

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 Microbiologie
Spécialité: Biotechnologie Microbienne



Réf:

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

***Elaboration d'une mayonnaise enrichie à l'huile
essentielle et d'extraits phénoliques de citrus limon***

Présenté par:

Madi Melina & Idir Wissam

Soutenu le: **14 juillet 2022**

Devant le jury composé de:

Mme. ARKOUB.W

MCA

Présidente

Mme. DJINNI. I

MCA

Examinatrice

Mme. LAINCER.M.F

MCA

Promotrice

Année universitaire:2021/2022

Dédicaces

Je tien tout d'abord à remercier DIEU
Je dédie ce modeste travail:

A mes chers parents

Quoi que je fasse ou je dise je ne saurai jamais vous remercier comme il se doit, votre affection me couvre, votre bienveillance me guide et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

A mes sœurs SABIHASOUHILA et LYNDA

Que j'aime énormément : vous étiez toujours près de moi. Merci de m'avoir toujours soutenu et merci pour votre amour, votre affection et vos encouragements. Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite.

A mes deux frères RACHID et YANIS

En signe de l'affection et du grand amour que je vous porte, les mots sont insuffisants pour exprimer mon profond estime. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et de mon attachement indéfectible. Que Dieu vous accorde santé et succès.

A Monsieur Abderrahmane pour tout l'encouragement que tu m'as offert, je te dédis ce travail, qui n'aurait pas pu être achevé sans ton éternel soutien et optimisme.

Que dieu t'accorde la santé et la réussite.

A la mémoire de mes grands-parents

Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour vos âmes.

A tous mes oncles et mes tantes

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A tous mes cousins et cousines spécialement **SOUAD** Trouvez ici l'assurance de mon profond respect et de mon fidèle attachement. Que ce travail soit le symbole de ce que je ressens envers toi. Que dieu vous bénisse et t'accorde longue vie pleine de joie et de réussite.

A ma chère binôme **Melina** que j'adore et avec qui j'ai partagé le bonheur et le malheur tout au long mon cursus d'étude j'espère que tu trouveras ici l'expression de ma profonde gratitude.

WISSAM

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier notre **DIEU**, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail. Nous tenons particulièrement nos profonds remerciements et nos vives connaissances à Notre promotrice **Laincer Mourdjene F** Pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour sa confiance, sa patience, son entière disponibilité, ses conseils, ses orientations, ses encouragements incessants, qui nous ont permis de mener à bien ce mémoire.

On tient à exprimer notre profond respect et remerciements à Mme **Arkoub. W**, d'avoir accepté de présider le jury notre soutenance.

On tient également nos remerciements à Mme **Djini.I.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de lire, corriger et examiner ce mémoire.

Un grand merci au meilleur directeur qui nous a ouvert ses portes avec un grand sourire **Mr. Hedjal Samir** et **M. Tadjet Bobkeur**, d'avoir bien voulu accepté de nous accueillir au sein de Laboratoire de Recherches et Développement de Cevital afin de réaliser la formulation de nos échantillons.

Nos vifs remerciements s'adressent également à l'ensemble du personnel de laboratoire Microbiologie au niveau de Cevital .

Nous remercions également aux techniciens et les ingénieurs de laboratoire du bloc 12 pour leurs très grandes aides, disponibilité et leurs gentillesse, aux secrétaires de notre département de Microbiologie.

Nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment.

Dédicaces

A mes cher parents, qui m'ont souvent motivé et qui m'ont offert la liberté de choisir et donné, cette confiance sans cesse renouvelée. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... tout simplement je souhaite que Dieu vous préserve une longue vie Un soutien exceptionnel .

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à mon ami Hichem , Kenza et Kamilia qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Papa mon héros

A mon petit frère Badri

A mes sœurs

A tout mes amies

MELINA

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier dieu, De nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre formation de master et pouvoir réaliser ce travail de recherche.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre encadreur Mme Lincer qui nous a guidé par ses précieux conseils et suggestions, et la confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de ce travail.

Nous tenons à gratifier aussi les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude en acceptant d'examiner notre travail.

Des remerciements en plus pour tous les enseignants de l'université de Targua-Ouzemour pour leur accompagnement durant notre formation.

Enfin, on adresse nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Introduction	1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. La mayonnaise	3
I.1. Définition la mayonnaise	3
I.2 Ingrédients de la mayonnaise.....	3
I.3. Processus de production industrielle de la mayonnaise	4
I.4. Qualité microbiologique de la mayonnaise	5
II. Généralités sur les agrumes	6
II.1. Le citronnier.....	6
II.2. Citron.....	6
II.2.1. Définition.....	6
II.2.2. Systématique botanique du Citron	7
II.2.3. Variétés de citron.....	7
II.2.4. L'importance de citrus en Algérie.....	8
III. Les huiles essentielles d'écorce du citron.....	9
III.1. Définition.....	9
III.2. Localisation et lieu de biosynthèse.....	9
III.3. Compositions de l'huile essentielle du citron.....	10
III.4. Domaine d'utilisation des huiles essentielles	10
III.5. Toxicité des huiles essentielles.....	11

III.6. Effets thérapeutiques.....	11
IV.1. Composés phénoliques.....	12
IV.1.1. Définition.....	12
IV.1.2. Classification.....	12
IV.1.3. Principaux composés phénoliques des écorces des agrumes.....	12
IV.2. Flavonoïdes.....	13
IV.2.1. Définition.....	13
IV.2.2. Propriétés antioxydants des flavonoïdes.....	15

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal	16
I.1. Echantillonnage.....	16
I.2 Traitement et échantillons.....	16
II.1 Extraction des huiles essentielle du citron (<i>citrus limon</i>).....	17
II.1.1 Hydrodistillation.....	17
II.1.2 Rendement d'extraction.....	18
II.2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles.....	19
II.2.1. Neutralisation du radical DPPH.....	19
II.3. Toxicité de l'huile essentielle.....	19
III.1. Extraction et dosage des polyphénols.....	20
III.1.1. Extraction assistée par micro-ondes.....	20
III.2. Modélisation statistique par un plan composite.....	21

I.2.1. Validation du modèle.....	22
III.3. Dosage des composés phénoliques	22
III.3.1. Dosage des polyphénols utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.....	23
III.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	23
IV.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
IV.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	25
V.1. Préparation de la mayonnaise enrichie en l'huile essentielle et l'extrait phénolique du citron.....	25
V.1.1. Définition.....	25
V.1.2. Ingrédients de la mayonnaise.....	26
V.1.3. Conditionnement et stockage.....	27
V.2. Les analyses microbiologiques.....	28
V.3. Détermination de quelques paramètres physico-chimiques.....	30
V.3.1. Humidité (H %)	30
V.3.2. Extrait sec.....	30
V.3.3. Potentiel d'Hydrogène (pH).....	30
V.3.4. Acidité totale.....	30
V.3.5. Indice peroxyde	31
V.3.6. Viscosité.....	32
V.3.7. Activité de l'eau.....	32
V.3.8. Réfraction.....	32
VI. Analyse de vieillissement accéléré.....	33
VII. Étude statistique.....	33

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Extraction d'huile essentielle de l'écorce de Citrus limon.....	34
I.1. Le rendement.....	34
I.2. Activité antioxydante.....	34
I.2.1. Test de piégeage de radical DPPH.....	34
II.1. Modélisation de l'extraction des composés phénoliques.....	36
II.1.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student.....	38
II.1.2. Analyse de variance (ANOVA).....	39
II.1.3. Conditions optimales.....	39
II.1.4. Diagramme des résidus.....	40
II.1.5. Conditions optimales.....	41
II.2. Teneur en polyphénols et flavonoïdes de l'extrait de citron.....	41
II.2.1. Dosage des composés phénoliques.....	42
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	42
III.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	43
III.1.1. Evaluation de pouvoir anti radicalaire par le DPPH	43
III.2. Cytotoxicité de l'HE et l'extrait phénolique de citron : effet hémolytique	44
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique (<i>citrus limon</i>).....	45
III.3.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	45
IV.1. Analyse physico-chimiques	46
IV.2. Analyse microbiologique.....	47
IV.3. Teste de vieillissement accélérer.....	48
Conclusion	50

Liste des abréviations

PH : Potential d'hydrogène

GMP :Goode Manufacturing Practices

SAU :Surface Utile Agricole

HE :HuileEssentille

HD :Hydro Distillation

ICi 50:Concentration d'Inhibition 50%

DL50:Dose létale 50

PBS:Solution Tampon Phosphate Salin

FT:Flavonoïdes totaux

MS:Matière Sèche

CMI :Concentration Minimale Inhibitrice

EPC :Extrait Phénolique de Citron

PCA :Plate Count Agar

YGC :Yeast- Glucose- Choramphénicol

RVS :RappaportVassiliadis Soja

MKTTN :Muller-kauffmannTétrathionateNovobiocine

IP :Indice de Peroxyde

MIT :Mayonnaise Industrielle Témoin

MHEC :Mayonnaise Huile Essentille

MEPC :Mayonnaise Extrait Phénolique

Liste des tableaux

Tableau I : Critères microbiologiques de la mayonnaise.

Tableau II : Les variétés de citron.

Tableau III : Composants huile essentielle de citron.

Tableau IV : Effets thérapeutiques des huiles essentielles de citron

Tableau V : Matrice d'expériences du plan CCD

Tableau VI : Composition de mayonnaises fabriquées

Tableau VII : Analyses microbiologique effectuées sur la mayonnaise.

Tableau VIII : Valeurs expérimentales et prédites de l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des écorces de citron.

Tableau X : Valeurs estimés des coefficients du model (en unités codées).

Tableau XI : Résultats de l'analyse de variance (Citron).

Tableau XII : Conditions optimales de l'extraction des CP obtenues dans l'étude préliminaire.

Tableau XIII : Teneur en composés bioactifs (polyphénols totaux et flavonoïdes) de l'extrait de citron.

Tableau XIII : Résultat de l'effet hémolytique de l'huile essentielle et l'extrait phénoliques et leurs concentrations.

Tableau XV : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait de citron.

Tableau XVI : Résultats de l'analyse physico-chimique de la mayonnaise fabriquées a base huile essentiel de citron (HEC) et extrait phénolique de citron (EPC) et industriel (mayonnaise industriel témoin).

Tableau XVII : Résultats microbiologique des trois mayonnaises.

Tableau XVIII : Le processus de vieillissement de nos échantillons HEC ET EPC ET MIT

Liste des figures

Figure 1: Anatomie de la structure de fruit de citron.

Figure 2 : Production Algérie .

Figure 3 : Structures chimiques des acides phénoliques.

Figure 4 : Fruit de citron.

Figure 5: Principe de l'hydrodistillation.

Figure 6 : Photographie du dispositif d'hydrodistillation.

Figure 7: Photographie opération d'extraction par micro-onde.

Figure 8 : Schéma du protocole du dosage des flavonoïdes totaux.

Figure 9 : Photographie d'une préparation mayonnaise.

Figure 10 : Diagramme de préparation de la phase aqueuse.

Figure 11 : Activité de piégeage du radical DPPH de l'HE de l'écorce de citron.

Figure 12 : Diagramme des résidus.

Figure 13 : Valeurs prévues et réelles des facteurs pour un rendement maximal sur l'extraction des composés phénoliques de citron.

Figure 14: Evaluation de pouvoir antiradicalaire DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de Citrus limon.

Introduction

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours dans le but de résoudre leurs problèmes de santé. Elles forment la base de la médecine traditionnelle grâce à leur richesse en métabolites secondaires utilisées comme composés actifs. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**Ventrella et Marinho, 2008; Ladohet *et al.*, 2014**). Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé des populations.

Ces maladies à l'origine du stress oxydatif sont dues généralement à la production excessive des espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN) qui pourraient devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule ; les lipides, les protéines et les acides nucléiques (**Valko *et al.*, 2006**). Ceci provoquerait un dysfonctionnement cellulaire et serait impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (**Aruoma, 2003**).

Plusieurs études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, antioxydant ou autres, qui pourraient être efficaces pour la santé (**Tumbas *et al.*, 2010**). De nombreux travaux ont été réalisés sur différentes espèces de citrus et ont montré qu'elles contenaient en majorité des composés phénoliques et des huiles essentielles ayant un fort potentiel antioxydant corroborant leurs usages traditionnels. Parmi toutes ces espèces le citron « *Citrus limon* » est populaire par sa richesse en vitamine C, des quantités considérables de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les caroténoïdes sont identifiées (**Del Rio *et al.*, 2004**).

Les écorces de citrus sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les composés phénoliques des écorces de citrus sont caractérisés par leurs activités antioxydantes, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (**Bocco *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2010**).

Les huiles essentielles de citrus sont des mélanges complexes qui ont un large spectre d'activités biologiques telles que l'activité antioxydante (**Misharina et Samusenko,2008**), anti-inflammatoire (**De Moraes et al., 2006**), antimicrobienne (**Chanthaphon et al.,2008; Fisher et Phillips, 2008; Jafari et al., 2011**) et antifongique (**Viuda-Martos et al., 2008; Chutia et al., 2009**). Ces activités peuvent être d'une grande importance dans le domaine alimentaire (**Cristaniet al., 2007**).

L'extraction de l'huile essentielle et des composés phénoliques à partir des écorces de citrus a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments (**Ramphul et al.,2010**).

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile essentielle et des composés bioactif à partir de l'écorce de citrus (*Citrus limon*), dans l'objectif de mettre en évidence leurs propriétés antioxydante dans une matrice alimentaire. Pour cela nous avons procédé au cours de cette étude à des substitutions des antioxydants synthétiques, utilisé comme antioxydant dans la fabrications de la mayonnaise « Fleurial» par l'extrait de l'huile essentielle et les composés phénoliques de citron aux niveaux du Laboratoire de Recherche et de Développement de Cévital/ Béjaia. Le but étant de savoir si la mayonnaise élaborée avec l'extrait de l'huile essentielle et les composés phénoliques de citron seront plus résistantes à l'oxydation que les mayonnaises classiques qui contiennent des antioxydants chimiques.

Afin de mener à terme cette étude, le premier chapitre est consacré aux généralités sur la mayonnaise ainsi que sur l'huile essentielle et les composés phénoliques de citron. En suite le chapitre deux est consacré à la partie expérimentale dont le matériel et les méthodes exploités. Dans le dernier chapitre une discussion des résultats obtenus à été présenté. Nous achevons ainsi ce travail par les principales conclusions et les perspectives envisagées.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

I. La mayonnaise

I.1. Définition

La mayonnaise est une sorte d'émulsion semi-solide d'huile (phase discontinue) dans l'eau (phase continue). Elle présente des propriétés viscoélastiques dues au réseau formé par les lipoprotéines adsorbées autour des gouttes d'huile avoisinantes. En raison de son pH faible et de sa teneur élevée en graisse, elle est relativement résistante à la détérioration microbienne. Bien que les levures et les moisissures puissent causer des dommages, relativement peu d'autres organismes ont été isolés de la mayonnaise. Les émulsions sont des systèmes dispersés métastables constitués d'au moins de deux liquides non miscibles et d'un agent amphiphile. L'un des liquides est dispersé dans le second sous forme de petites gouttes sphériques dont la taille varie de 0,1 à quelques dizaines de micromètres (Arditty, 2004).

I.2 Ingrédients de la mayonnaise

La mayonnaise est une sauce condimentaire obtenue en émulsionnant une ou plusieurs huiles alimentaires dans une phase aqueuse constituée par du vinaigre. L'émulsion huile dans l'eau étant produite en utilisant du jaune d'œuf. La mayonnaise peut contenir des ingrédients facultatifs conformément à la section.

- Huile

La fraîcheur initiale de la mayonnaise est d'une importance primordiale. Elle est étroitement liée à la qualité de l'huile. En effet, dans la mayonnaise, l'huile est en contact avec l'eau, l'air et la lumière qui sont tous des facteurs bien connus pour leur action pro-oxydante.

En plus, les additifs ajoutés à la mayonnaise ne seraient en mesure ni de réprimander ni de masquer les saveurs d'une huile en voie d'oxydation (de rancissement). La stabilité de l'huile à l'auto-oxydation est un critère important pour le choix de la mayonnaise. Également, les traces métalliques apportées par les différents ingrédients (jaune d'œuf, vinaigre) et additifs ainsi que l'oxygène dissout, favorisent l'auto-oxydation. En plus, la présence de cires est susceptible de diminuer la durée de vie de la mayonnaise, car elle peut cristalliser durant le stockage du produit (Shen et al., 2011).

- Jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est utilisé dans la fabrication de la mayonnaise essentiellement pour ses propriétés émulsifiantes dues au complexe lécithine (33%) /protéine (16%). Le jaune d'œuf utilisable pour la fabrication de mayonnaise peut se présenter sous différentes formes : à l'état frais, congelé, en poudre ou concentré.

- Sel

Dans le sel de cuisine (NaCl), les ions sodium (Na^+) ont une charge opposée à celles des groupes phosphates, les extrémités polaires des lécithines. Le sodium neutralise donc ces groupes chargés négativement. Au contraire, les ions chlorure (Cl^-) neutralisent les charges positives des atomes d'azote. Cela diminue les répulsions électrostatiques entre les têtes polaires des micelles qui sont donc plus stables.

- Moutarde

La moutarde apporte une quantité d'eau plus importante que celle de l'huile. Par conséquent, elle permet la dispersion des micelles dans l'eau (Kone,2001)

I.3. Processus de production industrielle de la mayonnaise

On distingue deux types de processus de production : discontinu et continu.

Ces derniers peuvent être divisés en processus froids et semi-chauds. Dans le processus à froid, toutes les opérations de fabrication (mélange des ingrédients, formation d'émulsion pendant l'homogénéisation, conditionnement) sont effectuées à froid. Dans le processus semi-chaud, les ingrédients (eau, épices) sont pasteurisés à 80°C pendant quelques minutes puis refroidis. Les autres opérations sont semblables au processus à froid parce que l'homogénéisation nécessite une basse température pour former une émulsion stable (**Saarela et al., 2010**).

La mayonnaise consiste à préparer :

1. Phase grasse

Cette phase est constituée de l'huile dans les proportions définies selon la recette ainsi que des auxiliaires de fabrication qui y sont solubles tels que: l'émulsifiant, les vitamines, les arômes. La

préparation proprement dite de la phase grasse consiste à dissoudre les additifs dans l'huile. Le liquide limpide ainsi obtenu constitue la phase grasse complète

2. Phase aqueuse

Elle est constituée de l'eau et du vinaigre ainsi que des additifs qui y sont solubles tels que: le sel, le sucre, les arômes, les conservateurs ...etc.

I.4. Qualité microbiologique de la mayonnaise

Les mayonnaises sont des produits relativement fragiles sur le plan microbiologique et certains ingrédients dont particulièrement le jaune d'œufs frais est souvent contaminé. La quantité d'eau disponible pour les micro-organismes et le pH constituent les facteurs clés pour la stabilité de la mayonnaise. Un contrôle basé sur les bonnes pratiques de fabrication (GMP = Good Manufacturing Practices) ainsi que sur la qualité des matières premières, particulièrement les œufs, est décisif pour la qualité du produit fini. La réglementation algérienne préconise la recherche de microorganismes cités dans le tableau suivant

Tableau I: Critères microbiologiques de la mayonnaise (J.O N°39 de 2 Juillet 2017)

Catégories de denrées alimentaires	Micro-organismes	Limite microbiologique UFC/g	
		m	M
Mayonnaise non Stabilisée	Germe aérobies à 30	10 ⁴	10 ⁵
	Levures et moisissures	10 ²	10 ³
	<i>Escherichia coli</i>	10	10 ²
	Staphylocoques à coagulase +	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25g	
Mayonnaise Stabilisée	Levures et moisissures	10	10 ²
	<i>Escherichia coli</i>	4	40
	Staphylocoques à coagulase +	10	10 ²
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25g	

II. Généralités sur les agrumes

Le terme agrumes désigne un ensemble de petits arbres, sont des persistants et étalés avec des poussés épineuses, atteignant environ 2–15 m de haut, les feuilles sont unifoliées et alternent avec plus ou moins pétioles largement ailés. Les fleurs sont parfumées, généralement blanches mais parfois pigmentées de rose ou de violet, parfaites à 5 pétales et 5 sépales, et naissent solitaires ou en cymes courtes (**Polese, 2008**).

II.1. Le citronnier

Le citronnier est l'agrumes le plus cultivé par les particuliers, bien que sa culture ne soit pas la plus facile. Est un arbre peu rustique, sensible au froid comme à la chaleur excessive, mais également au vent, aux maladies et aux déficiences minérales du sol. Il souffre de chlorose lorsque le sol il est trop calcaire. Certaines variétés sont particulièrement sensibles au mal sec (**Swingle 1967**).

II.2. Citron

II.2.1. Définition

Les citrons (*Citrus limonia*) font partie de la vaste famille des Rutaceae originaire du bassin méditerranée (**Gollouin et Tonelli, 2013**). Selon les espèces, la fleur se transforme en fruit mur, de forme ronde, allongée ou ovale (8 à 12 cm de long sur 5 à 6 cm de diamètre), présentant un téton à une extrémité et quelque fois à chaque extrémité (**Espirad, 2002**). Il reste longtemps sur l'arbre sans que le goût s'altère (**Bachés, 2011**). Les caractéristiques et les compositions de citron :

Le fruit de citron est composé d'endocarpe et de péricarpe, ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière. La peau du citron est appelée écorce ou zeste. Elle est brillante et d'une couleur variant du vert au jaune vif selon la maturité du fruit.

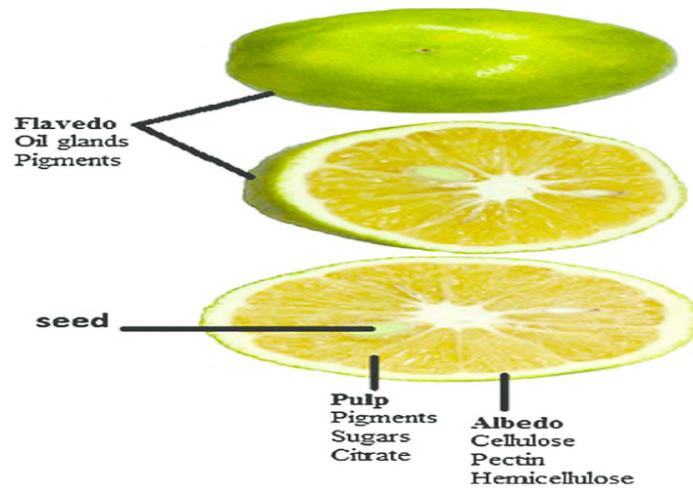


Figure 1: Anatomie de la structure de fruit de citron.

II.2.2. Systématique botanique de Citron

La classification scientifique du citron, selon (**Springer-Verlag, (2014)**), est comme suite :

Règne : Végétal

Famille : Rutacées

Division : Embryophyta

Genre : Citrus

Classe : Dicotyledoneae

Espèce : Citrus limon

Ordre : Géraniales

II.2.3. Variétés de citron

Parmi les innombrables variétés de citron que vous pouvez trouver sur les marchés voici les plus courantes :

Tableau II : Les variétés de citron (Espirad, 2002).

Variété	Saison	Caractère de fruit
Primofiori	Octobre à décembre	Forme Ovale, peau fine, pulpe très juteuse.
Internado	Septembre à octobre.	Fruit de grand de taille, peau très fine, pulpe juteuse et acide, pas des pépins
Verna	Toute l'année	Fruit de couleur jaune intense, peau rugueuse et épaisse, pas des pépins, peu acide.
Eureka	4 saisons	Forme ovoïde, un zeste difficile à prélevé, juteuse très acide.

II.2.4. L'importance de citrus en Algérie

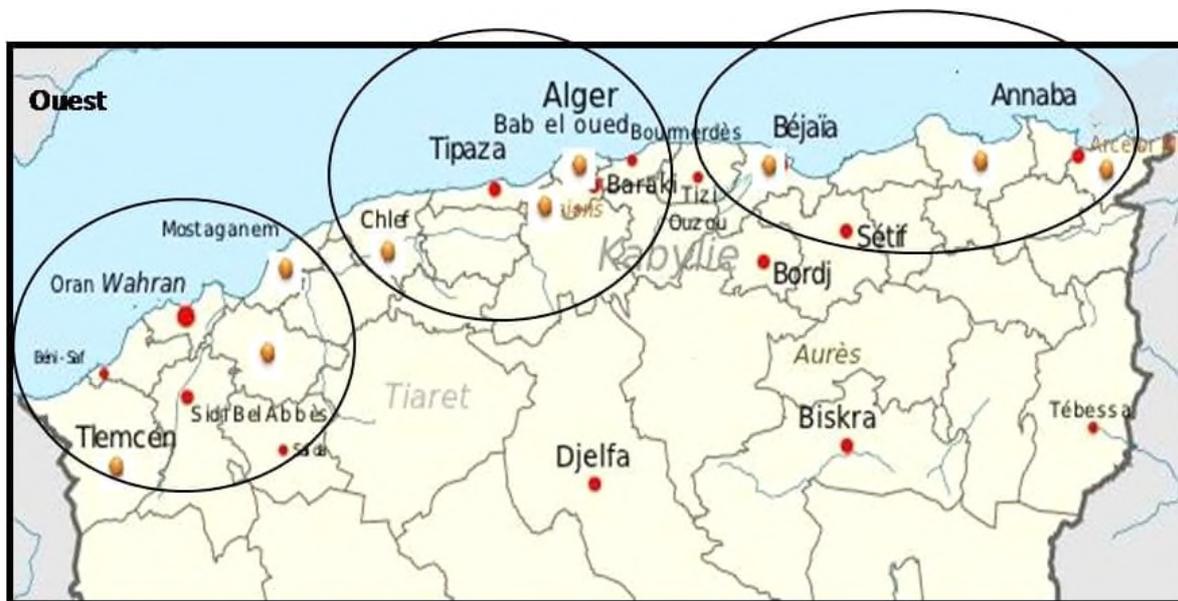


Figure 2 : Production Algérie (Ministre de l'agriculture et de développement rural, 2020).

Le verger agrumicole Algérien occupe 0,7 % de la surface agricole utile (SAU) et 6,8 % de la surface arboricole, soit 64154 ha dont 50826 ha en rapport. Le reste étant constitué de 909 Ha de jeunes plantations (**Anonyme a, 2020**).

La production totale de citron au niveau de la wilaya de Bejaia est de 6 730 tonnes pour la saison 2019/2020. Les plus importantes régions productrices de citron de wilaya sont Oued Ghir, El kseur, Amizour, Tazmalt, etc. (**Direction des services agricoles, 2020**).

III. Les huiles essentielles d'écorce du citron

III.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des liquides huileux aromatiques caractérisés par une forte odeur également appelées huiles volatiles ou étherées, limpide et rarement coloré, soluble dans les solvants organiques et insoluble dans l'eau. Ce sont des mélanges naturels très complexes de substances lipophiles, qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à différentes concentrations (**Eristanna et al. 2013**). Leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée (**Solene, 2012; Lakhdar, 2015**).

III.2. Localisation et lieu de biosynthèse

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (**Himed et Merniz, 2018**). Les glandes sébacées sont des structures sphériques situées juste sous l'épiderme dans les tissus primaires de la pousse (dans les feuilles, épines, prophyllis, sépales, etc.) (**Eristanna et al., 2013**). En particulier, dans le Flavédo qui représente la couche externe (zeste) contenant les glandes à des HE (**Kehal, 2013**). Ce dernier est la région pigmentée du Péricarpe, contient de nombreuses glandes sébacées constituées de cavités sécrétoires bordées de plusieurs couches de cellules épithéliales spécialisées.

III.3. Compositions de l'huile essentielle du citron

Composition chimique (%) d'huile essentielle de citron acclimatés en Algérie à partir de parties de peau fraîche (Djenane, 2015).

Tableau III : Composants huile essentielle de citron.

Composants	Huile essentielle de citron (%)
α -Pinene	03.07
β -Pinene	17.04
β -Myrcene	2.37
Limonene	5140
γ -Terpinene	13.46
Nerol	1.50
Geraniol	2.43
Neryl acétate	1.05
Isocaryophyllene	1.23

III.4. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs

- **Industriels :** parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (Grysole, 2005).

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Pingot, 1998 ; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 ; Aprotosoie et al., 2010). Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments, ceci est due à la présence de

composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Conner, 1993 ; Hammer et al., 1999) . Les huiles essentielles de Citrus limon servent à la fabrication d’arômes alimentaires, d’essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Choi et al., 2000 ; Robert ; Lobstein, 2005 ; Bisignano et al., 2011). Récemment, certaines études ont montré la possibilité d’intégrer les huiles essentielles de Citrus limon comme agent antioxydant (Himed, 2011 ; Hellal, 2011).

III.5. Toxicité des huiles essentielles

L’utilisation des huiles essentielles du citron extraites soit par hydro distillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Robert et Lobstein ,2005). Les huiles essentielles contenant des phénols, devraient être employées avec prudence. La toxicité peut se produire si les huiles essentielles sont utilisées à de fortes doses pendant un temps prolongé (Couderc, 2001).

III.6. Effets thérapeutiques

L’huile essentielle de Citron, d’odeur très agréable et tonique, peut être recommandée en olfactothérapie, en diffusion par voie orale ou topique. Sa richesse en limonène explique ses nombreuses propriétés regroupées dans le **tableau (IV)** suivant :

Tableau IV: Effets thérapeutiques des huiles essentielles de citron

Effets Thérapeutiques
. Facilite la digestion, Anti nauséuse, Anti-inflammatoire voire antidépressive Lutte contre les foies fatigués, les cheveux gras et les troubles de l'humeur. , Protège des infections virales, bactériennes ou fongiques Des études récentes suggèrent également un impact métabolique intéressant en cas de surcharge pondérale. Son mode d’obtention par expression à froid des péricarpes des fruits du citronnier impose la sélection de citrons de qualité biologique

IV.1. Composés phénoliques

IV.1.1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires spécifiques du règne végétal qui forment un très vaste ensemble de plus de 8000 molécules d'une extrême diversité (**Edeas, 2008**). Au niveau végétal, les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes (**Manach et al., 2004; Ignat et al., 2011**). Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, qui peuvent être méthyles, acyles ou glycosyles (**Singleton et Esau, 1969**). Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes les lignines et les xanthones (**Donatien, 2009**).

Les agrumes sont une très bonne source de composés phénoliques (**Balasundram et al.,2006**) . Ces derniers se trouvent en grande proportion dans l'écorce (**Gorinstein et al., 2001**).

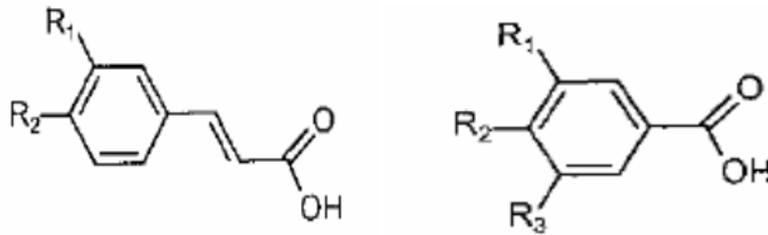
IV.1.2. Classification (annexe II)

IV.1.3. Principaux composés phénoliques des écorces des agrumes

On retrouve principalement deux classes de composés phénoliques dans les écorces d'agrumes : les flavonoïdes et les acides phénoliques.

- **Acides phénoliques**

Les principaux acides phénoliques : Les dérivés de l'acide benzoïque ou les acides hydroxybenzoïques Tels que l'acide gallique, les gallotanins et les ellagitanins. Les dérivés de l'acide cinnamique ou les hydroxycinnamiques qui comprennent les acides p- coumarique, caféique, férulique et sinapique qui sont des précurseurs d'anthocyanines (**Sarni- Manchado et Cheynier, 2006**)



Acide hydroxybenzoïques

R1=OH : Acide coumarique.

R = R2=OH : Acide caféique.

R1=OCH3 ; R2=OH : Acide férulique

Acide hydroxycinnamique

R1=R2=OH ; R3=H : Acide protocatechuique.

R= R2=R3=OH : Acide gallique.

Figure 3 : Structures chimiques des acides phénoliques (Manach et al., 2004).

IV.2. Flavonoïdes

IV.2.1. Définition

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavédo, désignant la couche externe des écorces d'agrumes (Donatien, 2009). Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal comme les légumes et les fruits tels que les agrumes (*citrus limon*) et ils sont consommés quotidiennement (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, ils sont responsables de la coloration jaune, orange et rouge de différents organes végétaux, tels que les fruits (notamment du genre *Citrus*) et les légumes (Ghedira, 2005). Ils agissent principalement comme antioxydants primaires et ils dérivent du flavane, qui contient 15 atomes de carbone, rangés dans la configuration C6-C3-C6 ; deux noyaux aromatiques A et B, liés entre eux par un hétérocycle oxygéné C (Gattuso et al., 2007; Chira et al., 2008).

Selon leurs structures moléculaires, les flavonoïdes sont divisées en cinq classes : Flavones, Flavanones, anthocyanines, Flavonols et Flavanols (ou catéchine) (La Guardia, Santo Giammanco et al, 2007).

- **Flavonols**

Ils sont les plus efficaces de tous les flavonoïdes grâce au groupe cétone et au numéro 3 du cycle C. Leur activité dépend des propriétés structurales, du milieu réactionnel où du test utilisé (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). La quercétine, le kœmpférol, la myricétine sont les flavonols communs des agrumes (Manthey et al., 2001).

- **Flavanones**

Les flavanones de citron sont présentes sous deux formes :

Forme d'aglycone : Narigénine et le hesperetin, l'ériocitrine, etc.

Forme de glycoside : il existe deux types :

- Neohesperidosides : La naringine, néohespéridine et neoeriocitrin, qui se composent d'une flavanone avec le neohesperidose (glucose rhamnosyl- α -1,2) et ils ont un goût amer,
- Rutinosides : L'hespéridine, narirutin et didymin, qui ont une flavanone et un rutinose (glucose rhamnosyl- α -1,6) et ils sont sans goût.

Les Flavanones sont habituellement présentes sous la forme de diglycoside, conférant le goût typique aux agrumes (Guardia et Santo Giammanco et al., 2007).

- **Flavones**

Dans certaines espèces d'agrumes, les flavonoïdes se retrouvent sous forme de flavones glycosilés (rutine, isorhoifoline, diosmine, etc.) et polyméthoxylés (sinensétine, nobilétine, tangerétine, etc.) (Jayaprakasha et Patil, 2007).

La diosmine est un constituant commun de plusieurs espèces d'agrumes (Kanaze et al., 2003).

- **Anthocyanines**

Le terme anthocyane dérive des mots grecs Athos (fleur) et cyan (bleu). Ces composés sont responsables de la coloration rouge, bleue ou violette de nombreux fruits, légumes et fleurs (Sarni-Manchado., 2006).

- **Flavanols**

Les flavanols existent sous forme de monomères également appelés catéchines ainsi que sous forme de polymères, les proanthocyanidines. Ils présentent un hétérocycle C saturé auquel s'ajoute une fonction hydroxyle en C3.

IV.2.2. Propriétés antioxydants des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (**Fuhrman et al., 1995**).

L'action antioxydant de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (**Cotelle, 2001**). A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FL-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (FL-O.) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Jovanovic et al., 1998**)

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (**Cos et Al., 1998**). Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (**Dacosta, 2003**), comme les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Chapitre II
Matériel et Méthodes

La première partie de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Génie Biologique de la faculté SNV de l'université de Bejaia. La seconde partie du travail a été réalisée au niveau du complexe Cevital : laboratoire de Recherche et Développement, laboratoire de Microbiologie d'une période allant de mai à juin 2022.

I. Matériel végétal

I.1. Echantillonnage

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est le citron (le fruit du citronnier), il a été récolté au mois de mai (2022) au niveau de la région d'ait melloul (36°36'45''N 5°10'21''E), wilaya de Bejaia. La récolte s'est faite manuellement, sur le même arbre, les fruits ont été sélectionnés où ils doivent être mûrs de couleur jaune, comestibles et ne présentent aucun signe de blessure ou d'infection. Les fruits sont emballés dans des sacs étiquetés puis transportés au laboratoire (**Figure 4**).



Figure 4 : Fruit de citron.

I.2 Traitement et échantillons

Les fruits de citron sont lavés et nettoyés à l'eau du robinet puis à l'eau distillée pour les débarrasser de la poussière et de toutes les impuretés, puis un essuyage par un chiffon propre, ensuite, les fruits sont épluchés pour récupérer les écorces. Une bonne quantité d'écorces est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles de citron (méthode hydrodistillation). d'autres sont découpées et séchées dans un lyophilisateur jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

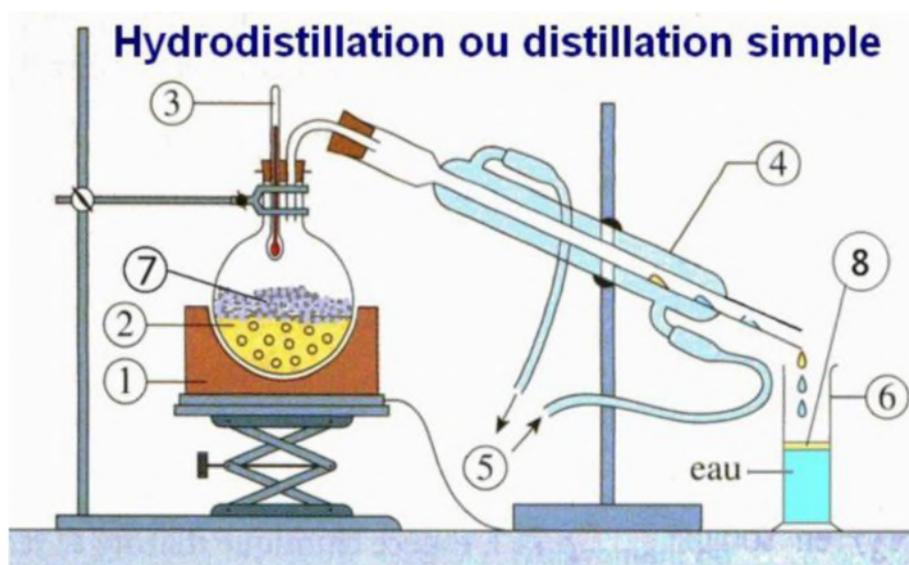
en suite ces dernières sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique pour avoir une poudre fine, suivi par un tamisage de cette poudre avec un tamisier dont le diamètre est inférieure à 125 μ m, la poudre obtenue est conservées dans des boucaux en verre, fermés hermétiquement, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière.

II.1 Extraction des huiles essentielle du citron (*citrus limon*)

II.1.1 Hydrodistillation

➤ Le principe

L'extraction des huiles essentielles (HE) à partir de zeste de citron à été effectuée par la technique d'hydrodistillation. L'hydrodistillation (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction des huiles essentielles. Dans son principe, elle consiste à immerger la matière végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La figure 5 détaille.



1. Chauffe-ballon; 2.Eau bouillante; 3.Thermomètre; 4.Réfrigérant à eau; 5.Arrivée d'eau froide et sortie d'eau tiède; 6.Essencier ; 7.Végétal ; 8.Huile essentielle.

Figure 5: Principe de l'hydrodistillation (Solene, 2012).

➤ **Protocole expérimental**

650g d'écorces fraîches de citron est introduite dans un ballon de 5 litres rempli d'eau distillée jusqu'aux deux tiers (2/3) de sa capacité, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2h.

Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau du huiles essentielles qui la surnagent. (Jazet Dongmo *et al.*, 2008). (figure 6)

L'huile essentielle est conservée dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C.



Figure 6 : Photographie du dispositif d'hydrodistillation.

II.1.2 Rendement d'extraction

Le rendement en huiles essentielles est le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la masse d'écorce utilisée. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) (Ndoye Foe *et al.*, 2016).

Il est calculé par cette formule :

$$R (\%) = M_{HE}/M_E * 100$$

R : Rendement en huile essentielle % .

M_{HE}: Masse d'huile essentielle (g).

M_E : Masse d'écorce (g).

II.2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

II.2.1. Neutralisation du radical DPPH

➤ Le principe

Le DPPH° (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH° est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Gachkar *et al.*, 2007).

➤ Le protocole expérimental

la solution de DPPH est préparée selon le protocole Sahin *et al.*,(2004), il consiste à solubiliser 2,9 ml de la solution DPPH (60µM) avec 0,1 ml de l'extrait à différentes concentrations des huiles essentielles testées ou l'antioxydant de référence, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport ou contrôle négatif, contenant uniquement la solution de DPPH, est mesurée à 517 nm. Les IC50 ont été déterminées pour chaque extrait, et définies comme étant la concentration du substrat qui entraîne la neutralisation de 50 % de l'activité du DPPH.

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I %) est calculée avec la relation suivante :

Ac : Absorbance du contrôle.

Ae : Absorbance de l'échantillon.

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = \text{DPPH} (\%) = \frac{A \text{ controle} - A \text{ echantillon}}{A \text{ controle}} \times 100$$

II.3. Toxicité de l'huile essentielle

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé présentant une toxicité par voie orale avec des doses létales à 50% (DL50) supérieures à 5 g/kg, peut provoquer des effets néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques...etc, et peut entraîner une insuffisance rénale chez l'enfant à doses élevées (Lakhdar, 2015). L'usage des huiles essentielles en application locale, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations et des allergies. Les huiles d'agrumes (pamplemousse, citron...etc) sont photosensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil L'utilisation des

huiles essentielles doit s'accompagner de nombreuses précautions (Chavanne, 2011; Muther, 2015).

➤ Le protocole

La solution PBS a été préparée préalablement et conservé 4°C, tandis que La suspension érythrocytaire est fraîchement préparée avant toute utilisation.

Préparation de PBS : la solution tampon phosphate salin (PBS) a été préparé à pH = 7.4, par l'utilisation des produits suivants : NaCl (137mM), KCl (2,7mM), Na_2HPO_4 (8mM), KH_2PO_4 (2mM) (Mohan, 2006).

Préparation de la suspension érythrocytaire : le sang est collecté chez des patients sains dans des tubes héparines. Le plasma est éliminé par une centrifugation à 3000 rpm /10min. Le culot est lavé trois fois avec le PBS (pH 7.4) et solubilisé à nouveau dans le même volume ainsi que la suspension érythrocytaire obtenue est diluée à 10%.

- Témoin positif est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par H_2O .
- Témoin négatif est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le PBS.

III.1. Extraction et dosage des polyphénols

III.1.1. Extraction assistée par micro-ondes

➤ Le principe de la technique

Repose sur l'effet direct des micro-ondes sur les molécules par conduction ionique et rotation du dipôle. Les molécules polaires comme les polyphénols et les solutions ioniques, absorbent fortement l'énergie des micro-ondes (présence d'un moment dipolaire permanent) entraînant une élévation rapide de la température et l'achèvement rapide de la réaction. La température élevée augmente la pénétration du solvant dans la matrice et les constituants sont libérés dans le solvant chaud environnant.



Figure 7: Photographie opération d'extraction par micro-onde.

III.2. Modélisation statistique par un plan composite centré

Un plan d'expériences de type composite centré a été appliqué afin d'étudier l'influence de trois facteurs opératoires sur l'extraction des composés phénoliques, à savoir le temps d'extraction (X_1), la concentration du solvant (X_2) et la masse de la poudre de citron (X_3).

La matrice du plan adoptée établie par le logiciel Minitab 17.0 est donnée dans le tableau (V).

Tableau V : Matrice d'expériences du plan CCD

Essai N°	Paramètres		
	Temps (S) (X1)	% du Solvant (X2)	[Poudre] (g/L) (X3)
1	40	30	0,2
2	80	30	0,2
3	40	70	0,2
4	80	70	0,2
5	40	30	0,4
6	80	30	0,4
7	40	70	0,4
8	80	70	0,4
9	60	50	0,3
10	60	50	0,3
11	60	50	0,3
12	20	50	0,3
13	100	50	0,3
14	60	10	0,3
15	60	90	0,3
16	60	50	0,1
17	60	50	0,5

III. 2.1. Validation du model

Les conditions optimales pour l'extraction des polyphénols totaux dépendant de la concentration du solvant, de la masse de l'échantillon et du temps d'extraction. Les valeurs expérimentales et prédites ont été comparées afin de vérifier la validité du modèle.

III.3. Dosage des composés phénoliques

III.3.1. Dosage des polyphénols utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu

➤ Le principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PM_{012}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{012}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La

coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

➤ **Mode opératoire**

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Özcan (2021) et ses collaborateurs (Özcan et al., 2021).

400 µl de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu, après 3 minutes, une solution de Na_2CO_3 à 7,5 % (10 ml) est ajoutée tout en agitant. Le volume total est ajusté à 25 ml avec l'eau distillée et le mélange est agité Vigoureusement.

Après une incubation de 60 min dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc.

Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique par 100 g MS par rapport à une courbe d'étalonnage (Annexe I).

III.3.2.Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux (FT) contenus dans les extraits est réalisée par la méthode décrite par (Wang et al., 2008) avec quelques modifications.

➤ **Le principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, qui est susceptible de donner par son groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (Ribereau Gayon et al., 1972 ; Boulekbache, 2005). D'après Ribereau (1968), les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons.

➤ **Mode opératoire**

La méthode adoptée pour le dosage des flavonoïdes totaux est celle décrite par Wang et ses collaborateurs (Wang et al., 2008).

0,3 ml de NaNO_2 à 5% a été ajouté à 1 ml d'extrait dans un tube d'essai de 20 ml. Le mélange a été maintenu pendant 6 min à température ambiante, puis on ajoute 0,3 ml de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ à 10% au mélange.

Après 6 min, le mélange est additionné de 4 ml d'hydroxyde de sodium (1N) et le volume total est ajusté à 10 ml avec l'eau distillée, après une incubation de 15 min l'absorbance est mesurée à 510 nm. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de catéchine par 100g de matière sèche, en se référant à une courbe d'étalonnage (**annexe I**)

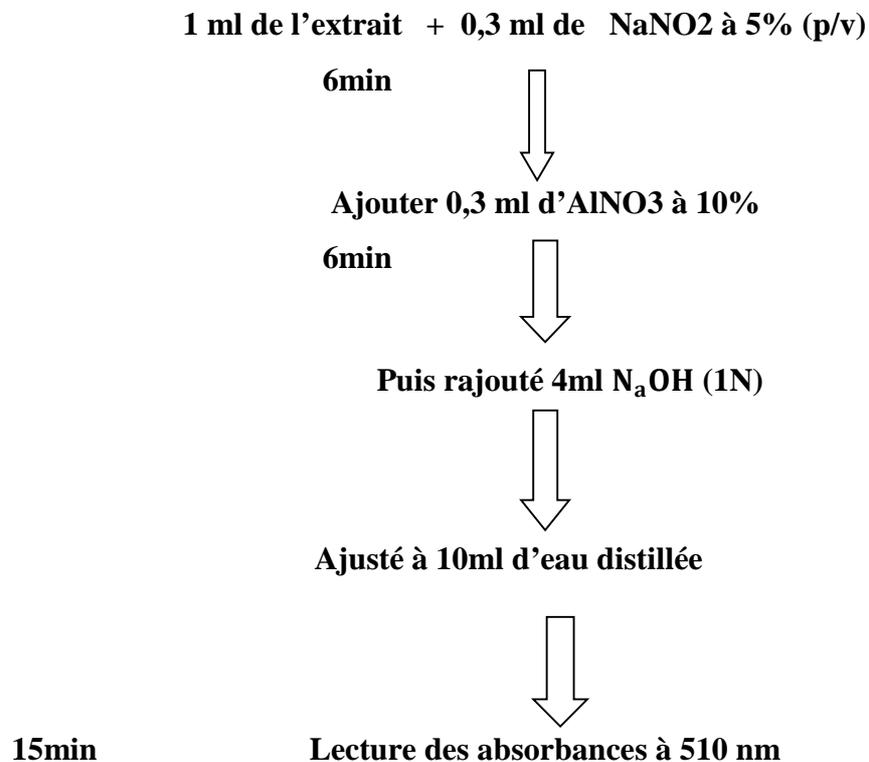


Figure 8 : Schéma du protocole du dosage des flavonoïdes totaux.

IV.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne

I- Les souches cibles :

L'activité antimicrobienne des extraits phénoliques est testée sur cinq souches bactériennes.

Bactéries à Gram positif :

- *Salmonella Typhi*
- *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline
- *Staphylococcus aureus*

Bactéries à Gram négatif

- *Escherichia coli*
- *Vibrio cholerea*

IV.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ont été déterminées en utilisant la technique de micro dilution avec le bouillon Muller Hinton (NCCLS, 2006). Des plaques contenant 96 puits sont préparées en distribuant dans chaque puits 50 µl de bouillon Muller Hinton, Dans cette on rajoute les différents extrais afin d'avoir une concentration finale de 32mg/ml. On additionne un volume de 50µl de ce mélange à la cupule adjacente et ainsi de suite jusqu'à la dernière cupule ou l'on élimine les 50µl restant. La dernière cupule contient une concentration de 0.054mg/ml . Un volume de 50µl de la suspension bactérienne à 10⁷ est ajouté dans chaque cupule. Les plaques sont incubées à 37°C/24h. La CMI a été définie comme la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu.

V.1.Préparation de la mayonnaise enrichie en l'huile essentielle et l'extrait phénolique du citron**V.1.1. Définition**

La mayonnaise est une émulsion semi-solide d'huile (phase discontinue) dans l'eau (phase continue) (SHEN et al., 2011). Elle présente des propriétés viscoélastiques dues au réseau formé par les lipoprotéines adsorbées autour des gouttes d'huile avoisinantes (MA et CANOVAS, 1995).

V.1.2. Ingrédients de la mayonnaise préparée

Tableau VI : Composition de mayonnaises fabriquées

Mayonnaise à base de l'huile essentielle du citron (HEC) (g)	Mayonnaise à base de l'extrait phénolique du citron (EPC) (g)
l'eau	l'eau
sucre cristallisé	sucre cristallisé
sel	sel
huile colza	huile colza
jaune d'œuf	jaune d'œuf
HEC (huile essentiel de citron)	EPC (extrait phénolique de citron)
acide citrique	acide citrique
Arôme moutarde	Arôme moutarde
Vinaigre	Vinaigre



Figure 9 : Photographie d'une préparation de mayonnaise.

- **La phase grasse**

La phase grasse est constituée de l'huile dans les proportions définies selon la recette ainsi que des auxiliaires de fabrication qui y sont solubles tels que: l'émulsifiant, les vitamines, les arômes. La préparation proprement dite de la phase grasse consiste à dissoudre les additifs dans l'huile. Le liquide limpide ainsi obtenu constitue la phase grasse complète (KONE, 2001).

- **Phase aqueuse**

La phase aqueuse est constituée de l'eau et du vinaigre ainsi que des additifs qui y sont solubles tels que: le sel, le sucre, les arômes, les conservateurs ...etc. Selon KONE (2001), le procédé discontinu ou fabrication par charge est le procédé de choix pour la production de la mayonnaise à l'échelle semi-artisanale. Elle se déroule de la manière suivante sous vide: Introduire la phase aqueuse et le jaune d'œuf dans la cuve; Mettre en marche le broyeur colloïdal avec retour dans la cuve; Introduire, en petites quantités au départ, la phase huileuse; Augmenter progressivement la quantité de la phase huileuse à ajouter au fur et à mesure que l'émulsion commence à devenir visqueuse.

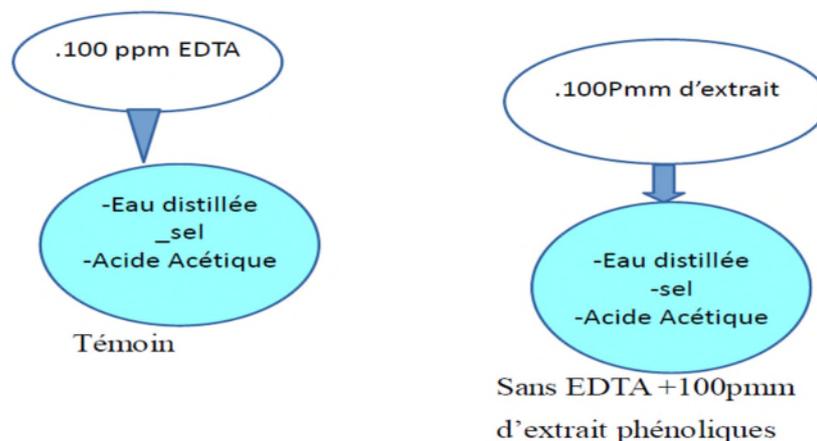


Figure 10 : Diagramme de préparation de la phase aqueuse.

V.1.3. Conditionnement et stockage

Les mayonnaises une fois préparées, sont versées dans des boîtes en verre stériles. Les boîtes de mayonnaise sont stockées à l'étuve à une température de 40°C Jusqu'à l'utilisation. Selon le journal officiel du 8 chaoual 1438 02 JUILLET 2017.

V.2. Les analyses microbiologiques

les germes recherchés au niveau de Cevital pour la mayonnaise ont été réalisés selon les recommandations de normes de l'organisation internationale de standardisation (**ISO**) et les exigences du (**JORA N°35 du 1998**) **Tableau VII**

- *Les salmonelles*
- *Les germes aérobies totaux*
- *Les levures /Moisissures*
- *Les coliformes fécaux (E. coli)*
- *Staphylococcus aureus*

Tableau VII : Analyses microbiologiques effectuées sur la mayonnaise

Germes recherchés	Milieux utilisés	Méthodes	Incubation	Lecture
Flore totale(ISO 4833/2003)	PCA	Ensemencement en masse	30°C/72h	Comptage des colonies et calcule de nombre N
Staphylococcus aureus (ISO 6888-1/2003)	Baird Parkeur	Ensemencement en surface	37°C/24h	Comptage des colonies noires ou grises brillantes
Levures et moisissures (ISO 21527-2/2008)	YGC	Ensemencement En masse	25°C/4 à 5 jours	Comptage des colonies Levures :colonies brillantes Moisissures :thalle étendus ,plats avec fructification coloré et des formes sporulés
Selmonelles (ISO6579/2002)	Eau pitonnée tamponnée	Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide	37/18h	Présence ou absence des colonies (colonie spécifique à centre noire)
	Bouillon RVS	enrichissement sélectif sur milieu liquide	41.5°C/24h	
	Bouillon MKTTN		37°C/24h	
	Gélose XLD	Isolement et identification (Ensemencement en surface)	37°C/24h	

V.3. Détermination de quelques paramètres physico-chimiques

L'analyse physico-chimique est effectuée afin de caractériser les produits alimentaires, c'est-à-dire: la quantité de certaines substances par exemple: le pH, la viscosité, l'humidité, activité de l'eau, l'acidité totale, l'indice peroxyde et de réfraction.

V.3.1. Humidité (H %)

Une portion de l'échantillon de fruit (10 g environ) est incubée dans une étuve à 103 ± 2 °C jusqu'à un poids constant. L'humidité est exprimée en pourcentage massique.

V.3.2. Extrait sec

L'extrait sec total ou matières sèches totales est l'ensemble de toutes les substances qui ne se volatilisent pas, dans des conditions physiques déterminées. L'appareil utilisé dans cette étape s'appelle un dessiccateur ou une thermo-balance.

➤ Mode opératoire

Prendre une coupelle, la peser à l'aide du dessiccateur puis tarer

- ✓ Ajouter une quantité de mayonnaise et l'étaler sur la coupelle
- ✓ Remettre la coupelle de l'appareil
- ✓ La fin d'évaporation se manifeste lorsque la perte du poids reste constante
- ✓ Le dessiccateur indique directement en pourcentage l'extrait sec sur l'écran.

V. 3.3. Potentiel d'Hydrogène (pH)

La mesure du pH se fait à l'aide d'un pH-mètre (**HANNA instruments, pH 209, Italie**). La sonde du pH-mètre est plongée dans le flacon ayant l'échantillon et la valeur du pH est directement lue.

V.3.4. Acidité totale

C'est la somme des acides organiques et des acides minéraux. Elle est exprimée en fonction de l'acide dominant. L'acidité est déterminée par la méthode suivante :

- Diluer avec d'eau distillée une quantité de 10g d'échantillon dans un Erlenmeyer.

Agiter le mélange après l'ajout de quelques gouttes de phénophtaléine.

- Titrer le tout avec une solution de KOH jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pale persistant après quelques seconde, lire dans la burette le volume de la chute (**Saïdani et Marzouk, 2003**).

L'acidité est calculée selon la formule suivante :

$$AC = [(ml) \times M \times N] / PE$$

V : Volume de la chute dans la burette.

PE : Masse de la prise d'essai.

M : Masse molaire d'acide acétonique 60 g /Mol.

N : Normalité de la solution KOH(0,1 N).

V.3.5. Indice peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) représente la quantité d'oxygène liée chimiquement à un acide gras ou à des chaînes organique d'un corps gras sous forme de peroxyde. La valeur de peroxyde est exprimée en millier équivalent d'oxygène actif par kilogramme d'huile (meq d'O₂ /Kg).

➤ Protocole

peser 5g d'huile à 0,01g près dans un Erlenmeyer, ajouter 12 ml de chloroforme et 18 ml d'acide acétique puis incorporer à cette solution 1 ml d'iodure de potassium (KI). Agiter la solution et mettre a l'abri de la lumière pendant 1min puis ajouter 75 ml d'eau distillée et agiter vigoureusement en présence d'empois d'amidon, titrer avec le thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) à 0,01N et parallèlement effectuer un essai à blanc (sous huile) jusqu'à décoloration totale de la solution.

$$IP = (V - V_0) \times 1000m / (meq d'O_2 / Kg)$$

Où:

N: normalité Na₂S₂O₃;

V, V₀ : volume en ml de Na₂S₂O₃ nécessaire pour le titrage de l'échantillon et de l'essai à blanc, respectivement ;

m : masse en gramme de la prise d'essai.

$$I_{per} = Chute.2$$

V.3.6. Viscosité

La viscosité est une propriété importante des fluides qui décrit une résistance des liquides à l'écoulement et qui est liée à la friction interne qui a lieu dans le fluide. Exprimer en Cp (centi poisse).

L'analyse de la viscosité de l'échantillon s'effectue en plusieurs étapes énumérées comme suite :

- Placer le mobile ainsi que son protecteur sur la partie tournante.
- Sélectionner le mobile idéal (L1, L2, L3 ou bien L4), la vitesse de rotation (de 100 jusqu'à 0.3 tour/minute) ainsi que la densité.
- Mettre l'échantillon à tester dans un bécher.
- Vérifier la température de l'échantillon à analyser (24 –26°C).
- Insérer et centrer le mobile dans le produit à tester jusqu'à ce que le niveau de l'huile, atteigne le repère pratiqué sur la tige.
- Lire la valeur de viscosité affichée sur l'écran.

V.3.7. Activité de l'eau

L'activité de l'eau ou (a_w) représente l'eau libre dans le produit. Elle évolue dans une gamme comprise entre 0 et 1 et est définie comme le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit et de la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température.

V.3.8. Réfraction

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre (model ZuZi N0.315). Le principe de l'indice de réfraction d'une matière est basé sur la mesure du pouvoir de cette matière à ralentir et à dévier la lumière (NF T 75 –112)

VI. Analyse de vieillissement accéléré

Ce teste consiste à oxyder la mayonnaise dans une étuve porté à 40°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de Humidité, Extrait sec, potentiel hydrogène, indice de réfraction, indice de peroxyde, activité d'eau, acidité, viscosité, diamètre de gouttelette (observée sous microscope optique).

VII. Etude statistique

Pour chaque test, trois essais ont été réalisés. L'étude statistique consiste en une analyse de la variance (**ANOVA**) suivie du test de « Newman-Keuls » à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5 Fr. Le degré de signification des données est estimé à la probabilité $p < 0,05$. Les coefficients de corrélation sont obtenus par l'analyse de régression linéaire à travers le coefficient de Pearson à la probabilité $p < 0,05$. L'analyse de la composante principale (ACP) ainsi que la classification ascendante hiérarchique (CAH) sont réalisées avec le logiciel R (**R Core Team 2016**).

Chapitre III
Résultats et discussion

I. Extraction d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon*

I.1. Le rendement

L'extraction par hydrodistillation du zeste frais (écorce) de citron étudiée a fourni une huile essentielle d'aspect huileux, ayant une coloration jaune claire avec de fortes et persistantes odeurs de fraîche de citron. Le rendement d'extraction calculé est de l'ordre de 1,13%, en fonction de la matière végétale fraîche.

Notre résultat en matière de rendement est supérieur aux rendements édités par **Blanco Tirado et al. (1995)** qui valent respectivement 0,19% et 0,7%, mais il est inférieur aux rendements obtenus par **Bourgou et al. (2012)**, **Hamdan et al. (2013)** et par **Himed (2011)** qui sont respectivement de l'ordre de 1.30%, 2% et 2,18%.

Cette différence de rendement est peut être due à plusieurs facteurs tels que la période de la récolte, les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraîcheur), la saison, la génétique de la plante et la méthode d'extraction utilisée (**Djenane, 2015**). Le degré de maturation du fruit influe remarquablement le rendement de l'huile essentielle. **Bourgou et al. (2012)** ont constaté que le rendement en HE du citron augmente au début puis diminue vers la fin de la maturation. D'après **Himed (2011)**, le mode d'extraction a un impact sur le rendement d'extraction des huiles essentielles.

I.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée par le test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.

I.2.1. Test de piégeage de radical DPPH

Les solutions préparées en mélangeant le DPPH avec l'huile essentielle à différentes concentrations sont incubées pendant 30min, la couleur violette vire vers le jaune résultant d'une activité antioxydante. Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH sont résumés dans la figure suivante :

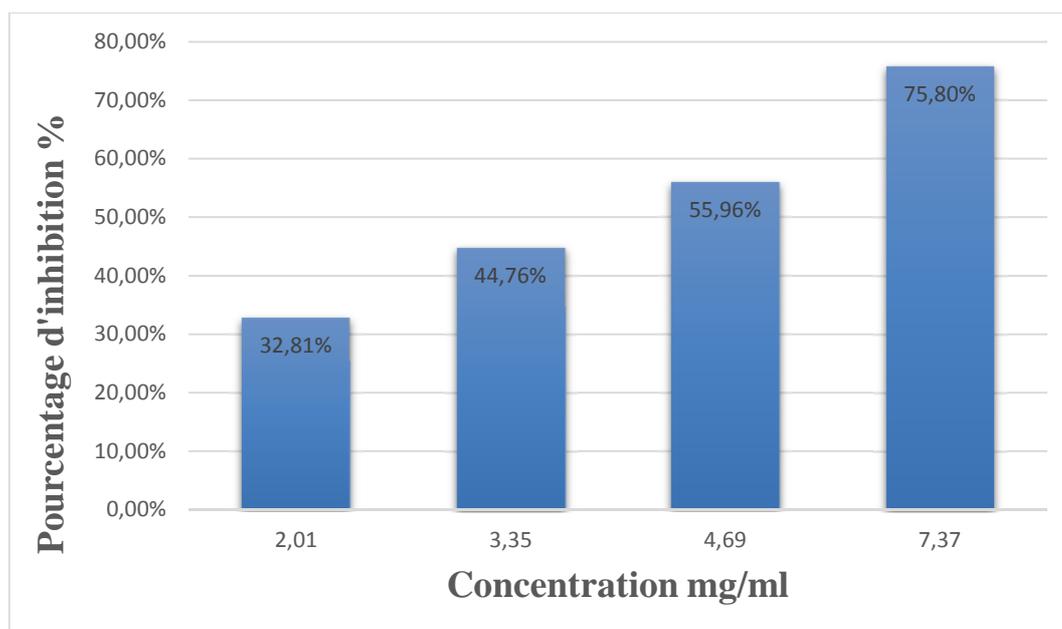


Figure 11 : Activité de piégeage du radical DPPH de l'HE de l'écorce de citron.

L'évaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* a montré une forte activité de piégeage des radicaux avec une valeur d'IC₅₀ = 4,06mg /ml.

La valeur IC₅₀ de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de citron obtenue est comparée avec les travaux de **Golmakani et Moayyedi. (2015)** qui a trouvé une activité inhibitrice d'IC₅₀= 44,06 mg/ml, une autre étude de **Hamdan et al. (2013)** a trouvé une valeur d'IC₅₀ = 26,66 ±2,07 mg/ml supérieure à nos résultats avec une activité plus faible.

D'autre part, ces résultats sont complètement différents des résultats de **Loizzo et al. (2016)** où ils ont trouvé une valeur d'IC₅₀ = 1,17 mg/ml inférieure a nos résultats avec une activité antioxydante plus importante.

L'activité antioxydante de l'HE testée est probablement liée aux composants majoritaires qui sont principalement les monoterpènes notamment le D-limonène, le β-pinène et le γ-terpinène (**Misharina et Samusenko, 2008**). **Campêlo et al. (2011)** ont montré que l'HE du citron est constitué de 99% de D-limonène. Selon **Tang et al. (2001)**, le β-pinène et le limonène présentent des propriétés antioxydantes importantes ; ils ont minimisé le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyle.

En outre, **Misharina et al. (2011)** ont trouvé que l'activité antioxydante des huiles essentielles d'écorces de citron dépend de leur composition et de leur concentration.

Le résultat obtenu a montré que l'HE de citron possède un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus important. Ces résultats nous permettent de déduire que l'échantillon d'huile essentielle testé a une capacité de neutraliser les radicaux libres en leur donnant un atome d'hydrogène. Selon **Leong et Shui (2002)**, tout composé ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres DPPH, est considéré comme étant un excellent antioxydant (**Ben Hsouna et al., 2017**).

II.1. Modélisation de l'extraction des composés phénoliques

L'étude de l'influence des trois paramètres opératoires, le temps d'extraction (X_1), la concentration du solvant (X_2) et la masse de l'échantillon (X_3) sur l'extraction des composés phénoliques a été modalisée par un plan d'expérience CCD. Les valeurs ainsi obtenues sont regroupées dans la matrice présentée sur le tableau (IX).

Ce plan est composé des huit essais du plan factoriel (essais 1 à 8) et les trois (3) essais réalisés au centre du domaine (essais 9,10 et 11) et enfin les six essais du plan en étoile (essai 12 à 17).

Tableau IX : Valeurs expérimentales et prédites de l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des écorces de citron.

Essai N°	Paramètres			CP	
				Mg équivalent d'acide gallique/100 g MS	
	Temps (S)	% du Solvant	Poudre (g/L)	Réponse	Réponse
Mesurée				Prédite	
1	40	30	0,2	1734	1589
2	80	30	0,2	1836	1792
3	40	70	0,2	1759	1646
4	80	70	0,2	1976	1792
5	40	30	0,4	1836	1935
6	80	30	0,4	2046	2074
7	40	70	0,4	1994	1952
8	80	70	0,4	1975	2034
9	60	50	0,3	2057	2059
10	60	50	0,3	1996	2059
11	60	50	0,3	2040	2059
12	20	50	0,3	1940	1996
13	100	50	0,3	2254	2281
14	60	10	0,3	1679	1666
15	60	90	0,3	1587	1683
16	60	50	0,1	1042	1241
17	60	50	0,5	1945	1829

Les résultats montrent que la teneur en Composés phénoliques totaux des extraits de citron est comprise entre 1042 et 2254 mg EAG/100g MS. Ces résultats sont très proches des valeurs prédites avec 1241 et 2281 mg EAG/100g MS.

Les coefficients du modèle de seconde degré (les effets linéaires, d'interactions et quadratiques) sont au nombre de 10, ces valeurs sont regroupées dans le tableau X.

Tableau X: Valeurs estimées des coefficients du model (en unités codées).

Citron					
Terme	Coef		SE coef	T	P
Constante	2059,1	b_0	82,4	25,00	0,000
Temps	142,2	b_1	74,7	1,91	0,098
Solvant	8,5	b_2	74,7	0,11	0,913
Poudre	294,0	b_3	74,7	3,94	0,006
Temps*temps	80	b_1^2	136	0,59	0,574
Solvant*solvant	-384	b_2^2	136	-2,83	0,025
Poudre*poudre	-523	b_3^2	136	-3,86	0,006
Temps*solvant	-57	b_{12}	211	-0,27	0,795
Temps*poudre	-64	b_{13}	211	-0,30	0,771
Solvant*poudre	-39	b_{23}	211	-0,18	0,859

II.1.1. Vérification de la signification des coefficients par le test de Student

Le test de Student permet de déterminer si parmi les coefficients du modèle, il existe des coefficients non significatifs, lesquels seront éliminés de l'équation de régression car leur influence sur l'extraction des CPT est négligeable.

Pour chaque coefficient, la comparaison de la valeur calculée du test de Student avec la valeur tabulée (ou en se basant sur la valeur de P) permet de vérifier sa signification.

Seuls les coefficients ayant une valeur de P inférieur à 0.05 peuvent être considérés avoir une influence sur la réponse.

D'après les résultats du tableau X, on remarque que les coefficients significatifs sont b_0 , b_3 , b_2^2 et b_3^2 .

Les coefficients non significatifs ($P > 0,05$) sont exclus de l'équation de régression du model, qui sous réserve de validité, s'écrit :

$$\bar{Y} = 2059,1 + 294X_3 - 384X_2^2 - 523X_3^2 \dots\dots\dots(1)$$

D'après le model obtenu (équation 1), on remarque que le seul facteur opératoire qui a un effet linéaire sur la réponse est la masse de la poudre d'écorce de citron, on note toutefois aucune interaction entre les différents facteurs opératoires considérés.

II.1.2. Analyse de variance (ANOVA)

Les résultats de l'analyse de variance obtenus par logiciel de modélisation sont rassemblés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats de l'analyse de variance (Citron).

Citron					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	985051	109450	4,91	0,024
Effets linear	3	426973	142324	6,38	0,021
Effets Interaction	3	4433	1478	0,07	0,976
Résidus	7	156051	22293		
Lack of fit	5	154069	30814	31,09	0,331
Erreur pure	2	1982	991		
Total	16	1141102			

D'après la valeur P ($>0,05$) (citron) correspondant au test F du lack of Fit (0,331) qui n'est pas significatif (manque d'ajustement), on peut avancer que l'équation du model postulé ne présente pas de biais, c'est à-dire que l'erreur due au modèle est non significative devant l'erreur aléatoire (erreur pure). D'une autre part l'équation du model est adéquate et valide.

II.1.3. Conditions optimales

Les conditions optimales de l'extraction des composés phénoliques à partir d'écorces de citron sont indiquées dans le tableau XII.

Les résultats indiquent les optimums obtenus à partir de l'étude préliminaire des paramètres étudiés.

Tableau XII : Conditions optimales de l'extraction des CP obtenues dans l'étude préliminaire

	Les paramètres d'extractions	Les optimums obtenus	Valeurs des teneurs optimal PPT(mg EAG /100gMS)
Citron	Temps (S) % du solvant poudre (g)	100s 65,75% 0,487g	Y prédite =1945,81

II.1.4.Diagramme des résidus

Nous avons également présenté dans la figure (12) les variations des résidus (c'est la différence entre la valeur du rendement expérimental et prédit par le model) en fonction des valeurs prédite du rendement.

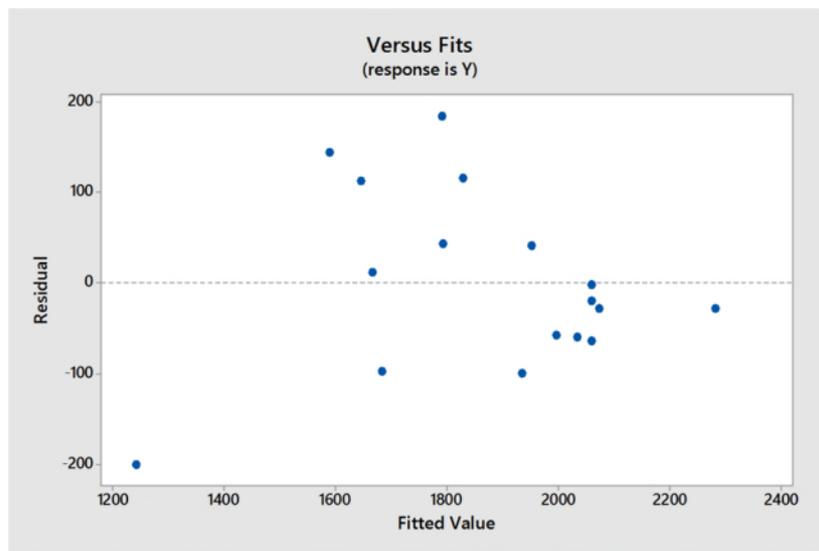


Figure 12 : Diagramme des résidus.

Le diagramme des résidus ci-dessus (figure12) ne laisse apparaître aucune relation entre les valeurs prédites et les résidus, car les points semblent disposés aléatoirement, ce qui traduit l'absence d'informations dans les résidus et que tout est expliqué par le modèle de régression obtenu.

II.1.5. Conditions optimales

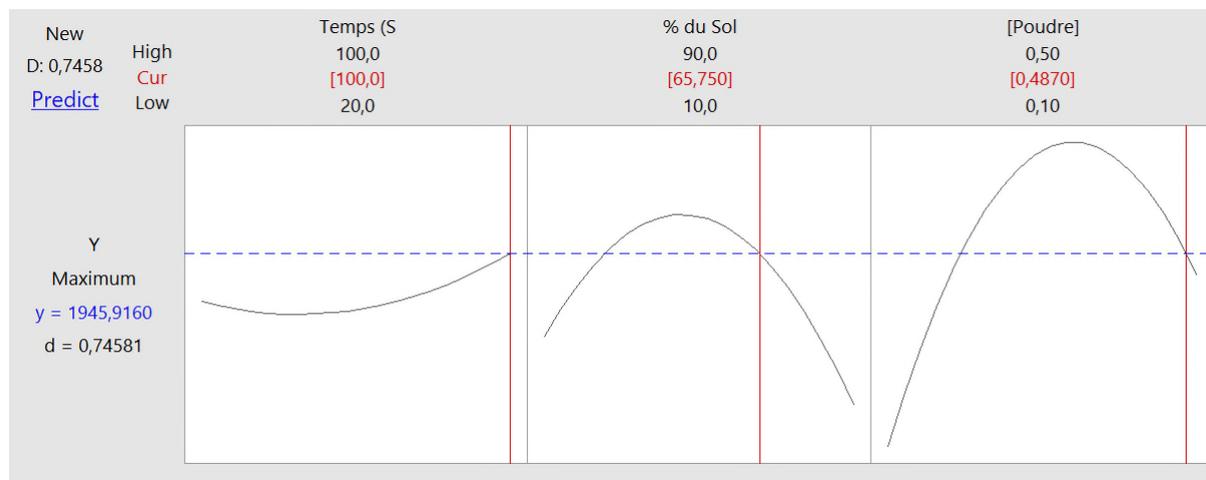


Figure 13 : Valeurs prévues et réelles des facteurs pour un rendement maximal sur l'extraction des composés phénoliques de citron

II.2. Teneur en polyphénols et flavonoïdes de l'extrait de citron

Tableau XIII : Teneur en composés bioactifs (polyphénols totaux et flavonoïdes) de l'extrait de citron.

Teneur en polyphénols totaux	1808,24±55,87 Mg équivalent d'acide gallique/100gMS
Teneur en flavonoïdes	46,73±3,94 Mg équivalent de catéchine/100gMS

II.2.1. Dosage des composés phénoliques

Les citrus sont une source importante de composés bioactifs dont les composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes...) qui peuvent être les principaux contributeurs à l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg d'acide gallique équivalents par gramme d'échantillon (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Annexe I**).

La concentration des polyphénols totaux obtenues est présentée dans **le tableau (XIII)** il est exprimés en mg EAG/100Gms. La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait acétonique montre le résultat qui est de **1808,24±55,87** mg GAE/g MS, correspondant au l'extrait de l'écorce de citron. Selon **Ghasemi et al. (2009)**, la teneur en polyphénols totaux des citrus varie de 104,2 à 223,2 mg d'équivalents d'acide gallique/g sont largement inférieure à nos résultats (**1808,24** mg GAE/g MS).

Toutefois, d'autres études ont montré que les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait d'écorce de citron est non conforme avec nos résultats (**Ghasemi et al., 2009 ; Gerhard, K et Alexnder, H, 2009**) ; ceci peut être du à la nature du solvant utilisé, la méthode d'extraction, la température d'extraction et le stade de maturation pourraient influencer la teneur en composé phénoliques.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué avec la méthode spectrophotométrique qui est une méthode colorimétrique adaptée de (**Zhishen et Al., 1999**).

La concentration des flavonoïdes obtenues est présentées dans **le tableau (XIII)**, il est exprimés en mg CE/ 100g MS.

D'après le tableau (14), nous avons observé que la teneur en flavonoïde dans l'extrait de citrus est de (46,73 ±3,94 mg CE/ 100g MS) est supérieure à celle trouvée par **OMOBA et al., 2015** et **ESSADIK et al., 2015** qui sont respectivement de 3,30 ± 0,30 mg CE/g MS et 1,43 ± 0,201 mg CE/g MS, et elle est inférieure à celle trouvée par **SELMİ et al., 2017** qui est de 87,48±1,59 mg CE/g MS.

D'après **Lu et al., (2006)** et **Vanamala et al., (2006)**, et **Klimczak et al., (2007)** la variabilité des teneurs en flavonoïdes des citrus est influencée par plusieurs facteurs dont l'origine génétique, le degré de maturation, le mode de conservation, la méthode d'extraction et la nature du solvant utilisé.

III.1. Evaluation de l'activité antioxydante

III.1.1. Evaluation de pouvoir anti radicalaire par le DPPH

Le pouvoir antioxydant de nos différents extraits a été aussi estimé avec la méthode de DPPH. C'est la méthode la plus populaire pour le dépistage de l'activité antiradicalaire d'un composé unique ou d'un mélange de composés. Cette méthode est considérée, d'un point de vue méthodologique, comme l'une des plus faciles, plus précise et productive de l'activité antioxydante de l'extrait de citron (**Pereira Nunes et Al, 2012**).

Les valeurs présentées selon la **figure(14)**; montrent le pouvoir réducteur de l'extrait de citron a différents concentrations.

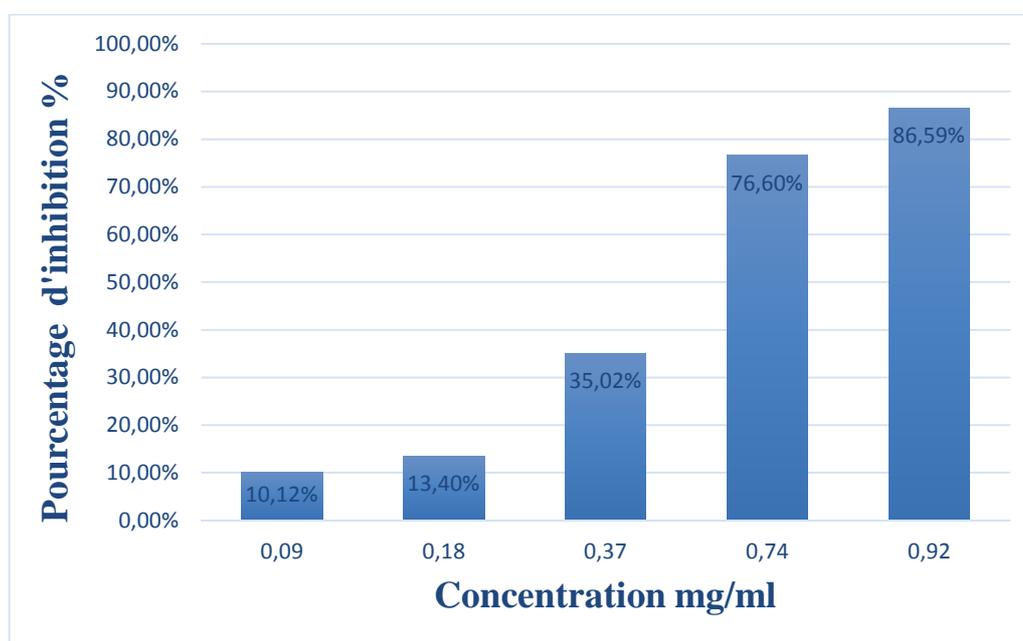


Figure 14: Evaluation de pouvoir antiradicalaire DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de *Citrus limon*.

L'activité antioxydante évaluée pour l'extrait de citrus est exprimée en IC50; c'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% de radical libre (DPPH), plus L'IC50 est faible plus l'extrait est avec un potentiel antioxydant puissant.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait phénolique de l'écorce de *Citrus limon* a montré que cette activité est très importante avec une valeur d'IC50 = 0,49mg /ml.

Nos résultats sont en accord avec ceux déjà publiés qui ont montré que les écorces de citrus représentent la fraction la plus riche en polyphénols, laquelle a révélé un potentiel antioxydant puissant (**Bocco et al., 1998 ; Gorinstein et al., 2001**). Cependant, **Ghasemi et al. (2009)** ont

signalé que l'activité antiradicalaire de l'écorce de citron de valeur d'IC50 de l'ordre de 1,4 mg/ml, qui est significativement supérieure comparé à nos résultats étudiés.

III.2. Cytotoxicité de l'HE et l'extrait phénolique de citron : effet hémolytique

Toute substance biologiquement active est susceptible, à forte ou à faible dose pour une administration prolongée, de produire des effets indésirables, voire nocifs. Les essais de toxicité comme de cytotoxicité accompagnent donc les essais d'activités biologiques.

Dans ce travail, la cytotoxicité est évaluée *in vitro*, en utilisant les érythrocytes comme modèle cellulaire, afin d'évaluer l'effet hémolytique en présence et en absence de nos extraits. Les résultats enregistrés sont reportés sur le **tableau(XIII)**.

Pour des concentrations de **16 et 0,0625mg/ml** de l'extrait phénolique, le taux d'hémolyse provoqué est comparable à celui du témoin négatif (présence de PBS) ils sont respectivement de **5,77%, 5,64% et 5,50%**. On peut conclure en premier lieu, a ces concentrations de l'extrait phénolique, l'effet hémolytique et donc cytotoxique est négligeable.

Pour une concentration de **32mg/ml** de l'extrait phénolique, le taux d'hémolyse provoqué est comparable à celui du témoin négatif (présence de PBS) de **7,27% et 5,50%**. On constat que l'effet hémolytique est donc cytotoxique.

Pour le même extrait, une gamme de concentrations comprise entre **2mg/ml à 0,125mg/ml** a été employée, les taux d'hémolyse est comparable à celui du témoin négatif (présence de PBS) sont compris entre **4,59%, 5,50% et 5,50%**.on constat que, l'effet hémolytique est non toxique.

Pour toutes les concentrations allant de **32mg/ml à 0,0625mg/ml** de l'extrait de l'huile essentielle de citron, le taux d'hémolyse provoqué est comparable à celui du témoin négatif (présence de PBS) ils sont respectivement de **-0,90%, -0,22% et 5,50%**. On constat aucun effet hémolytique et donc non cytotoxique.

Tableau XIII : Résultat de l'effet hémolytique de l'huile essentielle et l'extrait phénoliques et leurs concentrations.

Les concentrations mg/ml	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Extrait phénoliques	7,27	5,77	5,28	5,29	4,59	4,97	4,93	5,28	5,50	5,64
L'huile essentielle	-0,55	-0,59	-0,90	-0,59	-0,72	-0,73	-0,35	-0,33	-0,28	-0,22

III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique (*citrus limon*)

III.3.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Afin de déterminer l'efficacité de notre extrait, on a procédé à la détermination des CMI. Globalement, les résultats des CMI relatifs à l'extrait actifs ont mis en évidence des niveaux d'activité antibactérienne très variables selon la souche testée.

Bubonja-Sonje et al. (2011) ont distingué différents niveaux d'activité des extraits en se basant sur les concentrations minimales inhibitrices : Forte activité < 0,4 mg/ml, intermédiaire 0,4 ≥ CMI ≥ 0,8mg/ml et faible CMI > 0,8mg/ml

Tableau XV : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait de citron.

Extrait/germe	<i>SARM</i>	<i>S.Typhi</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>E.coli</i>
Extrait de citron	<0.08 +++	>10,66 ---	<0.08 +++	<0.08 +++	>10,66 ---

(+++ Présence de l'activité). (--- absence de l'activité)

L'extrait du Citrus possède des activités vis-à-vis des différentes souches bactériennes avec des CMI allant de 0,08 – 10,66 mg/ml. Les souches les plus sensibles sont les Gram + (*SARMet S.aureus*) et *V. cholerea* tandis que *S.Typhi* et *E.coli* montrent une résistance vis-à-vis des deux extraits. Nos résultats sont supérieurs à ceux de **Fiorentini et al., (2021)** pour les extraits d'écorces de Citrus.

En général, les propriétés antimicrobiennes des composés phénoliques ont été rapportées. Le mécanisme d'action implique l'altération de la perméabilité de la membrane cellulaire qui pourrait entraîner le découplage de la phosphorylation oxydative, l'inhibition du transport actif et la perte des métabolites en raison de la détérioration de la membrane cytoplasmique (**Denyer 1995**). De même, la présence de groupes hydroxyles dans les composés phénoliques peut influencer leur efficacité antimicrobienne en se liant au site actif des enzymes, en formant des liaisons hydrogène avec les enzymes et en modifiant leur métabolisme (Ceylan et Fung 2004).

IV.1. Analyses physico-chimiques

Dans cette partie, nous sommes intéressés à l'analyse physico-chimique de la mayonnaise commerciale (Fleural) et celles fabriquées au laboratoire additionné avec 100 PPM huile essentielle et extrait phénolique du Citrus Limon. Les résultats de ces analyses sont récapitulés dans le **Tableau (XVI)**.

Tableau XVI : Résultats de l'analyse physico-chimique de la mayonnaise fabriquées a base huile essentiel de citron (HEC) et extrait phénolique de citron (EPC) et industriel (mayonnaise industriel témoin)

Unités	M HEC	MEPC	MIT
Humidité (%)	22,5 ^a ±0,3	22,36333333 ^a ±0,035118846	23 ,67 ^b ±0.01
Extrait sec (%)	77 ,5 ^a ±0.03	77,6366667 ^b ±0,035118846	76,33 ^b ±0,9
Activité de l'eau (%)	0,92 ^a ±0	0,92 ^a ±0	0.98 ^b ±0
Potentiel d'hydrogène	3,35333333 ^a ±0,01525252	3,32333333 ^b ±0,02081666	3,3766667 ^b ±0.0152753
Acidité (g)	0,38133333 ^a ±0,002516611	0,38353333 ^a ±0,020120222	0,3885 ^a ±0.0029021
Indice de Peroxyde (meq d'O2/Kg	2 ^a ±0,1	1,38666667 ^b ±0,032145503	3,2 ^c ±0
Viscosité (cp)	121369,667 ^a ±90400,27747	138687,333 ^b ±84,23973725	80813,333 ^b ±1357,69
Refraction	1,4089 ^a ±0	1,4329 ^b ±0	1.437 ^c ±0

Dans la même ligne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$), moyenne \pm écart type ($n=3$)

Les résultats des paramètres physico-chimiques sont conformes aux normes internes de l'unité interne de l'entreprise (tableau XVI). D'après l'étude statistique on constate que le Acidité des trois échantillons (MEHC, MEPC et MIT) ne relève aucune différence significative, or que la différence inclus dans les résultats de humidité, extrait sec, activité d'eau, Ph, indice de peroxyde et viscosité.

On remarque des différences significatives entre les 3 échantillons de mayonnaises pour les résultats indices de peroxyde ce qui indique l'extrait phénolique et huile essentielle en Citrus Limon protège notre huile de l'oxydation. De même avec la viscosité, on enregistre des différences significatives entre le mayonnaise additionner à l'extrait et huile comparant à celle témoin indiquant une meilleure consistance de ses dernières.

Concernant les paramètres humidité et extrait sec la variation des résultats avec la mayonnaise industrielle est probablement due aux conditions de fabrication étant donné que les deux mayonnaises additionnées huile et extrait sont fabriquées à l'échelle laboratoire alors que celle industrielle à l'échelle pilote.

IV.2. Analyse microbiologique

Les résultats de l'analyse microbiologique des trois mayonnaises effectuées au sein de laboratoire d'analyse microbiologique de l'unité Cevital sont représentés dans le **Tableau (XVII)** suivant :

Tableau XVII: Résultats microbiologique des trois mayonnaises.

Les bactéries recherchées	Les produits			Limites microbiologiques (ufc/g)	
	MI	MHEC	MEPC	M	M
Germes aérobies à 30 °C	0	0	0	10 ⁴	10 ⁵
Levures et moisissures	0	0	0	10 ²	10 ³
Escherichia coli	0	0	0	10	10 ²
Staphylocoques à coagulase +	0	0	0	10 ²	10 ³
Salmonella	ABS	ABS	ABS	Absence dans 25 g	

ABS = absence

Les résultats d'analyse obtenus, montrent une absence totale des coliformes fécaux, *salmonelles*, *staphylococcus aureus*, et des germes aérobies et levures et moisissures au niveau des trois mayonnaises étudiées.

IV.3. Teste de vieillissement accéléré

Le processus de vieillissement de nos échantillons HEC ET EPC ET MIT est résumé ou **Tableau (XVIII)** suivant :

Tableau XVIII : Résultats de suivi de test vieillissement des mayonnaises.

	Echantillon	Indice peroxyde (meq d'O2/Kg)
T1=0 jrs	MT t1	3,2 ^b ±0
	M HEC t1	2 ^d ±0,1
	M EPC t1	1.38 ^a ±0,020
T2=10 jrs	MT t2	4 ^d ±0
	M EPC t2	2,66 ^b ±0,61
	MT HEC t2	4,1 ^c ±0,1
T3=20 jrs	MT t3	4.2 ^c ±0.05
	MT EPC t3	18,66 ^f ±0,30
	MT HEC t3	3,9 ^c ±0,7
T4=30 jrs	MT t4	6,46 ^d ±0.30
	MT EPC t4	13,26 ^e ±0,30
	MT HEC t4	6,2333333 ^d ±0,25166115

Après 30 jours d'incubation des trois produits de mayonnaise dans une étuve à 40 °C, en suivant les paramètres physico-chimique et microbiologique chaque 7 jours.

Les résultats obtenus ainsi que étude statistique sont illustrées dans le tableau XVIII Le test de Schaal a été utilisé pour évaluer la stabilité accélérée des mayonnaises, Le tableau montre

les changements de PV obtenus pour les mayonnaises additionnées aux différents extraits de citron et la mayonnaise témoin à l'EDTA pendant la période de stockage (30j).

L'indice de peroxyde évalué au jour 0 est plus élevée chez MT d'une valeur de 3,2 que les deux autres fabriqués (MHEC et MEPC), avec une valeur de (1.38 et 2 mg eq O_2 actif/kg).

Les résultats démontrent la fraîcheur des échantillons; ils n'ont pas subi le phénomène; oxydation. Après une semaine on observe une augmentation significative environ 2,1 : indice de peroxyde de la mayonnaise HEC par rapport aux mayonnaise extrait de citron une faible augmentation remarque par rapport à la mayonnaise fabriquée à base d'extrait phénolique . Cela peut expliquer par le développement de l'oxydation des lipides et la formation de ses produits primaires (**Angelo & Jorge, 2008**).Après les deux autres semaines on remarque que la mayonnaise HEC et celle du témoin augmentent d'une valeur reprochable par contre celle de EPC l'augmentation élevée.

On remarque qu' après (30j) ya une confirmation de notre étude des différences significatives entre les 3 échantillons de mayonnaises par les résultats indices de peroxyde ce qui indique que la mayonnaise fabriquée à base de l'huile essentielle du citron est meilleur par rapport à la mayonnaise fabriquée extrait phénolique du citron est rentrée dans l'oxydation secondaire comparant à celle industrielle (Fleuriel),comme il est indiqué par le teste Schall l'indice peroxyde étudié.

MPEC n'est pas stable par comparaison.

Conclusion Générale

Nous rappelons que l'objectif de cette étude est de valoriser les écorces du citron (*Citrus limon*) par l'utilisation de son huile essentielle et l'extrait phénolique comme antioxydant dans la mayonnaise.

Au cours de cette étude, nous avons pu aboutir aux conclusions suivantes :

Le rendement moyen en huile essentielle du citron obtenu par hydrodistillation est de l'ordre de 1,13%. L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle du citron *in vitro* par les méthodes de réduction du DPPH, a montré que cette huile essentielle possède un pouvoir antioxydant, donc son emploi dans la mayonnaise peut constituer un moyen possible de l'oxydation

Concernant les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes elles sont respectivement de l'ordre **1808,24±55,87** mg GAE/g MS, 46,73 ±3,94 mg CE/ 100g MS.

L'évaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle et de l'extrait phénolique est faite par le test DPPH, a révélé qu'elle possède une activité antioxydante intéressante avec une valeur de d'IC50 de 4,06mg /ml.et 0,49mg /ml respectivement.

L'incorporation de l'huile essentielle et l'extrait phénolique de citron à 100 ppm a exhibé un effet protecteur presque similaire à celui de l'antioxydant de synthèse à 100 ppm. En revanche la substitution de ces extraits a permis d'allonger le temps de peroxydation et donc un effet protecteur supérieur, cela prouve son efficacité contre l'oxydation et permettant ainsi une bonne stabilité des paramètres d'oxydation de la mayonnaise.

En outre, les résultats des analyses microbiologiques obtenus révèlent l'absence de tout germe pathogène ou d'altération, la flore aérobie mésophile, la moisissure et les levures. Il serait donc nécessaire de poursuivre cette étude d'une part pour confirmer ces résultats et les compléter par un suivi plus complet couvrant toute la période de conservation.

La substitution des additifs chimiques (EDTA) par l'extrait phénolique et l'huile essentielle de citron est une approche novatrice qui à été concluante, incitant ainsi à une co-valorisation, dans l'objectif d'élaborer un aliment fonctionnel.

En perspectives afin de finaliser cette étude il est souhaitable de :

- Poursuivre l'étude durant la durée de (1 mois) pour confirmer la stabilité de la mayonnaise (suivi microbiologique) afin de savoir l'efficacité de l'extrait phénolique et de l'huile essentielle sur les germes pathogènes et d'altération), test Schall (Ce test

CONCLUSION GENERALE

rend compte de l'altération des corps gras par oxydation, inconvénient majeur touchant essentiellement les acides gras insaturés (AGI). Les résultats obtenus montrent que la teneur en composés phénoliques totaux des extraits de citron est comprise entre 1042 et 2254 mg EAG/100g MS.

- Réaliser des tests in vivo pour évaluer une éventuelle toxicité ou confirmer leur non toxicité ;
- Appliquer ces extraits à d'autres produits alimentaires ;

Références

Références

- ❖ **Aprotosoie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, **58 (1)**. pp. 46-54
- ❖ **Arditty S., Schmitt V., Giermanska-Kahn J., Leal-Calderon F. (2004).** Materials based on solid-stabilized emulsions. *J. Colloid and Interface Science*, **275(2)**, 659-664. doi:10.1016/j.jcis.2004.03.001
- ❖ **Aruoma, O.I. (2003).** Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mut. Res.*, **9(20)**: 523 - 524.
- ❖ **Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, **99(1)**: 191-203.
- ❖ **Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative structure–activity relationship) models**
- ❖ **Badr .R Al-Deen; B. Al-Oklah and L. Al-Amir,** Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils extracted from citrus fruit peels, National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria, 2012
- ❖ **Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., Hamdi, N. (2017).** Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *In lipids in health and disease* 16:146.
- ❖ **Bisignano G., Cimino F., Saija A. 2011.** Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Group. pp.529-548

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Blanco Tirado, C., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., Martínez, J. R. 1995.** Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 697, p. 513.
- ❖ **Bourgou S., Rahali F. Z., Ourghemmi I., Saidani Tounsi M., 2012.** Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 10 p.
- ❖ **Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J. & Abram, M. 2011.** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821-1827.
- ❖ **Bocco, A., Cuvelier, M.E. Richard, H., Berset, C. (1998).** Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem*, 46(6): 2123-23.
- ❖ **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 2ème Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623p.
- ❖ **Campêlo L.M. L., Almeida A . A. C., Freitas R. L.M., Cerqueira G. S., Sousa G. F., Saldanha G. B., Feitosa C.M., Freitas R. M. 2011.** Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 8 p.
- ❖ **Chanthaphon, S., Chanthachum, S. et Hongpattarakere, T. (2008).** Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 125–131.
- ❖ **Chutia, M., Bhuyan, P.D., Pathak, M.G., Sarma, T.C. et Boruah, P. (2009).** Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 777–780.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Choi H-S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. 2000.** Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, pp. 4156-4161

- ❖ **Chira K., Such J.H., Sancier C., Teissedre L. 2008.** Les polyphénols d'origine naturelle. *Journal of Phytothérapie* , **6**: 78-82.

- ❖ **Del Rio, J.A., Fuster, M. D., Gomez, P., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., ET Ortuno, A. (2004).** Citrus limon : a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food chem*, **84**:457-461.

- ❖ **Denyer SP (1995)** Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int BiodeteriorBiodegrad* **36(3-4)**:227-245

- ❖ **Couderc, V.L., 2001.** Toxicité des huiles essentielles. Thèse de grade Docteur Vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse, 61 p.

- ❖ **Cotelle, N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, **1**: 569-590.

- ❖ **Conner D. E., 1993.** Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. ; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468

- ❖ **Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K. et al., (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*, **61**: 71-76.

- ❖ **Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G. et Micieli, D. (2007).** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6300-6308.

- ❖ **Ceylan E, Fung DYC (2004).** Antimicrobial activity of spices. *J Rapid Meth Auto Micro* **12(1)**:1-55

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Dacosta, Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Paris : Ed Yves Dacosta. **P. 317.**

- ❖ **De Moraes, P.A., Galindo, L.A.I. et Costa, M. (2006).** Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. In experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, **78**, 1720– 1725.

- ❖ **Djenane, D. (2015).** Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*,**4**: 208-228.

- ❖ **Donatien K. (2009).** Enquête Ethnobotanique de six plantes Médicinales Maliennes-Extraction, identification d'alcaloïdes-Garactérisation, quantification de polyphénols: Etude leur activitéantioxydante . Thèse en cotute Ile avec l'UniversitéPaul Verlaine de Metz-UPVM(France), **188P.**

- ❖ **Edeas, M., 2008.** Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, **5(5)**: 264-270.

- ❖ **Ignat, I., Volf, I. and Popa, V.I., 2011.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, **126(4)**: 1821-35.

- ❖ **Eirini Sarrou, Paschalina Chatzopoulou, Kortessa Dimassi-Theriou and Ioannis Therios ,** Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Peel, Flowers and Leaf Oils of *Citrus aurantium* L. Growing in Greece, *MOLECULES* ISSN 1420-3049, 2013

- ❖ **Eristanna, P., Vito, A. L., & Maria, A. G. (2013).** Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. . *Current Organic Chemistry*, 3042-3049.

- ❖ **Essadik F.Z., Haida S., Kribii A., Kribii A.R., Ounine K. et Habsaoui A.(2015).** Antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. var. amara Peel from western of Morocco, identification of volatile compounds of its essential oil by GC-MS and a preliminary study of their antibacterial activity. *International Journal of Innovation and Scientific Research*. **16(2)**: 425-432.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Fabian, F. W., Wetherington, M C. (1950).** Spoilage in salad and French dressing due to yeasts. *Food Res.* **15**, 135-137
- ❖ **Ferial, M., Abou-Salem, Azza A, Abou-Arab. (2008).** Chemical, microbiological and sensory evaluation of mayonnaise prepared from ostrich eggs. *Grasas y Aceites*, **59 (4)**. P. 352-360.
- ❖ **Fisher, K. et Phillips, C. (2008).** Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*.**19**, 156– 164.
- ❖ **Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J.*
- ❖ **Gattuso G., Barre ca D., GargiulliC., Leuzzi., GarstiC. 2007.** Flavonoïdes composition of citrusjuices. *Mole cule* , review Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Unive rsitàdi Messina, Salita Sp e rone 31, I-98166 Messina, Italy ,**12**: 1641-1673.
- ❖ **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007.** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*,**102**, pp. 898-904
- ❖ **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007.** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*,**102**, pp. 898-904
- ❖ **Gerhard, K et Alexander, H. (2009).** Nutritional-Physiological Properties of Citrus Fruit Peel and Seed. *Nutrition Security Forall*.
- ❖ **Ghasemi, K., Ghasemi, Y., and Mohammed, A.E. (2009).** Antioxydant Activity, Phénol and Flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm*, **22 (3)**: 277-281.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Golmakani, M.T. et Moayyedi, M. (2015).** Comparison of heat and mass transfer of different microwave- assisted extraction methods of essential oil from Citrus limon (Lisbon variety) peel. *Food Sci. Nutr*, **3(6)**: 506–518.
- ❖ **Gorinstein, S., Martin-belloso, O., Park, Y.S et al (2001).** Composition of some biochemical characteristics of different citrus fruit. *Food Chem*, **47(3)**: 115-309.
- ❖ **Grysole J. 2005.** La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique : Chapitre 07.* Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162
- ❖ **Guardia., Giam m anco S., DiMajo D., Giam m ancode Mourizio M. 2007.** Flavonoïdes de citron: structure moléculaire activité biologique et propriétés salim e ntaire : 467-468.
- ❖ **Hamdan, D., Ashour, M.L., Mulyaningsih, S., El-Shazly, A. et Wink, M. (2013).** Chemical composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus x limon* L. Burm. f.) and their anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Z. Naturforsch*, **68 c**: 275 – 284.
- ❖ **Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**,(6), pp. 985-990
- ❖ **Hellal Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. **78 p.**
- ❖ **Himed L. 2011.** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine. **65 p**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Himed & Merniz**, «Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon*): encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée», Thèse de doctorat en Sciences, Constantine, Université Frères Mentouri, (2018, 06 25), 111p.
- ❖ **HIMED Louiza, 2018**. Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon*): encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée, thèse de doctorat, Université Frères Mentouri Constantine1.
- ❖ **Jayap rakash a G.K., Patil B.S. 2007**. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit Extracts from citron and blood orange . *Journal of Food Chemistry*, **101** : 410-418.
- ❖ **Jazet Dongmo, P.M., Kuate, J., Ngouana, V., Damesse, F., Sonwa, E.T., Amvan Zollo, P.H. et Menut, C. (2008)**. Comparaison des propriétés anti-radicalaires et anti-inflammatoires des huiles essentielles de *Citrus reticulata* var. Madagascar et *Citrus sinensis* var. Casagrande du Cameroun. *Fruits*, **63**: 201–208.
- ❖ **Jafari, S., Esfahani, S., Fazeli, M.R., Jamalifar, H., Samadi, M. et Najarian-Toosi, A. (2011)**. Antimicrobial activity of lime essential oil against food-borne pathogens isolated from cream-filled cakes and pastries. *International Journal of Biological Chemistry*, **5**, 258–265.
- ❖ **Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y. (1998)**. Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*, **7**: 137-161.
- ❖ **Kanaze F.I., Gabrielic., Kokkalou E., Georgarakis M., Niopasi. 2003**. Simultaneous reverse d-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33** : 243-249.
- ❖ **Kehal, Farida. (2013, 06 27)**. Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche. Constantine, UNIVERSITE CONSTANTINE 1, Algerie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Kim, at. et Adsule, P.G. (2003).** Citrus, Handbook of fruit science and technology. Production, composition, storage and processing. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 39–65
- ❖ **Klim czak I., Male cka M., Szlach ta M., Gliszczynska-Swiglo A. 2007.** Effe ct of storage on th e covte nt of p olyp h e nols; vitam in C and th e antiox idant activity of orange juices. *Journalof Food Com position and Analysis*, **20** : 313-322.
- ❖ **Ladoh Yemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., LentaNdjakou, B., Mpondo Mpondo, E., Yinyang, J. et Wansi, J.D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *J.Appl Biosci*, **84**:7636– 7643.
- ❖ **Lakhdar, L. (2015).** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro. Thèse de doctorat. Université Mohammed V de Rebat. **164p.**
- ❖ **Leong, L.P., and Shui, G. (2002)** An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry*, 69-75.
- ❖ **Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Di Sanzo, G., Verardi, A., Lopresto, C.G., Pugliese, A., Menichini, F., Balducchi, R. et Calabro, V. (2016).** Chemical profile and antioxidant properties of extracts and essential oils from *Citrus x limon* (L.) Burm. cv. Femminello Comune. *Chem. Biodiversity*, **13**: 571 – 581.
- ❖ **LuY ., Z h ang C., Buch e liP., W eiD. 2006.** Citrus Flavonoïdsin Fruit and TraditionalCh inese Me dicinalFood Ingre die ntsin Ch ina. *Journalof Plant FoodsforHum an Nutrition* **61** : 57-6
- ❖ **Manach, C., Scalbert, A., Morand C., Remesy C., Amenez L. (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Manthey J.A., Guthrie N., Grohmann K. 2001.** Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation. *Current Medicinal Chemistry*. **8(2)** : 135-153.
- ❖ **Mohan, C., (2006).** Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD, San Diego, California, Calbiochem, **p:22**.
- ❖ **Misharina T.A., Samusenko A.L. 2008.** Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* **44(4)**, pp. 482–6
- ❖ **Misharina, T.A., Terenina, M.B., Krikunova, N.I. et Kalinichenko, M.A. (2011).** The influence of the composition of essential lemon oils on their antioxidant properties and the stability of the components. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **37**, 883– 887.
- ❖ **NCCLS, 2006.** National Committee for Clinical Laboratory Standards, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard, 5th ed., NCCLS document M7-A5. NCCLS, Pennsylvania, USA
- ❖ **Ndoye Foe et al. BMC Complementary and Alternative Medicine** 1 Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon
- ❖ **Ndoye Foe, F.M.C., Kemegni Tchinnang, T.F., Nyegue, A.M., Abdou, J-P., Gbaweng Yaya, A.J., Tchinda, A.T., Oyono Essame, J-L. et Etoa F-X. (2016).** Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**:117.
- ❖ **Omoba O.S., Obafaye R.O., Salawu S.O., Bolognon A.A. et Athayde M.L. (2015).** HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*. **4**: 498-512.
- ❖ **Özcan, M.M., Ghafour, K., Al Juhaimi, F., Uslu, N., Babiker, E.E., Mohamed Ahmed, I.A., Almusallam, I.A., 2021.** Influence of drying techniques on bioactive

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

properties, phenolic compounds and fatty acid compositions of dried lemon and orange peel powders. *Journal of food science and technology* **58**, 147–158.

- ❖ **Pingot A. 1998.** Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp. 230-236
- ❖ **Pucci, Laura, Triscornia, Stefano, Lucchesi, Daniela, et al.** Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients. *Clinical chemistry*, 2007, vol. **53**, no 3, p. 480-488.
- ❖ **Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O.I. (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**: 75-87
- ❖ **Ribereau–Gayon P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. In: Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. 1–40.
- ❖ **Robert A. et Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, **522 p.**
- ❖ **Saarela, A. M., Paula, H., Sinikka, M., Atte, V. W. (2010).** Elintarvikeprosessit. 3. uudistettu painos. Savonia-ammattikorkeakoulun julkaisusarja. D5/9/2010. Kuopio: Savonia- ammattikorkeakoulu.
- ❖ **Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire 17, rue Auguste Frot 77590 Bois le roi imprimé en France que n°46090 Me rcués N°805(I).PP. 2-3.
- ❖ **Sahin, F., Güllüce, M., Diferencia, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou., M. et al. (2004).** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, **15**, 549–557.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ **Shen, R., Luo S., Dong J. (2011).** Application of oat dextrin for fat substitute in mayonnaise. *Food Chem.* 126, 65-71. Singleton, V.L and Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine and their significance. *Advances in Food research.*
- ❖ **Solene, J. (2012).** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. **142p.**
- ❖ **Swingle, W.T. (1967).** The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. (eds.) *The Citrus industry.* 2eme edition. Berkeley: University of California. 190-430.
- ❖ **Tang S., Shcchan D., Buckley D.J., Morrsey P.A., Kerry J.P. 2001.** Anti-oxidant activity of added tea catechines on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, **36**, pp. 685- 692
- ❖ **Tumbas Vesna, T., Cetkovic Gordana, S., Djilas Sonja, M., Canadanovic-Brunet Jasna, M., Vulic, K., Zeljko, K.J., Skerget, M. (2010).** Antioxydant activity of mandarin (citrus reticulata) peel. *BIBLID*, **40**: 195-203.
- ❖ **Vanam ala J., Re ddivariL., Y oo K.S., Pike L.M., PatilB.S. 2006.** Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grape fruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19** : 157-166.
- ❖ **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*, **160**: 1-40.
- ❖ **Ventrella, M.C. et Marinho, C.R. (2008).** Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. *Revista Brasil. Bot*, **31(3)** : 457-467.
- ❖ **Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y. Fernandez-Lopez, J. Perez-Alvarez, J. (2008).** Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, *Food Control*, **19**, 1130–1138.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., Hsu, H.-W., 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. Food chemistry **106**, 277–284

Références par sites web:

- ❖ Anonyme. (2007). La mayonnaise Une sauce hypocrite
<http://www2.agroparistech.fr/Lamayonnaise-Une-sauce-hypocrite.htm>
- ❖ Anonyme. (2012). Mayonnaise biologique kivinat.
[www.markal.fr/media/Mayonnaisesqueeze- KIVINAT. pdf](http://www.markal.fr/media/Mayonnaisesqueeze-KIVINAT.pdf). Arditty S., Schmitt V., Giermanska-Kahn J., Leal-Calderon F. (2004). Materials based on solid-stabilized emulsions. J. Colloid and Interface Science, 275(2), 659-664. doi:10.1016/j.jcis.2004.03.001
- ❖ Arnold A. (2014/2016). Fiche pédagogique «Mayonnaise».
https://www.enil.fr/images/doc/pralim/11.Fiche_p%C3%A9dagogique_Mayonnaise.pdf
- ❖ ASIEDU, J. (1991). La transformation des produits agricoles en zone tropicale: approche technologique: KARTHALA Editions. AVRAMESCU, A. M., BAZZARO, F., MAHDJOUR, M., SAGOT, J. C., SIMION I. (2014). Elaboration d'une approche d'analyse sensorielle tactile des matériaux biosources, U.P.B. Sci. Bull., Séries B, Vol. 76, Iss. 1, ISSN 1454 – 2331, p.236 – 245.
- ❖ Boit,N.(2006)'Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des oranges d'un arbre forstier
- ❖ EISSN : 1684-5315 Jazet Dongmo et al., 2008
- ❖ GASTRONOMAYO. (1901). La Mayonnaise. <http://gastronomayo.centerblog.net/>
- ❖ GAUTIER, B., LAURENT, B., OHIER, M., TOUSSAI, N. (2012). Une stratégie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

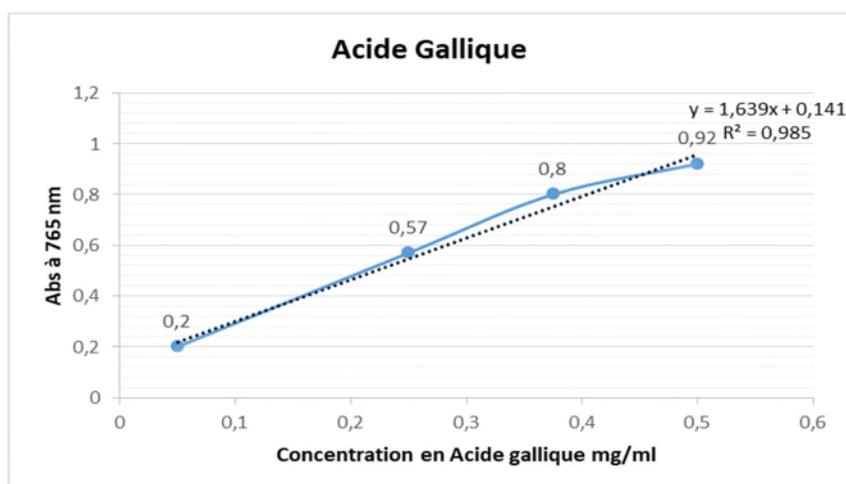
publique pour les industries alimentaires. Rapport conseil général de l'alimentation de l'agriculture et des espaces Ruraux. France. P4.

- ❖ httpAnonyme. (2006). Code de bonnes pratiques mayonnaise. <https://www.eacce.org.ma/.../CodeBonnPratiques-Mayonnaise-Moutarde-TomatoKetc>
<s://www.planetoscope.com/fruits-legumes/1491-production-mondiale-de-citrons-et-limes.html>
- ❖ <https://www.atlasbig.com/fr-fr/pays-par-production-de-citron>
- ❖ ITAB.,SITEWEB.http://www.itab.asso.fr/downloads/colloque-peuv/9_moisseeff.pdf
Consulté le 10.06.2019
- ❖ ISO 8851.02.2004
- ❖ ISO 3727 :1977
- ❖ ISO 3594 :1976
- ❖ GOUPY J., CREIGHTON, L. (2002). Introduction au plans d'expériences 3eme L'usine nouvelle, page 304
- ❖ Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 2022; 51(1): 87-9
- ❖ Journal Officiel de la République Algérienne [10] (JORA N° 35 du 1998)
- ❖ J J. °N°6 « Arrête 27/06/2011 J.O N° 39 de 2 Juillet 2017 JACOLOT, B. (1997). Intérêt nutritionnel de la consommation de l'huile d'olive. OCL, 1997, Vol 4, N° 5, p.373-4, Septembre- Octobre 1997. JACQUES E., XAVIER PAGES-XATART-PARES, CHRISTIAN, A., ODILE, M.
- ❖ KONES.(2001).Fabrication artisanale de la mayonnaise.
pmb.sicac.org/opac_css/doc_num.php?explnum_id=474

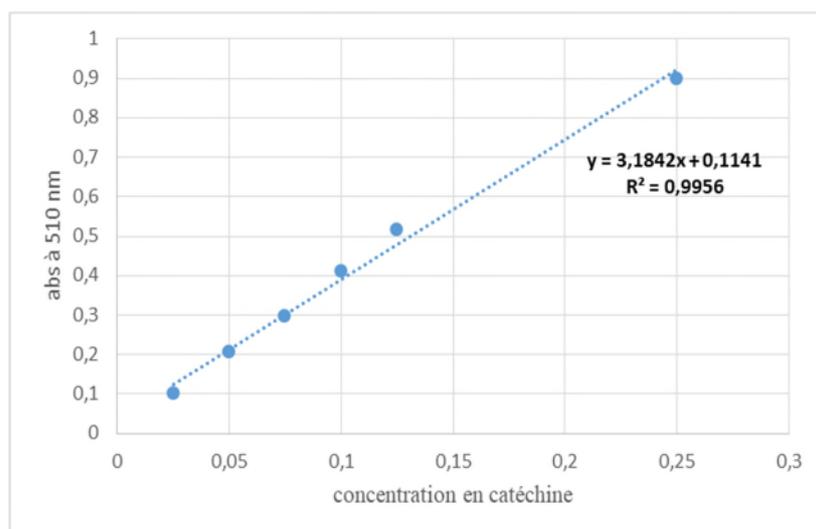
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ❖ Mutin Georges. L'Algérie et ses agrumes. In: Revue de géographie de Lyon, vol. 44, n°1, 1969. pp. 5-36,doi : <https://doi.org/10.3406/geoca.1969.2637>
https://www.persee.fr/doc/geoca_0035-113x_1969_num_44_1_263
- ❖ Published online January 312022 <https://doi.org/10.3746/jkfn.2022.51.1.87> Copyright © The Korean Society of Food Science and Nutrition
- ❖ Posté Le : 03/05/2019 Source : azititou.wordpress.com
- ❖ SHEN, R., LUO S., DONG J. (2011). Application of oat dextrin for fat substitute in mayonnaise. Food Chem. 126, 65-71.
- ❖ tablau (<https://agronomie.info/fr/production-des-agrumes-en-algerie/>)(Bellabas, 2009)

Annexe I



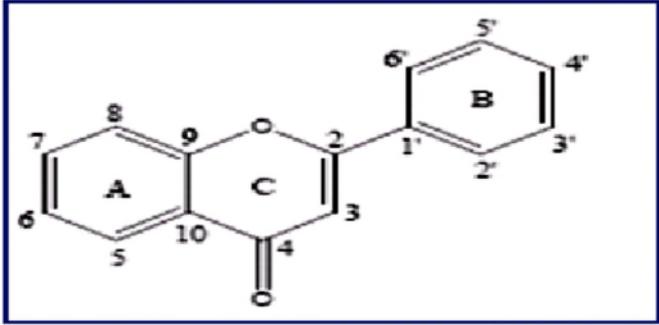
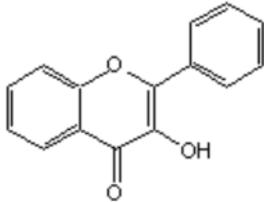
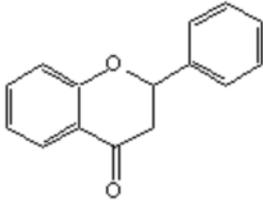
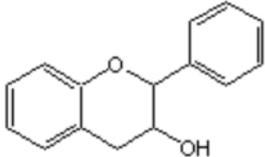
Courbe d'étalonnage (acide gallique) du dosage des polyphénols totaux.

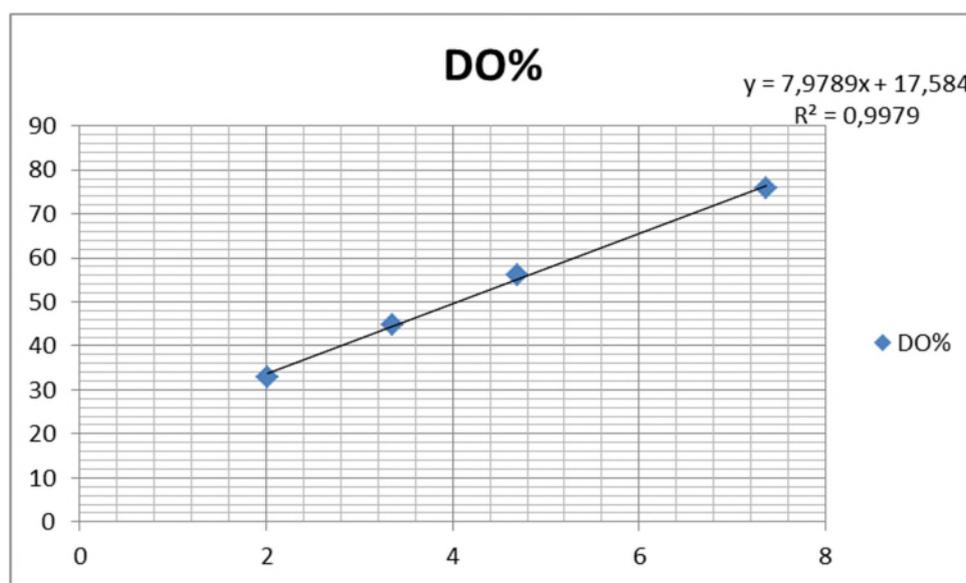
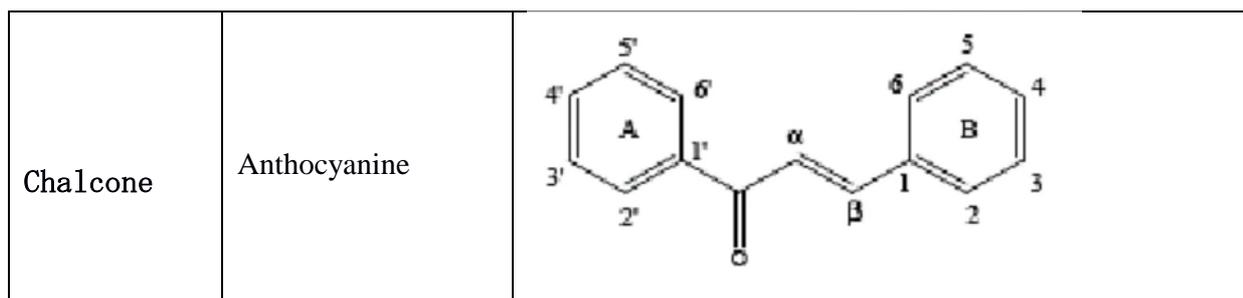


Courbe d'étalonnage (Catéchine) du dosage les flavonoïdes

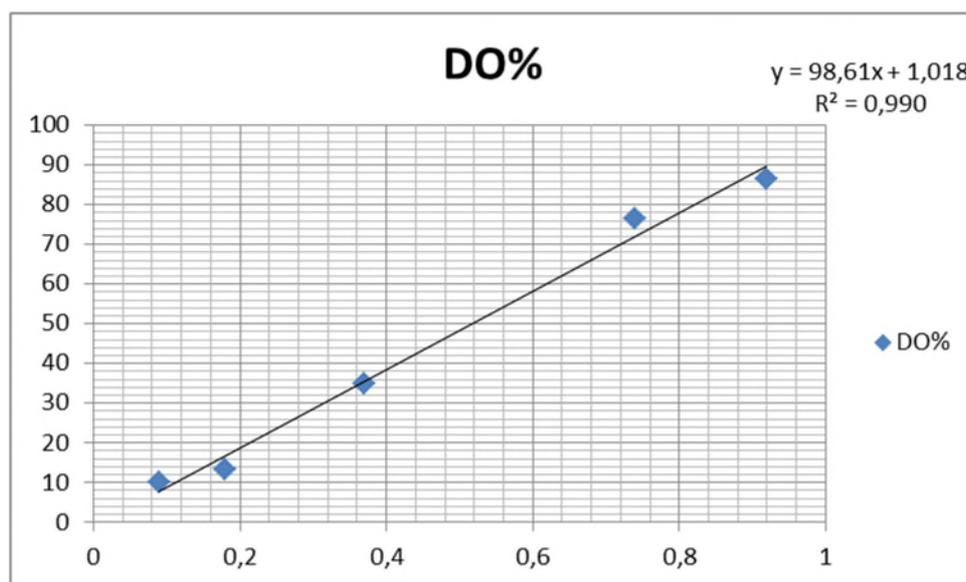
Annexe II

Tableau : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe.

Principaux classes des flavonoïdes	Composés	Structure de base
Flavone	Naringénine Galangine Diosmetine	
Flavonol	Myricétine Quercétine Kaempférol Dihydrokaempférol	
flavanone	Hesperétine Galangine	
flavanol	Catéchine	



Courbe d'étalonnage de réduction du radical DPPH de l'huile essentielle de citron



Courbe d'étalonnage de réduction de du radical DPPH de l'extrait phénolique de citron

Résumé

Cette étude a été conduite dans le but de valoriser les écorces du citron (*Citrus limon*) par l'utilisation de son extrait phénolique et l'huile essentielle comme agent antioxydant naturel dans la mayonnaise «Fleurial». L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation, et l'extrait phénolique par micro-onde. L'activité antioxydante de ces derniers a été étudiée par la méthode de la réduction du radical DPPH• indiquant que l'écorce de *C.limon* a une activité antioxydante plus importante. L'addition de cet extrait a procuré des caractéristiques physico-chimiques à la mayonnaise légèrement différente du témoin.

L'évaluation de la stabilité oxydative réalisée par le test de l'indice de peroxyde et l'acidité, ont montré que la mayonnaise enrichie en composés bioactifs de l'extrait à 100 ppm. Les analyses microbiologiques ont révélé l'absence totale des flores mésophiles, de germes pathogènes, levures et moisissure dans toutes les préparations de mayonnaise.

Mot clés : Huile essentielle, extrait phénolique, antioxydant, Citron.

Abstract

This study was conducted with the aim of valorising the peel of the lemon (*Citrus limon*) by using its phenolic extract and essential oil as a natural antioxidant agent in the mayonnaise "Fleurial". The essential oil was extracted by hydrodistillation, and the phenolic extract by microwave. The antioxidant activity of the latter was studied by the DPPH-radical reduction method, indicating that *C. limon* bark has a higher antioxidant activity. The addition of this extract provided physicochemical characteristics to the mayonnaise slightly different from the control.

Evaluation of oxidative stability by the peroxide value test and acidity showed that the mayonnaise enriched in bioactive compounds of the extract at 100 ppm. Microbiological analyses revealed the total absence of mesophilic flora, pathogenic germs, yeast and mould in all mayonnaise preparations.

Keywords: Essential oil, phenolic extract, antioxidant, Citron.