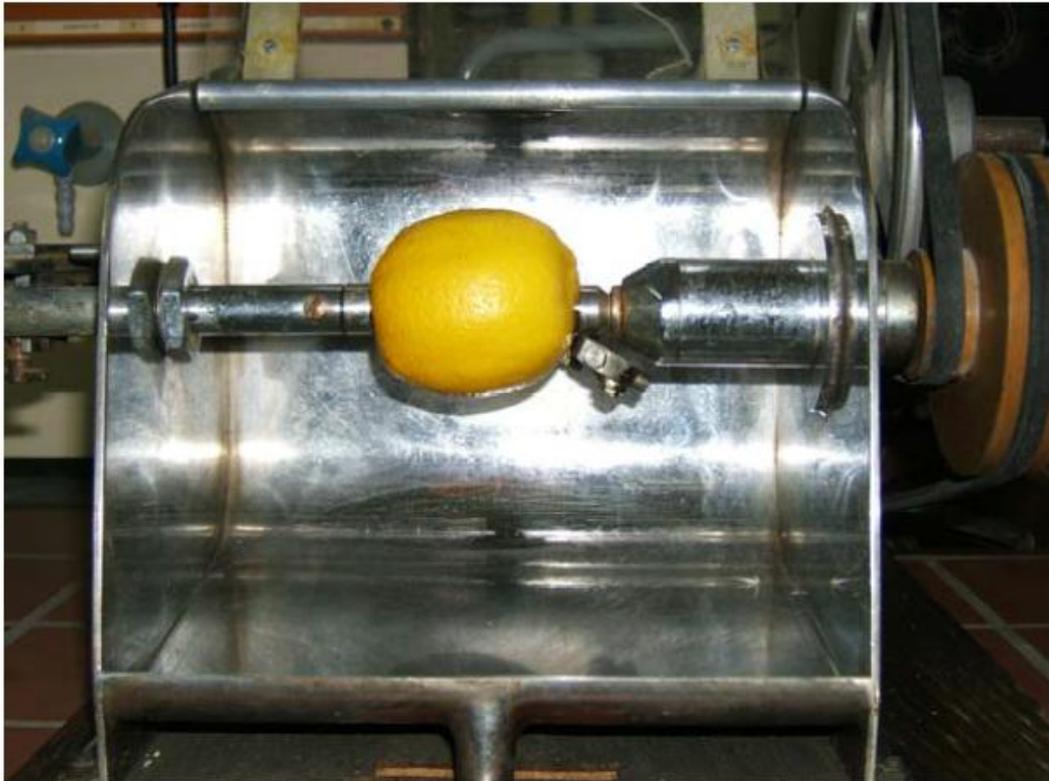
Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène où la matière végétale est immergée dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les cellules libèrent leurs contenus aromatiques qui seront entraînés par la vapeur d'eau en passant par un refroidisseur. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage ; son but est de saturer le circuit et de limiter les pertes de substances précieuses fortement hydrosolubles (Franchomme et Pénol, 1990). En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger (Bruneton, 1987 ; Lucchesi, 2005).

### 2.7.3. Expression à froid

Les HEs d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères ; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide (**fig. 7**). Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme.

L'essence est alors séparée par décantation. Diverses techniques manuelles ou mécaniques, traitant le fruit entier ou seulement les écorces, sont utilisées (Belaïche, 1979 ; Ferhat et *al.*, 2010).



**Figure 7** : photo du montage de l'expression à froid (Bousbia, 2011)

#### **2.7.4. Autres méthodes d'extraction**

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont les méthodes les plus importantes aujourd'hui pour l'obtention des HES à partir des plantes (Baker et *al.*, 2000; Kulisic et *al.*, 2004). Néanmoins, d'autres techniques ont été développées :

- **Extraction par les fluides supercritiques**

La grande sélectivité des fluides supercritiques, avec la faible polarité et le poids moléculaire des composés les plus importants dans la fraction volatile, permet l'utilisation d'une température et d'une pression faibles (Bicchi, 2000). C'est pourquoi cette technique est recommandée pour l'extraction des huiles essentielles afin de ne pas les altérer.

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé ; le CO<sub>2</sub> supercritique (à l'état supercritique c.-à-d. à T= 31°C et P = 73bars, le CO<sub>2</sub> possède un bon pouvoir d'extraction). C'est le gaz le plus utilisé car il est ininflammable, non corrosif, peu coûteux, et généralement sûr. (Son utilisation minimise le potentiel d'hydrolyse et d'isomérisation durant

l'extraction grâce à la faible température) (Rozzi *et al.*, 2002 ; Fellah *et al.*, 2006 ; de Souza *et al.*, 2008).

- **Extraction assistée par micro-ondes**

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique récente développée, dans le but de réduire le temps d'extraction, de diminuer la consommation de solvants, d'augmenter le rendement en extraction et d'améliorer la qualité des extraits. Le rayonnement micro-onde permet de chauffer l'eau présente naturellement dans le matériel végétal. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes sécrétrices, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (Chemat *et al.*, 2006 ; Sahraoui *et al.*, 2008).

## **2.8. Toxicité des HEs**

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques (Hammer et Carson, 2011). Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (Bernadet, 1983).

Les huiles essentielles de *Citrus* sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photosensibilisantes. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus limon* extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Teuscher *et al.* 2005).

## **2.9. Méthodes de caractérisation des HEs**

La détermination de la composition chimique des H.Es est une étape importante malgré le développement des méthodes de séparation et d'identification. Elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en oeuvre de diverses techniques.

### **2.9.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les progrès

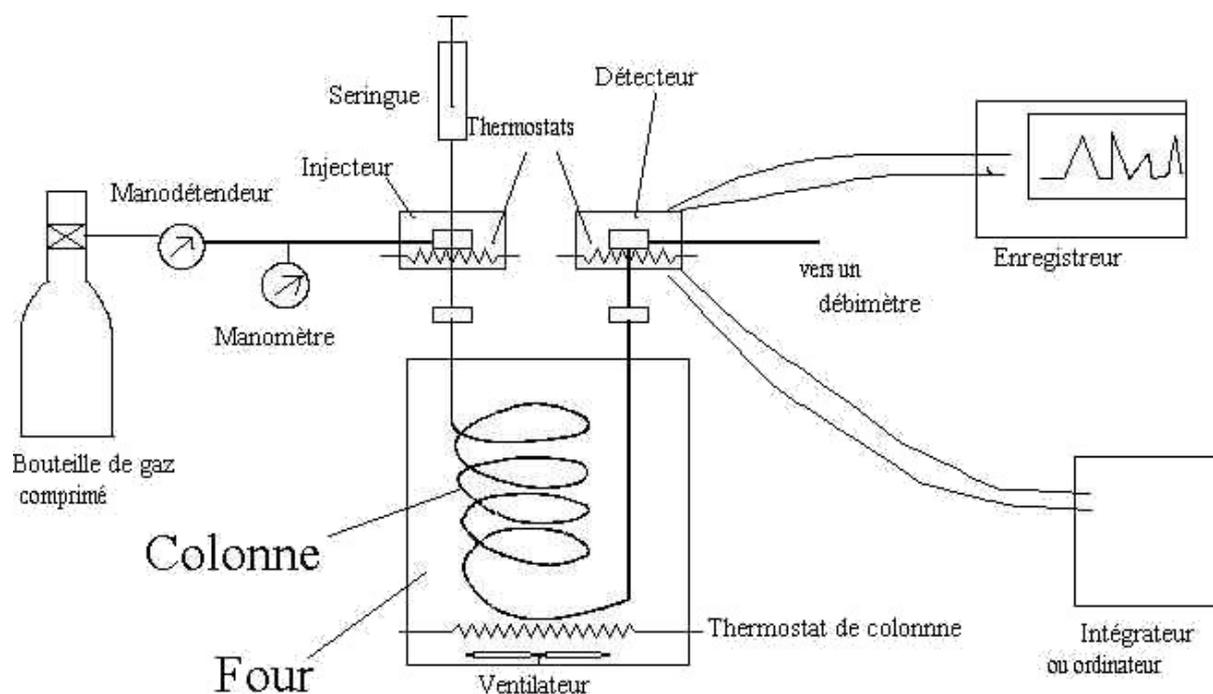
technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des H.Es.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans le four et un détecteur (**fig. 8**). Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en “*split*” ou injection avec “division de flux”, il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur (hélium, azote, argon, ou hydrogène). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire (Bouchonnet et Libong, 2002).

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique la colonne analytique. Cette colonne peut être de deux types : colonne remplie ou colonne capillaire. Dans le cas des H.Es, les colonnes capillaires semblent plus adaptées ; elles sont en métal, en verre ou plus souvent en silice fondue. Les substances de l'échantillon traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire (Besombes, 2008).

Le développement des phases stationnaires et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les H.Es. Ainsi, la CPG bidimensionnelles (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec les composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans la première colonne, puis les composés qui coéluent sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés (Paolini, 2005).



**Figure 8 :** Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse (Besombes, 2008).

### 2.9.2. La spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse, où les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" (IE) ou à "ionisation chimique" (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (Bouchennet et Libong, 2002). Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur ration « masse/Charge », à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (Besombes, 2008). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

### 2.9.3. Couplage CPG/SM

Le couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé. Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM – IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des HEs (Cavalli, 2002). Le bombardement de substances par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (Bouchennet et Libong, 2002).

### **2.10. Effets biologiques**

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries.

Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (Bandoniene et *al.*, 2000).

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

Chapitre III  
Le genre *Citrus*

### 3.1. Classification botanique

Le genre *Citrus* est un genre de plantes des pays chauds de la famille des Rutacées, regroupant des arbres et arbustes dont plusieurs espèces sont cultivées pour leurs fruits, les agrumes.

La classification des agrumes est comme suit :

**Règne** : Végétal.

**Embranchement** : Spermaphytes.

**Sous-embranchement** : Angiospermes.

**Classe** : Eudicotylédones.

**Ordre** : Rurales.

**Sous-classe** : Rosidées.

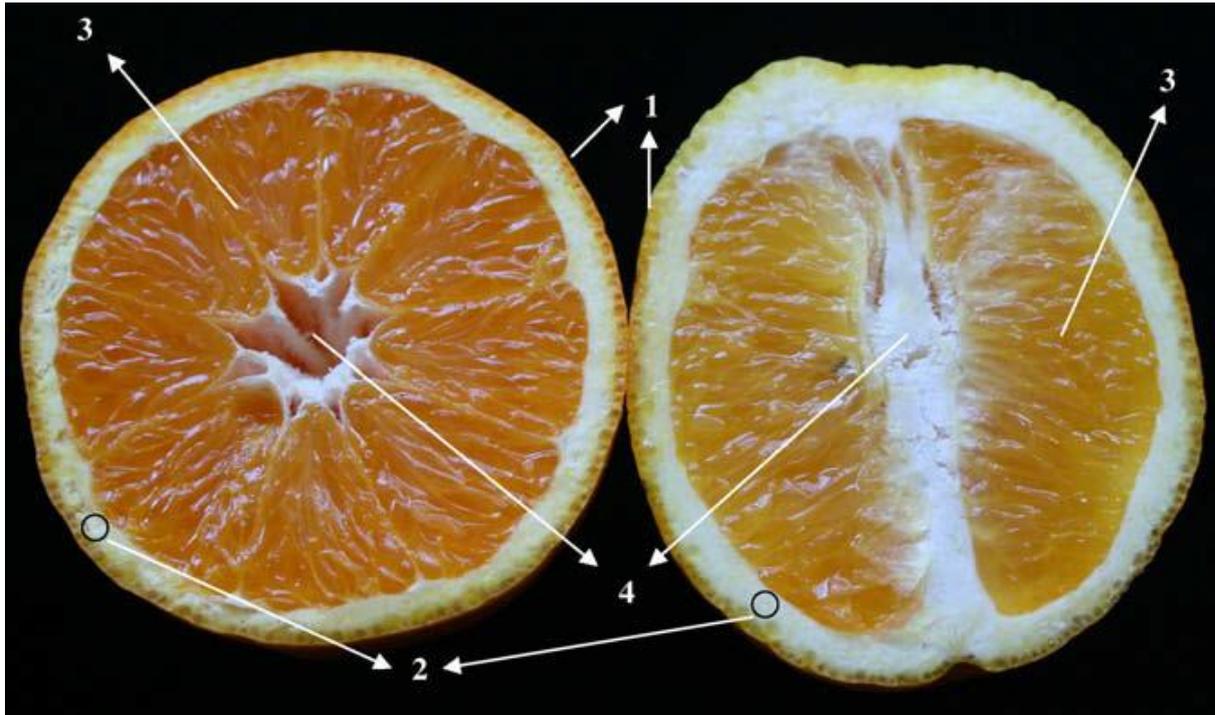
**Famille** : Rutaceae.

**Genres** : Poncirus, Fortunella, et Citrus.

(Guignard, 2001).

### 3.2. Etude botanique

Les Citrus sont des arbustes de couleur verte, de longueur variant de 3 à 15 m et dont le bois est très dur (Ferhat et *al.*, 2010). Les feuilles sont cireuses et coriaces, elles sont simples, en général découpées en trois folioles mais fréquemment réduites à la foliole terminale, de forme ovale-lancéolée à allongée (Teuscher et *al.*, 2005 ; Dupont et Guignard, 2007 ; Ferhat et *al.*, 2010). Les fleurs sont soit solitaires soit groupées, de couleur blanche. Le fruit est une baie, ronde ou allongée, de taille très variable et son poids peut atteindre un kilogramme (Teuscher et *al.*, 2005 ; Ferhat et *al.*, 2010). L'écorce du fruit (péricarpe) est appelée « flavédo », comprend une partie externe, l'épicarpe (dénommé « zeste »), coloré en jaune, orangé à rouge à maturité, parsemé de nombreuses poches sécrétrices schizolysigènes remplies d'huile essentielle, et un mésocarpe externe. Le mésocarpe interne, appelé « albédo » de couleur blanche, a une texture plus ou moins spongieuse et d'épaisseur variable. L'épiderme interne ou endocarpe, émet des poils renflés charnus qui forment la pulpe sucrée et comestible (Teuscher et *al.*, 2005 ; Dupont et Guignard, 2007) (**fig. 9**).



**Figure 9 :** Coupes transversale et longitudinale du fruit d'oranger. 1 – Flavédo ; 2 – albédo ; 3 – endocarpe ; 4 – placenta. (Guimarães *et al.*, 2010)

Les poches sécrétrices (dont le type est exclusivement présent chez les Rutacées) sont toujours superficielles et libèrent leur contenu (HE) à la moindre pression (Bruneton, 2001).

### 3.3. L'espèce *Citrus sinensis* et ses variétés

L'oranger *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, est l'espèce du genre *Citrus* la plus importante, tant par le nombre de variétés qu'elle renferme, que par l'importance de ses productions.

Les fruits sont de forme et de coloration variables suivant les variétés, ce qui permet de classer les oranges en quatre groupes :

- Les oranges blondes Navel. Elles se différencient des autres par deux caractéristiques : la présence au sein de l'apex, d'un fruit rudimentaire « Navel » et l'absence de pépins. les variétés les plus communes sont Washington, Thomson ;
- Les oranges blondes : communes (multipliées traditionnellement et contenant des pépins) et fines (plus cultivées pour leur productibilité, époque de production, absence de pépins). Les variétés de ce groupe sont : Salustiana, Hamlin, Cedenera, Shamouti et Valencia late ;

- Les oranges sanguines ne se distinguent des blondes que par la présence de pigments anthocyaniques dans l'épiderme et la pulpe. Les variétés sont : Double fine améliorée, Moro et Tarocco ;
- Les oranges sans acidité : comme les Limettes, limonettes, et les citrons doux sont insipides. Les variétés sont Impérial, Réal, Lima. (Ferhat et *al.*, 2010).

### 3.4. Les huiles essentielles de *Citrus* et leur synthèse

Ce sont bien sûr les fruits des *Citrus* spp.-les hespérides- qui confèrent à la famille son importance économique. Les mêmes *Citrus* fournissent à l'industrie agro-alimentaire pectines et huiles essentielles, lesquelles sont également utilisées en parfumerie (Bruneton, 2001).

Les *Citrus* sont caractérisés par la présence dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpe des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique (Goris, 1967 cité par Ferhat et *al.* 2010). Dans les fleurs de *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Ce sont les fleurs d'orangers, très odorantes, qui en contiennent le plus. Dans les feuilles, le limbe est formé du parenchyme palissadique et du parenchyme lacuneux dont l'ensemble constitue le mésophylle. C'est dans le parenchyme lacuneux que se forment les poches à essence (Ferhat et *al.*, 2010). (**fig. 10**)

Il a été rapporté que les huiles essentielles d'écorces de *Citrus* font partie des sources riches en composés bioactifs à savoir les coumarines, les flavonoïdes, les carotènes, les terpènes et linalool, etc. (Mondello et *al.*, 2005). Elles sont aussi utilisées contre l'anxiété, les troubles du sommeil. Elles ont également des effets stomachique, eupeptique, sédatif et antispasmodique (Chevallier et Crouzet-Segarra, 2004).



**Figure 10 :** Micrographie photonique d'une coupe de péricarpe du fruit de *Citrus* sp. (La cavité correspond à une poche sécrétrice vidée de son HE) (Caissard et Baudino, 2012).

# Partie expérimentale

# Chapitre I

## Matériel et méthodes

Ce travail consiste en une étude comparative entre les HEs extraites à partir du zeste frais et sec de l'orange douce *Citrus sinensis*.

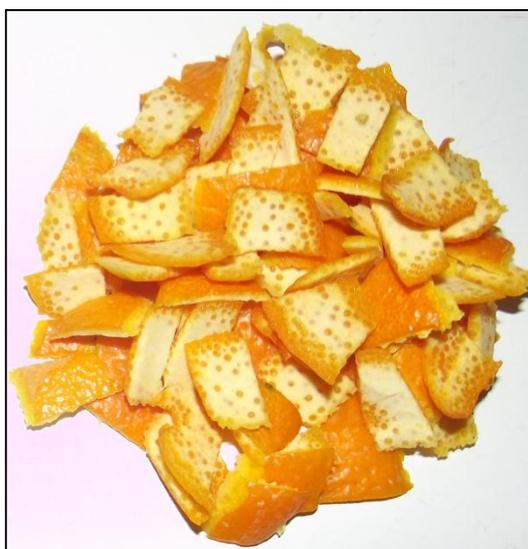
## 1.1. Matériel

### 1.1.1. Matériel végétal

Les fruits d'orange douce *Citrus sinensis* (variété Valencia late) ont été directement récoltés au hasard à partir d'une exploitation agrumicole privée située à Oued Ghir, wilaya de Bejaïa, le mois d'avril 2013.

Les fruits ont été soigneusement lavés, séchés et épluchés à l'aide d'un économe (en évitant d'inclure l'albédo). Les écorces sont coupées en petits morceaux d'environ 1 cm<sup>2</sup> maximum.

La quantité du zeste obtenu est ensuite divisée en deux portions, l'une est laissée sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière, tandis que l'autre moitié sera utilisée à son état frais (**fig. 11**)



A



B

**Figure 11:** photographies des écorces fraîches (A) et sèches (B) de *Citrus sinensis*

#### ➤ Description

La Valencia Late est l'orange à jus la plus répandue dans le monde.

Le fruit de la variété d'orange douce Valencia :

- Est de forme ronde, un peu ovalisante ;
- Est de taille moyenne : de 6 à 9 cm de diamètre et pèse 140 à 180 g ;
- A une peau fine, une écorce jaune-orangé et peu rugueuse ;
- A une pulpe très juteuse et acidulée ;
- Est souvent asperme, mûrissant entre avril et juin d'où son nom « Late » (tardive).

**(fig. 12)**



**Figure 12:** photographie d'une coupe longitudinale et transversale du fruit de *Citrus sinensis* variété Valencia late.

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Extraction des HEs

L'huile essentielle a été extraite à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger (Kamal et *al.*, 2011) (**fig. 13**). La technique d'hydrodistillation consiste à immerger la matière végétale (dans notre cas l'épicarpe frais et sec de l'orange douce) dans de l'eau distillée : 200-250g\* d'écorces sont introduites dans le ballon. Après addition de l'eau distillée (1-1.5 L)\*, le mélange est porté à ébullition jusqu'à 3h après obtention de la première goutte d'huile essentielle. Grâce au système de cohobation, la quantité d'eau au sein du ballon est quasiment la même tout au long de la distillation (Ferhat et *al.*, 2010).

➤ *Principe :*

La chaleur provoque l'éclatement des cellules contenant les essences, libérant donc leur contenu. Les molécules aromatiques des HEs ainsi que la vapeur d'eau sont condensées en traversant un système de refroidissement.

Les gouttelettes d'eau-HE sont récupérées dans une ampoule à décanter. Deux phases non miscibles apparaissent : une phase huileuse surnageant une phase aqueuse.

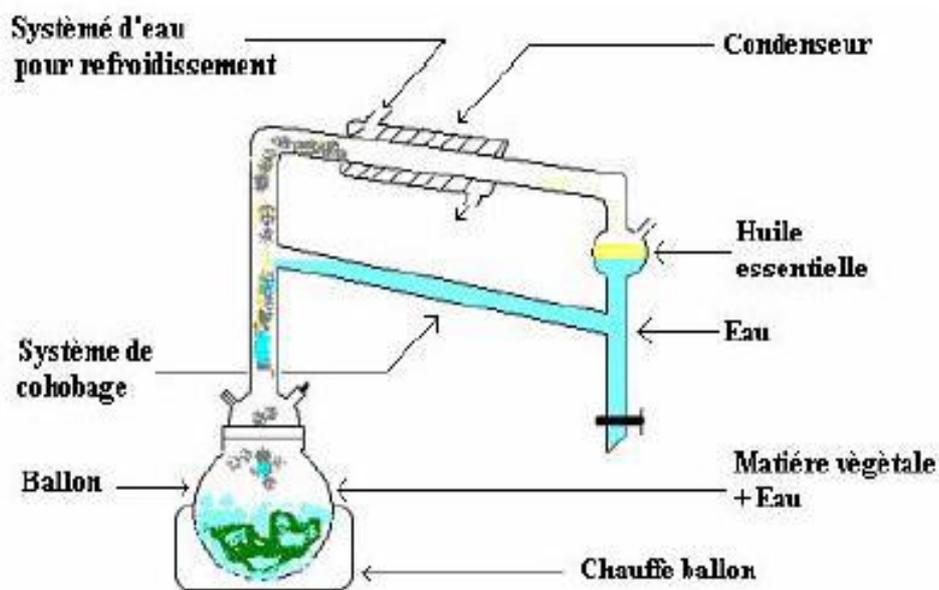
Le principe de l'hydrodistillation (ainsi que celui de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau) repose sur le fait que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées (Baker et *al.*, 2000; Lucchesi, 2005 ; Donelian et *al.*, 2009).

Pour débarrasser l'huile essentielle décantée des traces d'eau restante, on utilise le sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Hussain et *al.*, 2008).

L'huile essentielle est conservée à 4°C dans des flacons opaques pour une utilisation ultérieure (Chanthaphon et *al.*, 2008 ; Sharma et Tripathi, 2008).

---

\* Les quantités de zeste et les volumes d'eau distillée introduits varient selon la nature des écorces (fraîches ou sèches).



**Figure 13 :** Dispositif d'hydrodistillation, type Clevenger (Hernandez Ochoa, 2005).

Pour caractériser les, il est intéressant d'évaluer quelques paramètres qui concernent les HEs extraites.

#### 1.2.1.1. Taux d'humidité

La teneur en eau des échantillons a été déterminée selon la méthode du séchage.

Une quantité d'écorces est pesée à l'état frais, puis après séchage, et le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$(H)\% = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

Où

H : humidité (%)

$M_f$  : masse du matériel végétal frais (g)

$M_s$  : masse du matériel végétal sec (g)

### 1.2.1.2. Rendements des HEs

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

$$R (\%) = \frac{Phe}{Pmv} \times 100$$

Où

R : rendement en HE (%)

Phe : poids de l'HE extraite (g)

Pmv : poids du matériel végétal traité (g)

## 1.2.2. Caractérisation des HEs

### 1.2.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractères qui déterminent la qualité organoleptique d'une HE sont son aspect, sa couleur et son odeur.

### 1.2.2.2. Indices physiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

- **Mesure de la densité relative à 20°C (Norme NF T 75 - 111)**

La densité relative de l'HE est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est  $d_{20}$ . La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de volume : 5 ml à la température de 20°C.

- **Mesure de l'indice de réfraction (norme NF T 75 – 112)**

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre (ZUZI abbe refractometer). Quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^{\circ}\text{C})$$

$I_{20}$  = Indice à 20°C

$I_t$  = Indice à la température ambiante ou de mesure.

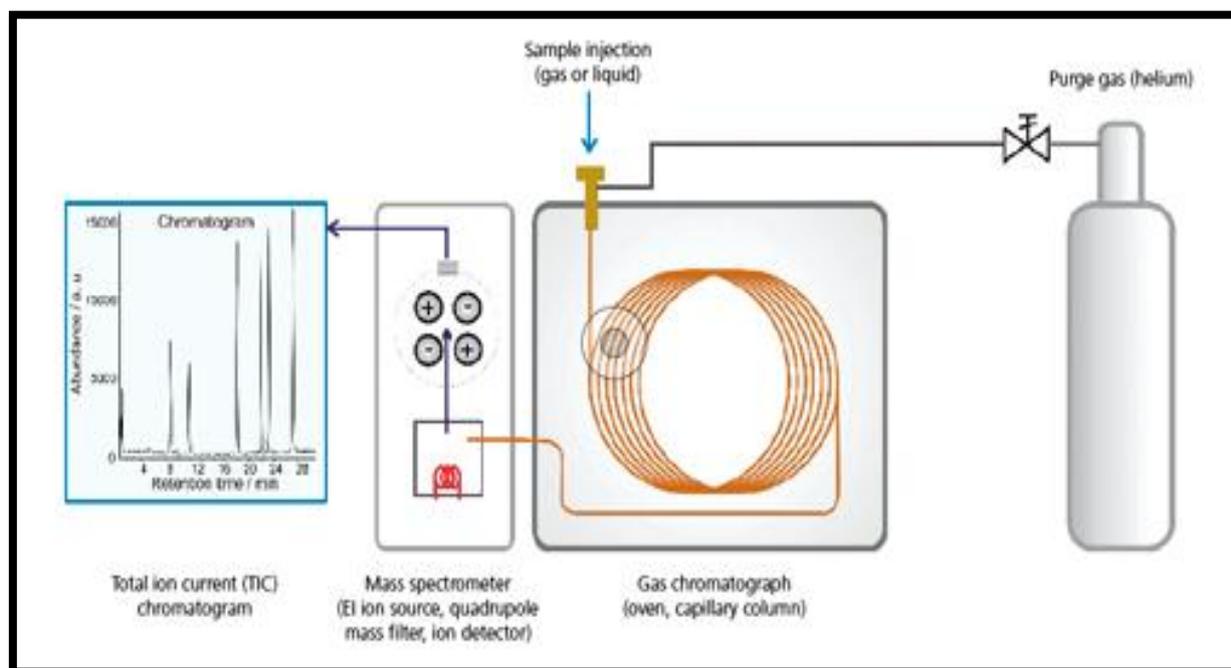
$T$  = Température ambiante.

### 1.2.2.3. Analyse de la composition chimique des HEs par CG/SM

Les composés des huiles essentielles (HEs) des écorces fraîches et sèches de *Citrus sinensis* ont été séparés sur une colonne chromatographique capillaire. La température du four a été programmée à partir de 40°C jusqu'à 250°C avec un pas (ou rampe) de 6°C.min<sup>-1</sup> ; les températures initiale et finale ont été maintenues pendant 5 minutes chacune. L'Hélium était utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>. Un volume de 0.2 µl a été injecté pour chaque huile essentielle, avec le mode splitless (sans division du volume de l'échantillon injecté).

La chromatographie gazeuse a été couplée à un spectromètre de masse qui joue le rôle du détecteur afin d'identifier les différents composés des HEs étudiées.

La figure 14 suivante représente un schéma des différents éléments qui composent la CG/SM.



**Figure 14** : schéma des éléments de la CG/SM



$$I\% = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Où  $A_{\text{blanc}}$  est l'absorbance du control (contenant tous les réactifs sauf le composé à tester), et  $A_{\text{échantillon}}$  est l'absorbance de l'échantillon.

### 1.2.3.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Le principe est basé sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  (fer ferrique), présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , en sa forme réduite  $\text{Fe}^{2+}$  (fer ferreux) (Ak et Gülçin, 2008).

L'activité réductrice a été déterminée selon la méthode d'Oyaizu modifiée (Lagha et Madani, 2013 ; Amezouar, 2013).

500  $\mu\text{l}$  de solution d'échantillons à différentes concentrations sont mélangés, dans des tubes à essai, avec 1.25 ml de tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 1.25 ml de solution de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) (à 1%). Les tubes sont ensuite incubés à 50°C pendant 20 min. Un volume de 1.25 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (à 10%) est ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant (1.25 ml) est mélangé à l'eau distillée (1.25 ml) et 250  $\mu\text{l}$  de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ , 0.1 %). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique et le BHA sont utilisés pour la comparaison. Dans ce test, plus l'absorbance est élevée, plus le pouvoir réducteur est grand (Singh et *al.*, 2010).

### 1.2.3.3. Activité scavenger du $\text{H}_2\text{O}_2$

Le principe de cette méthode est qu'il y a une diminution de l'absorbance du  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec l'oxydation de ce dernier (Ak et Gulcin, 2008).

L'évaluation de l'effet scavenger sur le peroxyde d'hydrogène est réalisée selon la méthode rapportée par Kumar *et al.* (2007). 2 ml d'extrait méthanolique et d'huile essentielle à différentes concentrations sont additionnés de 1,2 ml d'une solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40 mM dans un tampon phosphate à pH 7,4 et à 0,1 M). Le blanc de l'échantillon est préparé de la même

façon en remplaçant la solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le tampon phosphate. Après 10 min d'incubation, la lecture se fait à 230 nm. L'acide ascorbique et le BHA sont utilisés comme standards.

Le pourcentage d'inhibition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du H}_2\text{O}_2 = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

Avec

A<sub>E</sub> : absorbance de l'échantillon.

A<sub>T</sub> : absorbance du témoin.

#### **1.2.4. Analyse statistique**

Les expérimentations réalisées dans le présent travail ont été répétées trois fois, les moyennes et les écarts types sont calculés par le logiciel Origin. 8.6E.

Le seuil de signification est fixé à p<0,05.

# Chapitre II

## Résultats et discussion

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

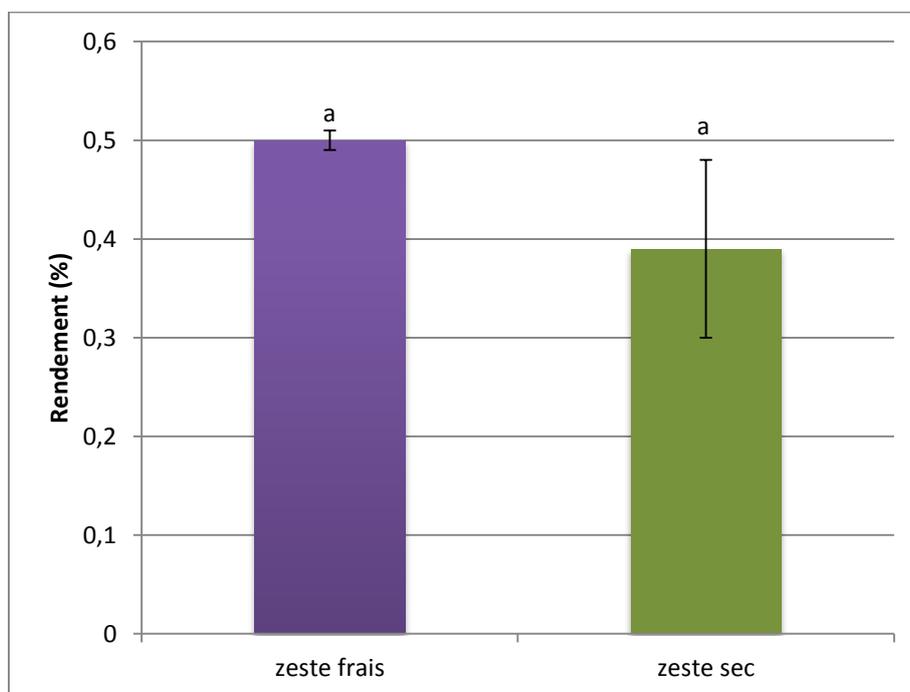
### 2.1. Le taux d'humidité

Le but de ce test était d'estimer la quantité d'eau présente dans le matériel végétal. Ce dernier étant séché à température ambiante.

Le taux d'humidité est estimé à  $68.52 \pm 0.45\%$

### 2.2. Calcul du rendement

La figure 16 représente les rendements des HEs obtenus avec hydrodistillation des zestes frais et sec de *C. sinensis* variété Valencia.



**Figure 16:** Rendements des HEs extraites

Nous remarquons que le zeste frais représente un rendement plus élevé d'HE que le zeste sec (respectivement  $0.50 \pm 0.01\%$  et  $0.39 \pm 0.09\%$ ). La différence entre les deux rendements est néanmoins non significative (l'analyse de l'ANOVA révèle une valeur de F observée = 5.75 ; P = 0,14).

Cependant, les résultats publiés par Kamal *et al.* (2011) ont montré des rendements plus élevés des HEs extraites par hydrodistillation des écorces séchées à température ambiante de *C. sinensis*.

Des résultats proches des nôtres ont toutefois été obtenus par Ferhat *et al.* (2010) de l'huile essentielle extraite de la même variété par la même méthode.

De plus, des rendements significativement élevés sont obtenus par Bousbia (2011) lors de l'hydrodistillation des écorces de *C. sinensis*. Var. Valencia (1.1%) et par Sunda avec les espèces *C. limonum*, *C. bergamia*, *C. reticulata* (0.5%, 0.7% et 0.95%, respectivement).

Ces différences entre les résultats peuvent être expliquées par le fait que les rendements d'huiles essentielles sont influencés par plusieurs facteurs lors de leur extraction : soit des facteurs qui concernent la plante (espèce, variété, race chimique, etc.) soit des facteurs liés aux conditions expérimentales (procédé d'extraction, durée d'extraction, etc.), d'ailleurs, la valeur élevée de l'erreur sur le rendement du zeste sec en HE peut être attribuée à une différence de la durée du séchage des échantillons d'écorces.

Le faible rendement obtenu de l'HE issue du zeste sec peut également être expliqué par une évaporation des éléments d'HEs après stockage du matériel végétal.

### **2.3. Caractérisation des huiles essentielles**

#### **2.3.1. Caractéristiques organoleptiques**

Les huiles essentielles des écorces fraîches et sèches ont présenté les caractéristiques suivantes :

Aspect : liquide, limpide, mobile ;

Couleur : jaune orangé ;

Odeur : caractéristique, d'une certaine fraîcheur pour l'huile essentielle de l'écorce fraîche, et légèrement acidulée pour l'huile essentielle de l'écorce sèche.

#### **2.3.2. Indices physiques**

Les résultats des densités ainsi que ceux des indices de réfractions sont résumés dans le tableau I.

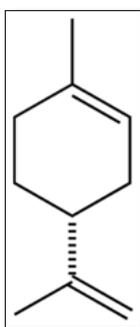
**Tableau I:** les indices physiques étudiés des HEs des écorces fraîches et sèches de *C. sinensis*

Paramètre étudié	HE du zeste frais	HE du zeste sec
Densité	0.811	0.843
Indice de réfraction	1.469	1.470
Indice de réfraction corrigé	1.483	1.484

En comparant ces résultats à ceux obtenus par Ferhat et *al.* (2010) (densité 0.849, indice de réfraction 1.474) et Kamal et *al.* (2011) (densité :  $0.834 \pm 0.02$ ,  $0.835 \pm 0.02$ , indice de réfraction à 25°C  $1.4596 \pm 0.03$ ,  $1.4622 \pm 0.04$ ) et sachant que l'indice de réfraction a été mesuré à une température de 23°C, nous pourrions conclure que ces valeurs sont conformes aux normes décrites par l'AFNOR (Anonyme, 2006).

### 2.3.3. Analyse chimique par CG/SM

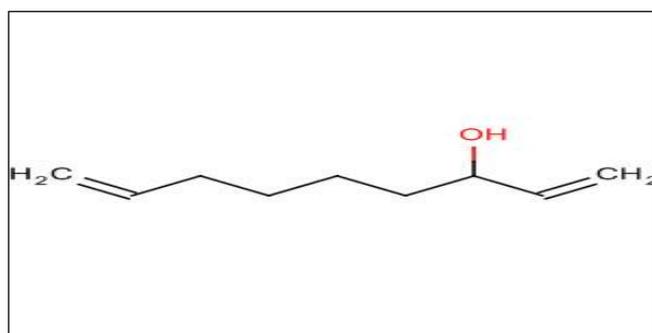
L'analyse des HEs du zeste frais et sec de *C. sinensis* a montré que le composé monoterpénique, le limonène, dont la structure est illustrée dans la figure 17, représente le composé le plus abondant dans les deux HEs : avec un pourcentage 83% et 92% pour les HEs des écorces fraîches et sèches, respectivement. D'autres études réalisées sur les HEs de différents *Citrus*, extraites par différentes techniques, ont révélé l'abondance du limonène : de 71.39 à 72.9 %, par hydrodistillation, Ferhat et *al.* (2010), 90.5% par expression à froid, Azar et *al.* (2011). Cependant des résultats différents des nôtres ont été obtenus par Kamal et *al.* (2011) : 80.9% et 72.7% de limonène dans les HEs du zeste frais sec, respectivement.

**Figure 17 :** Structure du limonène

La composition des huiles essentielles est influencée par divers facteurs ; variabilité génétique, facteurs environnementaux, méthodes d'extraction, etc.

D'autre part, les conditions expérimentales de la chromatographie gazeuse (températures initiale et finale, et la durée de leur maintien, etc.) peuvent fortement influencer sur la détection des composés sortant de la colonne ; par exemple, la résolution est meilleure si le pas (rampe) du gradient de température du four est faible (dans notre cas, il est égal à 6°C/min alors que dans l'étude de Kamal et *al.* (2011) il était de 4°C/min).

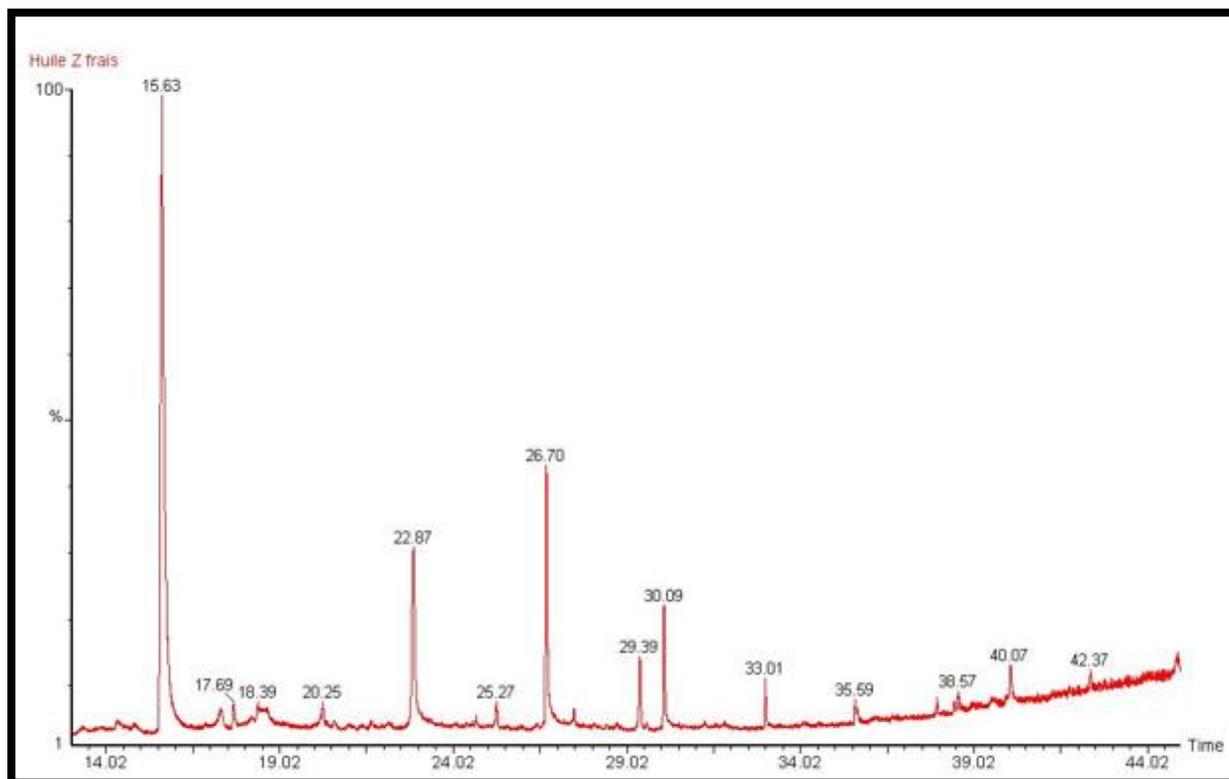
Un autre composé identifié dans les deux huiles est le 1,8-Nonadièn-3-ol, (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O) dont la structure est représentée dans la figure 18 suivante :



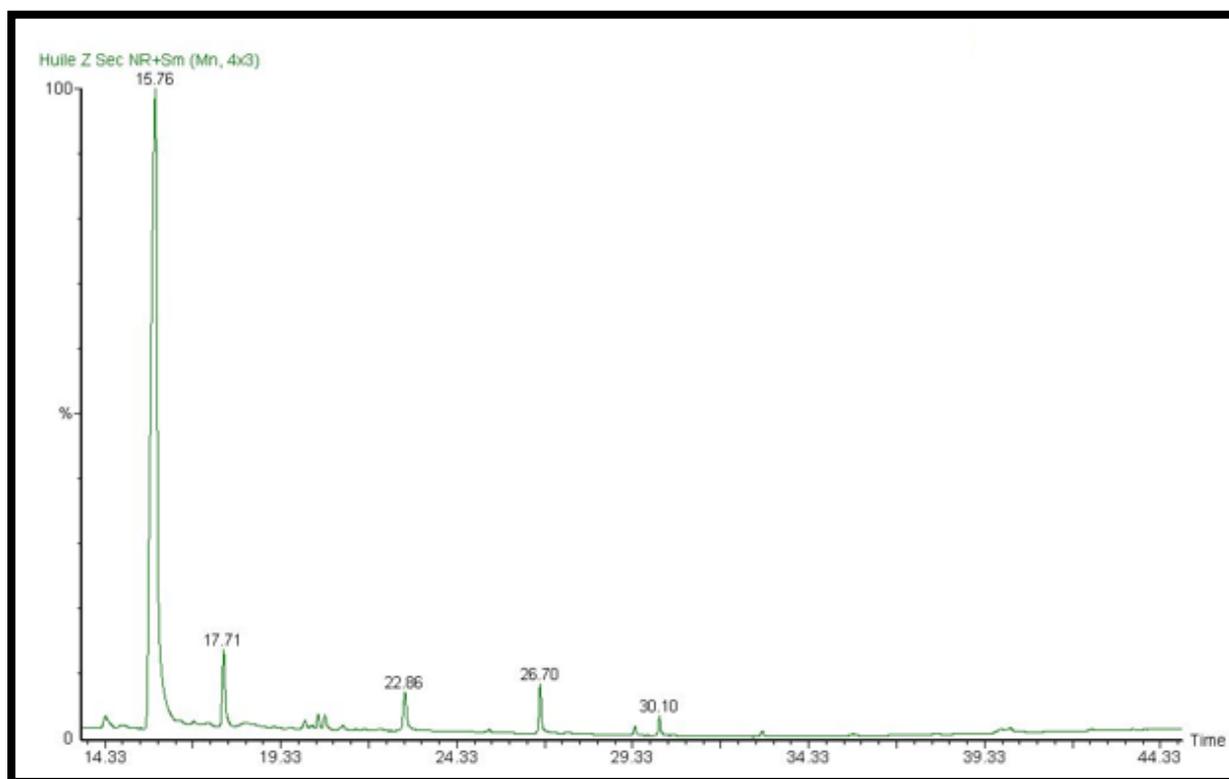
**Figure 18** : structure du 1,8-Nonadièn-3-ol

Les chromatogrammes obtenus après analyse des deux HEs sont représentés dans les figures 19 et 20.

Les pics qui apparaissent avant le limonène (dont les temps de rétention sont plus petits) appartenant à des composés non identifiés, pourront correspondre, par comparaison aux autres travaux, aux monoterpènes suivants :  $\alpha$ -pinène, sabinène,  $\alpha$ -phyllandrène,  $\beta$ -myrcène, et  $\Delta^3$ -carène.



**Figure 19** : chromatogramme de l'huile essentielle du zeste frais



**Figure 20** : chromatogramme de l'huile essentielle du zeste sec

## 2.4. Activité antioxydante

### 2.4.1. Activité scavenger du radical DPPH

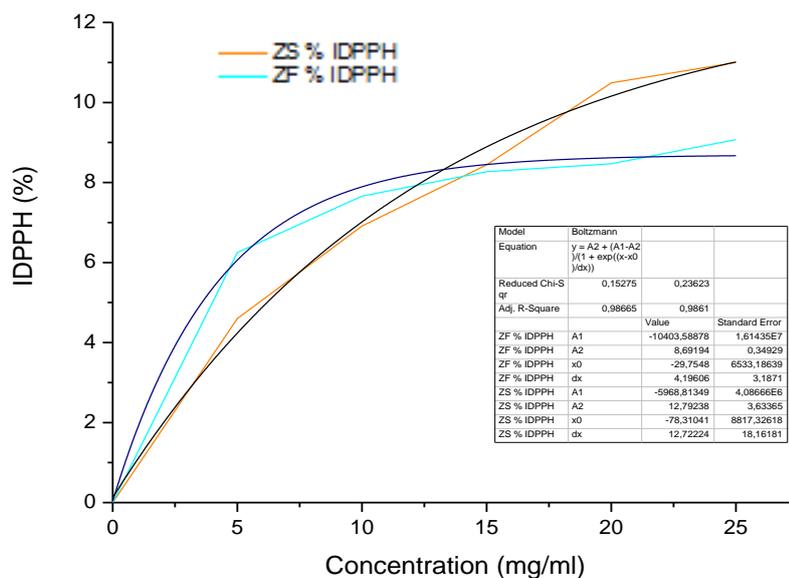
Le test du DPPH est l'une des méthodes les plus utilisées dans l'évaluation de l'activité antioxydante (Duh *et al.*, 1997 ; Kulisic *et al.*, 2004 ; Molyneux, 2004 ; Katalinic *et al.*, 2006 ; Szabo *et al.*, 2006 ; Chang *et al.*, 2007 ; Lim et Tee, 2007 ; Stoilova *et al.*, 2007 ; Sarikurkcu *et al.*, 2008).

Le DPPH est un radical libre qui accepte un électron ou un proton pour devenir stable (Gulcin, 2004). Il peut facilement être réduit par un antioxydant (AH) ceci peut être démontré par la réaction suivante :



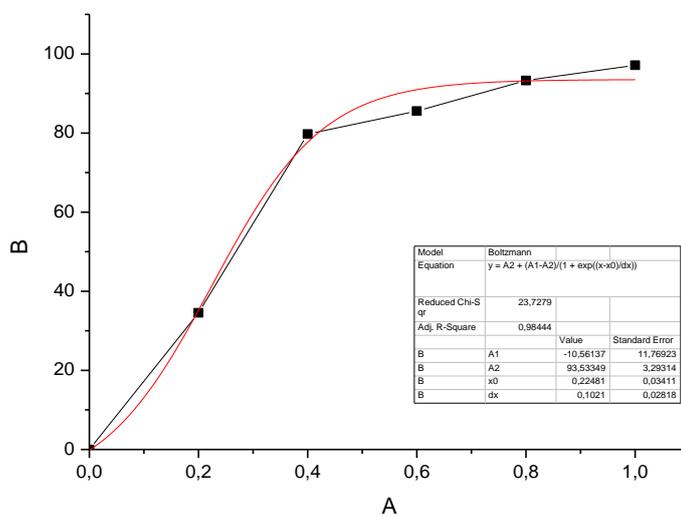
Le maximum d'absorption du DPPH est de 517nm. La diminution de l'absorbance, causée par les antioxydants, est due à une réaction entre les molécules antioxydantes et le radical. Ceci est visible par le changement de couleur du pourpre au jaune. C'est pourquoi le DPPH est usuellement utilisé comme substrat pour évaluer l'activité antioxydante (Elmastas *et al.*, 2006).

La capacité des deux HEs et des standards à piéger le DPPH sont montrés dans les **figures 21, 22 et 23**



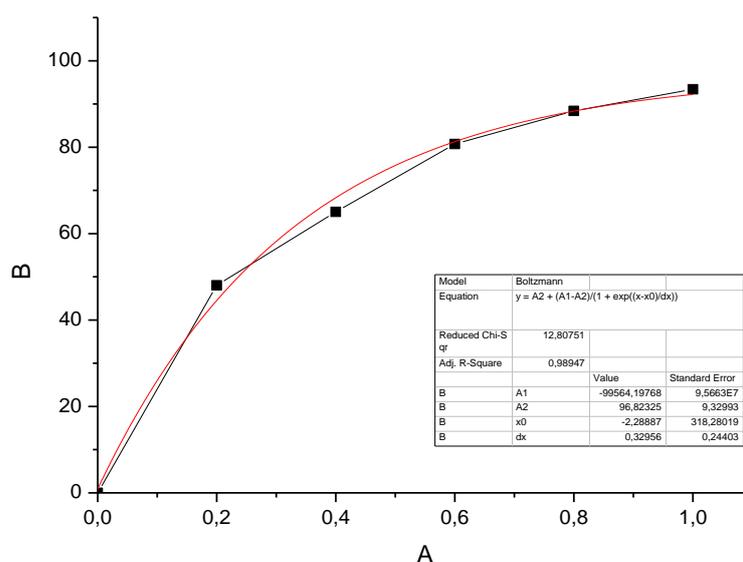
1

**Figure 21 :** activité scavenger du DPPH des HEs exprimée en pourcentage d’inhibition en fonction de la concentration (mg/ml)



1

**Figure 22 :** activité scavenger du DPPH de l’acide ascorbique exprimée en pourcentage d’inhibition (B) en fonction de la concentration (mg/ml) (A)



1

**Figure 23 :** activité scavenger du DPPH de BHA exprimée en pourcentage d'inhibition (B) en fonction de la concentration (mg/ml) (A)

D'après ces résultats, il est nettement remarqué que l'acide ascorbique et le BHA présentent des pourcentages plus élevés. Les valeurs des  $IC_{50}$  calculées sont 0,26 mg/ml et 0,24 mg/ml pour le BHA et l'acide ascorbique. Néanmoins, ce dernier a montré une capacité plus élevée avec  $97,14 \pm 0,09\%$ , que le BHA  $93,65 \pm 0,28\%$  à la concentration de 1 mg/ml.

Le pouvoir scavenger à l'égard du DPPH exercé par l'HE du zeste sec était plus élevé que celui du zeste frais

D'après les résultats du test effectué, nous avons constaté qu'à la plus grande concentration utilisée qui est de 25 mg/ml nous avons obtenu un pourcentage d'inhibition de  $11 \pm 0,46\%$  et  $9,07 \pm 0,06\%$  avec les HEs du zeste frais et sec, respectivement, et suite à la faible quantité de ces huiles, nous n'avons pas pu aller au delà de la concentration 25 mg/ml, par conséquent, il était impossible de déterminer la concentration correspondante à 50% d'inhibition de l'HE. D'ailleurs, Sarrou et *al.* (2013) ont obtenu un pourcentage d'inhibition de l'HE de d'écorces de *C. aurantium* vis-à-vis du DPPH égal à 19,29%.

Nous avons constaté qu'il y a un très fort coefficient de corrélation entre la concentration de l'huile essentielle et son effet scavenger du DPPH (ce coefficient est égal à 0,83 et 0,96 pour l'huile essentielle du zeste frais et sec respectivement).

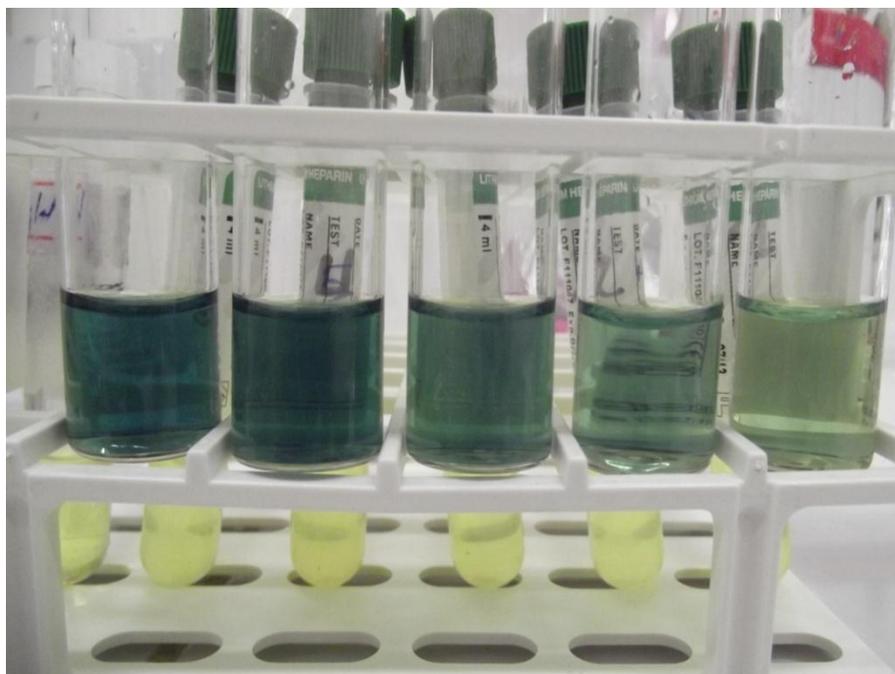
Il est difficile d'accorder la capacité antioxydante des HEs à un composé précis des HEs vue la complexité de celles-ci. Les composés présents à fortes et faibles proportions peuvent les deux exercer un effet antioxydant (Wang *et al.*, 2008).

#### 2.4.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est généralement utilisé comme indicateur de la donation des électrons (Shon *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2008) qui constitue un mécanisme important des antioxydants permettant la réduction des composés oxydés. Cette réduction permet la régénération des antioxydants oxydés (Ksouri *et al.*, 2009).

La capacité de nos extraits et des standards à réduire le fer ferrique du ferrocyanure de fer en fonction de leurs concentrations est représentée dans les **figures 25** et **26**. L'absorbance à 700nm augmente avec la concentration des extraits indiquant l'existence de composés capables de donner des électrons.

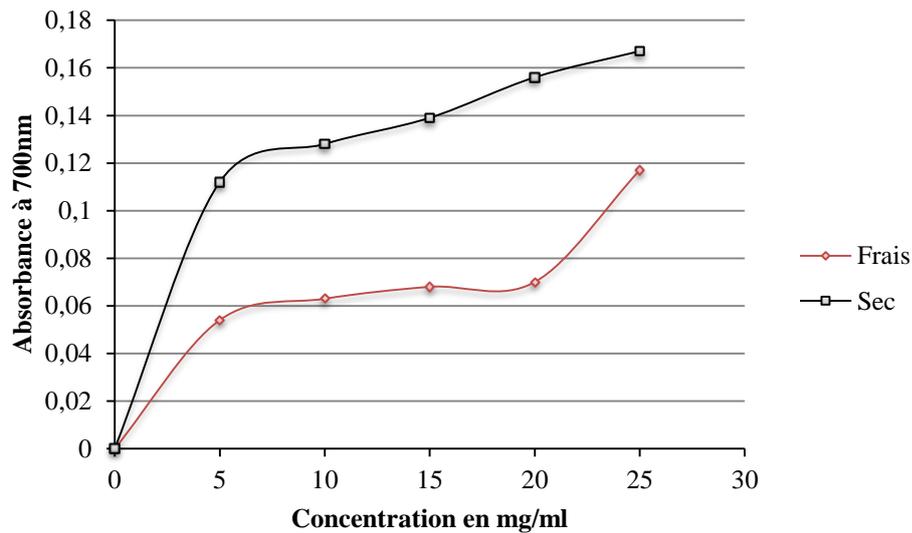
Dans ce test, la solution possédant un pouvoir réducteur change de couleur, du jaune à différents degrés du bleu et du vert selon la capacité réductrice (Wu *et al.*, 2013). (**fig 24**)



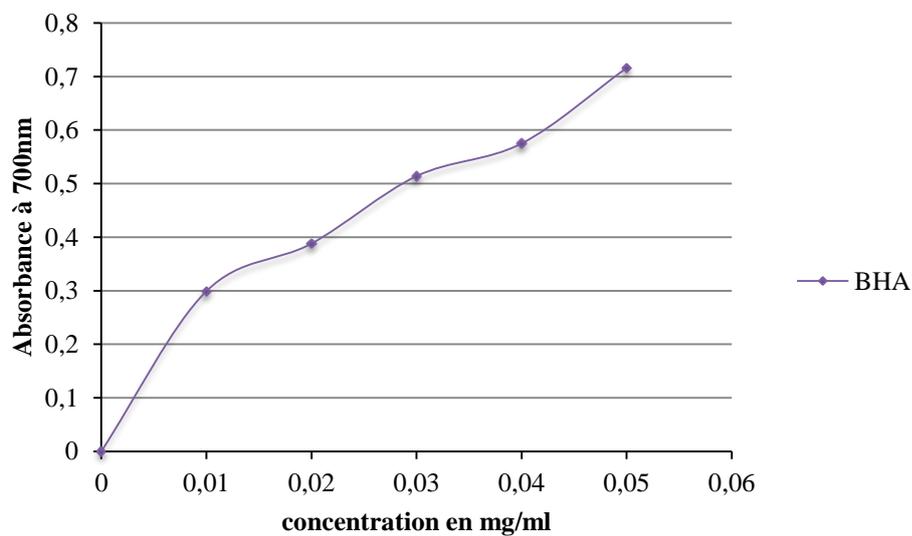
**Figure 24** : changement de coloration de la solution du jaune vers le bleu, test du pouvoir réducteur (le standard).

Le pouvoir réducteur exercé par le standard BHA est très élevé par rapport à nos huiles essentielles, présentant une absorbance égale à 0.716 à la concentration 0.05mg/ml.

Les huiles essentielles, quant à elles, ont présenté un pouvoir réducteur, exprimé par l'absorbance à 700nm, allant de  $0.054 \pm 0,03$  à  $0.117 \pm 0.01$  pour le zeste frais, et  $0.112 \pm 0.01$  jusqu'à  $0.167 \pm 0.04$  pour le zeste sec (pour cinq concentrations identiques de 5 à 25 mg/ml).



**Figure 25:** Pouvoir réducteur des huiles essentielles du zeste de *Citrus sinensis* à l'état sec et frais.



**Figure 26 :** Pouvoir réducteur du BHA

Ces résultats ont été comparables à ceux obtenus par Wu *et al.* (2013), (avec conversion des unités) bien que les nôtres soient plus élevés. Ceci peut être expliqué par la différence de l'espèce étudiée ainsi que le paramètre étudié (étude à différents stades de maturité).

Nous remarquons ici que l'huile essentielle du zeste sec exerce un pouvoir réducteur plus élevé que celle du zeste frais.

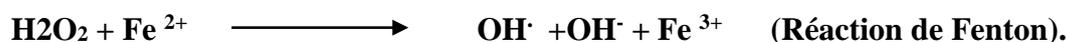
Les deux huiles essentielles présentent des différences significatives (Fobs= 8.67 ; P= 0,012).

L'activité réductrice présente des différences significatives (0.85 et 0.99 pour les huiles essentielles du zeste frais et sec respectivement)

En comparant les activités réductrices des huiles essentielles à celles du BHA, on peut conclure que ce dernier possède une plus grande activité réductrice que nos échantillons. Les mêmes constatations ont été retrouvées par Dorman *et al.* (2003) et Kanatt *et al.* (2007).

### 2.4.3. Activité scavenger du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive non radicalaire ayant tous ses électrons périphériques appariés, plus stable que le radical superoxyde, mais c'est un redoutable précurseur de radicaux libres (Halliwell, 2000). L'absence de charge à sa surface rend cette espèce réactive très lipophile et peu réactive en milieu aqueux et la majeure part de sa toxicité provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (HO $\cdot$ ). En effet, le peroxyde d'hydrogène en présence des ions ferriques (Fe<sup>2+</sup>) donne le radical hydroxyle par la réaction de Fenton ou bien par la réaction de Haber-Weiss (De Leiris, 2003 ; Vamecq *et al.*, 2004 ; Edreva *et al.*, 2005).



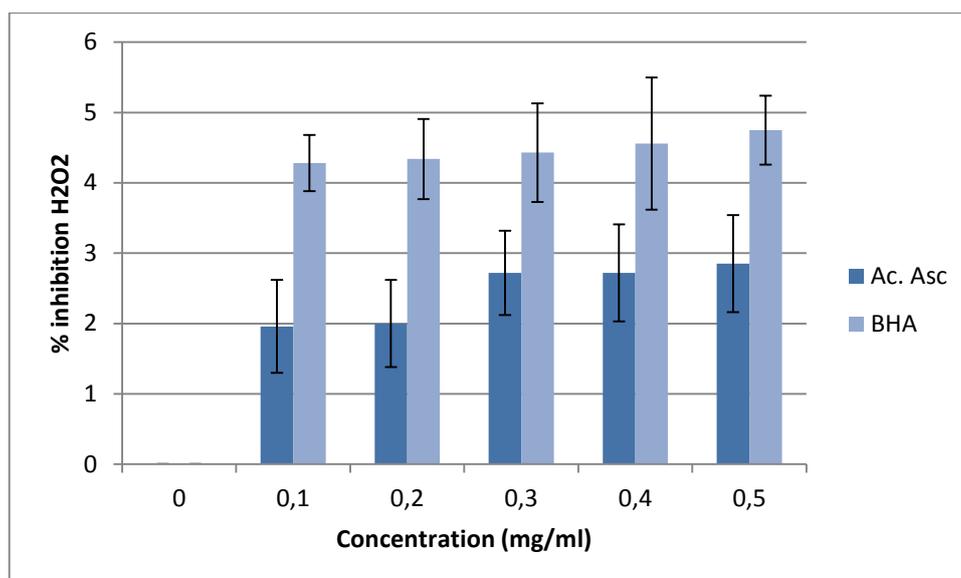
Le test H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> choisi pour cette étude, est basé sur le piégeage du radical libre stable H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne sa décomposition en molécule d'eau (Rajeshwar *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008) selon la réaction suivante :



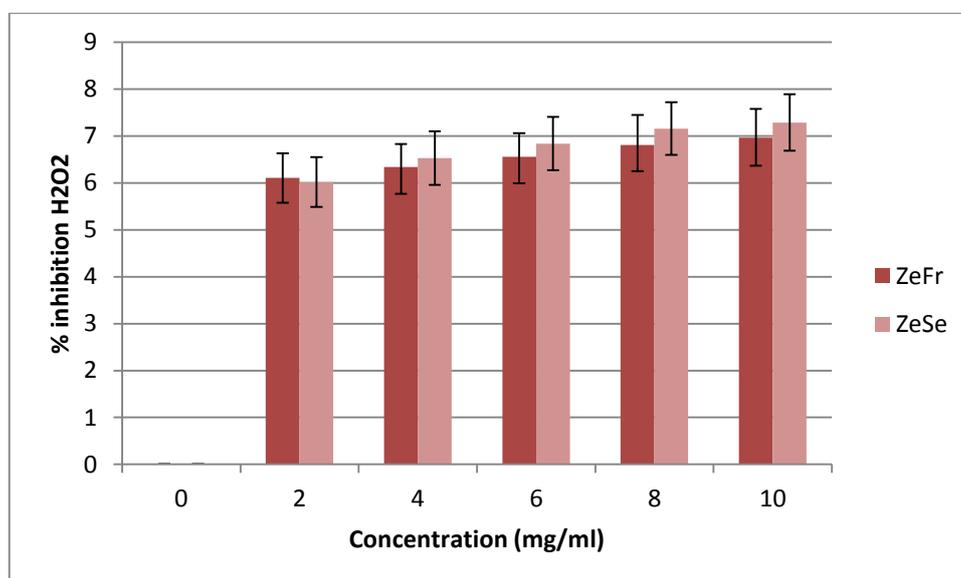
Selon les **figures 27** et **28**, l'activité scavenger du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente significativement (P<0.05) avec l'élévation de la concentration des huiles essentielles et des antioxydants de synthèse (l'acide ascorbique et le BHA).

Les résultats obtenus pour les standards (**fig. 27**) montrent que les pouvoirs antiradicalaires les plus élevés sont obtenus avec le BHA, ceci se traduit par des pourcentages d'inhibition qui varient de 4.28 à 4.75% à des concentrations allant de 0,1 à 0,5 mg/ml. Tandis que l'acide ascorbique présente des pourcentages d'inhibition, faibles (environ de moitié) aux mêmes concentrations reflétant ainsi un faible effet scavenger par rapport au BHA.

Les huiles essentielles sont utilisées à des concentrations identiques pour ce test (**fig. 28**). A des concentrations allant de 2 à 10 mg/ml, les pourcentages d'inhibition varient de 6.11 à 6.97% et de 6.02 à 7.29% pour les huiles essentielles du zeste frais et sec respectivement.



**Figure 27 :** L'activité scavenger des standards vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).



**Figure 28 :** L'activité scavenger des HEs vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Comme il a été déjà rapporté dans la littérature (Kulisic *et al.*, 2004), l'utilisation de différentes méthodes est nécessaire pour l'évaluation de l'activité antioxydante. La présente étude montre que l'utilisation d'une seule méthode est insuffisante pour vérifier l'activité antioxydante des extraits étudiés. Le faible pouvoir réducteur de l'huile essentielle n'implique pas forcément une faible activité antioxydante car dans la méthode d'étude du pouvoir réducteur on utilise un milieu aqueux, défavorable aux huiles essentielles qui sont apolaires.

Comparativement aux standards, d'après les résultats des différentes activités antiradicalaires des huiles essentielles vis-à-vis des radicaux utilisés dans cette étude, les valeurs qui expriment le potentiel antiradicalaire le plus important sont obtenues contre le radical  $H_2O_2$ . Ce qui pourrait être expliqué par la nature du milieu réactionnel. La polarité et l'hydrophobicité des antioxydants qui s'ajoutent aux facteurs mentionnés ci-dessus, présentant ainsi des rôles importants dans l'activité antioxydante (Wu *et al.*, 2013). Il a été montré que les antioxydants polaires sont plus actifs dans des milieux aqueux tandis que les antioxydants non polaires sont plus actifs dans des milieux hydrophobes que dans des milieux aqueux. C'est peut être pour cela que les extraits étudiés ont montré une forte activité réductrice du  $H_2O_2$  notamment par l'huile et qui serait lié à la polarité du  $H_2O_2$  qui est beaucoup plus liposoluble. (Frankel et Meyer, 2000 ; Grassmann *et al.*, 2003 ; Kulisic *et al.* 2004).

Quant à l'activité antiradicalaire, plusieurs auteurs (Yamaguchi *et al.*, 1998; Kulisic *et al.*, 2004), ont rapporté que la polarité du substrat n'affecte pas l'activité scavenger du radical DPPH.

Les différences des résultats des tests réalisés pour l'étude de l'activité antioxydante entre les huiles essentielles du zeste frais et sec, montrent globalement une forte activité de l'huile issue du zeste sec.

Si l'on compare les compositions chimiques de ces deux huiles caractérisées par Kamal *et al.* (2011), nous allons remarquer une différence des proportions des groupes de composés des huiles essentielles :

Les monoterpènes étaient plus abondants dans l'HE du zeste frais, inversement aux mono- et sesquiterpènes oxygénés dont la présence était significativement plus élevée dans l'HE du zeste sec.

# Conclusion et perspectives

Les HEs sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés biologiques très intéressantes à mettre à profit dans divers domaines : industrie pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, etc.

Les agrumes occupent aujourd'hui la seconde place dans les échanges mondiaux des produits végétaux. Dans l'industrie agroalimentaire, les oranges sont largement exploitées pour en extraire leur jus, vitamine C, voire des pectines. Mais, les déchets de ces transformations, principalement les écorces, sont souvent jetés. Or, ces dernières peuvent nous fournir des composés à propriétés biologiques importantes notamment les huiles essentielles.

Dans ce travail, nous avons procédé à une étude comparative entre les huiles essentielles extraites des écorces fraîches et sèches de *C. sinensis* en prenant l'exemple de la variété Valencia late.

L'extraction des HEs montre que le rendement du zeste frais est plus élevé que le zeste sec ( $0.50 \pm 0.01\%$  et  $0.39 \pm 0.09\%$  respectivement).

Quant à l'activité antioxydante, l'huile essentielle du zeste sec présente généralement plus d'efficacité par rapport au zeste frais ( $11 \pm 0.46\%$  et  $9.07 \pm 0.06\%$  pour le test DPPH, et des valeurs allant de  $0.054 \pm 0.06$  à  $0.117 \pm 0.11$  pour le zeste frais, et  $0.112 \pm 0.01$  jusqu'à  $0.167 \pm 0.08$  pour le zeste sec concernant le pouvoir réducteur, et les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  varient de  $6.11 \pm 0.52\%$  à  $6.97 \pm 0.61\%$  et de  $6.02 \pm 0.53\%$  à  $7.29 \pm 0.6\%$  pour les huiles essentielles du zeste frais et sec respectivement).

Bien que leurs effets antioxydants semblent être faibles en comparaison aux antioxydants standards et à d'autres HEs, les huiles essentielles de *C. sinensis* exercent un effet antioxydant et pourront être utilisées dans la conservation d'aliments, en pharmacologie ou en cosmétique.

Etant donné la complexité de la composition des huiles essentielles il serait intéressant :

- De les caractériser par GC-MS et HPLC, pour identifier les composés responsables de l'activité antioxydante;
- D'extraire ces composés et de tester leurs activités biologiques séparément ;
- D'effectuer une étude de l'activité antimicrobienne pour éventuellement l'utiliser comme antibiotique ou conservateur ;
- De réaliser des tests enzymatiques pour évaluer l'activité de ces substances sur les enzymes antioxydantes ;

- De tester leur activité antiproliférative, ce qui prouverait leur pouvoir protecteur contre la cancérisation cellulaire ;
- De rationaliser les paramètres variables tels que le temps de séchage ;
- D'utiliser d'autres techniques d'extraction des huiles essentielles afin d'optimiser les rendements ainsi que la qualité des huiles essentielles
- Extraire les huiles essentielles à partir des autres parties de la plante (fleurs, feuilles et brindilles) ;
- Etudier les différentes activités biologiques *in vivo*.

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, les traitements à base de plantes et leurs essences reviennent au premier plan, et des effets secondaires de certains médicaments et additifs alimentaires sur l'organisme

# Références bibliographiques

- **Abdel-Hameed E-S.S. (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, **114**: 1271–1277.
- **AFNOR NF T-75- 111 & 112 :** (Association Française de Normalisation, Norme). « Huiles essentielles ». Paris, France
- **Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74** :636–643.
- **Ak T. and Gülçin İ. (2008).** Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemic-Biological Interactions*. **174**: 27-37.
- **Al-Mamary, M., Al-Meerri, A. and Al-haboui, M. (2002).** Antioxydant activities and Total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22: 1041-1047.
- **Amezouar F., Badri W., Hsaine M., Bourhim N., et Fougrach H. (2013).** Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. *Pathol Biol (Paris)*
- **André, R. (1998).** La maladie de Parkinson. Edition Masson. 16-19.
- **Andrian, J., Potus, J. and Frangne, R. (2003).** La science alimentaire de A à Z 3ème édition, Technique et Documentation. Paris. 259.
- **Anonyme. (2006).** Bulletin d'analyse huile essentielle orange douce *Citrus sinensis* (L.) Pers. Laboratoire « Florame aromathérapie »
- **Azar P.A. Nekoei M. Larijani K. and Bahraminasab S. (2001).** Chemical composition of the essential oils of *Citrus sinensis* cv *Valencia* and a quantitative structure-retention relationship study for the prediction of retention indices by multiple linear regression. *J. Serb. Chem. Soc.* 76. 1627-1637.
- **Baker, G. R., R. F. Lowe et I. A. Southwell. (2000).** Comparison of oil recovered from tea tree by ethanol extraction and steam distillation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **48**: 4041-4043.
- **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D.; and Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*.**46**: 446-475.
- **Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. et Gruzdiene, D. (2000).** Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Research International*, **33**: 785-791.

- **Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefond-Rousslot, D., Legrand, A. and Peyner, J. (2006).** Le stress oxydant, composante Physiopathologique de l'athérosclérose. *Oxidative stress in the atherosclerotic Process. Immuno-analyse et biologie spécialisée.* **21:** 144-150.
- **Beckman, K.; and Ames, B. (1998).** The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews.***78:** 1998.
- **Bekhechi C., Abdelouahid D. (2010).** Les huiles essentielles. Office des publications universitaires. P 14, 31 et 32.
- **Belaïche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine SA., tome1. 9-128
- **Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: Etat des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme.* **20 :** 48-53.
- **Bernadet M. (1983).** Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles, Eds. Dangles, France. 384 p.
- **Besombes C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle. France.
- **Bicchi C., (2000).** Essential oils/Gas Chromatography. *University of Turin, Turin, Italy. Academic Press.*2744-2755.
- **Bonnefond-Rousselot D., Peynet J., Beaudeau J.L., Terond P., Legrand A. et Delattre J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme.* **16 :** 260-267
- **Borchardt J.R., Wyse D.L., Sheaffer C.C., Kauppi K.L., Fulcher R.G., Ehlke N.J., Biesboer D.D. and Bey R.F. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *Journal of Medicinal Plants Research,* **2:** 081-093.
- **Bouchonnet S. et Libong D. (2002).** Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex.
- **Bousbia N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat en chimie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger. 128p.

- **Bruneton J. (1987).** Phytochimie et pharmacognosie. Ed. Lavoisier. France, p83-.86.
- **Bruneton J. (1993).** ). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3éme Edition Lavoisier, Paris. p 488
- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3éme Edition Lavoisier, Paris. 1120
- **Bruneton J. (2001).** Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. Ed. TEC & DOC Lavoisier. pp 461,
- **Burits, M., & Bucar, F. (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14, 323–328. *In Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A. , Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen ,A. (2005).* Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus var. sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus var. rosulans*. *Journal of Food Engineering*.**66**:447–454.
- **Bursal E., Köksal E., Gülçin I., Bilsel G. and Gören A.C. (2013).** Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. *Food Research International*. **5**: 66-74
- **Burt S.A. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods. *International Journal of Food Microbiolog*, **94 (3)**, 22-25.
- **Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodriguez M.R.A., Corazza M.L., Vladimir O.J. & Cansian R.L. (2008).** Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, **25**, 207-211.
- **Cai Y., Luo Q., Sun M. and Corke H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**: 2157–2184.
- **Caissard J.C. et Baudino S. (2012).** Sécrétion et stockage des huiles essentielles par les végétaux. *In : Fernandez X. et Chemat F. : La chimie des huiles essentielles, tradition et innovation.* Ed. Vuibert. pp.22-32
- **Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M-C., Pénicaud L., et Casteilla L. (2006).** Les espèces actives de l'oxygène : le *yin* et le *yang* de la mitochondrie. *Médecine sciences*, **1(22)**: 47-53.
- **Cavalli J-F. (2002).** Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse.

- **Celikel N. et Kavas G. (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, **26**, 174-181.
- **Celiktas O. Y., Kocabas E. E. H., Bedir E. Sukan F. V., Ozek T. and Baser K. H. C. (2006).** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. **100**: 553-559.
- **Chang, H.-C.; Huang G.-J.; Agrawal, D.C.; Kuo, C.-L.; Wu, C.-R.; and Tsay, H.-S. (2007).** Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as “Gusuibu”. *Botanical Studies*. **48**: 397-406.
- **Chanthaphon S., Chanthachum S., Hongpattarakere T. (2008).** Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. *ongklanakaran J. Sci. Technol.* 30 (Suppl.1), pp. 125-131.
- **Charpentier B., Hamon-Lorleac'h F., Harlay A., Huard A., Ridoux L., et Chanselle S. (2008).** Guide du préparateur en pharmacie. 3<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson, 1358.
- **Cheeseman, K.H., and Slater, L. (1993).** An introduction of the radicals' biochemistry. *British medical Bulletin*. **49**: 481-493.
- **Chemat, F., Lucchesi, M.E., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G. and Visinoni, F. (2006).** Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta* . **555**: 157–160.
- **Chevallier L., Crouzet-Segarra C. (2004).** Médicaments à base de plantes. Editions Masson. p 18,23, 162-175.
- **Cillard J. et Cillard P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **1**: 24-29.
- **Cocorin N., Guerin C. (2003).** Valorisation chimique du végétal : les agrumes. Cité par **Ferhat et al., 2010**.
- **Cuendet, M., Hostettmann, K., & Potterat, O. (1997).** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144–1152. In **Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen, A. (2005).** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. **66**:447–454.

- **De Leiris, J. (2003).** Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*. **19**: 40-44.
- **De Souza, A.T., Benazzi, T.L., Grings, M.B., Cabral, V. and Antônio, E. (2008).** Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids*. **47**: 182–187.0
- **Delamare Longaray, A. P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L. and Echeverrigaray S. (2007).** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*. **100**: 603–608.
- **Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. **74**: 101–109.
- **Delignette-Muller, M.L. (1992).** Méthode de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse n°118-15.
- **Demoffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J. and Lekeux, P. (2005).** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Animale. Médecine. Vétérinaire*. **149**: 1-9.
- **Desmettre, T., Rouland, J.F. and Lecerf, J.M. (2005).** Glaucome et nutrition. Role des facteurs nutritionnels au cours des hypertopies oculaires et du glaucome. *EMCOphthalmologie*. **2** :224-229.
- **Donelian, A., L. H. C. Carlson, T. J. Lopes et R. A. F. Machado. (2009).** Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO<sub>2</sub> and by steam distillation. *The Journal of Supercritical Fluids*. **48**: 15 20.
- **Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M.J. (2003).** Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. **83**: 225-262.
- **Duh, P.-D.; Yen, W.J.; Du, P.-C.; and Yen, G.C. (1997).** Antioxidant activity of mung Bean Hulls. *JAOCs*. **74**:1059–1063.
- **Dupont F.; Guignard J.L. (2007).** Botanique, Systématique moléculaire. Ed. Masson p 189

- **El Kalamouni C. (2010).** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat en sciences des agroressources. Université de Toulouse. 223p.
- **Elmastaş M., Gülçin İ., Işildak ÖKüfrevioğlu., Ö.İ., İbaoğlu K. and Aboul-Enein H.Y. (2006).** Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts *Journal of the Iranian Chemical Society*. **3**: 258-266.
- **Encyclopédie des plantes médicinales. (2001).** Identification, préparation, soins. Larousse. p 54.
- **Erkan N., Ayranci G. and Ayranci E. (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, **110**: 76–82.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.
- **Fellah, S. Romdhane, M. and Abderraba, M. (2006).** Extraction et étude des huiles essentielles de *la salvia officinalis.l* cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Societe Algerienne de Chimie*. **16**: 193-202.
- **Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010).** Citrus d'Algérie, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction. Office des Publications Universitaires. P 38, 42, 52-57
- **Franchomme, P. and Pénoel, D. (1990).** Thérapie. Eléments de médecine aromatique. L'aromathérapie exactement. R.J. édition. Limoges. 30-32, 61
- **Frankel, E. N. and Meyer, A. S. (2000).** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**: 1925–1941.
- **Gamain B., Arnaud J., Favier A., Camus D., Dive D. and C. Slomianny C. (1996).** Increase in Glutathione peroxidase activity in Malaria parasite after selenium supplementation. *Free Radical Biology & Medicine*, **4**: 559-565.
- **Garnero P. (1996).** Huiles essentielles. *In* techniques de l'ingénieur. Paris. K345
- **Golebiowski J. et Frenandez X. (2012).** Chimie des substances odorantes. *In* : **Fernandez X. et Chemat F. : La chimie des huiles essentielles, tradition et innovation.** Ed. Vuibert. pp. 9-21
- **Goris A. (1967).** Manuel de botanique. Edition Clin. 265-268

- **Goudable J. et Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygènes et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **11**: 115-20.
- **Grassmann, J.; Hippeli, S.; Vollmann, R.; and Elstner, E.F. (2003).** Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7576–7582.
- **Guignard J.L. (2001).** Botanique, Systématique moléculaire. Ed. Masson, 290.
- **Guimarães R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa M.J., Carvalho A.M., Ferreira I. C.F.R. (2010).** Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology.* **48** : 99–106
- **Gülçin I., Bursal E., Şehitoğlu M.H., Bilsel M. and Gören A.C. (2010).** Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* **48** : 2227–2238
- **Gulçin, I. (2004).** Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L). *Turk Journal Agriculture.* **28**: 25-33.
- **Halliwell B. (1991).** Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American Journal of Medicine*, **3**: 14-22.
- **Halliwell B. (2008).** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?
- **Halliwell B. (2011).** Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*, **3** (32): 125-130.
- **Halliwell, B., Clement, M.V. and Long, L.H. (2000).** Hydrogen peroxide in the human body. *Federation of European Biochemical Societies.* 486:10-13.
- **Hammer K. A. Carson C. F. (2011).** Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. pp. 255 – 295
- **Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**: 3-6.
- **Hernandez Ochoa L. R. (2005).** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de doctorat en Sciences de procédés, Sciences des Agroressources université de Toulouse France. N° d'ordre : 2264.

- **Houghton, P. J.; Raman, A. (1998).** Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. 1st ed. London: Chapman and Hall.
- **Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H and Przybylski, R. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* **108**: 986-995
- **Jang H-D., Chang K-S., Huang Y-S, Hsu C-L., Lee S-H., and Su M-S. (2007).** Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry*, **103**: 749–756.
- **Jayaprakasha G.K., Girenavar B. and Patil B.S. (2008).** Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT*, **41**: 376–384.
- **Johnston, A.R., Hanrahan, J.R., Chebib, M., Duke, R.K and Mewett, K.N. (2006).** Modulation of Ionotropic GABA; Receptors by Natural Products of Plant Origin. *Advances in Pharmacology*. **54**: 286-316.
- **Junghanns K.T., Kneusel R.E., Groger D. and Matern U. (1998).** Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, **2**: 403- 411.
- **Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N. and Ashraf, M. Y. (2011).** Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels *International Food Research Journal* **18**: 1275-1282
- **Kamdem Waffo A.F., Coombes P.H., Neil R. Crouch N.R., Mulholland D.A., Sawsan M.M. El Amin S.M.M. and Smith P.J. (2007).** Acridone and furoquinoline alkaloids from *Teclea gerrardii* (Rutaceae: Toddalioideae) of southern Africa. *Phytochemistry*, **68**: 663–667.
- **Kanatt S., Chander R. and Sharma A. (2007).** Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) irradiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, **100**: 451–458.
- **Karou D., Dicko M., Simpoire J. and Traore A.S. (2005a).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, **4**: 823-828.
- **Karou, D ., Dicko, M. H., Simpoire, J., Yameogo, S., Sanon, S. and Traore, A S. (2005b).** Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **106**: 119-133.

- **Katalinic V., Milos M., Kulisic T. and Jukic M. (2006).** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**: 550–557.
- **Kelen M. ; Tepe B. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*. **99**: 4096–4104
- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition clinique et métabolisme*. **20** : 165-177.
- **Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C. and Abdely C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 2083–2091.
- **Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; and Milos, M. (2004).** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. **85**: 633–640.
- **Kumar, S.; Kumar, D.; Singh, N.; and Vasisht, B.D. (2007).** In vitro free radicals scavenging and antioxidant activity of *moringa oleifera* pods. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. **1**: 17-22.
- **Lagha-Benamrouche S. et Madani K. (2013).** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. **50** : 723– 730
- **Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; and Carde, J-P. (1994).** Biogénèse des monoterpènes. II - La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **133**: 79-99.
- **Lee, K.-W.; Everts, H. and Beynen, A.C. (2004).** Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science*. **3**: 738-752.
- **Legendre L. (2012).** Voies de biosynthèse des huiles essentielles. In : **Fernandez X. et Chemat F.** : La chimie des huiles essentielles, tradition et innovation. Ed. Vuibert. pp.35-57
- **Lim, T.T.; et Tee, J.J. (2007).** Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*. **103**: 1003–1008.
- **Liu, J. (1995).** Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol*. **49**: 57–68.

- **Lubinic, E. (2003).** Manuel pratique d'aromathérapie, les huiles essentielles et leur utilisation. Edition Vigot. 331.
- **Lucchesi M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes, conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat de en sciences. Université de la Réunion. 143p.
- **Mantle D., Anderton J.G., Falkous G., Barnes M., Jones P. and Perry E.K. (1998).** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **121**: 385–391.
- **Marshall K.A., Reiter R.J., Poeggeller B., Aruoma O.I. and Halliwell B. (1996).** Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biology & Medicine*, **3**: 307-315.
- **Matkowski A. (2008).** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. *Poland Biotechnology Advances*, **26**:548-560.
- **Menvielle-Bourg, F. J. (2005).** Superoxide dismutase (SOD), a powerful antioxidant, is now available orally. *Phytothérapie*. **3**: 1-4.
- **Meyer B., Warnod. (1984).** Natural essential oils : extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & Flavorist*. **9**: 93-103
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**: 211-219.
- **Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P. and Dugo, G. (2005).** Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of *Citrus* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **20**: 136-140
- **Neffati, A., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Limem, I., Kilani, S., Skandrani, I., Bhourri, W., Le Dauphin, J., Barillier, D., Mosrati, R., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira K. (2009).** Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **27**: 187–194.
- **Ogino, K.; and Wang, D-H. (2007).** Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: An approach to disease prevention. *Acta Med. Okayama*. **61**: 181-189.

- **Oktay M., Gülçin İ. and Kufreviöglu O.İ. (2003).** Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft Und- Technologie*, **36**:263-271.
- **Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M. & Bellabas M.A. (2005).** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, **4**, 147-157.
- **Paolini J. (2005).** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Astéraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicm corsicum*. Thèse de Doctorat en Chimie organique et analytique. Université de Corse. 292p.
- **Paris, M. and Hurabielle, M. (1981).** Abrégé de matière végétale pharmacognosie. Tome 1. Généralités monographiques. Ed. Masson.
- **Pincemail, J., Defraigne J.O. and Limet, R. (1998).** Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. Medi Sphère. 1-5.
- **Piochon M. (2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- **Pokorny, J., Yanishlieva, and Gordon, M. (2001).** Antioxydants in food. Edition Woodhead Publishing. p 7-20.
- **Rajeshwar, Y., Senthil Kumar, G.P., Guta, M. and Mazumder, U.K. (2005).** Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Mucuna pruriens* (FABACEAE) seeds. *Euroapean Bulletin of Drug Research*.13 (1): 31-39.
- **Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Goff, L.K.L. and Had-Aissouni, L. (2005).** Stress oxydatif cerebral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate. Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 24:502-509.
- **Rozzi N. L., Phippen W., Simon J. E. and. Singh R. K, 2002.** Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, **35**: 319–324.
- **Sahraoui, N., Abert Vian, M., Bornard, I., Boutekedjiret, C. and Chemat, F. (2008).** Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils,

comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*. **1210**: 229–233

- **Sarikurkcu, C.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; and Harmandar, M. (2008).** Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*. **99**: 4239–4246.
- **Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Theriou K. and Therios I. (2013).** Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece. *Molecules*. **18** : 10639-10647
- **Sharma N. and Tripathi A. (2008).** Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarpessential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*. **163**: 337-344.
- **Shon, M.-Y.; Kim, T.-H.; and Sung, N.-J. (2003).** Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*. **82**: 593–597.
- **Sies, H. (1993).** Strategies of antioxidant defense. *Europe. Journal. Biochemistry*. **215**: 213-219.
- **Singh R., Singh B., Singh S., Kumar N., Kumar S. and Arora S. (2010).** Umbelliferone – An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Food Chemistry* **120** : 825–830
- **Skocibusic, M., N. Bezic and V. Dunkic. (2006).** Phytochemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. *Food Chemistry*. **96**: 20-28.
- **Soultos, N., Tzikas, Z., Christaki, E., Papageorgiou, K. and Steris, V. (2009).** The effect of dietary oregano essential oil on microbial growth of rabbit carcasses during refrigerated storage. *Meat Science*. **81**: 474–478.
- **Stary F. et Jirasek V. (1973).** Plantes médicinales, Atlas illustré.
- **Stoilova, I.; Krastanov, A.; Stoyanova, A.; Denev, P.; and Gargova, S. (2007).** Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*. **102**: 764–770.
- **Sunda Makuba T. (2012).** Contribution à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. Thèse de Doctorat en sciences, université de Liège. 143p.

- **Svoboda, K.P.; and Hampson, J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*
- **Szabo M., Chambre D., Iditoiu C., 2006.** New method for the calculus of the antioxidant activity in the DPPH spectrophotometric assay. *Scien. And Techn. Bull. Of Univ. A. Vlaicu Arad Volume 11 (XII)*,
- **Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A ., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen ,A. (2005).** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*.**66**:447–454.
- **Teuscher, E. ; Anton, R. ; and Lobstein, A. (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Edition TEC & DOC Lavoisier.* p 6, 77
- **Thomson, M.; Al-Qattan, K. K.; Al-Sawan, S.M.; Alnaqeeb, M. A.; Khan, I.; and Ali, M. (2002).** The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* **67**: 475-478.
- **Tien, Y.-Y.; Ng, C.-C.; Chang, C.-C. ; Tseng, W.-S.; Kotwal, S.; and Shyu, Y.-T. (2005).** Studies on the lactic-fermentation of sugar apple (*Annona squamosa* L.) puree. *Journal of Food and Drug Analysis.* **13**: 77-381.
- **Tripathi, P.; Dubey, N.K.; Banerji, R.; and Chansouria, J.P.N. (2004).** Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* **20**: 317–321.
- **Tripathi, S.; Bruch, D.; and Kittur, D.S. (2008).** Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* **8**:1-7.
- **Turkoglu A., Kivrak I., Mercan N., Duru M.E., Gezer K. and Turkoglu H. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biotechnology,* **5** (11):1146-1150.
- **Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; and Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.***160**: 1–40.
- **Valnet. (1984) :** Aromathérapie. Ed. Maloine. Paris

- **Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P. and Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*. **18**: 16-23.
- **Wang W., Wu N., Zu Y.G., Fu Y.J., 2008.** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*. **108** : 1019– 1022.
- **Wassmann, S.; Wassmann, K.; and Nickenig, G. (2004).** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. **44**: 381-386.
- **Wichtl M. et Anton R. (2003)** : les plantes thérapeutiques. Traditions, pratiques officinales, science et thérapeutiques. *Ed TEC et DOC Lavoisier*.
- **Wichtl M. et Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques : tradition pratique, officinale, science et thérapeutique. Ed. Tec et Doc.
- **Wong S. P., Leong L. P., Koh J. H. W., 2006.** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. **99**: 775–783
- **Wu Z., Li H., Yang Y., Zhan Y., Tu D. (2013).** Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Industrial Crops and Products*. **46**: 311– 316.
- **Wu, C-R., Huang, M-Y., Lin, Y-T., Ju, H-Y. and Ching, H. (2007).** Antioxidant properties of Cortex fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*. **104** : 1464–1471.
- **Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.; and Terao J. (1998).** HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**: 1201–1204.
- **Young, I.S.; and Woodside, J.V. (2001).** Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* **54**:176-186.

# Annexes



**Résumé :** le présent travail a été mené dans le but de valoriser les écorces de l'orange douce *Citrus sinensis* tout en comparant entre les huiles essentielles extraites des écorces fraîches et sèches. Les huiles essentielles ont été extraites à partir des écorces par hydrodistillation et ont été caractérisées par la mesure de leurs paramètres physicochimiques (indice de réfraction, densité et composition chimique par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse). L'évaluation de l'activité antioxydante a été faite par utilisation du test de piégeage du DPPH, le pouvoir réducteur et l'inhibition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'extraction a révélé un rendement en huiles essentielles plus élevé pour les écorces fraîches (0.5% contre 0.39% pour les écorces sèches). Les indices physiques tels que la densité (0.811 et 0.843) et l'indice de réfraction (1.469 et 1.470) des huiles essentielles des écorces fraîches et sèches respectivement, ont été conformes à la norme. Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse ont montré que le limonène était le composé le plus abondant (83% et 92% pour les huiles essentielles des écorces fraîches et sèches, respectivement). Dans les trois tests utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante, l'huile essentielle des écorces sèches a montré plus d'efficacité par rapport à celle des écorces fraîches.

**Mots clés :** huiles essentielles, *Citrus sinensis*, hydrodistillation, activité antioxydante, séchage, extraction

**Abstract :** This work was conducted in order to value the sweet orange *Citrus sinensis* peels, comparing between essential oils extracted from fresh and dried peels. The essential oils were extracted using hydrodistillation method and characterized with the measure of their physicochemical parameters (refractive index, density and chemical composition by gas chromatography/mass spectrometry). The evaluation of the antioxidant activity was done using the DPPH scavenging test, the reducing power and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibition. The extraction revealed higher yield of essential oils with fresh peels (0.5% against 0.39% with dried peels). The physical indices such as density (0.811 and 0.843) and refractive index (1.469 and 1.470) of fresh and dried peels essential oils, respectively, were up to standard. The results of the gas chromatography/mass spectrometry analysis showed that the limonene was the most abundant compound (83% and 92% in the essential oils of fresh and dried peels, respectively). In the three tests used to study the antioxidant activity, the dried peels essential oil showed more efficacy compared to the one of fresh peels.

**Key words:** essential oils, *Citrus sinensis*, hydrodistillation, antioxidant activity, drying, extraction

**المخلص:** تم إجراء هذا العمل بهدف تقييم قشور البرتقال *Citrus sinensis* وذلك بالمقارنة بين الزيوت الأساسية المستخلصة من كل من القشور الطرية والمجففة. تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير و حُدِّدَت خصائصها عن طريق قياس معالماتها الفيزيوكيميائية (مؤشر الانكسار الضوئي، الكثافة و التركيب الكيميائي بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي/مطيافية الكتلة). قُمنَا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق استعمال اختبار DPPH، القوة الإرجاعية و كذا اختبار فوق أكسيد الهيدروجين H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. كشف استخلاص الزيوت الأساسية عن مردود أعلى لدى القشور الطرية (0.5% مقابل 0.39% للقشور الجافة). و كانت المؤشرات الفيزيائية مثل الكثافة (0.811 و 0.843) و مؤشر الانكسار الضوئي (1.469 و 1.470) للزيوت الأساسية المستخلصة من القشور الطرية و المجففة على التوالي تتوافق مع المعايير. إن نتائج كروماتوغرافيا الطور الغازي/مطيافية الكتلة أثبتت أن الليمونين كان المركب الأكثر وفرة في الزيوت الأساسية (83% و 92% في الزيوت الأساسية المستخلصة من القشور الطرية و المجففة على التوالي). في الاختبارات الثلاثة المنجزة لدراسة النشاط المضاد للأكسدة، أظهرت الزيوت الأساسية المستخلصة من القشور المجففة فعالية أكبر من تلك التي استخرجت من القشور الطرية.

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت الأساسية، *Citrus sinensis*، التقطير، النشاط المضاد للأكسدة، تجفيف، استخلاص