

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département de Biologie Physico-Chimique.

Filière: Sciences Biologiques.

Option: Pharmacologie Moléculaire.



Réf:

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

MASTER

Thème

**Evaluation *in vitro* des activités antioxydante et anti
inflammatoire des huiles essentielles de l'écorce de *Citrus*
*limon.***

Présenté par:
OUALI Thilili & SADOUNI Yamina
Soutenu le: **19 Juin 2017**

Devant le jury composé de:

M^{me} Ait Ali. D.

M^r Basli. A.K.

M^{me} Metrouh-Amir. H.

MCB

MCA

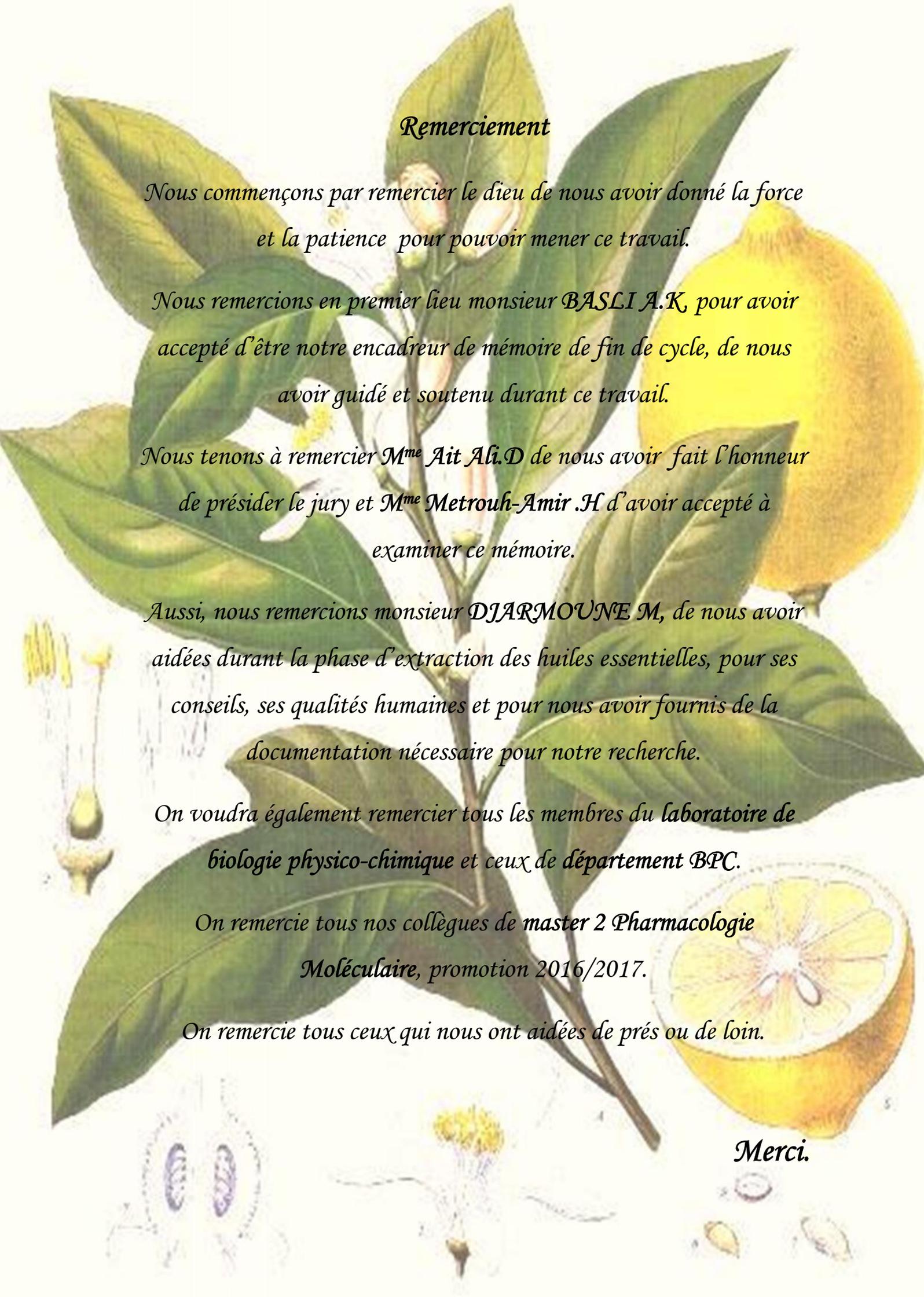
MCB

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire: 2016 / 2017.



Remerciement

Nous commençons par remercier le dieu de nous avoir donné la force et la patience pour pouvoir mener ce travail.

Nous remercions en premier lieu monsieur BASLI A.K, pour avoir accepté d'être notre encadreur de mémoire de fin de cycle, de nous avoir guidé et soutenu durant ce travail.

Nous tenons à remercier M^{me} Ait Ali.D de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et M^{me} Metrouh-Amir .H d'avoir accepté à examiner ce mémoire.

Aussi, nous remercions monsieur DJARMOUNE M, de nous avoir aidées durant la phase d'extraction des huiles essentielles, pour ses conseils, ses qualités humaines et pour nous avoir fournis de la documentation nécessaire pour notre recherche.

On voudra également remercier tous les membres du laboratoire de biologie physico-chimique et ceux de département BPC.

On remercie tous nos collègues de master 2 Pharmacologie Moléculaire, promotion 2016/2017.

On remercie tous ceux qui nous ont aidées de près ou de loin.

Merci.

Dédicaces

*Avant tous je remercie le dieu qui m'a donné la volonté, le courage et la patience
durant mes 5 ans d'études.*

*Aux être les plus chères aux monde « mes parent » AMAR et HASSINA, pour
tous les sacrifices que vous avez consentis à mon égard afin que je puisse mener à
bien mes études. Vous avez m'inculquée le sens du devoir, de la responsabilité, de
la dignité, de l'honneur et de l'humilité. Je ne pourrais jamais vous rendre ce que
vous avez fait pour moi, mais j'espère seulement que vous trouverez dans ce
modeste travail, un réel motif de satisfaction.*

*A mon fiancé et mon futur mari RAMDANI TOUFIK, avec qui je continuerai
mon chemin dans la vie avec plein de bonheur et de satisfaction, inchallah. Merci
pour ta disponibilité toujours à ma coté et tous ce que tu as fait pour moi. Je
t'aime.*

*A mes chères sœurs ASSIA et THIZIRI et mon frère LOUNES, vous êtes toute
ma vie, je vous aime.*

*A mes grands parents : AICHA et LHADJ SAADI, que vos âmes dorent en paix
vous resterez toujours dans ma mémoire, et MOHAND et DJAMILA, je vous
souhaite une longue vie pleine de santé.*

A mes oncles maternels : SMAIL et FAHIM, et mon oncle paternel HAMOU.

*A mes tantes maternelles : GHALIA, SAFIA, ANISSA et FASIA, et mes
tantes paternelles : HADDA et BAKHI.*

A toute la famille OUALI et mes proches.

A toutes mes chères amies : HAKIMA, LINDA, NOUZHA et LYDIA.

Thilelli.

DEDICACE

Je tiens de dédire ce modeste travail :

A mes parents: A ma chère mère :

Je ne saurais en quelques phrases trouver les mots justes pour exprimer tous les efforts et les sacrifices que tu as consenti pour nous, tes enfants afin de nous encourager d'aller toujours vers l'avant.

A mon père :

Qui m'a soutenu durant ma formation, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

A mon mari :

Qui était toujours avec moi dans mes beau et mauvaises moments, qui m'a aidé sans plainte, merci beaucoup à toi TAREK et toutes la famille KHALDI.

Ames grands parents : « Que Dieu les gardes pour moi ».

A mes chères sœurs : IMENE, MESSOUDA et son époux MOHAMMED et mon petit prince IBRAHIME et ses sœurs MERIEM et NESSRINE.

Ames chères frères: YACINE, FERHAT, ABD-ELGHAFFOUR.

A mes tontes: RAZIKA, WAHIBA et ses garçons, HAFIDA et ses filles.

A mes chères amie: Tita, Linda, Nozha, Lydia, Sousou et Assoum et tous mes autres amies

YAMINA

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

CHAPITRE I: Synthèse Bibliographique

I-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....2

I.1-Généralités sur les agrumes.....2

I.1.1-Histoire des agrumes.....2

I.1.2-Caractères généraux des *Citrus*.....2

I.2-Espèce *Citrus limon*.....3

I.2.1-Taxonomie.....4

I.2.2- Composition chimique de citron.....4

I.2.3-Usage de citron.....5

I.3-Huiles essentielles.....5

I.3.1-Définition.....5

I.3.2- Composition chimique des huiles essentielles.....6

I.3.2.1- Huiles essentielles des agrumes.....6

I.3.2.2-Huiles essentielles de citron.....8

I.3.3-Biosynthèse aromatique.....8

I.3.4-Toxicité des huiles essentielles.....9

I.4-Stress oxydatif et antioxydants.....10

I.4.1-Stress oxydatif.....10

I.4.2-Antioxydants.....	11
I.4.3-Activité antioxydante des huiles essentielles.....	11
I.5-Inflammation et activité anti inflammatoire des substances naturelles.....	12
I.5.1-Généralité sur l'inflammation.....	12
I.5.2-Activité anti inflammatoire des substances naturelles.....	13
I.5.2.1-Mode d'action des huiles essentielles anti inflammatoire.....	13

CHAPITRE II : Matériel et Méthodes

II-MATERIEL ET METHODES.....	15
II.1-Matériel.....	15
II.1.1-Matériel végétal.....	15
II.2-Méthodes.....	15
II.2.1- Extraction des huiles essentielles.....	15
II.2.1.1- Hydrodistillation.....	15
II.2.1.2-Taux d'extraction.....	17
II.2.2-Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i>	17
II.2.2.1-Activité scavenger du DPPH.....	18
II.2.2.2-Pouvoir réducteur	20
II.2.3- Evaluation de l'activité anti inflammatoire des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i>	21
II.2.3.1- Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine).....	21
II.2.3.2-Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)..	22
II.3-Analyse	24

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

III-RESULTATS ET DISCUSSION.....	25
III.1-Extraction des huiles essentielles de l'écorce de <i>Citrus limon</i>	25
III.2- Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i>	26
III.2.1-Activité anti radicalaire par DPPH.....	26
III.2.2-Evaluation de pouvoir réducteur.....	27
III.3-Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	29
III.3.1-Evaluation de l'activité protectrice contre la dénaturation d'albumine.....	29
III.3.2-Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire).....	30
Conclusion et perspectives.....	32
Références bibliographiques.....	33
Annexes	

A. Ascorbique: Acide Ascorbique.

Abs C: absorbance de contrôle.

Abs T: absorbance de test.

AINS: anti-inflammatoire non stéroïdien.

C. limon: *Citrus limon*.

COX2: cyclo-oxygénase 2.

DIC: Diclofénac de sodium.

DL₅₀: la dose létale médiane.

DPPH: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle.

EAR: Espèces Azotées Réactives.

EOR: Espèces Oxygénées Réactives.

GC-MS: la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (en anglais: Gas chromatography-mass spectrometry).

HD: hydrodistillation.

HRBC: globules rouges humains (en anglais, human red blood cells).

HSA: albumine de sérum humain (en anglais, Human serum albumin).

IC₅₀: concentration de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50%.

IPP: isopentényl pyrophosphate.

NF-kappaB: nuclear factor-kappa B.

PE: acide phosphoénolpyruvique (phosphoenolpyruvate).

PH: le potentiel hydrogène.

P_{HE}: poids d'HE extraite (g).

P_{mv}: poids de matériel végétal utilisé.

LISTE DES ABREVIATIONS

RBC: les globules rouges, en anglais (red blood cells).

Rpm: rotation par minute.

TNF : le facteur de nécrose tumorale .

5-LOX: 5-lipoxygénase.

3D: 3 dimensions.

[C]: concentration.

Numéro de figure	Titre	page
1	Coupe transversale de fruit d'un <i>Citrus</i> .	3
2	Les écorces fraîches de citron.	15
3	L'hydrodistillation.	16
4	Dispositif d'hydrodistillation.	17
5	Réaction du DPPH avec un antioxydant.	18
6	Protocole de réduction de radical DPPH.	19
7	Protocole de pouvoir réducteur.	20
8	Les phénomènes d'agrégation.	21
9	Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine.	22
10	Protocole de stabilisation membranaire.	24
11	Variation de couleur de DPPH vers le jaune en fonction de la concentration d'huile essentielle.	26
12	La réaction de coloration de la solution en présence de réducteur.	28

Numéro de tableau	Titre	Page
I	Composition chimique (%) d'huile essentielle de citron acclimatés en Algérie à partir de parties de peau fraîche identifiées par analyse GC-MS.	8
II	La densité et le rendement en huile essentielle de l'écorce de <i>Citrus limon</i> extraite par la méthode d'hydrodistillation.	25
III	Evaluation de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de l'écorce de <i>Citrus limon</i> .	27
IV	Le pouvoir réducteur d'huile essentielle de <i>Citrus limon</i> et de l'acide ascorbique comme standard.	28
V	Evaluation de l'activité inhibitrice de la dénaturation d'albumine.	30
VI	L'activité anti hémolytique d'huile essentielle de l'écorce de <i>C.limon</i> et de diclofénac de sodium.	31

Introduction

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours pour 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; Ladoh et al., 2014**).

Le recours à la médecine traditionnelle est due à diverses raisons comme par exemple : le coût des plantes médicinales qui est faible par rapport aux médicaments conventionnels, la disponibilité de ces plantes surtout dans les régions les plus éloignées et au sein des populations les moins favorisées, les effets secondaires indésirables des médicaments, l'envie de consommer « bio » et ces effets bénéfiques sur la santé, l'existence des maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace (**Zenasni, 2014**).

Parmi ces plantes, on a le genre *Citrus* appartenant à la famille des *Rutaceae*, est l'une des cultures les plus largement cultivées dans le monde surtout dans les climats tropicaux et les régions tempérés. Elles sont très riches en composés actifs (polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, les huiles essentielles...etc) (**Chutia et al., 2009; Kamal et al., 2011**).

Actuellement, les huiles essentielles des plantes aromatiques possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés médicinales: antibactériennes, anti inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, anti-tumoral, insecticides, insectifuges...etc, ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique tels que la cosmétique, la parfumerie, l'aromathérapie et l'agroalimentaire (**Choi et al., 2000; Zenasni, 2014**).

L'écorce des *Citrus* est l'une des parties de la plante riche en métabolites secondaires, tels que les huiles essentielles qui sont étudiées pour ces composés actifs (coumarines, terpènes et linalool...etc) (**Dhanavade et al., 2011; Kamal et al., 2011**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude des huiles essentielles extraites de l'écorce de l'espèce *Citrus limon* (citron jaune), dans le but de déterminer leur intérêt biologique. Ce travail porte sur :

- Extraction des huiles essentielles à partir de l'écorce fraîche de fruit de citron.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante (effet scavenger vis-à-vis du DPPH et le pouvoir réducteur).
- Evaluation *in vitro* de l'activité anti inflammatoire.

Synthèse
Bibliographique

I.1-Généralités sur les agrumes

I.1.1-Histoire des agrumes

Le mot agrume provient de latin (*acrumen* = saveur) acre qui désignait dans l'antiquité, des arbres à des feuilles acides (**Faucon, 2015**).

La culture des agrumes a commencé en Chine, Inde, Indochine, Indonésie. Le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Theophrastus en 310 avant J-C. Les romains ont importé les oranges et les citrons de leur province comme un fruit couteux pour leurs banquets. Les plantes qu'ils cultivaient à Rome ont survécu mais portaient peu de fruits. Au 10^{ème} siècle, les conquérants arabes réintroduisent le cédrat en Europe et introduisent de nombreuses nouveautés telles que le citron et l'orange amère (**Bousbia, 2011**).

I.1.2-Caractères généraux des *Citrus*

Les agrumes appartiennent à la famille des *Rutacées* et correspondent aux espèces exploitées chez les genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* (**Dongmo et al., 2002**).

Le genre *Citrus* appartient à la sous famille des *Aurantioideae*, y compris plusieurs espèces: cédratier, limonier, citronnier, pamplemoussier, oranger doux, oranger amer, bergamotier, mandarinier, clémentinier...etc (**Faucon, 2015; himizu et al., 2016**).

Tous les fruits des *Citrus* cultivés ont presque la même structure, ils sont composés essentiellement de deux parties morphologiques : le péricarpe et l'endocarpe (pulpe) (figure N°1) (**Terol et al., 2010**).

- ✓ le péricarpe est nommé aussi l'écorce, il est composé du zeste (épicarpe ou *flavédo*), partie la plus externe de ce péricarpe, de couleur orangée ou jaune, contenant de nombreuses poches sécrétrices de type schizolysigènes, riche en huile essentielle (**Chavanne, 2011; Faucon, 2015**).

Un mésocarpe (ou *albédo*) de couleur blanche, de texture souvent cotonneuse ou spongieuse, de nature cellulosique, d'épaisseur variable, est la partie la plus intérieure du péricarpe (**Janati et al., 2012; Faucon, 2015**).

- ✓ La partie interne, l'endocarpe ou pulpe constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et

ont une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (**Bousbia, 2011**).

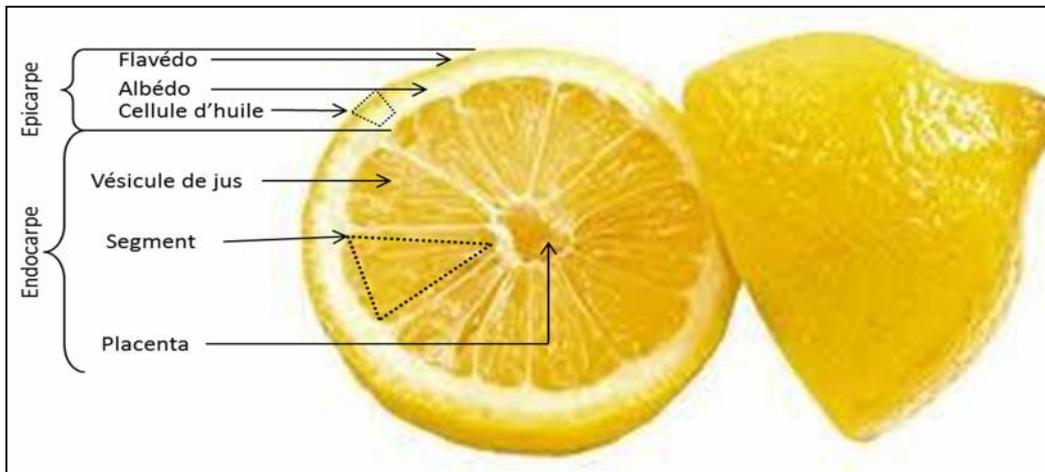


Figure N° 1: Coupe transversale de fruit d'un *Citrus* (**Duan et al., 2014**).

I.2-Espèce *Citrus limon*

Citron (*Citrus limon*) appartenant à la famille *Rutacées*, est parmi les plus importantes espèces d'agrumes après l'orange et la mandarine, très cultivée aujourd'hui dans les climats tropicaux et subtropicaux et même dans les régions tempérées du monde (**Singh et al., 1994; Bousbia, 2011**).

Le citronnier est un arbuste vigoureux aux branches robustes et épineuses de petite taille de 2 à 4 m de hauteur, sensible aux gelées, d'une durée de vie d'environ 40 ans. Avec des feuilles grandes, très parfumées et coriaces. Leurs fleurs sont très agréablement odorantes, regroupées à l'aisselle des feuilles (**Bousbia, 2011; Faucon, 2015**).

Les citrons sont des fruits de forme ovale, pointus et mamelonnés à leur sommet, de 8 à 12 cm de long. Leur écorce (zeste) épaisse de couleur verte vire au jaune à la maturité, contenant une essence à odeur caractéristique. Sa pulpe est acide et les graines qu'il contient ont des cotylédons blancs. On pratique 2 récoltes par an : une en été pour les fruits, et l'autre en hiver pour le jus et l'huile essentielle (**Goetz, 2014; Faucon, 2015**).

I.2.1- Taxonomie (Goetz, 2014)

Règne : *Plantae*.

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Ordre : *Sapindales*.

Famille : *Rutacées*.

Genre : *Citrus*.

Espèce : *Citrus limon* (L.).

I.2.2- Composition chimique du citron

Citrus limon contient de nombreux composants chimiques, y compris les composés phénoliques (tel que les flavonoïdes dont les flavanones sont les plus abondant 90%, contenus dans la partie blanche de la peau du fruit), et d'autres éléments nutritifs et non nutritifs (vitamines, minéraux, fibres alimentaires, huiles essentielles et caroténoïdes) (**González-Molina et al., 2010; chavanne, 2011**).

Le fruit présente une haute teneur en vitamine C et contient d'autres vitamines de groupe A et B (B1, B2, B3, B6 et B9) avec des petites quantités. La teneur en protéines est de 1.1 g/100 g. Divers substances minérales tel que Na (sodium), K (potassium), Ca (calcium), Cu (cuivre), Fe (fer), Mg (magnésium), Zn (zinc) et P (phosphore) en été identifiées dans le citron dont le potassium est le minéral le plus abondant avec une valeur de 8600 mg/100g. Ces éléments jouent un rôle important dans les systèmes biologiques, sont essentiels pour la nutrition et largement utilisés dans le domaine de la médecine clinique. La peau de citron contenait de la graisse brute (4,98%), fibre brute (15,18%). L'arôme de citron résulte de ces huiles essentielles abondantes dans les vacuoles de l'écorce, il s'agit d'un mélange de limonène, du citral, citronellal et des coumarines. L'acide citrique est l'acide organique le plus représenté dans le citron avec une quantité de 5–6 g/100 ml (**González-Molina et al., 2010; Guimaraes et al., 2010; Janati et al., 2012**).

I.2.3-Usage de citron

Le citron présente une large utilisation grâce à sa composition:

- ✓ Usage culinaire: le citron pelé ou finement gratté donne sa propre saveur qui est très prisée en cuisine et en pâtisserie, le jus du citron permet de fabriquer des boissons rafraîchissantes.
- ✓ En cosmétologie, le citron est utilisé pour resserrer les pores, il passe pour éclaircir la peau, résorber les comédons et s'utilise en masque antirides ou pour donner de l'éclat aux cheveux. Il entre aussi dans la composition de nombreux parfums **(Bousbia, 2011)**.
- ✓ De plus, le citron contient des flavonoïdes, en particulier de flavanone qui montre des activités bénéfiques en tant qu'agents protecteurs contre le cancer et les maladies cardiovasculaires, inflammatoires et allergique **(Gil-Izquierdo et al., 2004)**.
- ✓ Le citron est utilisé par les femmes pendant le grossesse pour soulager les nausées et les vomissements **(Yavari kia et al., 2014)**.

Les huiles essentielles se caractérisent par différentes propriétés notamment, antibactériennes, antioxydantes, antifongiques, antivirales, anti-scorbut, antiallergiques, neuro-protecteurs, anticonvulsifs, sédatifs, anti-nociceptifs et anti-inflammatoires. Elles sont largement utilisées comme agent aromatisant dans les aliments, les boissons et les confiseries et comme parfum **(Lahlou, 2004; Sharopov et al., 2015)**.

I.3-Huiles essentielles

I.3.1-Définition

La pharmacopée française définit une huile essentielle comme « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de composition» **(Cazau-Beyret, 2013)**.

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Ce sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, très odorantes et de densité généralement inférieure

à celle de l'eau. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. 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).

Ces composés aromatiques localisés dans différents organes producteurs des végétaux (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches à essences (González-Molina *et al.*, 2010; Lakhdar, 2015).

Le terme « essence » correspond à la substance aromatique qui est sécrétée de façon naturelle par la plante, après distillation cette substance devient une huile essentielle. Ce terme ne peut être employé que pour certaines plantes comme celles contenant des citrals (orange, citron, mandarine...etc.) (Gauriat, 2015).

I.3.2- Composition chimique des huiles essentielles

I.3.2.1- Huiles essentielles des agrumes

Les huiles essentielles constituées principalement des métabolites secondaires lipophiles volatils tels que les hydrocarbures (terpènes et sesquiterpènes) et les composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, phénols, éthers, esters, lactones et éthers phénoliques). Ils sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 80 de l'huile, tandis que d'autres composants sont présentés seulement comme trace (Bousbia, 2011; Sharopov *et al.*, 2015).

De nombreux facteurs influents sur la composition des huiles essentielles, les facteurs environnementaux en particulier (propriétés du sol, approvisionnement en eau, lumière du soleil, température) ont un effet important sur la qualité et la quantité de la composition d'huile. Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus (Bousbia, 2011; Sharopov *et al.*, 2015).

- ✓ **Les terpènes** : ce sont des molécules les plus répandues dans les huiles essentielles.

1. Les monoterpènes (C_{10}) : sont les composés majeurs des huiles essentielles avec des teneurs comprises entre 89,8 % et 99,08%. Le limonène est en général le composé le plus abondant, et d'autres composants monoterpéniques comme - pinène, -thujène, -pinène, -terpinène, -terpinène, p-cymène...etc (**Dongmo et al., 2002; Faucon, 2015**).
 2. Les sesquiterpènes (C_{15}): ce sont des terpènes en C_{15} présents en faible quantité dans les plantes, sauf dans le bois des arbres.
 3. Les diterpènes (C_{20}) : molécules assez rares dans les huiles essentielles, et présentes en faibles quantités (cypres, thuya, mélèze).
 4. Les triterpènes (C_{30}): leur présence est aléatoire dans les huiles essentielles. Car, plus la molécule contient un nombre important de carbones, plus elle est « lourde » et donc plus il est difficile de l'extraire par distillation à la vapeur d'eau. Les triterpènes font souvent partie des structures épicuticulaires des plantes aromatiques.
- ✓ **Phénols et terpénols (Monoterpénols(C_{10}) Sesquiterpénols(C_{15}) et Diterpénols):** molécules possédant une fonction alcool.
 - ✓ **Aldéhydes** : il existe des aldéhydes terpéniques et des aldéhydes aromatiques.
 - ✓ **Lactones** : esters intramoléculaires non aromatiques très actifs, non toxiques, à l'état de traces dans les huiles essentielles.
 - ✓ **Coumarines** : ce sont des esters intramoléculaires aromatiques, très souvent présentés dans les essences, en particulier les essences de *Citrus*. Toujours en faible concentration dans les huiles essentielles.
 - ✓ **Phtalides** : famille chimique apparentée aux coumarines, d'odeur puissante et caractéristique.
 - ✓ **Composés azotés** : ce sont des composés peu courants au sein des huiles essentielles.
 - ✓ **Les composés sulfurés** : ces composés se rencontrent souvent à l'état de traces dans les huiles essentielles.
 - ✓ **Les acides, les esters, cétones, oxydes terpéniques, éthers (Faucon, 2015).**

I.3.2.2-Huiles essentielles de citron

La composition des huiles de citron est dominée par les hydrocarbures monoterpéniques et contient en plus du limonène, α -pinène, une quantité considérable de β -terpinène et une plus petites quantités d'autres monoterpènes : 2-thujène, l' γ -pinène, le camphène, le β -phellandrène, o-cymène, et terpinolène (Sokovi *et al.*, 2010; Francis et Bui, 2015).

L'aldéhyde-citral est également présente dans le citron, sous la forme de stéréoisomères néral et gérianique. Le citral et le linalol sont traités comme l'arôme le plus puissant des composés dans *C.limon*. L'acide citrique est l'acide organique majeur du citron (González-Molina *et al.*, 2010).

Selon l'étude de (Djenane, 2015) l'analyse chimique des huiles essentielles du citron a identifié les principaux composés représentés dans le tableau I.

Tableau I : Composition chimique (%) d'huile essentielle de citron acclimatés en Algérie à partir de parties de peau fraîche identifiées par analyse GC-MS (Djenane, 2015).

Composants	Huile essentielle de citron (%)
-Pinene	03.07
-Pinene	17.04
-Myrcene	2.37
Limonene	51.40
-Terpinene	13.46
Nerol	1.50
Geraniol	2.43
Neryl acetate	1.05
Isocaryophyllene	01.23

I.3.3-Biosynthèse aromatique

La biosynthèse des huiles essentielles au sein du végétal démarre par la photosynthèse (métabolite primaire), c'est un processus permettant aux végétaux d'utiliser l'énergie solaire, pour fabriquer des sucres et d'autres substances organiques. A partir de ces sucres, les plantes aromatiques élaborent des molécules spécifiques selon deux voies majeures (Faucon, 2015; Gauriat, 2015):

✓ Voie des terpènes

Cette voie aboutit à la synthèse des monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), des sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), et des diterpènes ($C_{20}H_{32}$).

La synthèse de ces terpènes fait à partir de l'IPP (isopentényl pyrophosphate en C_5), IPP est issue de la voie du mévalonate. Par ailleurs, des réactions d'oxydoréduction donnent lieu à d'autres molécules comme des monoterpénols, des phénols, des aldéhydes, des cétones...etc, apportant des propriétés chimiques particulières (**Faucon, 2015; Muther, 2015**).

✓ Voie des phénylpropanes

Elle se caractérise par des mécanismes d'oxydation et démarre par un acide aminé : la phénylalanine obtenue par la voie du shikimate. L'acide shikimique est issu de la condensation d'une unité phosphoenolpyruvate (PEP) (glycolyse) et d'une unité d'érythrose-phosphate, le shikimate est un précurseur essentiel pour initier la synthèse de nombreux métabolites secondaires au sein des végétaux et micro-organismes (**Faucon, 2015; Gauriat, 2015**).

La phénylalanine conduit à la formation de plusieurs composés des huiles essentielle, des phénols, des acides ou encore des coumarines. Plus rarement, des molécules de type lactones ou phénols méthyl-éthers peuvent être retrouvés (**Faucon, 2015**).

Une fois synthétisé, ces métabolites vont pouvoir être libérés par des cellules sécrétrices formant des structures histologiques particulières. Elles vont servir de zones de production et de lieux de stockage des substances aromatiques sécrétées *in vivo* par la plante. Ces substances se nomment des essences.

Ces structures sont différentes en fonction de l'organe producteur ainsi que de l'espèce végétale (**Gauriat, 2015**).

I.3.4-Toxicité des huiles essentielles

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% (DL_{50}) 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 essences d'agrumes (pamplemousse, citron...etc) sont photo-sensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil (**Lakhdar, 2015**).

L'utilisation des huiles essentielles doit s'accompagner de nombreuses précautions. La plupart des composés d'une huile essentielle sont lipophiles et sont donc rapidement absorbés, quel que soit la voie d'administration. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la dangerosité d'une huile essentielle comme la teneur en molécules toxiques, la manière d'appliquer l'huile essentielle, le dosage ou encore la durée de l'application. Il convient donc de tester une huile essentielle avant toute utilisation. De plus, il convient de ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur les muqueuses (nez, yeux...etc), ce type d'application nécessite une dilution systématique de l'huile essentielle. Elle est déconseillée aux femmes enceintes et aux femmes qui allaitent (**Chavanne, 2011; Muther, 2015**).

I.4-Stress oxydatif et antioxydants

I.4.1-Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et des éléments oxydants et la capacité de leur élimination par les antioxydants d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (**Barouki, 2006; Reuter et al., 2010**).

Le stress oxydatif peut résulter d'une exposition accrue aux oxydants ou d'une protection réduite contre les oxydants (**Davies, 2000**).

Dans les conditions normales, la balance oxydative définit donc l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces antioxydantes. Mais en conditions d'oxydation, les prooxydants emportent sur les antioxydants, qui peuvent conduire à de nombreuses maladies inflammatoires (**Bayala, 2014**).

➤ Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules naturelles de notre propre métabolisme, ils sont très réactifs et instables. Ils attaquent des composants cellulaires sains pour voler un électron pour devenir stables.

Ce balayage d'électrons par les radicaux libres, collectivement appelés stress oxydatif, qui cause des dégâts à la membrane cellulaire, aux protéines, aux parois des vaisseaux sanguins, aux lipides ou même à l'ADN. Les radicaux libres sont des espèces réactives d'oxygène (EOR) et les dérivés d'espèces azotées réactives (EAR). La formation des

radicaux libres se produit soit par les processus naturels du corps tels que le processus métabolique dans les mitochondries et dans le cytochrome oxydase et la peroxydation lipidique, parfois par la stimulation microbienne sur les neutrophiles ou des facteurs environnementaux comme l'exposition aux rayonnements (**Govindarajan et al., 2005; Lakshmi et al., 2014**).

I.4.2-Antioxydants

De façon générale, un antioxydant est défini comme étant toute substance qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat et permet de maintenir l'homéostasie cellulaire. Il existe plusieurs systèmes antioxydants présents dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase, le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines...etc (**Barouki, 2006; Gauche et Hausswirth, 2006**).

I.4.3-Activité antioxydante des huiles essentielles

Dans le cadre de la toxicité des antioxydants synthétiques et la demande des consommateurs pour les produits naturels, l'utilisation des produits végétaux comme source d'antioxydants deviendrait plus exigée du fait que ces produits sont moins toxiques.

Parmi ces différents produits végétaux, les huiles essentielles ont une activité antioxydante de grand intérêt car elles peuvent préserver les aliments des effets toxiques des oxydants et jouent un rôle important dans la prévention de certaines maladies (**Miguel, 2010**).

Les monoterpènes oxygénés, tels que le thymol, le carvacrol et le -terpinéol, sont principalement responsables du potentiel antioxydant des huiles végétales qui les contiennent. Le monoterpène -caryophyllène possède également une activité de piégeage des radicaux libres, donc les plantes médicinales ayant une activité antioxydante intéressante constitueraient une source de traitement des maladies où sont impliquées les Espèces Oxygénées Réactives (EOR) et les Espèces Azotées Réactives (EAR) (**Bayala, 2014**).

Si les huiles essentielles peuvent éliminer certains radicaux libres, elles peuvent aussi agir comme anti inflammatoires parce que l'une des réponses inflammatoires est l'éclatement oxydatif qui se produit dans diverses cellules (monocytes, neutrophiles, éosinophiles et

macrophages). La phagocytose des bactéries, qui se produit pendant l'inflammation s'accompagne d'une augmentation spectaculaire de la consommation d'oxygène, ce qui donne la formation de radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Miguel, 2010).

I.5-Inflammation et activité anti inflammatoire des substances naturelles

I.5.1-Généralités sur l'inflammation

La réaction inflammatoire est la réponse physiologique des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique (Ndoye Foe *et al.*, 2016).

Son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire (Poubelle et Borgeat, 2000; Hellal, 2007).

L'inflammation se caractérise par des manifestations clé: la rougeur, la chaleur, l'enflure et la douleur. Elle est maintenant reconnue comme un type de réponse immunitaire non spécifique (Srdan V. Stankov, 2012).

- ✓ Les médiateurs de l'inflammation:
 - Les facteurs locaux (amines vasoactives: histamine, sérotonine, prostaglandines et leucotriènes, cytokines pro-inflammatoires (Interleukines)).
 - Les facteurs circulants (le système des kinines, le système du complément, le système de coagulation).
 - Dérivés de l'acide arachidonique, fibrine, mastocytes, lymphocytes, éosinophiles, neutrophiles, macrophages (Gauriat, 2015).
- ✓ Il existe deux types d'inflammation, aigue et chronique.
 - L'inflammation aigue: comporte notamment la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur nécrosant des tumeurs (TNF), les interleukines qui sont libérées par les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes et agissent par l'intermédiaire de récepteurs sur des organes cibles (Salier *et al.*, 1997).
 - L'inflammation chronique: caractérisé par un ensemble des réactions systémiques prolongées, rencontrée à la suite d'une inflammation aigüe, causée par une infection persistante par les parasites, les bactéries ou les virus. La réaction a

dépassé sa fonction initiale de réparation, elle devient invalidante et souvent douloureuse (Hellal, 2007; Lin et Karin, 2007).

I.5.2-Activité anti inflammatoire des substances naturelles

Sur le marché, la plupart des médicaments anti inflammatoires sont chimiquement fabriqués, bien que ces médicaments soient assez puissants, l'administration à long terme entraîne des effets secondaires comme l'intolérance gastrique (Ndoye Foe *et al.*, 2016).

C'est dans cette lumière que les remèdes naturels à partir des végétaux, tel que certains composés d'huiles essentielles qui ont un effet anti inflammatoire similaire à celui des médicaments de synthèses avec très peu d'effets secondaires, l'efficacité et la sécurité prouvées sont recherchées comme substituts pour les traitements chimiques.

I.5.2.1-Mode d'action des huiles essentielles anti inflammatoires

✓ Propriétés liées à la classe électrique:

Les molécules aromatiques donneurs d'électrons tel que les coumarines vont agir d'avantage sur la phase primaire de l'inflammation, et elles vont par exemple compenser la perte en électrons des tissus enflammés (Faucon, 2015; Gauriat, 2015).

Il y a plusieurs composantes des huiles essentielles responsables de l'activité anti inflammatoire :

✓ Les esters monoterpéniques

Les esters sont des composés fragiles, très sensibles à l'hydrolyse. Ils sont constitués d'une partie acide et d'une partie alcool. Ce sont des donneurs d'électrons, leurs fonctions acides agissent sur la libération de monoxyde d'azote et sur les prostaglandines de type II. Ils vont agir sur la phase primaire de l'inflammation (Gauriat, 2015).

✓ Les aldéhydes monoterpéniques

➤ Exemple du citronellal

C'est un anti inflammatoire par modulation de la réponse immunitaire et par mobilisation des leucocytes. C'est un antioxydant qui inhibe aussi la prostaglandine E2 (Gauriat, 2015).

➤ Exemple des citrals

Ce sont des anti inflammatoires par inhibition de l'acide nitrique (NO) (agent utilisé lors d'études cliniques afin de démontrer une activité anti inflammatoire). Ils ne suppriment pas

l'activité des COX2. Ils agissent également par inhibition du NF-kappaB qui est une protéine intervenant dans la régulation de la réponse immunitaire et le stress cellulaire. C'est un facteur de transcription stimulant l'expression de certains gènes qui participent au processus inflammatoire tels que les cytokines et leurs récepteurs (**Gauriat, 2015**).

✓ **Les sesquiterpènes**

Ce sont des molécules lourdes, présentées en faibles quantités donc peu de rendements. Elles sont capables d'inhiber la synthèse des leucotriènes par inhibition de la 5-lipo-oxygénase. L'enzyme 5-LOX est impliquée dans la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes. La surproduction de leucotriènes provoque une inflammation, ainsi que une diminution de la perméabilité capillaire par inhibition de la libération de l'histamine (**Gauriat, 2015**).

Matériel
et
Méthodes

II.1-Matériel

II.1.1-Matériel végétal

Le produit ayant servi à l'extraction des huiles essentielles est la partie écorce (zeste) du citron (*Citrus limon*), que nous avons achetés du marché local de Bejaia, au mois de mars 2017.

Les fruits ont été soigneusement lavés pour les débarrasser de la poussière, puis séchés et épluchés à l'aide d'un couteau en évitant d'inclure l'albédo, la matière blanche (les écorces sont coupées en petits morceaux) (Figure N°2).

La quantité des zestes frais obtenus est ensuite utilisée dans le but d'obtenir les huiles essentielles en vue d'évaluer leur activité antioxydante et anti inflammatoire.



Figure N°2: Les écorces fraîches de citron.

II.2-Methodes

II.2.1-Extraction des huiles essentielles

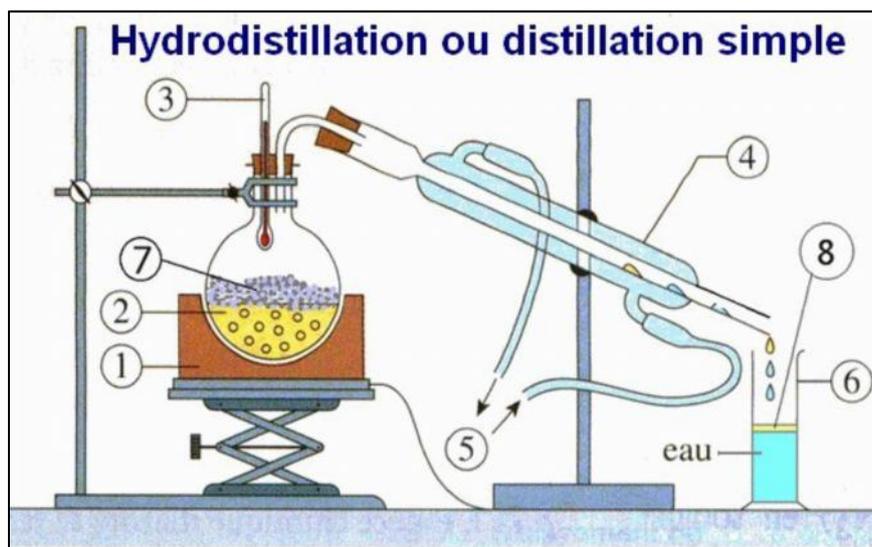
II.2.1.1-Hydrodistillation

➤ **Le principe**

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 bain d'eau, l'ensemble est ensuite porté à l'ébullition, à pression atmosphérique. Sous l'action de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées et entraînées par la vapeur d'eau qui est ensuite condensée. Bien

que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Puis les deux phases, la phase aqueuse (hydrolat) et la phase organique surnageante (huile essentielle) sont séparées par leurs différences de densité (Venturini, 2012; Herzi, 2013).

Ce schéma explique l'appareillage de l'hydrodistillation.



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 N°3: L'hydrodistillation (Solene, 2012).

➤ Protocol expérimental

200g de matière végétale (les zestes frais de citron) ont été introduits dans un ballon contenant de l'eau. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3 heures (Khodabakhsh *et al.*, 2015).

Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau d'huile essentielle qui la surnage (Figure N°4).

Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C (Jazet Dongmo *et al.*, 2008).



Figure N°4: Dispositif d'hydrodistillation.

II.2.1.2- Taux d'extraction

Après l'hydrodistillation, le rendement en huiles essentielles est le rapport entre le poids d'huile essentielle extraite et le poids de la biomasse végétale utilisé. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) (Ndoye Foe *et al.*, 2016).

Il est calculé par cette formule:

$$R(\%) = \frac{P_{HE}}{P_{mv}}$$

R: le rendement en huiles essentielles (%).

P_{HE}: poids d'huile essentielle extraite (g).

P_{mv}: poids de matériel végétal utilisé.

II.2.2- Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de *Citrus limon*

L'activité antioxydante d'huile essentielle des écorces fraîches de *Citrus limon* a été déterminée par le test de piégeage du DPPH et le test de réduction de fer.

II.2.2.1-Activité scavenger du DPPH

➤ Le principe

Le test DPPH est largement utilisé pour étudier l'activité de balayage des composés de produits naturels. Le DPPH a un électron impair qui forme la couleur violette, conduisant à une longueur d'onde d'absorbance à 517 nm (**Bui Thanh et al., 2016**).

Les huiles essentielles ont la capacité d'inhiber le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) par la donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons (**Choi et al., 2000**).

Lorsque le DPPH réagit avec un antioxydant, perd sa couleur violette et devient de couleur jaune (**Lakshmi et al., 2014**).

La réduction du radical par un donneur d'atome H (ROH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune (DPPH-H) et au radical (A•) (Figure N°5).

La réaction de réduction de DPPH: $\text{DPPH}^\bullet + \text{ROH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{RO}^\bullet$ (**Fekih, 2015**).

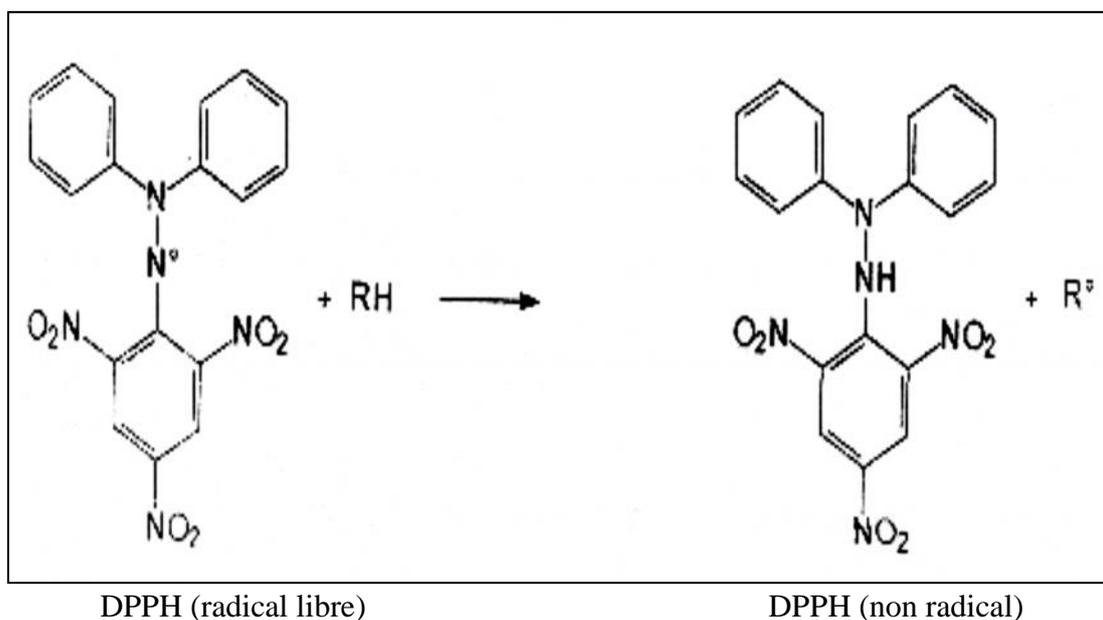


Figure N°5 : Réaction du DPPH avec un antioxydant (Obame Engonga, 2009).

➤ Le protocole expérimental

Le protocole expérimental suivi dans cette étude été celui de **Wu et Ng. (2008)** avec certaines modifications.

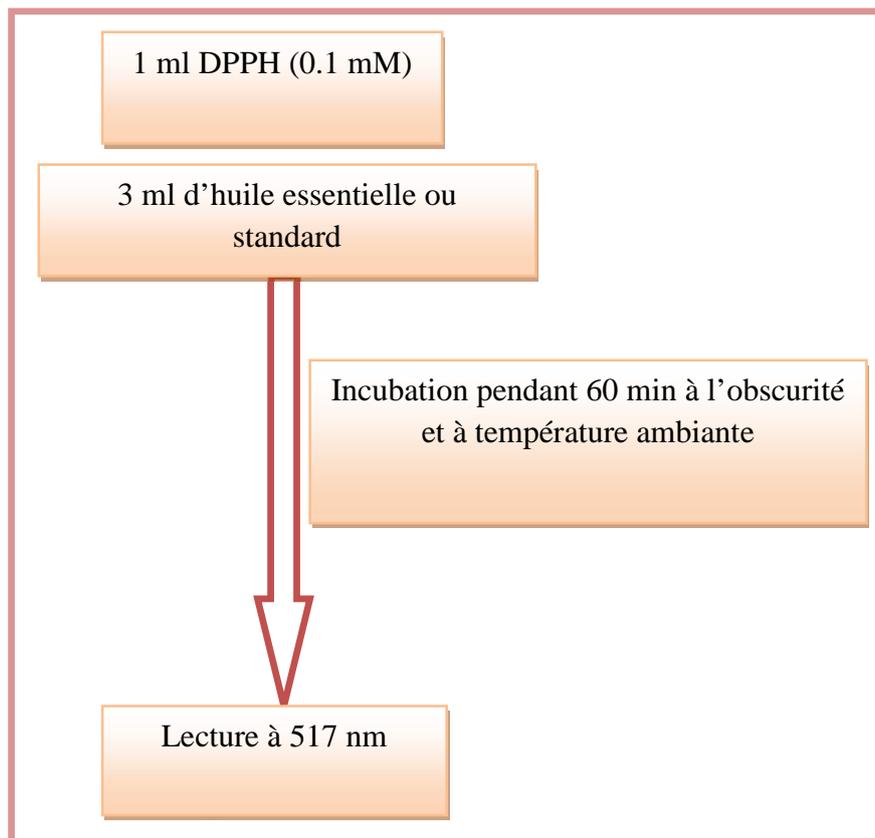


Figure N°6 : Protocole de réduction de radical DPPH (Wu et Ng, 2008).

➤ Expression des résultats

L'activité scavenger du radical DPPH selon **Herzi. (2013)** est exprimée en pourcentage d'inhibition de ce dernier selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition } \% = \frac{\text{Abs C} - \text{Abs T}}{\text{Abs C}} \times 100$$

Abs T: absorbance de test.

Abs C: absorbance de contrôle.

NB: le contrôle négatif contient le méthanol à la place d'huile essentielle et de standard.

A partir des résultats présentant l'activité scavenger en %, on peut déterminer l'IC₅₀ (concentration d'huiles essentielles nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH).

II.2.2.2-Pouvoir réducteur

➤ Le principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant, le principe de ce test est basé sur la réaction de réduction de Fe^{3+} (fer ferrique), présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en sa forme réduite Fe^{2+} (Fer ferreux). L'activité réductrice a été déterminée selon la méthode d'Oyaizu. (1986) modifiée (Oktay *et al.*, 2003).

La capacité de l'agent antioxydant peut être évalué par un spectrophotomètre à 700 nm, l'augmentation de l'absorbance indique une augmentation de capacité réductrice (Miguel, 2010).

La chimie des analyses à base de fer peut être résumée avec l'équation de réaction suivante:
 $\text{Fe}^{3+} \text{---L} + \text{antioxydant} \longrightarrow \text{Fe}^{2+} \text{---L} + \text{antioxydant oxydé}$ (Guimarães *et al.*, 2010).

➤ Protocole expérimental:

Le pouvoir réducteur de l'huile essentielle de citron est déterminé selon la méthode décrite par Oktay *et al.* (2003).

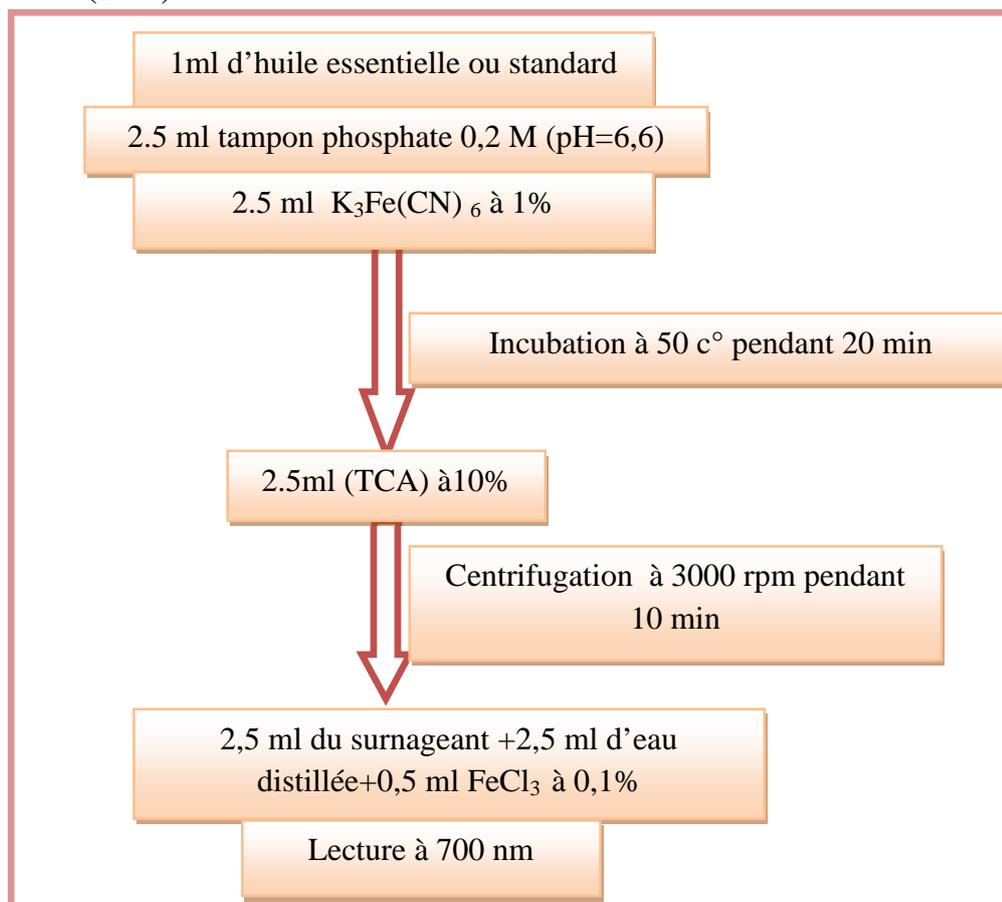


Figure N°7 : Protocole de pouvoir réducteur (Oktay *et al.*, 2003).

II.2.3- Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'huile essentielle de *Citrus limon*

II.2.3.1- Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)

➤ Le principe

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application de stress ou de composé externe, comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou une chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées (**Leelaprakash et Mohan Dass, 2011; Bui Thanh et al., 2016**).

Sous l'action d'un traitement thermique, l'albumine peut subir des changements de conformation (Figure N°8) associés à un mauvais repliement de la structure 3D provoquant le processus d'agrégation (**Militello et al., 2003**).

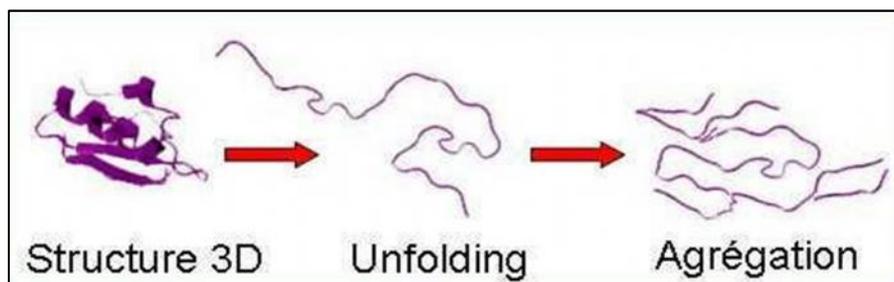


Figure N°8: Les phénomènes d'agrégation (**Rondeau, 2009**).

La dénaturation des protéines est l'une des causes bien documentées de l'inflammation et conduit à divers maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti inflammatoire (**Habibur Rahman et al., 2015; Osman et al., 2016**).

➤ Le protocole

L'effet inhibiteur *in vitro* d'huile essentielle de *Citrus limon* a été déterminé en utilisant une méthode de dénaturation protéique décrite par **Habibur Rahman et al. (2012)** avec certaines modifications.

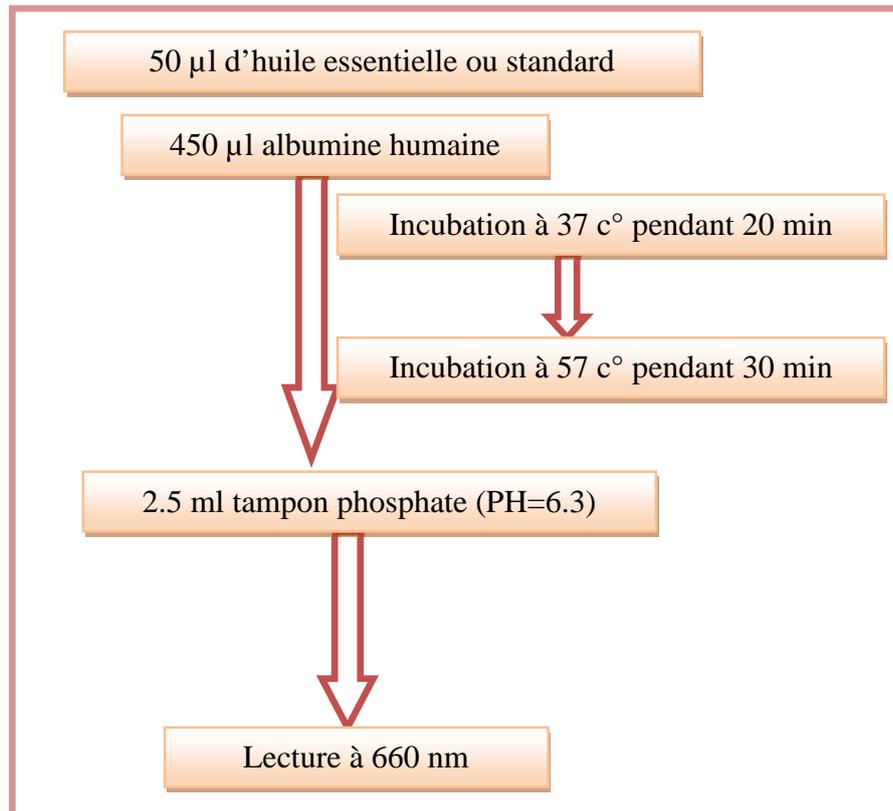


Figure N°9: Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine (Habibur Rahman *et al.*, 2012).

➤ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante (Bui Thanh *et al.*, 2016):

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{Abs C} - \text{Abs T}}{\text{Abs C}} \times 100$$

Abs C : absorbance de contrôle.

Abs T : absorbance de test.

II.2.3.2-Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)

➤ Le principe

L'action anti hémolytique *in vitro* d'huile essentielle a été évaluée par l'utilisation de modèle érythrocytaire, ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane à similitudes avec d'autres membranes cellulaire (Shobana et Vidhya, 2016).

Si les globules rouges (RBC) sont exposés à des substances nuisibles telles que le milieu hypotonique alors la rupture de sa membrane se produira, provoquant la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant. Étant donné que les membranes des globules rouges humains (HRBC) sont similaires aux composants de la membrane lysosomale. L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule (**Habibur Rahman et al., 2015; Labu et al., 2015**).

Il existe une relation entre l'hémolyse et l'inflammation, car pendant l'inflammation, il y a une lyse de la membrane lysosomale qui libère leurs composants enzymatique produisant une variété des troubles (**Labu et al., 2015**).

L'hémolyse est détectée visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma. Dans cette étude, la stabilisation de la membrane HRBC est effectuée par l'inhibition de l'hypotonie (**Habibur Rahman et al., 2015; Shobana et Vidhya, 2016**). La lecture de la densité optique de surnageant récupéré est réalisée par un spectrophotomètre visible.

➤ Le protocole expérimental

Le protocole suivi pour l'étude de l'activité protectrice de la membrane des érythrocytes par les huiles essentielles est celle de **Labu et al. (2015)**.

- Préparation de la suspension des érythrocytes

On a prélevé le sang d'un volontaire sain qui n'a pas pris de médicament anti inflammatoire pendant 15 jours avant le prélèvement.

L'obtention des érythrocytes est comme suit:

- Centrifugation de sang pendant 10 min à 3000 rpm.
- Lavage des érythrocytes trois fois avec une solution iso-saline [(154 mM NaCl) dans un tampon phosphate à 10 mM (pH= 7,4)].
- Reconstitution des globules rouges sous forme d'une suspension à 10% dans la solution iso-saline.

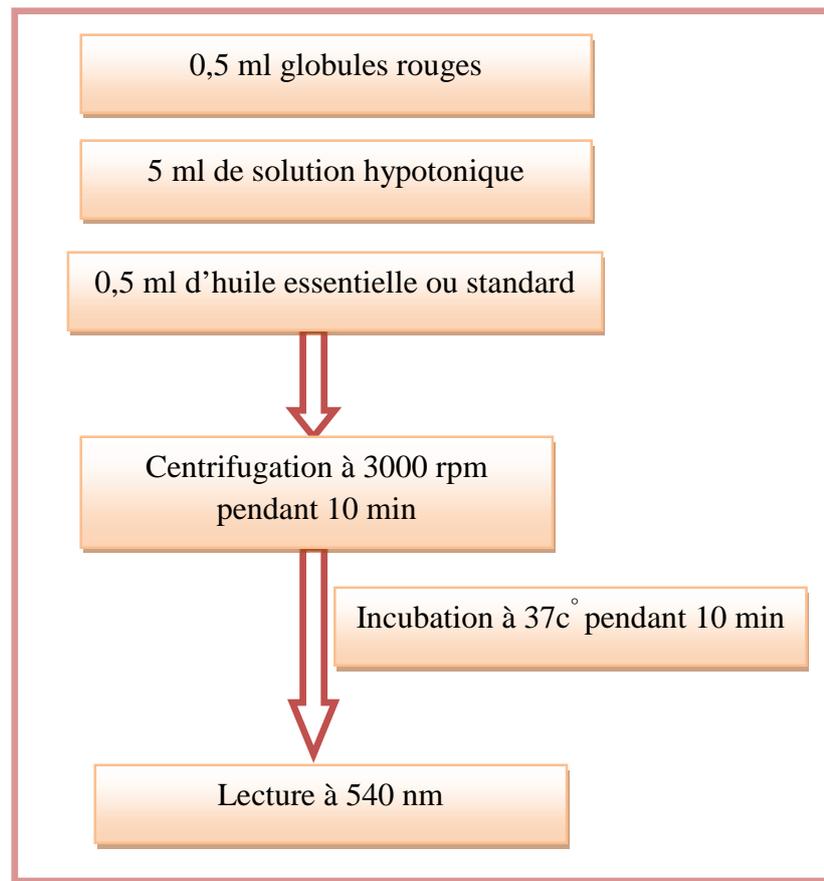


Figure N°10: Protocole de stabilisation membranaire (Labu *et al.*, 2015).

➤ Expression des résultats

L'inhibition de l'hémolyse est obtenue en pourcentage par la formule suivante : (Labu *et al.*, 2015).

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{Abs C} - \text{Abs T}}{\text{Abs C}} \times 100$$

Abs T: absorbance de test (huile essentielle ou standard).

Abs C: absorbance de contrôle.

II.3-Analyse

Chaque expérience est répétée trois fois, les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart type. Les valeurs d'IC₅₀ sont mesurées par régression linéaire.

Résultats
et
Discussion

III.1-Extraction des huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon*

L'extraction par hydrodistillation de plante étudiée a fourni une huile essentielle d'aspect liquide et limpide, ayant une coloration jaune claire avec de fortes et persistantes odeurs. Ces résultats sont comparés à une étude de **Ferhat *et al.* (2007)** qui a trouvé les mêmes propriétés organoleptiques d'huile essentielle de *Citrus limon*.

Tableau II: La densité et le rendement en huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* extraite par la méthode d'hydrodistillation.

Méthode d'extraction	Hydrodistillation
Le rendement %	0,57%
La densité	0,85

L'étape d'extraction durant laquelle les molécules aromatiques sont recueillies est nettement longue (3 heures) dont une première partie relative au chauffage de la matière végétale et correspondant à la montée en température au sein du réacteur au fur et à mesure pour atteindre 100°C, température d'ébullition de l'eau, étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit.

-La seconde étape correspond à une extraction progressive de l'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon*.

- Enfin, la dernière étape correspond au rendement maximal possible.

Le rendement d'hydrodistillation d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* est de 0,57%, Ce résultat est comparable à d'autres études (**Kuate *et al.*, 2003; Djenane, 2015**) qui ont trouvé des proportions variables aux environ de 0,3 à 0,6% ; 0,7% respectivement. D'autre part, d'autres travaux comme ceux de **Guimarães *et al.* (2009)**, ont montré que le rendement de l'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* est de $0,18 \pm 0,004$ %, par contre ceux de **Hamdan *et al.* (2013)** le rendement est de 2%.

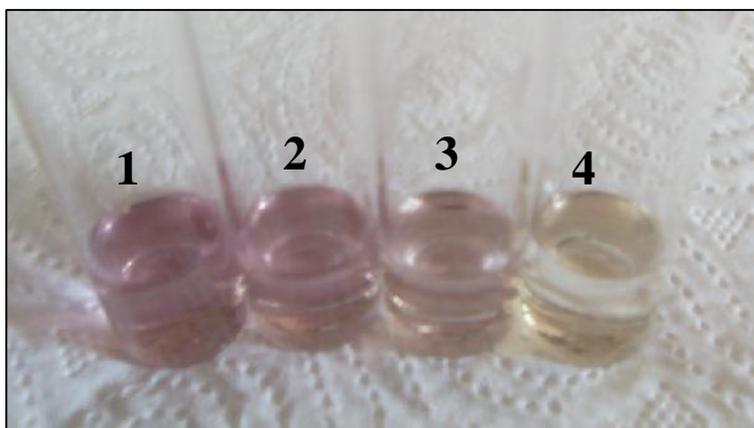
Cette différence de rendement est peut être due à un ensemble de paramètres comme l'origine géographique, la méthode d'extraction, la période d'extraction, la maturité de fruit mais également aux conditions d'expérimentation (**Djenane, 2015**).

Selon la documentation technique fourni par les laboratoires PhytoSun'Aroms: les huiles essentielles de *Citrus limon* doivent avoir une densité de 0,8522 (Faucon, 2015).

III.2-Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de *Citrus limon*

III.2.1-Activité anti radicalaire par DPPH

Les solutions préparées en mélangeant le DPPH avec l'huile essentielle à différentes concentrations sont incubées pendant 60 min, la couleur violette vire vers le jaune résultant d'une activité antioxydante comme la figure N°11 indique:



Concentration: 1- 3,75g/ml, 2- 7,5mg/ml, 3- 15 mg/ml, 4- 30 mg/ml.

Figure N°11: Variation de couleur de DPPH vers le jaune en fonction de la concentration d'huile essentielle.

Les résultats de l'activité antioxydante d'huile essentielle et de standard (A.Ascorbique), ainsi les valeurs d'IC₅₀ sont présentées dans le tableau III:

Tableau III: Evaluation de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon*.

	[c]	%d'inhibition	IC50mg/ml
Control	-	0	-
A. ascorbique	100µg/ml	78,354 ± 0,002	0,06
A. ascorbique	25µg/ml	28,860 ± 0,006	
A. ascorbique	12,5µg/ml	11,898 ± 0,002	
<i>C.limon</i>	30mg/ml	60,506 ± 0,008	24,30
<i>C.limon</i>	15mg/ml	34,43 ± 0,010	
<i>C.limon</i>	7,5mg/ml	22,151 ± 0,013	
<i>C.limon</i>	3,75mg/ml	14,81 ± 0,018	

L'évaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* a montré que cette activité est moins importante avec une valeur d'IC₅₀=24,30mg/ml par rapport au standard utilisé qui donne une valeur d'IC₅₀ de 0,06 mg/ml.

La valeur IC₅₀ de l'activité anti radicalaire d'huile essentielle de citron obtenue est comparée avec l'étude de **Hamdan et al. (2013)** qui a trouvé une activité inhibitrice d'IC₅₀ = 26,66 ± 2,07 mg/ml, une autre étude de **Golmakani et Moayyedi. (2015)**, a trouvé une valeur IC₅₀ = 44,06 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 de 1,17 mg/ml.

III.2.2-Evaluation de pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon* a été évalué en utilisant la méthode de réduction du fer. L'activité antioxydante est basée sur la capacité d'huile essentielle à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺.

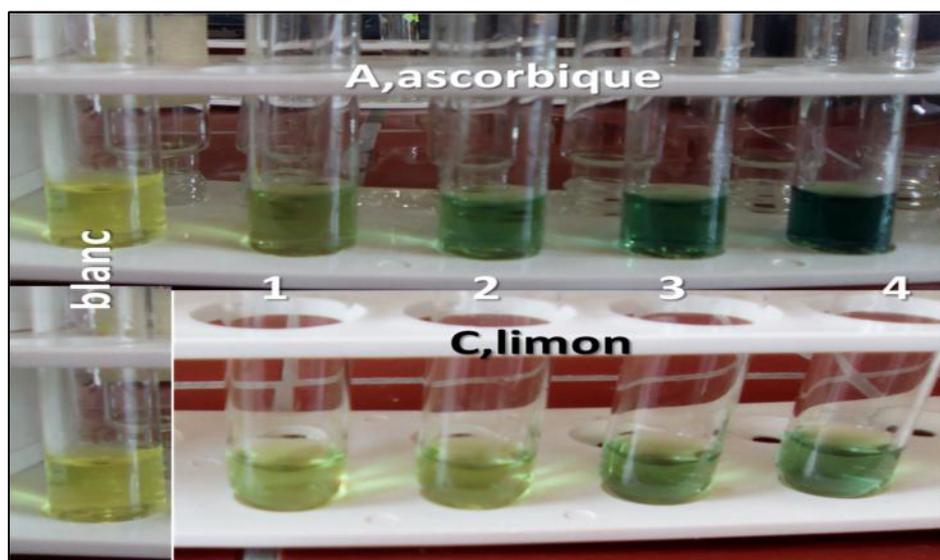
Les résultats des absorbances sont présentés dans le tableau IV:

Tableau IV: Le pouvoir réducteur d'huile essentielle de *Citrus limon* et l'acide ascorbique comme standard.

	[c]	Absorbance 700nm
<i>C.limon</i>	30mg/ml	0,345 ± 0,03
<i>C.limon</i>	15mg/ml	0,224 ± 0,03
<i>C.limon</i>	7,5mg/ml	0,203 ± 0,01
<i>C.limon</i>	3,75mg/ml	0,182 ± 0,005
A. Ascorbique	250µg/ml	1,13 ± 0,03
A. Ascorbique	125µg/ml	0,606 ± 0,01
A. Ascorbique	62,5µg/ml	0,388 ± 0,03
A. Ascorbique	31,25µg/ml	0,242 ± 0,01

L'évaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus* est déterminée par rapport à la vitamine C (acide ascorbique).

Nous avons remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne différentes concentrations d'huile essentielle et d'acide ascorbique avec les réactifs de test, la solution change de couleur instantanément du jaune au vert (figure N°12).



A.Ascorbique: 1- 31,25µg/ml, 2- 62,5µg/ml, 3- 125µg/ml, 4- 250µg/ml.

C.limon: 1- 3,75mg/ml, 2- 7,5mg/ml, 3- 15mg/ml, 4-30mg/ml.

Figure N°12: La réaction de coloration de la solution en présence de réducteur.

Le pouvoir réducteur obtenu par l'acide ascorbique est très puissant avec une absorbance de 1,13 à la concentration de 250 μ g/ml, par rapport à l'huile essentielle de *Citrus limon* qui présentait un pouvoir réducteur faible, exprimé par absorbance allant de 0,182 \pm 0,005 à 0,345 \pm 0,03 pour des concentrations variées de 3,75mg/ml à 30mg/ml.

Dans une autre étude de **Wu et al. (2013)** effectuée sur une autre espèce de la même famille de citron, *Citrus medica* L.var. *sarcodactylis* (Finger citron), ils ont trouvé un pouvoir réducteur exprimé en fonction d'absorbance de 0,65 et 0,5 à une concentration de 15 μ g/ml pour le fruit avant maturation (immaturité) et au stade de maturité respectivement. Ce résultat n'est pas en accord avec le travail effectué sur l'écorce de citron. Ceci peut être expliqué par la différence de l'espèce étudié ainsi que le paramètre étudié (étude à différents stades de maturation).

D'autre part, le pouvoir réducteur de l'huile essentielle d'une autre plante de *Citrus paradisi a* été mesuré en pourcentage, il a montré un résultat de 78% pour une concentration de 1 mg/ml selon **Ou et al. (2015)**.

III.3-Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'huile essentielle de *Citrus limon*

III.3.1-Evaluation de l'activité protectrice contre la dénaturation d'albumine

La méthode d'anti dénaturation de l'albumine humaine est utilisée pour évaluer les propriétés anti inflammatoire d'huile essentielle de l'écorce de *Citrus limon*.

Le processus d'agrégation de l'albumine dépend de nombreux facteurs, tels que la température, le pH et la concentration (**Aymard et al., 1996**).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la capacité de l'huile essentielle à protéger l'albumine humaine contre la dénaturation suite à l'augmentation de la température.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Tableau V: Evaluation de l'activité inhibitrice de la dénaturation d'albumine.

	[c]	%d'inhibition	IC50 mg/ml
Control	-	0	-
DIC	250µg/ml	73,76	
DIC	125µg/ml	59,33	0,069
DIC	62.5µg/ml	47,75	
C.limon	15mg/ml	62,881	
C.limon	3,75mg/ml	32,975	10,54
C.limon	1,87mg/ml	24,220	

L'huile essentielle de *Citrus limon* a protégé l'albumine contre la dénaturation par la chaleur avec un pourcentage maximum de 62,88% à une concentration de 15mg/ml. L'effet de Diclofénac de sodium contre la dénaturation est très important avec un pourcentage de 73,76% à une concentration de 250µg/ml.

L'IC₅₀ d'huile essentielle de *Citrus limon* est 10,54 mg/ml. Les résultats obtenus montre que les huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon* possèdent une activité dose dépendante.

III.3.2-Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)

L'activité anti hémolytique d'huile essentielle de *C.limon* est évaluée en provoquant l'hémolyse par une solution hypotonique qui induit la désorganisation de la membrane et la libération de l'hémoglobine donnant au surnageant une légère coloration rouge en fonction de la proportion d'hémolyse.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI:

Tableau VI: L'activité anti hémolytique d'huile essentielle de l'écorce de *C.limon* et de Diclofénac de sodium.

	[C]	%d'inhibition	IC ₅₀ (mg/ml)
Control	-	0	
DIC	1mg/ml	75,20	
DIC	500µg/ml	65,72	0,168
DIC	250µg/ml	54,37	
DIC	125µg/ml	44,37	
C.limon	15mg/ml	50,52	
C.limon	7,5mg/ml	43,43	14,24
C.limon	3,75mg/ml	37,39	
C.limon	1,87mg/ml	12,50	

L'huile essentielle de *Citrus limon* a protégé les globules rouges contre l'hémolyse avec un pourcentage maximum de 50,52% à une concentration de 15mg/ml ; l'effet de standard anti inflammatoire contre l'hémolyse est très important avec un pourcentage de 75,20% à une concentration de 1mg/ml.

L'IC₅₀ d'huile essentielle de l'écorce de *C.limon* est 14,24 mg/ml dont la puissance est moins importante de celle du standard ayant une IC₅₀ de 0,168 mg/ml.

Cette étude a affirmé que les huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon* possèdent une activité anti hémolytique. Ce résultat est différent par rapport à d'autres travaux de **Caleño et al.(2016)** qui ont montré que les huiles essentielles de *Citrus aurantium* présentaient une activité anti hémolytique avec une IC₅₀ 86,69±4,98 µg/ml, selon ce même auteur, cette activité est associée à la forte présence d'un terpène : limonène qui est de 94,4% .

Ces résultats suggèrent que les composants d'huile essentielle de *C. limon* représentés par une fraction majoritaire des terpènes pourraient être les principaux constituants anti inflammatoires. Cependant, une analyse phyto-chimique plus détaillée sera nécessaire afin d'isoler et de caractériser les composés actifs responsables des effets de stabilisation de la membrane ainsi que de comprendre les mécanismes d'action exacts de ces activités.

Conclusion

et

Perspectives

Les agrumes occupent aujourd'hui une place importante dans les échanges mondiaux des produits végétaux, tel que le citron (*Citrus limon*) qui est riche en différents métabolites secondaires. Parmi eux, les huiles essentielles qui sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe et caractérisées par des propriétés biologiques importantes, ce qui leur confère d'être utilisées dans plusieurs domaines : industrie pharmaceutique, la cosmétique, l'industrie alimentaire...etc.

La présente étude avait pour objectif d'extraction d'huile essentielle de *Citrus limon* et l'évaluation de leur activité antioxydante et anti inflammatoire *in vitro*.

L'extraction d'huile essentielle de *Citrus limon* est effectuée sur la partie écorce du fruit par utilisation de la méthode d'hydrodistillation, avec laquelle nous avons obtenu un rendement de 0,57%, une densité de 0,85 et des propriétés organoleptiques comparables aux plusieurs études antérieures.

L'évaluation de l'activité anti radicalaire (antioxydante) contre le radical DPPH à des concentrations différentes a prouvé que l'huile essentielle de l'écorce de citron possède une bonne activité scavenger allant jusqu'à 60,5% pour une concentration de 30mg/ml. Le test du pouvoir réducteur a montré également des résultats notables.

Concernant l'activité anti inflammatoire, des résultats considérables de 62,88% et 50,52% pour les deux tests respectivement, l'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine et protection contre l'hémolyse ont été enregistrés.

Dans les perspectives souhaitées, il serait nécessaire de signaler l'écorce de *Citrus limon* comme étant une bonne source d'huile essentielle et d'utiliser d'autres techniques d'extraction afin d'optimiser le rendement ainsi que la qualité d'huile essentielle. Il est intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant et anti inflammatoire et même les autres propriétés *in vitro* et *in vivo* et pour assurer la non toxicité de cette huile essentielle.

Étant donné la complexité de composition chimique d'huile essentielle, il est intéressant de les caractériser par GC-MS ou d'autres techniques et identifier les composés responsables des différentes activités et les tester séparément.

Références
Bibliographiques

A

- **Aymard, P., Durand, D. et Nicolai, T. (1996).** The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of beta-lactoglobulin. *Int J Biol Macromol*, 19: 213- 221.

B

- **Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *m/s*, 22: 266-72.
- **Bayala, B. (2014).** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur d'université. Université Blaise Pascal. 141p.
- **Berker, K.I., Guclu, K., Tor, I. et Apak, R. (2007).** Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72:1157–1165.
- **Bousbia, N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 128p.
- **Bui Thanh, T., Vu Duc, L., Nguyen Thanh, H. et Nguyen Tien, V. (2016).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds of ethanol extract from *Sanchezia speciosa* Leonard's leaves. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*.

C

- **Caleno, C.JL., Ospina, C.CC., Arango, M.W., Arteaga, M.JJ. et Perea, M.E. (2016).** Application of essential oils from two species of the *Rutaceae* family as cellular oxidation controller agent and trypanocidal capacity. *Asian J Pharm Clin Res*, 9 (2): 213-219.
- **Cazau-Beyret, N. (2013).** Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse III sabbatier. 194p.
- **Chavanne, P. (2011).** 200 remèdes au citron. Editions First – Grund, Paris, 255p.

- **Choi, H-S., Song, H.S., Ukeda, H. et 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: 4156-4161.

- **Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C. et Boruah, P. (2009).** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Sci. Technol*, 42: 777-780.

D

- **Davies, K.J.A. (2000).** Critical review oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279-289.
- **Dhanavade, M.J., Jalkute, C.B., Ghosh, J.S. et Sonawane, K.D. (2011).** Study antimicrobial activity of lemon (*Citrus lemon* L.) peel extract. *Br. J. Pharmacol. Toxicol*, 2(3): 119-122.
- **Djenane, D. (2015).** Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4: 208-228.
- **Dongmo, P.M.J., Kuate, J., Boyom, F.F., Ducelier, D., Damesse, F., Zollo, P.H.A., Menut, M. et Bessiere, J.M. (2002).** Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de citrus sur la croissance mycelienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, 57(2): 95-104.
- **Duan, L., Guo, L., Liu, K., Liu, E.H. et Li, P. (2014).** Characterization and classification of seven citrus herbs by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *J Chromatogr A*, 1339: 118- 127. **In Mir, H. (2016).** Effet d'un extrait lyophilisé de l'écorce du citron vert (*Citrus latifolia*) combiné à la protéine purifiée de sardine sur le profil lipidique et le statut redox chez des rats *wistar rendus* hypercholestérolémiques. Thèse présentée pour l'obtention de diplôme de doctorat en sciences biologiques. Université d'Oran. 121p.

F

- **Faucon, M. (2015).** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.
- **Fekih, N. (2015).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat es-sciences en chimie. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen. 133p.
- **Ferhat, M.A., Tigrine-Kordjani, N., Chemat, S., Meklati, B.Y. et Chemat, F. (2007).** Rapid extraction of volatile compounds using a new simultaneous microwave distillation: solvent extraction device. *Chromatographia*, 65: 217–222.
- **Francis, G.W. et Bui, Y.T.H. (2015).** Changes in the composition of aromatherapeutic citrus oils during evaporation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6 pages.

G

- **Gauche, É. et Hausswirth, C. (2006).** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Movement & Sport Science*, 2 (58): 43-66.
- **Gauriat, E. (2015).** Accompagnement d'une rééducation physique post-traumatique par l'aromathérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges. 150p.
- **Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M.T., Porras, I. et Ferreres, F. (2004).** Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon*(L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *J. Agric. Food Chem*, 52: 324–331.
- **Goetz, P. (2014).** *Citrus limon* (L.) Burm. f. (*Rutacées*) Citronnier. *Phytothérapie*.
- **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.
- **González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A. et García-Viguera, C. (2010).** Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 51: 327–345.
- **Govindarajan, R., Vijayakumar, M. et Pushpangadan, P. (2005).** Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol*, 99: 165–178.

- **Guimaraes, R., Barros, L., Barreira, J.C.M., Sousa, M.J., Carvalho, A.M. et Ferreira, I.C.F.R. (2010).** Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol*, 48: 99 –106.
- **Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. et Jiang, Y. (2003).** Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Res*, 23:1719–1726.

H

- **Habibur Rahman., Chinna Eswaraiah, M., Vakati, K. et Madhavi, P. (2012).** *In-vitro* studies suggest probable mechanism of *Eucalyptus* oil for anti-inflammatory and anti-arthritis activity. *Int J Phytopharm*, 2(3): 81-83.
- **Habibur Rahman., Chinna Eswaraiah, M. et Dutta, A.M. (2015).** *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritis activity of *Oryza sativa* Var. *Joha Rice* (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, 15 (1): 115-121.
- **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.
- **Hellal, M. (2007).** Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine: Synthèses et activités anti-cytokine. Thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'université Louis Pasteur (Strasbourg I). Université Louis Pasteur (Strasbourg I). 324p.
- **Herzi, N. (2013).** Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse en vue de l'obtention de doctorat de l'université de Toulouse. Université de Toulouse. 185p.

J

- **Janati, S.S.F., Beheshti, H.R., Feizy, J. et Fahim, N.K. (2012).** Chemical composition of lemon (*citrus limon*) and peels its considerations as animal food. *GIDA*, 37 (5): 267-271.
- **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.

K

- **Kamal, G.M., Anwar, F., Hussain, A.I., Sarri, N. et Ashraf, M.Y. (2011).** Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *Food Res Int*, 18(4): 1275-1282.
- **Khodabakhsh, P., Shafaroodi, H. et Asgarpanah, J. (2015).** Analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrus aurantium L.blossoms* essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. *J Nat Med*.
- **Kuate, J., Dongmo, P.M.J., Ducleier, D., Damesse, F., Menut, C. et Bessière, J.M. (2003).** Effet de la cercosporiose à *Phaeoramularia angolensis* sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de peau d'orange. *Fruits*, 58: 143–149.

L

- **Labu, Z.K., Laboni, F.R., Tarafdar, M., Howlader, M.S.I. et Rashid, M.H. (2015).** Membrane stabilisation as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities of ethanolic extract of arial parts of *Spondias pinanata* (family: Anacardiaceae). *PhOL*, 2: 44-51.
- **Ladoh Yemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., Lenta Ndjakou, 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.
- **Lahlou, M. (2004).** Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr. J*, 19: 159–165.
- **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.
- **Lakshmi, G., Smitha, N., Ammu, S.V., Priya, C.L. et Bhaskara Rao, K.V. (2014).** Phytochemical profil, *in vitro* antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea nouchali* Linn: an in vitro study. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6 (6): 548-552.

- **Leelaprakash, G. et Mohan Dass, S. (2011).** In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *Int.J. Drug Dev & Res*, 3 (3): 189-196.
- **Lin, W-W. et Karin, M. (2007).** A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest*, 117: 1175–1183.
- **Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Di Sanzo, G., Verardi, A., Lopresto, C.G., Pugliese, A., Menichini, F., Balducci, 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.

M

- **Miguel, M.G. (2010).** Antioxidant and anti-Inflammatory activities of essential oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252 - 9287.
- **Militello, V., Vetri, V. et Leone, M. (2003).** Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophys. Chem*, 105: 133- 141.
- **Muther, L. (2015).** Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université d'Auvergne. 156p.

N

- **Ndoye Foe, F.M.C., Kemegni Tchingang, 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.

O

- **Obame Engonga, L.C. (2009).** Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Thèse de doctorat unique pour l'obtention du grade de docteur ès sciences biologiques appliquées. Université d'Ouagadougou. 258p.

- **Oktay, M., Gulcin, I. et Kufrevioglu, O.I. (2003).** Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm-Wiss. U-Technol*, 36: 263–271.
- **Osman, N.I., Sidik, N.J., Awal, A., Adam, N.A.M. et Rezali, N.I. (2016).** In vitro xanthine oxidase and albumin denaturation inhibition assay of *Barringtonia racemosa* L. and total phenolic content analysis for potential anti-inflammatory use in gouty arthritis. *J Intercult Ethnopharmacol*, 5 (4): 343 - 349.
- **Ou, M-C., Liu, Y-H., Sun, Y-W. et Chan, C-F. (2015).** The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9 pages.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.

P

- **Poubelle, P.E. et Borgeat, P. (2000).** Perspectives thérapeutiques de l'inflammation. *m/s*, 16: 917-23.

R

- **Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. et Aggarwal, B.B. (2010).** Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Rad Bio Med*, 49:1603–1616.
- **Rondeau, P. (2009).** Stress oxydant et glycation: relation structure et activités biologiques de l'albumine in vitro et in vivo dans le cadre de la pathologie diabétique. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur ès sciences de l'université de la Réunion. Université de la Réunion. 268p.

S

- **Salier, J-P., Rouet, P., Banine, F. et Claeysens, S. (1997).** Transcription des gènes de protéines plasmatiques dans le foie au cours de l'inflammation aiguë systémique. *m/s*, 13: 335-44.
- **Sharopov, F., Santhosh Braun, M., Gulmurodov, I., Khalifaev, D., Isupov, S. et Wink, M. (2015).** Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods*, 4(4): 645-653.
- **Shimizu, T., Kitajima, A., Nonaka, K., Yoshioka, T., Ohta, S., Goto, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Mochizuki, T., Nagasaki, H., Kaminuma, E. et Nakamura, Y. (2016).** Hybrid origins of Citrus varieties inferred from DNA Marker analysis of nuclear and organelle genomes. *PLoS ONE*, 11(11):1-58.
- **Shobana, S. et Vidhya, R. (2016).** Evaluation of *in vitro* hemolytic activity of different parts of abutilon indicum (Linn.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5): 1182–1196.
- **Singh, S., Ray, B.K., Bhattacharyya, S. et Deka, P.C. (1994).** In vitro propagation of *Citrus reticulata* blanco and *Citrus limon* Burm.f. *J. Hort. Sci*, 29(3): 214-216.
- **Sokovi , M., Glamo lija, J., Marin, P.D., Brki , D. et van Griensven, L.J.L.D. (2010).** Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15: 7532-7546.
- **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.
- **Srdan V. Stankov. (2012).** Definition of inflammation, causes of inflammation and possible anti-inflammatory strategies. *Open Inflamm. J*, 5: 1-9.

T

- **Terol, J., Soler, G., Talon, M. et Cercos, M. (2010).** The aconitate hydratase family from *Citrus*. *BMC Plant Biology*, 10: 222.

V

- **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.

- **Venturini, N. (2012).** Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples des spiritueux de myrte (*Myrtus communis L*) et de cédrat (*Citrus medica L*) de corse. Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur en chimie. Université de Corse-Pascal Paoli. Ecole doctorale environnement et société UMR CNRS 6134 (SPE). 242p.

W

- **Wu, S-J. et Ng, L-T. (2008).** Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT*, 41: 323–330.
- **Wu, Z., Li, H., Yang, Y., Zhan, Y. et Tu, D. (2013).** Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Ind. Crop Prod*, 46: 311– 316.

Y

- **Yavari kia, P., Safajou, F., Shahnazi, M. et Nazemiyeh, H. (2014).** The effect of lemon inhalation aromatherapy on nausea and vomiting of pregnancy: a double-blinded, randomized, controlled clinical trial. *Iran Red Crescent Med J*, 16 (3).

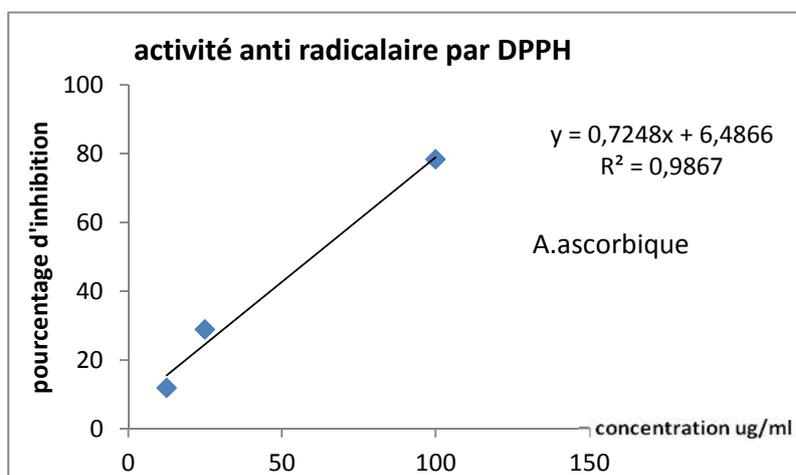
Z

- **Zenasni, L. (2014).** Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse de doctorat. Université Mohammed V-Agdal, Rabat. 155p.

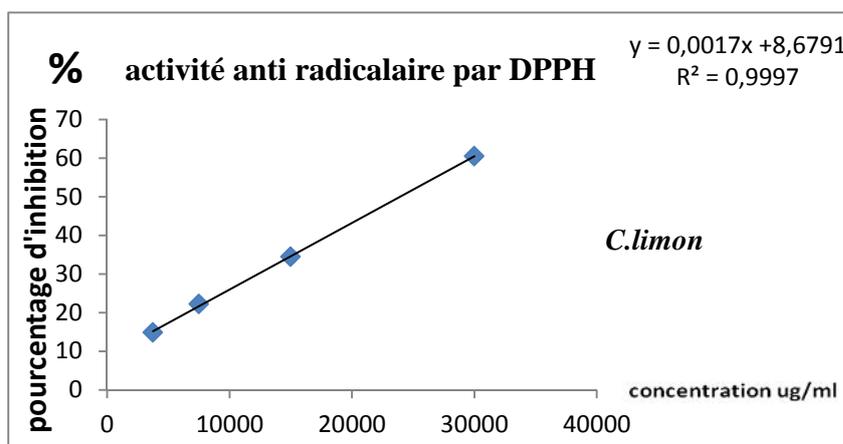
Annexes

		Densité optique (absorbance)			
[Concentration]		Activité antioxydante		Activité anti inflammatoire	
		DPPH	Pouvoir réducteur	Protection d'albumine	Anti hémolytique
Control	-	0,32	-	0,282	0,320
<i>C.limon</i>	30mg/ml	0,158±0,01	0,345 ± 0,03	-	-
<i>C.limon</i>	15mg/ml	0,181±0,002	0,224 ± 0,03	0,104±0,003	0,158±0,01
<i>C.limon</i>	7,5mg/ml	0,2±0,006	0,203 ± 0,01	0,116±0,003	0,181±0,002
<i>C.limon</i>	3,75mg/ml	0,28±0,01	0,182 ± 0,005	0,189±0,001	0,200±0,006
<i>C.limon</i>	1,87mg/ml	-	-	0,213±0,005	0,280±0,01

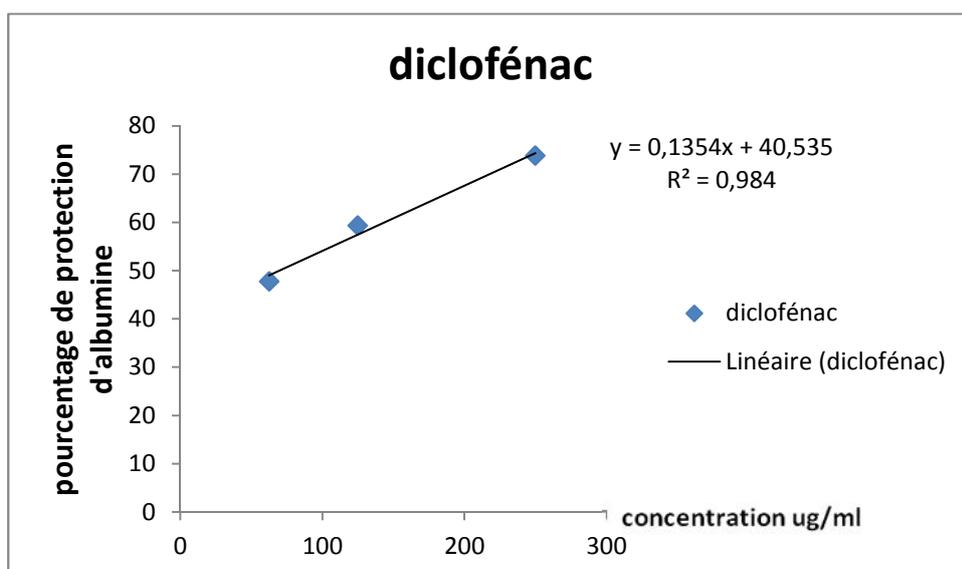
Annexe 1: Les absorbances de différentes concentrations d'huile essentielle de *C.limon*.



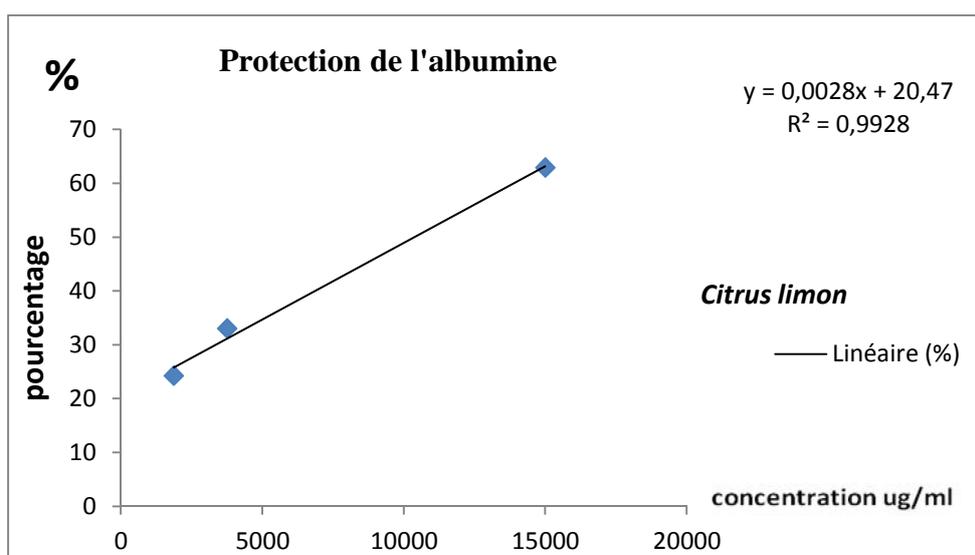
Annexe 2: Présentation de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique.



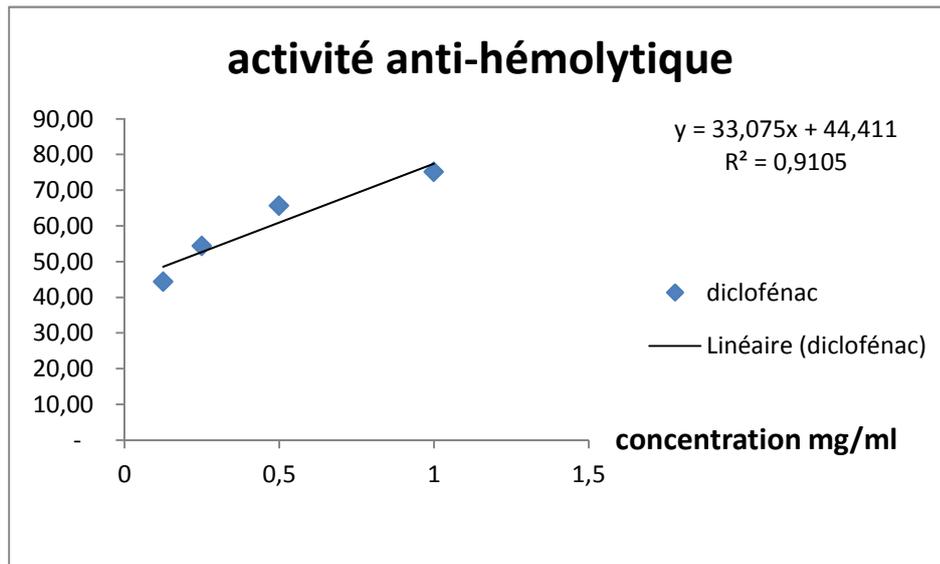
Annexe 3: Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle de *Citrus limon*.



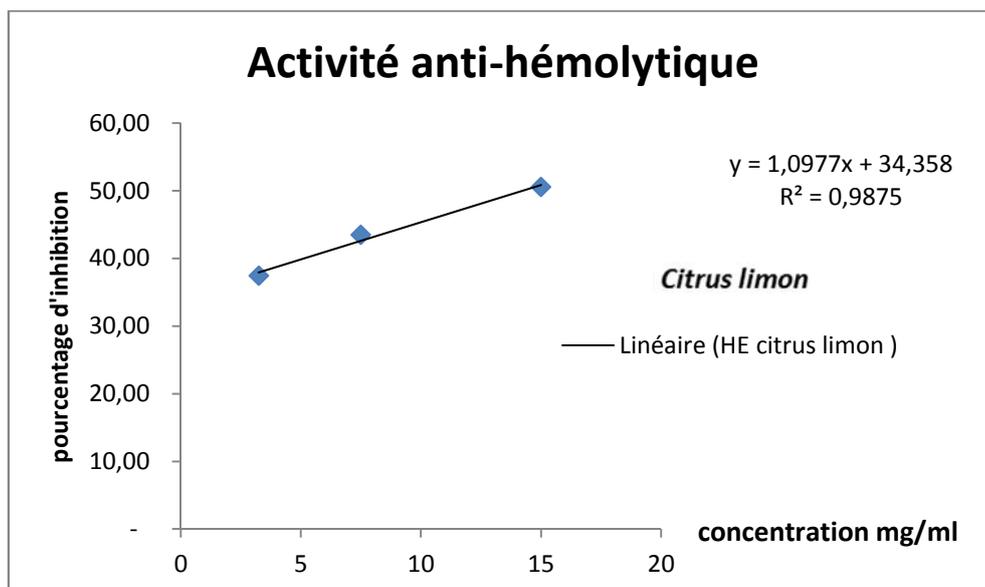
Annexe 4: Présentation de l'activité anti inflammatoire de standard.



Annexe 5: Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'huile essentielle de *Citrus limon*.



Annexe 6: Présentation de l'activité anti hémolytique de standard.



Annexe 7: Evaluation de l'activité anti hémolytique d'huile essentielle de *Citrus limon*.

Résumé: le but de ce travail est l'évaluation de l'activité antioxydante et anti inflammatoire *in vitro* de l'huile essentielle de l'écorce d'une espèce aromatique, *Citrus limon* appartenant à la famille des *Rutacées*. La première partie de cette étude concerne l'extraction d'huile essentielle de *Citrus limon* par l'hydrodistillation et la deuxième partie consiste à l'étude de son activité antioxydante et anti inflammatoire. La méthode de la réduction du radical DPPH^{*} et la réduction du fer (FRAP) indiquent que l'écorce de *C.limon* a une activité antioxydante plus au moins importante. En outre, l'activité anti inflammatoire *in vitro* est étudiée par la méthode de l'inhibition de la dénaturation de l'albumine et la stabilisation membranaire d'un model érythrocytaire, l'huile essentielle de *C.limon* a donné un pourcentage d'inhibition important confirmant sa propriété anti inflammatoire.

Mots clés : antioxydante, anti inflammatoire, huile essentielle, *Citrus limon*, *Rutacées*.

Abstract: the aim of this work is to evaluate the *in vitro* antioxidant and anti inflammatory activity of the essential oil of *Citrus limon* peel, belonging to the *Rutaceae* family. The first part of this study concerns the extraction of essential oil of *Citrus limon* by hydrodistillation, the second part consists the study of the antioxidant and anti-inflammatory activity of essential oil. The method of reduction the DPPH radical and reduction of iron (FRAP) indicates that the *C. limon* peel has a more or less important antioxidant activity. In addition, the anti inflammatory activity *in vitro* is studied by the method of inhibition of albumin denaturation and the membrane stabilization of an erythrocyte model significant inhibition confirming its anti-inflammatory property.

Keywords: antioxidant, anti-inflammatory, essential oil, *Citrus limon*, *Rutaceae*.

: الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للالتهاب في المختبر لزيت
لحاء الأنواع العطرية, حمضيات ليمون عائلة سذابية. الجزء الأول من هذه الدراسة تـ
الزيوت الأساسية من حمضيات ليمون عن طريق التقطير بالبخار والجزء الثاني هو دراسة النشاط
للتهاب زيت . طريقة خفض جذري • DPPH و تخفيض الحديد FRAP شير إلى أن
حمضيات ليمون لديه نشاط مضاد أكثر إلى أقل أهمية.
للتهاب في المختبر تم نه طريق تثبيط تمسخ
الزيت الاساسي لحمضيات ليمون قدم نسبة مئوية من تثبيط كبير يؤكد خاصيته المضادة للالتهاب.
: للتهاب الزيت ، الحمضيات ليمون، سذابية.