

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologie



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Biochimie

Par

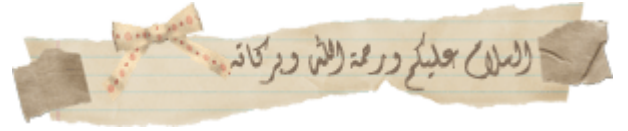
BENGAG AMINE

Thème :

Activité anti-inflammatoire, antibactérienne et antioxydante des essences de *Citrus* de la région de Chlef

Soutenue le Juillet 2021 devant le jury composé de :

KOICHE Malika	Professeur	UHB Chlef	Présidente
ALLEM Rachida	Professeur	UHB Chlef	Rapporteur
CHADLI Rabah	Professeur	Université de Mostaganem	Examineur
MEHDADI Zoheir	Professeur	Université de Sidi Bel Abbes	Examineur
ABBOUNI Bouziane	Professeur	Université de Sidi Bel Abbes	Examineur
MEZIANE Malika	MCA	UHB Chlef	Examinatrice



Mentions Spéciales

Au nom de الله, Le Clément, Le Miséricordieux

« Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est Toi l'Omniscient, le Sage » : Sourate 2, Verset 32 (Saint Coran).

Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète Mohamed, Paix et Salut sur lui, ainsi que ses compagnons, pour nous avoir apporté une religion comme l'Islam

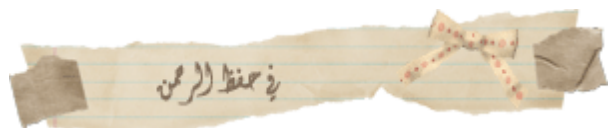
A mon père Djelloul: Les mots me manquent pour t'exprimer toute ma reconnaissance. J'ai toujours trouvé auprès de toi, compréhension et soutien. Tes prières et tes conseils ne m'ont jamais fait défaut tout au long de mes études. Trouve à travers ce modeste travail, la récompense de ton affection, de tes sacrifices et de ta patience.

A ma mère Fatima: Omi, que tes sacrifices, tes peines et tes privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail qui est aussi le fruit de ta persévérance, de ton courage et surtout de ta patience. Je voudrais à travers ce modeste travail, te rendre un hommage mérité et te dire combien je suis fier de l'éducation que tu m'as donnée. Puisse le Tout Puissant nous accorder de t'avoir encore longtemps auprès de nous pour que tu puisses bénéficier de l'ombre que tu as si jalousement protégé et entretenu.

A ma femme warda et sa famille, mon fils mohamed islam, ma fille rayhana maram et mon fils qui n'est pas encore né: A force de courage et de persévérance, j'achève aujourd'hui un travail qui est aussi le vôtre. Ce travail est le fruit de ton amour, ton soutien moral et tes encouragements. Que Dieu nous aide à atteindre nos objectifs dans la vie.

A mes frères: Mohamed et Abdelatif et abdelmoiz: Puisse l'affection, la confiance et la solidarité qui nous animent rester inébranlables. Fraternellement !

A ma sœur : Hakima, et sa fille et son mari Mansour : Vous m'avez beaucoup soutenu à travers vos conseils, vos encouragements. Trouvez à travers ce modeste travail, l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon profond respect.



Remerciements

A l'Université de Hassiba Ben Bouali - CHLEF : pour la qualité de la formation reçue, le soutien matériel et financier.

A Mme ALLEM Rachida: J'ai eu le privilège de bénéficier de votre aide tout au long de ce travail. Je garderai de vous le souvenir d'un maître disponible, toujours à l'écoute. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée ce qui m'a permis de mener à bien ce travail. Veuillez recevoir en retour mes sentiments de profonde reconnaissance. Que le Tout Puissant vous aide à réaliser vos projets les plus chers et vous accorde longue vie. Respectueusement.

A Mme Koïche Malika pour avoir assuré la présidence du jury de cette thèse. Pour toute l'aide que vous m'avez apportée, les discussions fructueuses qu'on a eues, et votre grande gentillesse.

A Mr MEHDADI Zohéir je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour l'honneur qu'il m'a fait de prendre de son temps précieux pour juger ce travail.

Mes remerciements vont aussi au membre du jury le Professeur A Mr CHADLI Rabah qui donnera à mon travail une valeur ajoutée à travers ses recommandations si importantes dont je serai très reconnaissant.

J'aimerais également remercier Mr ABBOUNI Bouziane pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'en être examinateur et surtout pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

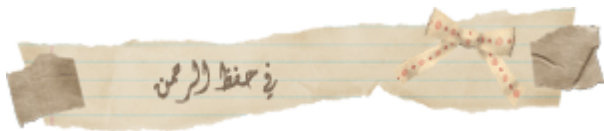
Mes remerciements vont également à la Doyenne MEZIANE Malika pour avoir accepté de se joindre à mon jury de thèse, je la remercie vivement pour son soutien.

A MEZIANE Malika et ALI HAIMOUD Safia Nul remerciement ne serait suffisant pour vous exprimer ma gratitude, mon amitié et mon profond respect.

A tout le personnel du laboratoire SAIDAL pour leur disponibilité et le soutien moral et pour l'esprit de collaboration et de courtoisie.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Très cordialement.



Liste des abréviations

AFNOR : Agence française de normalisation
ANOVA : Analyse Of Variance
ATCC: American Type Culture Collection.
% AUG : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte
% INH : Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens
APR: pouvoir antiradicalaire relatif
ATCC : American type culture collection
BHA : Butylhydroxyanisole
C. : *Citrus*
CASFM : comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
CCM : chromatographie sur couche mince
CMI : concentration minimale inhibitrice
CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
FOV : fraction organiques volatile
COX : cyclo-oxygénase
DL₅₀ : dose létale à 50%
DMSO : diméthylsulfoxyde
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DSA : Direction des services agricoles
EOA : espèces oxygénées activées.
e.s.m. : erreur standard à la moyenne
FAO : Food and Agriculture Organization
FMC : Food Machinery Corporation
FRAP: Ferric reducing-antioxidant power
GN : Gélose Nutritive
HE : Huile essentielle
IC₅₀: Concentration Inhibitrice à 50 %
IP : Intrapéritoniale
IL : Interleukine
ISO : Organisation internationale de normalisation
IV : Intraveineuse
MH : Mueller Hinton
NF- κ B : kappa B du facteur nucléaire.
NMRI : Naval Medical research institute
NO: oxyde nitrique
NOSi : l'oxydes nitriques synthase inducible
OMS : Organisation mondiale de santé
PGE : Prostaglandine
Qx : Quintaux
TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter
UFC : unité formant les colonies
VO : Voie orale
WHO : World Health Organization

Liste des figures

Figure 01	Classification des agrumes et origine génétique des <i>Citrus</i> cultivés	05
Figure 02	Schéma de la fleur des agrumes	08
Figure 03	Coupe transversale d'une orange	09
Figure 04	Localisation cellulaire des principales voies de synthèse des FOV chez les végétaux	13
Figure 05	Parties de plantes permettant la biosynthèse et la sécrétion des huiles essentielles	14
Figure 06	Les principaux constituants des HE	15
Figure 07	Méthodes d'extraction des huiles essentielles	16
Figure 08	Appareils d'hydrodistillation	17
Figure 09	Appareils d'entraînement à la vapeur d'eau	17
Figure 10	Pelatrice à gauche et centrifugeuse à droite	18
Figure 11	Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line	19
Figure 12	Principe d'une extraction par CO ₂ supercritique	19
Figure 13	Schéma de l'extraction par Flash Détente	20
Figure 14	Extraction assistée par micro-onde	21
Figure 15	Schéma du potentiel antioxydant et le mécanisme d'action des <i>Citrus</i>	29
Figure 16	Les variétés de <i>citrus</i> étudiées	31
Figure 17	Localisation des régions de récolte de la wilaya de Chlef	32
Figure 18	Cycle complet de récupération des essences des <i>Citrus</i> à TELOIZE	34
Figure 19	Schéma récapitulatif de la caractérisation des essences	36
Figure 20	Appareil de CG/SM	38
Figure 21	Injection de la carragénine à 1% sous plantaire de la patte postérieure de la souris	39
Figure 22	Injection IP des essences ou le déclophénac de sodium	40
Figure 23	Détermination à l'aide d'un pied à coulisse de la patte au niveau métatarsien	40
Figure 24	Schéma récapitulatif du dosage de l'activité antioxydante du radical DPPH	42
Figure 25	Protocole de la variation du % d'inhibition par DPPH en fonction de la concentration	43
Figure 26	Protocole du test d'activité antibactérien	49
Figure 27	Détermination de la CMI sur milieu solide	51
Figure 28	La bioautographie des essences étudiées par β-carotène et DPPH	69
Figure 29	Concentration inhibitrice des essences de <i>Citrus</i> , du Quercetine et BHA par DPPH	71
Figure 30	Pouvoir antiradicalaire des essences de <i>Citrus</i> , du Quercetine et BHA	73
Figure 31	La variation du % d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration	75
Figure 32	Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de <i>C. aurantium</i> vis à vis des souches pathogènes testées	79
Figure 33	Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de <i>C. sinensis</i> vis à vis des souches pathogènes testées	80
Figure 34	Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de <i>C. paradisi</i> vis-à-vis des souches pathogènes testées	81
Figure 35	Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de <i>C. reticulata</i> vis à avis des souches pathogènes testées	82
Figure 36	Taux de mortalité après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de <i>C. aurantium</i>	92
Figure 37	Taux de mortalité après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de <i>C. paradisi</i>	93
Figure 38	Taux de mortalité après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de <i>C. sinensis</i>	93
Figure 39	Taux de mortalité après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de <i>C. reticulata</i>	94
Figure 40	La DL ₅₀ après injection par différentes voies des essences de différentes variétés de <i>Citrus</i>	95

Annexes

- Figure 41** Photo de d'un réfractomètre
- Figure 42** Photo de polarimètre
- Figure 43** Séparation de l'essence après décantation et centrifugation
- Figure 44** Essences obtenues par expression à froid
- Figure 45** Le chromatogramme GC / MS de *C.aurantium*
- Figure 46** Le chromatogramme GC / MS de *C. sinensis*
- Figure 47** Le chromatogramme GC / MS de *C. reticulata*
- Figure 48** Le chromatogramme GC / MS de *C. paradisi*
- Figure 49** Aspect des colonies des souches étudiées sur géloses sélectives
- Figure 50** Illustration des résultats de l'identification des souches par Api 20E
- Figure 51** Les résultats de l'antibiogramme des souches étudiées (1)
- Figure 52** Les résultats de l'antibiogramme des souches étudiées (2)

Liste des tableaux

Tableau 01	Composition variétale des agrumes en Algérie	10
Tableau 02	Evaluation des superficies, rendement et productions des agrumes à Chlef	11
Tableau 03	Les différents espèces de <i>Citrus</i>	32
Tableau 04	La source des bactéries pathogènes étudiées	33
Tableau 05	Milieux d'identification et conditions de croissance des souches	45
Tableau 06	La lecture d'une galerie API [®] 20 ^E	46
Tableau 07	Le rendement en essence des <i>Citrus</i>	55
Tableau 08	Caractérisation de l'essence de <i>Citrus sinensis</i>	57
Tableau 09	Caractérisation de l'essence de <i>Citrus aurantium</i>	57
Tableau 10	Caractérisation de l'essence <i>Citrus paradisi</i>	58
Tableau 11	Caractérisation de l'essence de <i>Citrus reticulata</i>	58
Tableau 12	Composées chimiques(%) de l'essence de <i>C. aurantium</i> par CG/SM	60
Tableau 13	Composées chimiques(%) de l'essence de <i>C. reticulata</i> par CG/SM	61
Tableau 14	Composition chimiques (%) de l'essence de <i>C. sinensis</i> par CG/SM	62
Tableau 15	Composition chimiques (%) de l'essence de <i>C. paradisi</i> par CG/SM	63
Tableau 16	Pourcentages d'inhibition de l'œdème en fonction du temps	66
Tableau 17	Valeurs de l'activité antioxydante des essences des <i>Citrus</i> par le test de DPPH et ARP	70
Tableau 18	Aspect des colonies des souches étudiées sur géloses sélectives	76
Tableau 19	Caractères microscopiques des différentes bactéries étudiées	76
Tableau 20	L'antibiogramme des souches étudiées	77
Tableau 21	Les valeurs de CMI (μ l d'HE/ml) de <i>C. aurantium</i>	88
Tableau 22	Les valeurs de CMI (μ l d'HE/ml) de <i>C. sinensis</i>	89
Tableau 23	Les valeurs de CMI (μ l d'HE/ml) de <i>C. reticulata</i>	90
Tableau 24	Les valeurs de CMI (μ l d'HE/ml) de <i>C. paradisi</i>	91
Annexes		
Tableau 25	Trois répétitions de l'activité antioxydante par le test de DPPH	
Tableau 26	Trois répétitions de l'activité antioxydante par le test d'ARP	
Tableau 27	Le test d'ANOVA pour des données répétées	
Tableau 28	Diamètres des zones d'inhibitions de <i>C. paradisi</i> sur les bactéries pathogènes	
Tableau 29	Diamètres des zones d'inhibitions de <i>C. reticulata</i> sur les bactéries pathogènes	
Tableau 30	Diamètres des zones d'inhibitions de <i>C. aurantium</i> sur les bactéries pathogènes	
Tableau 31	Diamètres des zones d'inhibitions de <i>C. sinensis</i> sur les bactéries pathogènes	
Tableau 32	Le taux de mortalité après injection par différentes voies à différentes concentrations des essences de différentes variétés de <i>Citrus</i>	

Résumé:

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à la valorisation des zestes de quatre espèces de *Citrus* provenant de la région de Chlef. L'analyse par CG/SM des essences a révélé une abondance de composés monoterpéniques dominés par la présence du D- Limonène (94.75 % pour *C. reticulata*, 87.38 % pour *C. sinensis*, 86.29% pour *C. aurantium* et 82.98% pour *C. paradisi*).

Pour l'étude de l'activité antioxydante, nous avons utilisé la bioautographie par β - carotène et par DPPH. La valeur IC₅₀ est classée dans l'ordre de 1,9068±0,0912 mg/ml pour *C. reticulata*, 6,2086±0,0308 mg/ml pour *C. aurantium*, 12,7662±0,0736 mg/ml pour *C. paradisi*, la quercétine (IC₅₀ 15,9938±0,01284 mg/ml), 19,1567±0,0499 mg/ml pour *C. sinensis*, et le BHA (IC₅₀ 21,9938±0,01284 mg/ml). Les résultats obtenus montrent que les essences de *Citrus* réduisent de façon significative le DPPH, ceci pourrait être dû à la présence des monoterpènes, en particulier le β -pinène et le limonène dans ces essences.

L'activité anti-inflammatoire de ces essences a été testée avec la dose de 3 et 4 ml/kg par voie IP après avoir provoqué l'œdème de la patte des souris (MORINI) par la carraghénine. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux du traitement de référence (diclofenac de sodium). L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que ces essences présentent un effet anti-inflammatoire hautement significatif à une dose de 50 mg/kg du poids corporel, après une durée de 120 min pour la espèce de *C. aurantium*, après 150 min pour *C. paradisi* et *C. sinensis*, et après une durée de 180 min pour *C. reticulata*; les composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et leur effets synergiques peuvent justifier cette activité.

Parmi les 17 bactéries pathogènes testées, nous avons noté que l'essence de *C. sinensis* a montré une activité antibactérienne nettement plus prononcée pour les deux souches: *S. aureus* ATCC[®]29213 et ATCC[®]25923 (24 mm de diamètre) et pour *S. epidermidis* (32 mm de diamètres). Six souches pathogènes sont résistantes. L'essence de *C. aurantium* est un agent antibactérien pour la plupart des souches de collection avec un diamètre de zone d'inhibition de 22 mm. *B. subtilis* ATCC[®] 6633, *S. aureus* ATCC[®] 25923 sont très sensibles. Cependant, *E. coli* ATCC[®]25922, *E. feacalis* ATCC[®] 29212, *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853 sont résistantes à cette essence. Nous avons noté aussi que 50 % des souches testées sont sensibles à l'essence de *C. paradisi*. Un diamètre de 21 mm a été constaté pour les extrêmement sensibles (*S. aureus* ATCC[®]29213, *P. vulgaris* et *Streptococcus* sp.). L'essence de *C. reticulata* a montré une activité antibactérienne positive vis-à-vis de 64 % des souches testées. Les bactéries qui sont très sensibles (*S. aureus* ATCC[®]25923, *S. epidermidis* et *P. vulgaris*) présentent un diamètre supérieur à 20 mm, et une activité antibactérienne négative a été constatée vis-à-vis de 36% des souches étudiées. Cependant, l'activité antibactérienne des essences des *Citrus* étudiées pourrait, en partie, être associée aux composants majoritaires (Limonène, Caryophyllène, β -myrcène, β pinène, α pinène).

L'administration de l'essence de *Citrus* à la dose de 1% avec différentes voies (IV, IP, VO) prévient de façon significative respectivement la DL₅₀ de 2920, 3560 et 4360 mg/kg avec l'essence de *C. aurantium*, 3400, 3720 et 4520 mg/kg avec *C. reticulata*, 2600, 2600 et 3080 mg/kg avec *C. paradisi* et 2760, 3560 et 4040 mg/kg avec *C. sinensis*. A ces doses, l'essence des *Citrus* s'est révélée faiblement toxique. L'évaluation de la DL₅₀ de chaque espèce montre que l'administration par voie orale est très toxique par rapport aux autres voies et que l'essence de *C. reticulata* est très toxique par les trois voies (IV, IP et orale).

Ces résultats montrent que ces essences constitueraient une source potentielle de substances naturelles qui pourraient avoir une importante application dans le domaine agro-alimentaire et dans l'industrie pharmaceutique.

Mots clés: *Citrus*, CG/SM, potentiel antioxydant, activité antibactérienne, activité anti-inflammatoire, Toxicité.

ABSTRACT

In the present study we are interested in the valuation of the bark of some varieties of *Citrus* coming from the region of Chlef. The chromatographic (GC/MS) analysis of *Citrus* essence demonstrated an abundance of monoterpene compounds mainly limonene (94.75% for *C. reticulata*, 87.38% for *C. sinensis*, 86.29% for *C. aurantium* and 82.98% for *C. paradisi*).

For the study of antioxidant activity, we used β -carotene and DPPH bioautography. The IC_{50} value is classified in the order of 1.9068 ± 0.0912 mg/ml for *C. reticulata*, 6.2086 ± 0.0308 mg/ml for *C. aurantium*, 12.7662 ± 0.0736 mg/ml for *C. paradisi*, quercetin (IC_{50} 15.9938 ± 0.01284 mg/ml), 19.1567 ± 0.0499 mg/ml for *C. sinensis*, and BHA (IC_{50} 21.9938 ± 0.01284 mg/ml). The results obtained show that *Citrus* essences significantly reduce DPPH, this could be due to the presence of monoterpenes, in particular β -pinene and limonene in these essences.

The anti-inflammatory activity of these essences was tested with the dose of 3 and 4 ml/kg by the IP route after causing edema of the paws of mice (MORINI) by carrageenin. The results obtained were compared with those of the reference treatment (diclofenac sodium). The evaluation of the percentage of inhibition shows that these essences exhibit a highly significant anti-inflammatory effect at a dose of 50 mg / kg of body weight, after a duration of 120 min for the variety of *C. aurantium*, after 150 min for *C. paradisi* and *C. sinensis*, and after a duration of 180 min for *C. reticulata*; the major compounds (alcohols, phenols, terpene and ketone compounds) and their synergistic effects can justify this activity.

Among the 17 pathogenic bacteria tested, we noted that the essence of *C. sinensis* showed a markedly more pronounced antibacterial activity for the two strains: *S. aureus* ATCC®29213 and ATCC®25923 (24 mm in diameter) and for *S. epidermidis* (32 mm in diameter). Six pathogenic strains are resistant. The essence of *C. aurantium* is an antibacterial agent for most collection strains with an inhibition zone diameter of 22 mm. *B. subtilis* ATCC® 6633, *S. aureus* ATCC® 25923 are very sensitive. However, *E. coli* ATCC®25922, *E. faecalis* ATCC® 29212, *P. aeruginosa* ATCC® 27853 are resistant to this species. We also noted that 50% of the strains tested are sensitive to the essence of *C. paradisi*. A diameter of 21 mm was observed for the extremely sensitive (*S. aureus* ATCC®29213, *P. vulgaris* and *Streptococcus* sp.). The essence of *C. reticulata* showed positive antibacterial activity against 64% of the strains tested. Bacteria which are very sensitive (*S. aureus* ATCC®25923, *S. epidermidis* and *P. vulgaris*) have a diameter greater than 20 mm, and negative antibacterial activity was observed against 36% of the strains studied. However, the antibacterial activity of the *Citrus* essences studied could, in part, be associated with the major components (Limonene, Caryophyllene, β -myrcene, β pinene, α pinene).

The administration of the essence of *Citrus* at a dose of 1% with different routes (IV, IP, VO) significantly prevents the LD_{50} of 2920, 3560 and 4360 mg / kg respectively with the essence of *C. aurantium*, 3400, 3720 and 4520 mg / kg with *C. reticulata*, 2600, 2600 and 3080 mg / kg with *C. paradisi* and 2760, 3560 and 4040 mg / kg with *C. sinensis*. At these doses, the essence of *Citrus* was shown to be of low toxicity. Evaluation of the LD_{50} of each variety show that oral administration is very toxic compared to other routes and that the essence of *C. reticulata* is very toxic by all three routes (IV, PI and oral).

These results show that these essences would constitute a potential source of natural substances which could have an important application in the food industry and in the pharmaceutical industry.

Keywords: *Citrus*, GC/MS, Antioxidant potential, antibacterial effect, anti-inflammatory activity, Toxicity.

الملخص:

نحن مهتمون في هذه الدراسة بتثمين لحاء بعض أنواع الحمضيات القادمة من منطقة الشلف. لذلك أجرينا دراسة حسية وكيميائية فزيائية وجزئية مكنتنا من إثبات ثراء هذه الزيوت الطيارة في المركبات النشطة بيولوجياً.

أظهر تحليل المكونات الكيميائية بواسطة كروماتوغرافيا GC / MS للأنواع وفرة من مركبات المونوتربين التي يغلب عليها وجود الليمونين 94.75% لـ *C. reticulata* و 87.38% لـ *C. sinensis* و 86.29% لـ *C. aurantium* و 82.98% لـ *C. paradisi*

لدراسة نشاط مضادات الأكسدة ، استخدمنا طريقة التبييض بيتا كاروتين واختبار DPPH. قيمة IC_{50} مرتبة بالترتيب 1.9068 ± 0.0912 ميلغرام/مل لحمضيات صنف *reticulata* ، 6.2086 ± 0.0308 ميلغرام/مل لحمضيات *aurantium* ، 12.7662 ± 0.0736 ميلغرام/مل لحمضيات *paradisi* ، كيرسيتينين 15.9938 ± 0.01284 ميلغرام/مل و 19.1567 ± 0.0499 ميلغرام/مل لحمضيات *sinensis* ، أقل من 21.9938 ± 0.01284 BHA ميلغرام/مل. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن خلاصات الحمضيات تقل بشكل كبير من DPPH الذي أكدته طريقة bioautographic ويمكن أن تعزى إلى التأثير التآزري للمركبات الكيميائية الحيوية النشطة الموجودة في هذه الزيوت الطيارة مثل *monoterpenes* ، على وجه الخصوص بيتا-بينين والليمونين في هذه الزيوت الطيارة.

تم اختبار النشاط المضاد للالتهابات لهذه الزيوت الطيارة بجرعة 3 و 4 مل/كغ داخل الصفاق بعد التسبب في وذمة في مخلب الفئران (MORINI) بواسطة الكاراجينين. تمت مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع تلك الخاصة بالمعالجة المرجعية. يُظهر تقييم نسبة التثبيط أن هذه الزيوت الطيارة تظهر تأثيراً كبيراً مضاداً للالتهابات بعد فترة 120 دقيقة لنوع من الحمضيات *aurantium* ، وبعد 150 دقيقة للنوعين الآخرين من الحمضيات *paradisi* و *Sinensis* ، وبعد فترة 180 دقيقة لنوع من الحمضيات *reticulata* ، تقلل خلاصات الحمضيات الوذمة بشكل كبير. يمكن تبرير المركبات الرئيسية (الكحولات والفينولات والتيربين ومركبات الكيتون) وتأثيراتها التآزرية لهذا النشاط.

من بين 17 نوعاً من البكتيريا المسببة للأمراض التي تم اختبارها، لاحظنا أن الزيوت الطيارة نوع *sinensis* أظهر نشاطاً مضاداً للبكتيريا أكثر وضوحاً للسلاطين *S. aureus ATCC®29213* و *ATCC®25923* (قطر 24 ملم) من القطر و *S. epidermidis* (قطرها 32 مم) ستة سلالات مرضية مقاومة. مجموعة الزيوت الطيارة نوع *aurantium* هو عامل مضاد للجراثيم لمعظم سلالات المجموعة التي يبلغ قطر منطقة التثبيط فيها 22 مم. *B. subtilis ATCC®. 6633* و *S. aureus ATCC® 25923* حساسة للغاية. ومع ذلك، فإن *E. coli ATCC®25922* ، *E. faecalis ATCC® 29212* ، *P. aeruginosa ATCC® 27853* ، مقاومة لهذه الأنواع. لاحظنا أيضاً أن 50% من السلالات المختبرة حساسة للزيوت الطيارة نوع *paradisi*. لوحظ أن قطرها 21 مم بالنسبة للحساسية الشديدة *S. aureus ATCC®29213* ، *P. vulgaris* و *Streptococcus sp.* أظهرت خلاصة نوع *reticulata* نشاطاً إيجابياً مضاداً للبكتيريا مقابل 64% من السلالات المختبرة، 27% منها. البكتيريا شديدة الحساسية *S. aureus ATCC®25923* ، *S. epidermidis* و *P. vulgaris* لها قطر أكبر من 20 ملم، ولوحظ نشاط سلبي مضاد للبكتيريا مقابل 36% من السلالات المدروسة.

إن إعطاء خلاصة الحمضيات بجرعة 1% بطرق مختلفة من الوريد، طريق داخل الصفاق، عن طريق الفم إلى الفئران يمنع بشكل كبير LD_{50} (3400 و 3720 و 4520 مغ / كغ) بالنسبة لزيت حمض *reticulata* ، LD_{50} (2600 و 2600 و 3080 مغ / كغ) فيما يتعلق لزيت حمض *paradisi* ، الجرعة المميتة LD_{50} (2920 و 3560 و 4360 مغ / كغ) بالنسبة لزيت حمض *aurantium* . ولزيت حمض *Sinensis* LD_{50} (2760 و 3560 و 4040 مغ / كغ). في هذه الجرعات، تبين أن زيت الحمضيات منخفض السمية. يُظهر تقييم الجرعة المميتة LD_{50} لكل صنف أن الإعطاء عن طريق الفم شديد السمية مقارنة بالطرق الأخرى وأن زيت حمض *aurantium* شديد السمية سواء عن طريق الوريد أو عن طريق الفم أو عن طريق داخل الصفاق مقارنة بالطرق الأخرى

تظهر هذه النتائج أن هذه الزيوت ستشكل مصدرًا محتملاً للمواد الطبيعية التي يمكن أن يكون لها تطبيق مهم في مجال الأغذية وفي مجال الأدوية.

الكلمات المفتاحية: الحمضيات، CG / MS ، مضادات الأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للالتهابات، تسمم.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	01
Première partie: Synthèse bibliographique	
CHAPITRE I : Les agrumes	
1. Systématique	04
2. Taxonomie des <i>Citrus</i>	05
3. Caractéristiques morphologiques des agrumes	07
3.1. Système racinaire	07
3.2. Partie aérienne	07
4. Aspect économique	09
4.1. A l'échelle mondiale	09
4.2. A l'échelle nationale	10
4.3. A l'échelle régionale	10
5. Valeurs nutritionnelles des <i>Citrus</i>	11
CHAPITRE II : Huiles essentielles des <i>Citrus</i>	
1. Définition	13
2. Origine et localisation des HE	13
3. Rôle physiologique	14
4. Les principes actifs des huiles essentielles	15
4.1. Les composés terpéniques	15
4.2. Les composés aromatiques	16
4.3. Autres composés d'origine diverses	16
5. Techniques conventionnelles d'extraction	16
5.1. Distillation – Evaporation	17
5.2. Méthodes d'extraction à froid	18
6. Extraction par des techniques innovantes	19
6.1. Extraction par des solvants supercritiques	19
6.2. Extraction par Détente Eclair (Flash–Détente)	20
6.3. Extraction par ultrasons	20
6.4. Extraction assistée par micro-ondes	21
7. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles	21
8. Relation structure – activité	22
CHAPITRE III : Activités biologiques des huiles essentielles	
1. Activité anti-inflammatoire	23
1.1. Toxicité des médicaments anti-inflammatoires	23
1.2. La bio thérapeutique anti-inflammatoire	24
1.3. Méthode de détermination de l'activité anti-inflammatoire	24

2. Activité antibactérienne	25
2.1. Toxicité et résistance microbienne aux antibiotiques	25
2.2. La bio thérapeutique antibactérienne	26
3. Activité antioxydante	27
3.1. La bio thérapeutique antioxydante	27
3.2. Méthode de détermination de l'activité antioxydante	28
3.3. Mécanisme d'action des <i>Citrus</i>	28
4. Toxicité	29
4.1. Toxicité des huiles essentielles	29
4.2. L'évaluation des effets toxiques	30

Deuxième partie : Etude expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

I. Matériel	
1. Matériel végétal	31
2. Matériel animal	32
3. Matériel d'étude de l'activité antibactérienne	33
II. Méthodes	
1. Le procédé d'extraction des essences des <i>Citrus</i>	34
2. Le rendement des essences des <i>Citrus</i>	35
3. Caractérisation organoleptiques et physico chimique des essences des <i>Citrus</i>	35
3.1. Mesure de la densité relative à 20°	36
3.2. Mesure de l'indice de réfraction	37
3.3. Mesure de l'indice d'acide	37
3.4. Mesure du pouvoir rotatoire	37
4. Détermination de la composition biochimique des essences des <i>Citrus</i>	38
5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des essences des <i>Citrus</i>	39
6. Estimation du potentiel antioxydant des essences des <i>Citrus</i>	41
6.1. Bioautographie	41
6.2. Dosage de l'activité anti-radicalaire du radical stable DPPH	41
6.3. Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration	42
6.4. L'expression des résultats	43
7. La mise en évidence de l'activité antibactérienne des essences des <i>Citrus</i>	44
7.1. Tests de confirmation des souches	44
7.1.1. Repiquage des bactéries pathogènes	44
7.1.2. Purification	44
7.1.3. Etude des caractères macroscopiques	45
7.1.4. Etude des caractères microscopiques	45
7.1.5. Etude des caractères biochimiques	45
7.2. L'antibiogramme des souches pathogènes	47
7.3. Tests de l'activité antibactérienne	48
7.3.1. Méthode de disque	48
7.3.2. La détermination de la CMI	50
8. Détermination de la toxicité aigue des essences des <i>Citrus</i>	52
8.1. Protocole	52
8.2. Observations	53
8.3. Expression des résultats	53
9. Analyses statistiques	54

CHAPITRE II : Résultats et discussion

1. Extraction des essences de <i>citrus</i> et leurs rendements	55
2. Caractérisation des essences extraites	56

2.1. Analyses physico- chimique et organoleptique	57
2.2. Détermination de la composition biochimique par CG/SM	59
3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des essences des <i>Citrus</i>	65
4. Estimation du pouvoir antioxydant des essences des <i>Citrus</i>	68
4.1. Bioautographie	68
4.2. Dosage de l'activité anti-radicalaire	70
4.3. Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration	74
5. La mise en évidence de l'activité antibactérienne des essences des <i>Citrus</i>	75
5.1. Etude des caractères macroscopiques	75
5.2. Etude des caractères microscopiques	76
5.3. L'antibiogramme des souches étudiées	77
5.4. Effet antibactérien de l'essence des <i>Citrus</i>	78
5.4.1. Effet antibactérien de l'essence du <i>C. aurantium</i>	78
5.4.2. Effet antibactérien de l'essence du <i>C. sinensis</i>	80
5.4.3. Effet antibactérien de l'essence du <i>C. paradisi</i>	81
5.4.4. Effet antibactérien de l'essence du <i>C. reticulata</i>	82
5.5. La détermination de la CMI	87
5.5.1. La CMI de l'essence du <i>C. aurantium</i>	88
5.5.2. La CMI de l'essence du <i>C. sinensis</i>	88
5.5.3. La CMI de l'essence du <i>C. reticulata</i>	89
5.5.4. La CMI de l'essence du <i>C. paradisi</i>	90
6. Détermination de la toxicité aigue des essences des <i>Citrus</i>	91
6.1. Taux de mortalité des différentes voies d'administration	91
6.2. La DL ₅₀ des différentes voies d'administration	94
Conclusion	97
Références bibliographiques	
Annexes	

L'intérêt pour les produits naturels connaît depuis quelques années une importance grandissante. Cet intérêt se manifeste par une demande croissante de produits naturels bioactifs dénués de tout effet nocif (Aboughe Angone et *al.*, 2015). Ainsi parmi les familles botaniques douées des propriétés curatives, il y'a les Rutacées principalement localisées dans les régions tropicales (Parray et *al.*, 2012). Le genre *Citrus* est caractérisé par la présence de nombreux composés bio actifs issus du métabolisme secondaire tels que les huiles volatiles (He et *al.*, 2010).

Les zestes de *Citrus* sont une matrice hautement valorisable vue sa richesse en ingrédients fonctionnels ayant des applications très variées dans les industries agroalimentaires, cosmétique, nutraceutique et dans les industries de production de biocarburant et de matériaux biodégradables (Ledesma Escobar et Luque De Castro, 2014; Rafiq, 2016). D'autre part, l'utilisation industrielle des huiles essentielles doit faire face au problème de la variabilité de leur composition et leur instabilité au stockage ainsi que leur volatilité (Li et *al.*, 2014).

La production mondiale en agrume est considérée comme l'une des plus importantes dans le domaine agricole (Torquato et *al.*, 2017). Dans notre pays, la culture des agrumes joue un rôle clé en économie et représente un segment stratégique.

La dynamique de marché des huiles essentielles est soutenue par une demande sans cesse croissante en ingrédients naturels, ce qui a poussé les industriels des secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique d'avantage à les intégrer dans leurs formulations. La substitution d'un produit de synthèse par une huile essentielle permet d'accroître la valeur ajoutée (Kerdudo et *al.*, 2014). D'autres parts, les huiles essentielles sont des substances très actives et par ailleurs elles peuvent être toxiques. Leur toxicité est liée à la présence de certains sites fonctionnels oxygénés (Viaud, 1993).

Les essences et les huiles essentielles de *Citrus* extraites à partir des différentes parties de la plante (fleur, pépin, feuilles, et zeste) ont été utilisées pendant longtemps en parfumerie, cosmétique, confiserie et en pharmaceutique (Sawamura, 2010; Ciriminna et *al.*, 2014; Boughendjioua et boughendjioua, 2017; Dosoky et Setzer, 2018). Les essences de *Citrus* issues par expression à froid contiennent des principes actifs naturels et non dénaturés ce qui permet de les exploiter dans le domaine pharmaceutique et biologique: activité

antimicrobienne, anti oxydante, anti-inflammatoire, antispasmodiqueetc (Watson, 2011; Bassolé et Juliani, 2012).

Selon l'organisation Mondiale de la Santé, l'émergence de nouvelles maladies infectieuses ces dernières années dans le monde (Spicuzza et *al.*, 2007) et le développement de résistances aux médicaments (Zhang et Yew, 2009) constituent aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement durable.

La recherche de nouvelles molécules actives et à large spectre d'action est devenue une nécessité (Okou, 2012; Haddouchi et *al.*, 2013). De même, le BHA et le BTH ont été avérés cancérigènes (Nessrien et Mohamed, 2007; Japon- Ho et *al.*, 2009; Rashid et *al.*, 2010; Olivero-Verbel et *al.*, 2010), ce qui augmente l'intérêt pour les antioxydants naturels (Karoui et Marzouk, 2013). D'autre part, Ces dernières années, l'activité antioxydante des agrumes et leurs rôles dans la prévention et le traitement de diverses maladies chroniques et dégénératives ont attiré de plus en plus d'attention (Zou et *al.*, 2016).

Le traitement de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules, bien qu'étant efficaces, présentent le plus souvent des effets indésirables (ulcères gastriques, actions immunosuppressives, intolérances, accidents cardiovasculaires...) (Gaziano et *al.*, 2006; Crouzille et Siebert, 2010).

De ce fait, il y a un grand intérêt mondial pour la recherche de nouvelles sources de substances d'origine végétale naturelles et surdouées d'activités anti-inflammatoires et/ou antioxydantes pour l'amélioration de la santé humaine tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèse (Raza et *al.*, 2009; Dongmo et *al.*, 2010; Niki, 2012) et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire (Durackova, 2008). Justement des études ont montré que les sous-produits des agrumes pourraient être une source d'antioxydants naturels (Barreca et *al.*, 2011; Ramful et *al.*, 2011; De Moraes Barros et *al.*, 2012).

Des études antérieures sur *Citrus reticulata* ont rapporté diverses propriétés telles l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antiprolifératif, hypoglycémique et insecticide (Hamdan et *al.*, 2016). Ainsi l'huile essentielle de *Citrus*

aurantium est connue pour ses propriétés anti-infectieuses, analgésiques, anesthésiantes, cicatrisantes, bactéricides et antiseptiques (Ghédira et Goetz, 2015).

Dans ce contexte, le principal objectif ciblé dans ce travail est de tester les essences de *Citrus* afin d'évaluer les différentes activités biologiques et pharmaceutiques. Pour atteindre cet objectif, il nous a semblé nécessaire de procéder expérimentalement à :

- L'extraction par expression à froid des zestes de *Citrus* de quatre variétés: *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* et *C. aurantium*;
- La détermination de quelques caractères organoleptiques et physico chimiques ;
- L'analyse quantitative et qualitative par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CG/SM) ;
- L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* ;
- L'étude du pouvoir antioxydant par la bioautographie par DPPH et β - carotène ; et par dosage.
- L'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et la déterminant de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces essences ;
- La détermination *in vivo* de la toxicité aiguë de ces essences ;
- La détermination des molécules bioactives responsables de ces activités biologiques et pharmaceutiques.

1. Systématique:

La classification des agrumes est un peu complexe mais elle est généralement la même jusqu'à la famille ; et commence à être plus diversifiée au-delà du genre. La classification la plus adaptée est celle de Swingle et Reece (1967) comme suit:

- ❖ **Division** : Embryophytes
- ❖ **Sous Division** : Angiospermes
- ❖ **Classe** : Dicotyledoneae
- ❖ **Sous classe** : Archichlonideae
- ❖ **Ordre** : Géraniale.
- ❖ **Famille** : Rutaceae.
- ❖ **Sous famille** : Aurantioideae.
- ❖ **Tribu** : Citreae.
- ❖ **Sous tribu** : Citrinae
- ❖ **Genre** : *Citrus*.

Les agrumes comprennent trois genres principaux: *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*. Toutefois, la majorité des agrumes appartiennent au genre *Citrus* (Benedicte et Michel, 2011).

2. Taxonomie des *Citrus* :

La taxonomie du genre *Citrus* est assez complexe et confuse, du fait de nombreuses hybridations inter et intra-spécifiques (Nicolosi et *al.*, 2000). La classification établie par Tanaka (1977) élève au rang d'espèce de nombreux hybrides (162 espèces référencées), tandis que celle de Swingle et Reece (1967) n'en distingue que seize (Barboni, 2006).

Des études plus récentes portant sur la diversité des caractères morphologiques (Ollitrault et *al.*, 2003), de l'analyse des métabolites secondaires (Fanciullino et *al.*, 2006) et primaires (Luro et *al.*, 2011) ont montré que la diversité phénotypique des agrumes comestibles résulte principalement de la différenciation des quatre taxons de base. Les études réalisées à l'aide de marqueurs moléculaires (Garcia-Lor et *al.*, 2012; Ollitrault et *al.*, 2012) ont confirmé le rôle central joué par ces quatre taxons de base (Figure 01).

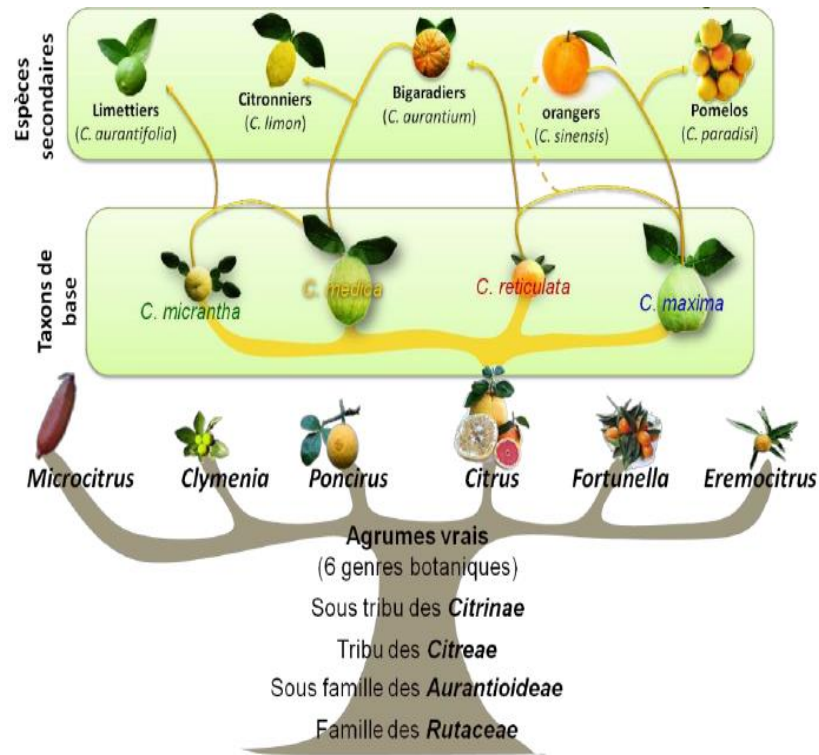


Figure 01: Classification des agrumes et origine génétique des *Citrus* cultivés (Khefifi, 2015)

Botaniquement, le genre *Citrus* englobe les arbres à feuilles persistantes de la famille des *Rutacées* (M'Hiri, 2015). Les espèces appartenant à ce genre (Hanke et Flachowsky, 2010) sont les suivantes:

➤ **Les Oranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**

C'est un hybride naturel, issu du croisement entre le mandarinier (*Citrus reticulata*) et le pomelo (*Citrus maxima*) (Nicolosi et al., 2000). Les principaux groupes sont:

- Les oranges blondes dont les variétés sont: Salustiana, Hamlin, Cedenera, Shamouti et Valencia late.
- Les oranges sanguines dont les variétés sont: Double fine améliorée, Moro et Tarocco.
- Les oranges sans acidité dont les variétés sont : Réal, Lima.

➤ **Les Bigarades (*Citrus aurantium* L.)**

Elles se divisent en deux classes: Variétés d'oranges, Hybrides d'oranges amères.

➤ **Les mandarines (*Citrus reticulata* Blanco.)**

- Les principales variétés de mandarines: Mandarine (*Citrus reticulata* Blanco.), Mandarine commune (*Citrus reticulata* Ponkan), Clémentine, Tangerine Satsumas (*Citrus unshin*), Mandarines méditerranéennes Willowleaf (*Citrus deliciosa*), Mandarine king (*Citrus nobilis*).
- Les principales variétés hybrides sont : Hybrides Tangelo x Clémentine, Hybrides King x Mandarine méditerranéenne (Willowleaf), Hybrides Tangerine x Willowleaf x Tangors .

➤ **Les Citrons (*Citrus limon* L. Burm f.)**

- Les principales variétés sont: Bears sicilienne, Berna verna, Eureka panachée, Primofiori Fino, Mesero, Santa Teresa, Citron sans pépins, Villa Franca (Lousert, 1989).
- Les principaux hybrides sont: Citron Volkamer (*Citrus volkameriana*), Limetta (*Citrus limetta*), Millsweet limetta, Citron Poire (*Citrus lumia*), Pomme d'Adam (*Citrus lumia* var.), Citron Galgal (*Citrus pseudolimon*), Citron Pondersa (*Citrus pyriformis*), Karna (*Citrus karna*), Citron Rough (*Citrus jambhiri*), Vangasay (*Citrus jambhiri*), Citron Meyer (*Citrus meyerii*), Citron neige (*Citrus kulu*), Yuzu (*Citrus junos*).

➤ **Les Limes (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle)**

Les variétés les plus importantes sont: Lime mexicaine, Lime persique, Lime kaffir, Lime italienne, Lime indienne, Lime mandarine, Lime Rangpur, Lime Otaheite, Lime Kusaie, Lime Gingembre, Lime Winged Blacktwig.

➤ **Le Cédrot (*Citrus medica* L.)**

Les plus importantes variétés sont: Bajoura (Cédrot muské), Balady (Chazon Ish), Halperin (Chazon Ish), Lefkowitz (Chazon Ish), Main de Buddha (cédrot doight), Diamante yanover, Etrog (Cédrot grec).

➤ **Les Pomelos (*Citrus maxima*)**

Les plus importantes variétés existantes sont: Cuban Shaddock, Hirado Buntan, Jaffa rouge, Mato Buntan, Siamese sweet, Tahitian Sarawak, Thong Dee.

➤ **Les Pamplemousses (*Citrus paradisi* Burm. merril)**

Le pamplemousse peut être divisé en trois grandes catégories selon la couleur de sa chair, son jus et la peau :

- Les variétés jaunes ou de couleur pâle comprennent: Duncan, Marsh, Oroblanco, Goldens, Whenney, Sweetie et Meogold.
- Les variétés les plus courantes sont de couleur rose: Henderson Ruby, Marsh ruby, Ray Ruby, Red Ruby, Thompson et Foster.
- Les pamplemousses montrant souvent une teinte rouge plus foncée sont les suivants : Star Ruby, Red Ruby, Ray, Rio Star, Red Rio, Sunrise et Jaffa Sunrise.

3. Caractéristiques morphologiques des agrumes :

Les *Citrus* sont des arbres de taille qui varie entre 4 à 12 m, épineux et de feuillage dense, plus au moins résistants au froid d'une façon générale. Ainsi les différentes variétés de *Citrus* se distinguent par la taille, la couleur, la forme et la composition du fruit (Ladaniya, 2008).

3.1. Système racinaire:

Chez les agrumes, le système racinaire occupe plus de 70% de la taille de l'arbre. Les racines ont un pivot qui peut dépasser de 2 m au-dessous de la surface (Walter et Sam, 2002).

3.2. Partie aérienne:

➤ **Tronc et rameaux:**

Le tronc est simple, dressé presque cylindrique, de couleur verte quand il est jeune et prend ensuite une couleur grise résultant de la formation de liège sous l'épiderme. Les rameaux sont épineux (Virbei-Alonso, 2011).

➤ **Feuille:**

Les feuilles d'agrumes sont persistantes glabres de couleur verte foncée ou verte claire possédant un pétiole articulé avec le limbe, plus ou moins ailé et renferment des glandes oléifères, de grande importance. En général les jeunes arbres sont pourvus de feuilles plus larges et plus grandes que celles des arbres adultes (Benedicteet, 2011).

➤ **Fleurs :**

Les fleurs des agrumes composées de 3 à 5 sépales verts, soudés en forme de coupe de protection constituant le calice, de 4 à 8 pétales généralement blancs ou légèrement colorés en pourpre chez certaines espèces, ils forment la corolle de 3 à 4, d'un ovaire à 6-14 loges surmonté par un style (figure 02) (Loussert, 1989).

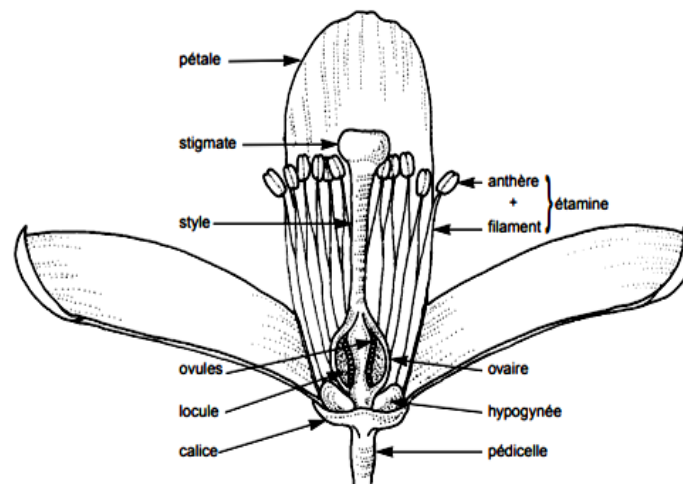


Figure 02: Schéma de la fleur des agrumes (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996)

➤ **Fruits :**

Les *Citrus* possèdent des tailles de fruit très variables allant de la plus grande (pamplemousse) jusqu'à la plus petite (Kumquat), et des formes aussi distinctes : ronde, ovale et bizarre (cédrot digitata), ainsi la couleur peut être verte, jaune, orange ou rouge suivant la variété de *Citrus* (Dugrand-Judek, 2015).

De l'extérieur à l'intérieur d'un fruit de *Citrus* (Mohanjain et Priyadarshan, 2009), il y'a (Figure 03) :

- a. **L'écorce** : c'est la partie externe et médiane de fruit, elle est généralement non comestible et est formée de deux parties: l'épicarpe et le mésocarpe (Ramful et al., 2011).
- L'épicarpe ou le flavédo représente 8 à 10% de fruit et constitue le zeste, contenant de nombreuses poches sécrétrices de type schizolysigènes, riche en huile essentielle (Faucon, 2015)

- Le mésocarpe ou l'albédo représente 25 % du fruit et est de couleur blanche et de consistance moelleuse (Janati et *al.*, 2012).
- b. **La pulpe** : ou bien l'endocarpe qui est formé de 40 à 50% de jus et entre 20 à 30 % de partie solide .Elle constitue la partie comestible, elle est divisée en loge dont l'ensemble de loges représentent un quartier. Chaque quartier peut porter des pépins ou non selon la variété de *Citrus*.

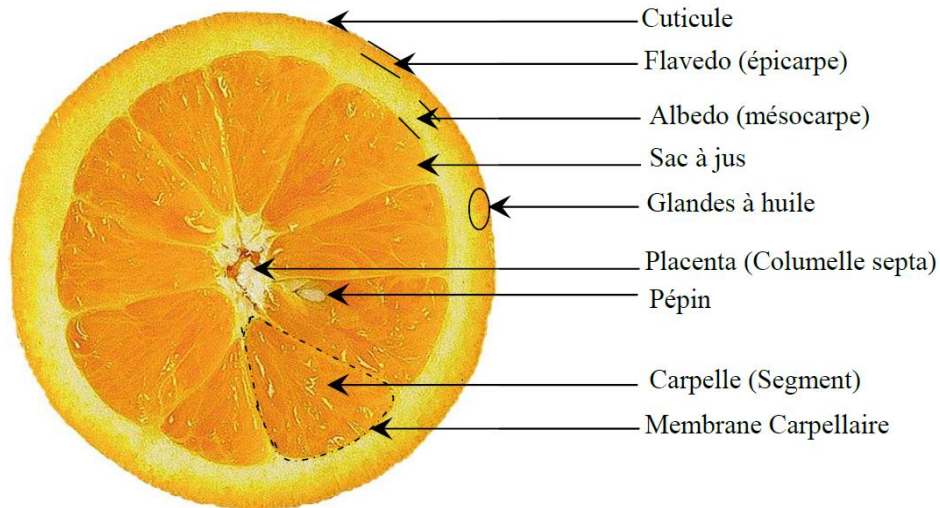


Figure 03 : Coupe transversale d'une orange (Ouldyyerou et *al.*, 2016).

4. Aspect économique

4.1. A l'échelle mondiale :

Grâce à leur grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes, les agrumes sont cultivés dans des zones tempérées chaudes jusqu'aux zones tropicales (entre les 40° de latitude nord et sud) (Luro et *al.*, 2013), cette capacité d'adaptation lui donne un rôle majeur dans le secteur agro-industriel. En effet le Brésil, la Chine, les États-Unis, l'Inde, le Mexique, le Pakistan, le Japon et l'Espagne produisent plus de deux tiers des agrumes du monde (Palou et *al.*, 2015; Simone et *al.*, 2016).

En 2016, plus de 124 millions de tonnes d'agrumes ont été produites (Paggiola et *al.*, 2016; Satari et Karimi, 2018); cette production est répartie en plusieurs variétés d'agrumes dans laquelle l'orange représente 57%, la mandarine 30%, le pamplemousse 7% et le citron et la lime 6%.

Quant à l'Algérie, elle occupe la 18^{ème} place dans le rang mondiale, avec une production de 1.2 millions de tonnes par an (FAO, 2013).

4.2. A l'échelle nationale:

Le secteur algérien des agrumes joue un rôle clé en termes économiques (Schimmenti et *al.*, 2013). La culture des agrumes représente pour notre pays un segment stratégique. Selon les dernières statistiques (FAO Stat, 2016), l'agrumiculture couvre actuellement une superficie totale de: 58749 ha. Le centre du pays compte 56% de cette surface d'agrumes, 30% se trouvent à l'est du pays, et 14% à l'Ouest. En 2013, la superficie cultivée était de 41382 ha pour les oranges, 12115 ha pour les mandarines, les clémentines, et enfin 3897 ha pour les citrons et limes (FAO Stat, 2016).

D'après Biche (2012), selon leurs exigences en eau et qualité des sols, les agrumes sont localisés essentiellement dans les plaines irrigables:

- La plaine de la Mitidja (44%).
- La plaine de Habra et Mascara (25%).
- Le périmètre de Bouna Moussa et la plaine de Safsaf (16%).
- Le périmètre de la Mina et le Bas Chélif (14%).

La gamme variétale du groupe des oranges est la plus importante (Tableau 01), avec une prédominance des variétés précoces, telle que le Washington Navel et le Thomson Navel.

Tableau 01: Composition variétale des agrumes en Algérie (Biche et *al.*, 2012)

Groupe	Surface (ha)	En%
Oranges	28000	62,3
Clémentine et Mandarine	13700	30,4
Citrons	2800	6,2
Pomélos	150	0,4
Autres	350	0,7
Total	45000	100

4.3. A l'échelle régionale :

Selon le billon provisoire de mars 2011, la production des agrumes à Chlef est significative, vu l'importance donnée à cette spéculation par les agriculteurs, ou l'application des différentes opérations étaient présentes telles que l'irrigation, la fertilisation et les

traitements phytosanitaires (Tableau 02) (Direction des sévices d'agricoles (DSA) de Chlef, 2012).

Tableau 02 : Evaluation des superficies, rendement et productions des agrumes à Chelf (DSA, 2012).

Variétés	Superficies Récoltée (ha)	Production Récoltée (Qx)	rendement obtenu (Qx/ ha)
Thomson navel	1 117	245 740	220
Washington navel	1 812	398 640	220
Hameline	99	16 335	165
Cadenera	163	26 895	166
Total Précoces	3 191	687 610	215
Portugaise	38	6 154	162
Sanguinely	36	6 120	170
Double fine	781	148 390	190
Total Saisons	855	160 664	189
Valencialate	530	90 116	170
Total Tardives	530	90 116	170
Total Orangers	4 576	938 390	186
Total Clémentiniers	420	67 200	160
Mandarinier	79	12 640	160
Satsuma	26	3 900	150
Chillard	10	1 500	150
Wilking	4	600	150
Total Mandariniers	119	18 640	157
Citronnier	63	10 080	160
Pomelo	22	3 520	160
Total Divers	85	13 600	160
Total Général	5 200	1 037 830	200

5. Valeurs nutritionnelles des *Citrus* :

Les écorces d'agrumes sont des matrices hautement valorisables vu leur disponibilité et leur richesse en ingrédients nutritionnels (Kammoun et *al.*, 2011). Plusieurs études montrent que les écorces d'agrumes contiennent des composés nutritionnels comme l'eau (soit 60% à 75% en base humide) (Ghanem et *al.*, 2012) et les sucres solubles (6,52-47,81 g/100g base sèche). De plus, ces coproduits sont riches en protéines (1,79-9,06 g/100g base sèche) et en minéraux (2,52-10,03 g/100 base sèche), la vitamine C (0,109-1,150 g/100g de base sèche) (Barros et *al.*, 2012; Goulas et *al.*, 2012) et les fibres alimentaires (6,30-82,69 g/100g base sèche) (Ghasemi et *al.*, 2009). Ces fibres acquièrent toutes les vertus des probiotiques et ont des applications potentielles en alimentation (Marin, 2007; Wang et *al.*, 2008).

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Aprotosoie et *al.*, 2010). D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (Holley et *al.*, 2005).

1. Définition :

Ce sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, lipophiles et souvent liquides, extraites à partir de plantes par entraînement à la vapeur ou hydro-distillation ou par expression à froid (Chouitah, 2012; Guinoiseau et *al.*, 2015). L'huile essentielle est séparée le plus souvent de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Fernandez et Chemat, 2012). Elles sont caractérisées par une odeur accentuée (Sbayou et *al.*, 2014) et renferment les principes odorants volatils contenus dans les végétaux (Chouitah, 2012)

2. Origine et localisation des HE:

Les huiles volatiles peuvent être considérées comme des résidus du métabolisme végétal. Suite à la photosynthèse au niveau des chloroplastes, l'énergie produite (NADPH et ATP) contribue au développement de la plante et indirectement à la biosynthèse de multiples composés secondaires comme les huiles essentielles (Narishetty et Panchagnula, 2004). Une observation synthétique des voies de synthèse des fractions organiques volatiles (FOV) révèle qu'un grand nombre fonctionne dans le chloroplaste. Ce sont aussi celles qui sont responsables de la synthèse de la majeure partie des constituants de la plupart des HEs (Figure 04) (Fernandez et Chemat, 2012).

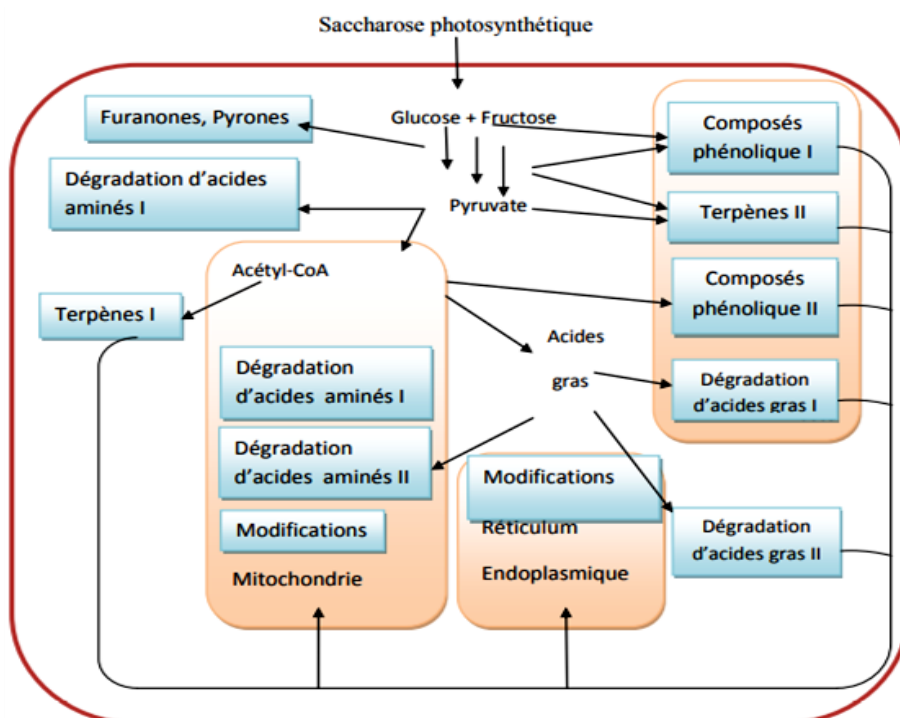


Figure 04: Localisation cellulaire des principales voies de synthèse des FOV chez les végétaux (Fernandez et Chemat, 2012).

Les *Citrus* élaborent et stockent les huiles essentielles dans des poches schizolysigènes localisées dans la partie externe du mésocarpe du fruit (flavedo) (Figure 05). C'est cette localisation particulière qui permet de les récupérer directement par expression à froid (Bruneton, 1999).

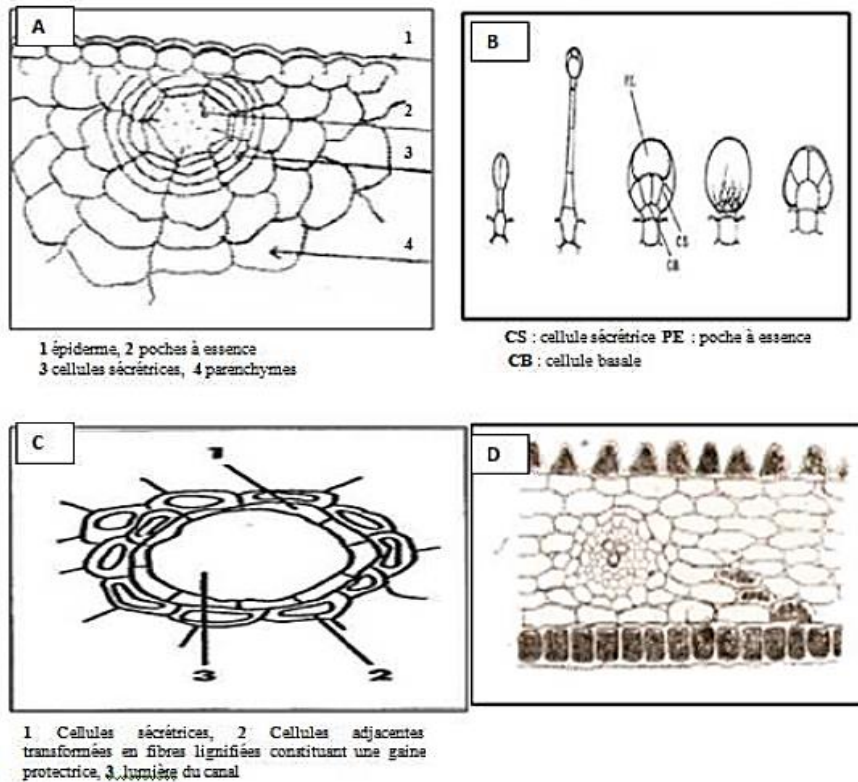


Figure 05: Parties de plantes permettant la biosynthèse et la sécrétion HE

- A. Poches à essences des *Citrus* (Ferhat et al., 2010)
- B. Différents types de poils sécréteurs chez la sauge officinale (Boukhatem et al., 2010)
- C. Coupe transversale d'un canal glandulaire schizogène de feuille de *Pinus pinaster* (Franchomme et al., 1990)
- D. Cellules à huiles essentielles des Lauracées (Franchomme et al., 1990)

3. Rôle physiologique

Les huiles essentielles jouent un rôle dans les interactions végétales, végétale-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs. En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables, elles protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques (El haib, 2011; Hammer, 2011; Tavares, 2012).

4. Les principes actifs des huiles essentielles :

Les constituants des HE possèdent un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou encore aromatique. Néanmoins, Les constituants des huiles essentielles appartiennent de façon quasi exclusive à trois groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes (Guinoisseau, 2010; Lakhdar, 2015) (Figure 06).

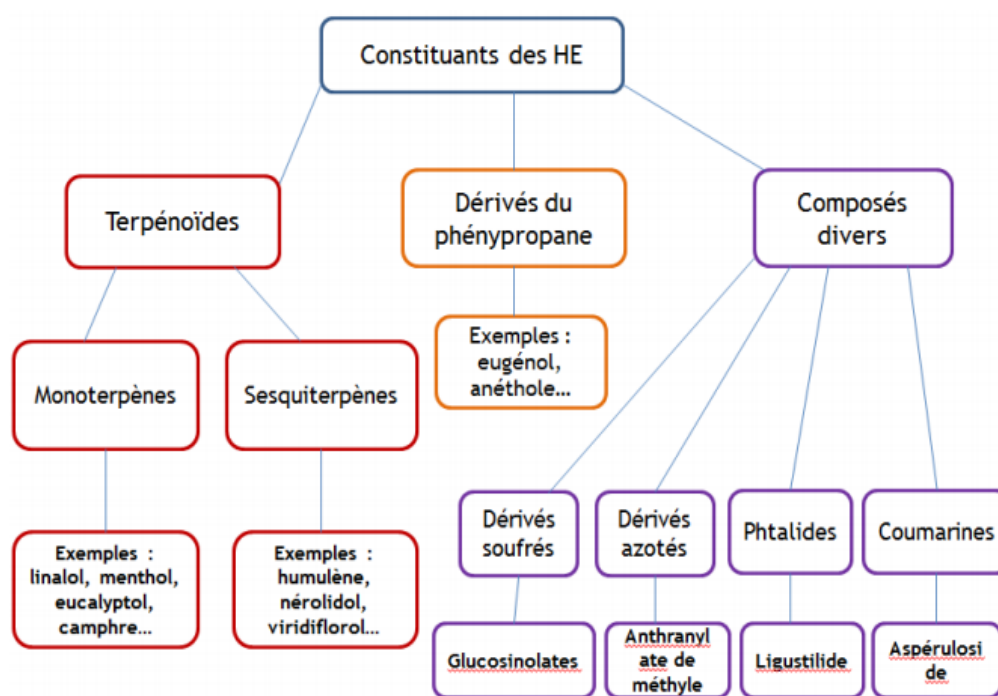


Figure 06: Les principaux constituants des HE (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012)

4.1. Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). Les tetraterpènes sont constitués de huit isoprènes. Les polyterpènes ont pour formule générale: $(C_5H_8)_n$ ou n peut être de 9 à 30.

Les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (Bakkali et al., 2008).

4.2. Les composés aromatiques:

Les composés aromatiques (volatils), dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents. Ce groupe de composés dérive majoritairement de la phénylalanine et comporte des composés constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (Calsamiglia, 2007).

4.3. Autres composés d'origines diverses:

Les huiles essentielles peuvent également renfermer divers produits issus de dégradation, processus mettant en jeu des constituants non volatils (comme les acides, alcools, aldéhydes, esters, etc) (Couic-Marinier et Lobstein., 2013). Les composés azotés et soufrés sont souvent rares dans les huiles essentielles (Selles, 2012).

5. Techniques conventionnelles d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des HE végétales (Figure 07). En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles, etc.), de la nature des composés (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins, ect...), du rendement en huile, des caractéristiques physicochimiques de l'HE à extraire, et de son usage après extraction (Laurent, 2016).

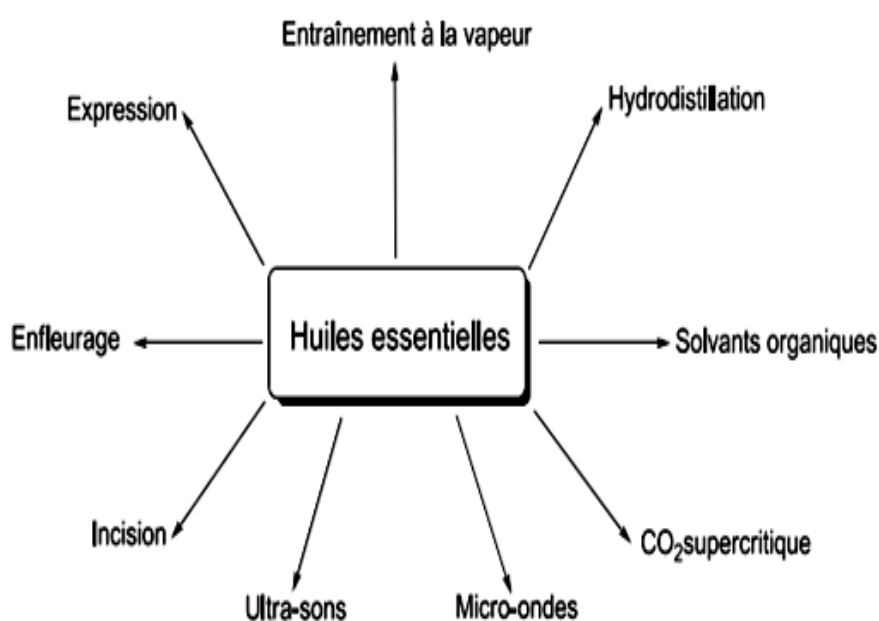


Figure 07: Méthodes d'extraction des huiles essentielles
(Luque de Castro et al., 1999)

5.1. Distillation - Evaporation

- **Hydrodistillation** dans laquelle le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante, l'huile essentielle est évaporée avec la vapeur d'eau (Figure 08), qui sont ensuite condensées à l'aide d'un réfrigérant. Le distillat est alors récupéré dans un erlenmeyer. L'eau et les molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique: l'huile essentielle (Jouault, 2012).

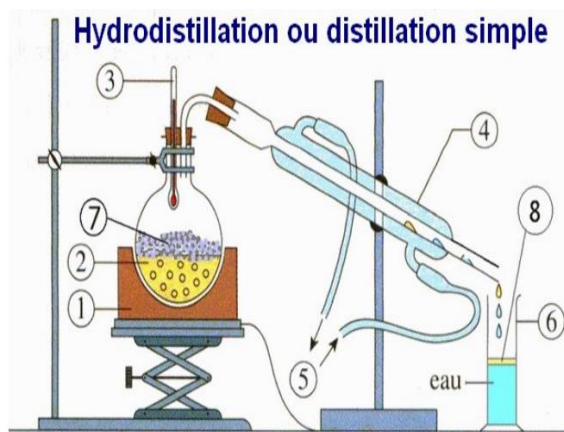


Figure 08: appareils d'Hydrodistillation (El haib, 2011)

- 1- Chauffe ballon 2- Ballon 3- Thermomètre 4- Réfrigérant 5 - Entrée et sortie d'eau 6- Erlenmeyer 7 - Matière à extraire l'essence 8 - La couche d'HE

- **La distillation à la vapeur saturée** : le végétal est supporté dans l'alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau (Figure 09). Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante (Hoare, 2012).

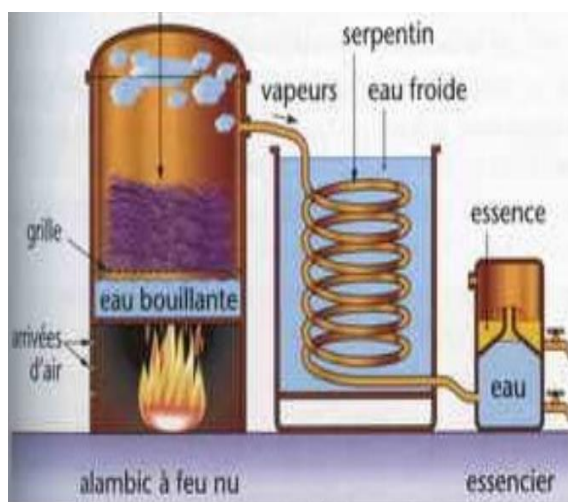


Figure 09: appareils d'entraînement à la vapeur d'eau (El haib, 2011)

5.2.Méthodes d'extraction à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid (Fillatre, 2011). Ce procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

Une nouvelle méthode d'extraction appelée «Pelatrice» (Figure 10), qui permet l'extraction de l'essence à partir du fruit entier. Les fruits sont envoyés dans une machine comportant trois couples de rouleaux en acier inox percés de trous, tournant en sens contraire et forçant les fruits à tourner sur eux-mêmes afin d'en râper toute l'écorce. Des jets d'eau récupèrent l'essence formant une émulsion. Celle-ci est séparée puis clarifiée dans plusieurs centrifugeuses (Dugo et Di Giacomo, 2002).



Figure 10: Pelatrice à gauche et centrifugeuse à droite (Dugo et Di Giacomo, 2002).

La société américaine Food Machinery Corporation (FMC), est ensuite arrivée sur le marché avec sa "FMC- IN-LINE". Cette machine permet l'extraction simultanément du jus et de l'essence (Figure 11). L'expression mécanique consiste donc à exercer une forte pression sur des alvéoles contenant l'huile essentielle. L'essence obtenue est écoulee latéralement lorsque les cellules du zeste (flavedo) éclatent lors de la descente du bol supérieur (Bonneval et Dubus, 2014).

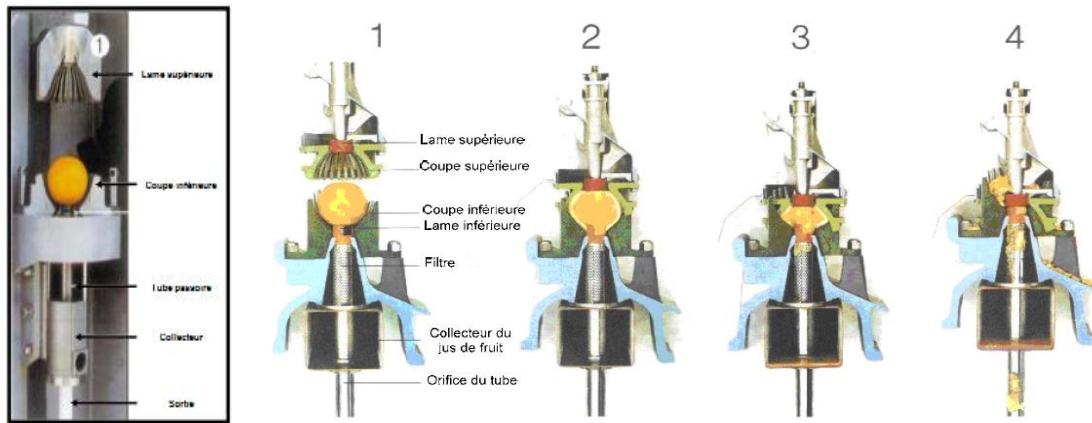


Figure 11 : Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line (Kimball, 1999)

6. Extraction par des techniques innovantes

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités (Ferhat *et al.*, 2010).

6.1.Extraction par des solvants supercritiques

Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone. Le CO₂ est thermodynamiquement stable, insipide, inodore et incolore, il est inflammable mais peut être asphyxiant à haute concentration. Son point critique est de 73,6 bar et sa température est de 31,4 °C. Dans cet état, l'extrait devient insoluble dans le CO₂ et précipite au fond de l'enceinte. Le gaz carbonique est ensuite liquéfié et peut être à nouveau utilisé (Diaaz-Reinoso *et al.*, 2006; Wenqiang *et al.*, 2007) (Figure 12).

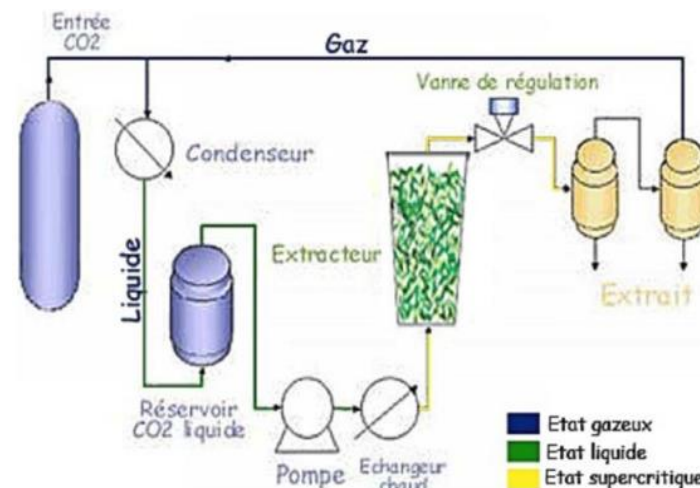


Figure 12 : Principe d'une extraction par CO₂ supercritique (Pourmortazavi, 2007).

6.2.Extraction par Détente Eclair (Flash-Détente)

La Flash-Détente brevetée par l'INRA en 1993 (Figure 13), est un procédé multi usages, multi-effets (Brat, 2001). Cette technique se réalise en deux étapes, la première consiste à étuver la matière végétale à 85 – 90°C par l'utilisation d'une vis à injection de vapeur. La seconde est une détente avec introduction brutale sous vide (environ 30 mbar) du matériel végétal. Cette mise sous vide instantanée provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé et une chute brutale de la température du milieu. Cette perte d'eau instantanée engendre un broyage fin dû à la création de micro-canaux intercellulaires. Les eaux d'évaporation sont récupérées séparément par condensation, ces eaux aromatiques sont riches en composés volatils aromatiques.

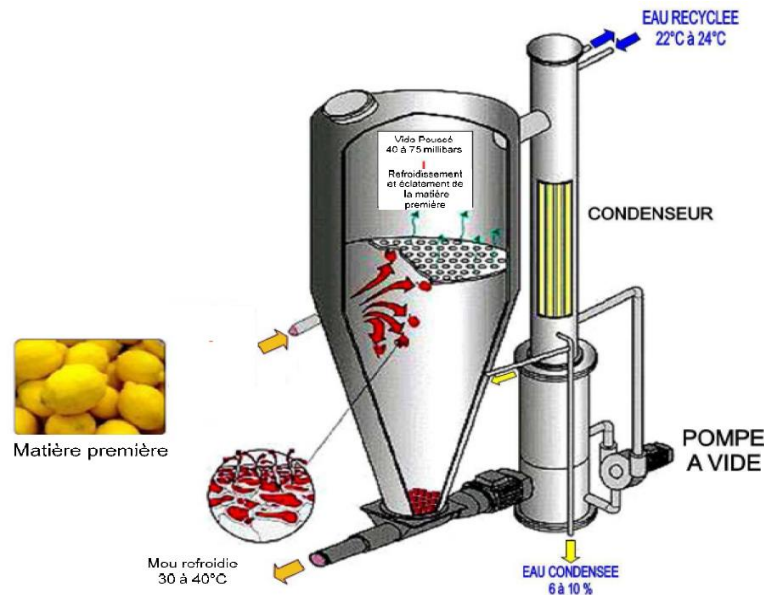


Figure 13 : Schéma de l'extraction par Flash Détente (INRA, 1993).

6.3.Extraction par ultrasons

L'utilisation des ultrasons permet d'effectuer des extractions en quelques minutes avec une reproductibilité élevée, ce qui simplifie l'opération et donne une plus grande pureté au produit final (Chemat et *al.*, 2011). Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie (Chemat et *al.*, 2008). Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatiqueaé ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Vinatoru, 2001).

6.4.Extraction assistée par micro-ondes

Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle (Figure 14). Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre de la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (Hemwimon et *al.*, 2007).

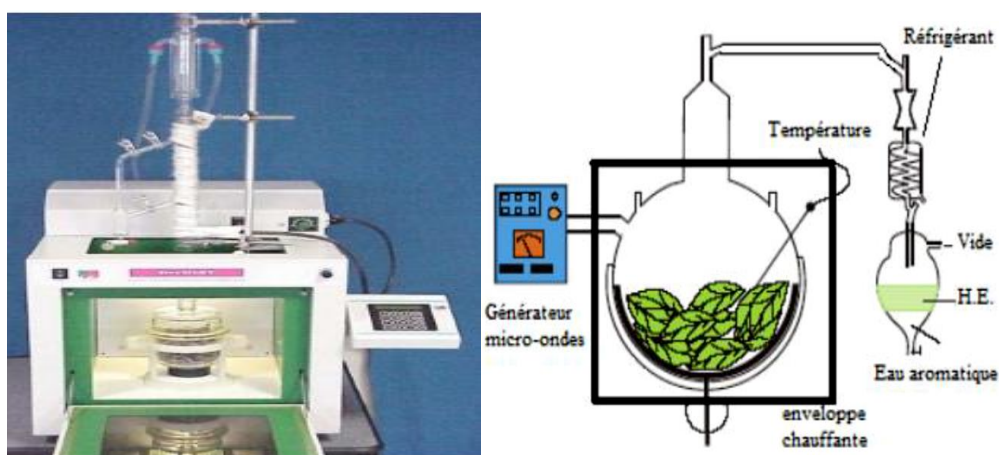


Figure 14: Extraction assistée par micro-onde (Lucchesi, 2005)

7. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles

Les critères de qualité des huiles essentielles sont définis dans des normes internationales ISO (International Organization for Standardization) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation) (NF ISO 855). Ainsi, les propriétés organoleptiques et physiques sont contrôlées telles que la coloration, l'odeur, la réfraction, la solubilité, le point éclair, mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acides et d'esters (Fillatre, 2011).

La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), capable de séparer tous les constituants d'une HE; le spectromètre de masse permet d'identifier les constituants au fur et à mesure de leur élution en déterminant leur structure respective. En effet, les molécules de faibles poids moléculaires (comme les monoterpènes) progressent plus rapidement que les molécules possédant un fort poids moléculaire (comme les sesquiterpènes) (Zellner et *al.*, 2010).

8. Relation structure - activité

La structure chimique des molécules aromatiques est composée d'un squelette carboné: variant par son nombre d'atomes de carbone, ses agencements, ses liaisons saturées ou insaturées et son isomérie; d'un ou plusieurs sites fonctionnels (le plus souvent oxydés, mais également azotés ou soufrés pour certaines molécules) positionnés d'une façon particulière. Pour un même squelette carboné, il y'a plusieurs conformations spatiales possibles (cis/trans, α/β , ...) pouvant être à l'origine de différentes activités. C'est cette conformation spatiale globale qui permettra à une molécule donnée de se lier à son récepteur biologique spécifique afin d'y exercer son activité. La connaissance de la composition d'une HE peut prévoir et expliquer au moins partiellement son activité thérapeutique. Néanmoins, cette information n'est pas exhaustive puisque l'activité d'une HE ne se résumerait pas à la somme des propriétés de ses constituants pris isolément. L'ensemble de ses propriétés ne pourrait alors être réduit à l'activité biochimique seule. Ce fait s'explique par le fait que les molécules aromatiques agiraient en interaction les unes avec les autres (synergie, inhibition...) et que leurs effets varieraient en fonction du terrain de l'individu sur lequel elles agissent (Molina et *al.*, 2017).

1. Activités anti-inflammatoire

L'inflammation est un phénomène réactionnel mis en œuvre par l'organisme chaque fois que l'intégrité de ses constantes morphologiques et biologiques est menacée à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse (Geng et *al.*, 2014; Qi Lia et *al.*, 2017; Du et *al.*, 2018). Les signes de ce processus sont: chaleur, rougeur, douleur, œdème (Noack, 2016; Yougbaré-Ziébrou et *al.*, 2016).

En fonction de l'HE et de la voie d'administration, l'activité anti-inflammatoire peut être indirecte en réaction à une action immunostimulante ou directe via plusieurs mécanismes (Inouye et Abe, 2007; Baudoux, 2017), tels que:

- Un transfert de charges électroniques: telles que les molécules terpéniques négatives agissant sur les foyers inflammatoires chargés positivement;
- Une hyperémie qui accélère le recrutement des leucocytes favorisant la réaction anti-inflammatoire;
- Un blocage de la synthèse et la sécrétion de différents médiateurs de l'inflammation (histamine, cytokines pro inflammatoires, prostaglandines, leucotriènes, oxyde nitrique, radicaux libres...), agissant ainsi à différents niveaux de l'activité anti-inflammatoire.

1.1. Toxicité des médicaments anti-inflammatoires

Les médicaments actuellement utilisés ont des effets toxiques potentiels tels que le saignement gastro-intestinal, saignement et ulcère peptique, tension artérielle et hypersensibilité systémique accrue (Panda et *al.*, 2009; Bjarnason et *al.*, 2018) significativement associée à l'utilisation aiguë d'anti-inflammatoires non stéroïdiens comme la dose régulière d'aspirine, le diclofenac, le kétorolac, le naproxène ou le nimésulide (Li et *al.*, 2011; Su et *al.*, 2011). Cependant, l'utilisation de substances chimiques de synthèse anti-inflammatoires est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile, qui pourraient agir directement sur les médiateurs de l'inflammation, et qui auraient une meilleure disponibilité (Brune et Patrignani, 2015; Kafeshani, 2015).

1.2. La bio thérapeutique anti-inflammatoire

Les huiles essentielles représentent une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires (Kim et *al.*, 2014).

Plusieurs études ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Koh et *al.*, 2002; Caldefie-Chézet et *al.*, 2006) et de son composé principal, l' α -terpinéol (Hart et *al.*, 2000).

Un autre exemple, l'huile essentielle de géranium (Maruyama et *al.*, 2005) ainsi que le linalol ont montré une activité anti-inflammatoire sur des œdèmes de pattes de souris induits par le carragénine (Paena et *al.*, 2002).

Concernant l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, Tumen et *al.* (2012) ont montré une guérison des lésions et un potentiel anti-inflammatoire dans le traitement expérimental des plaies chez la souris par application topique d'un onguent contenant 1% de l'huile.

Des études effectuées sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* par différents modèles expérimentaux dont, l'œdème de l'oreille, la pleurésie induite par carragénine et la chimiotaxie in vitro, ont permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'huile. Celui-ci est principalement dû au thymol et au carvacrol qui sont impliqués dans l'inhibition des œdèmes inflammatoires et dans la migration des leucocytes (Fachini-Queiroz et *al.*, 2012).

Les huiles essentielles possédant des aldéhydes ont des propriétés actives contre l'inflammation par voie interne comme l'HE du Gingembre (Mayer, 2012).

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles a été mise en évidence par de nombreux travaux, elle est due aux monoterpènes hydrocarbonés, sesquiterpènes hydrocarbonés et aux alcools sesquiterpéniques. Ces molécules présentent un intérêt grandissant car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, avec moins d'effets secondaires (Mebirouk, 2017 ; Dhingra et *al.*, 2018).

1.3. Méthode de détermination de l'activité anti-inflammatoire:

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est réalisée par différentes méthodes:

- Injection intra-articulaire de la Carragénine dans la patte postérieure (Winter et *al.*, 1962).
- Application locale de l'acide arachidonique à la surface de l'oreille (Backhouse, 2008).
- Inhibition de l'activité des protéases (Govindappa et Poojashri, 2011).
- Inhibition de la dénaturation des protéines "albumine bovine" (Karthik et *al.*, 2013).
- Test de stabilisation des membranes d'érythrocytes via l'induction d'hémolyse des globules rouges par hypotonie et par chaleur (Chippada et *al.*, 2011).

2. Activité antibactérienne:

Les huiles essentielles ont deux sortes d'activités sur les microorganismes, une activité létale (bactéricide) et l'autre inhibitrice de la croissance (bactériostase) (Kunle et *al.*, 2003). Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HE ou leurs composants actifs tels que: la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type des microorganismes ciblés (Malecky, 2007).

Les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont souvent des techniques de diffusion, dilution ou de bio autographie (Rio et *al.*, 1988). La technique de diffusion est souvent celle des disques ou de puits, tandis que les techniques de dilution en milieu liquide ou solide servent à déterminer les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (Wilkinson, 2006).

2.1. Toxicité et résistance microbienne aux antibiotiques

Il faut noter que les troubles toxiques causés par les antibiotiques sont différents d'une famille à l'autre, et même dans une famille il y a des discordances entre les antibiotiques; Cas de la streptomycine qui n'est pratiquement pas toxique pour le néphron, alors que la néomycine est la plus toxique pour cet organe (Berche et *al.*, 1991).

L'OMS a traité la résistance aux antibiotiques en lien avec des bactéries pathogènes. Elle a permis de lister les familles d'antibiotiques critiques en santé humaine classées par

ordre d'importance (WHO, 2016). L'OMS a également dressé une liste d'agents pathogènes pour lesquels les phénomènes de résistance posaient un enjeu critique en santé humaine afin d'orienter les recherches (WHO, 2017). Cette liste est constituée principalement des genres de bactéries Gram négatives: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*), *Campylobacter*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Shigella* et quelques genres de bactéries Gram positives *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

2.2. La bio thérapeutique antibactérienne:

Les huiles essentielles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003).

Hammer et *al.* (1999) ont conduit une étude qui portait sur l'activité antimicrobienne de 47 huiles essentielles contre 10 microorganismes.

En 2000, Dorman et Deans ont étudié l'activité de l'HE du poivre (*Piper nigrum*), du géranium (*Pelargonium graveolens*), d'origan (*Origanum vulgare*) et du thym (*Thymus vulgaris*) sur 25 genres différents de bactéries. Ces huiles volatiles ont montré des effets inhibiteurs considérables contre tous ces micro-organismes.

Ohno et *al.* (2003), ont trouvé que les huiles essentielles de la citronnelle et du citronnier, empêchent la croissance d'*Helicobacter pylori* et réagissent même dans des conditions d'acidité.

Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (Tohidpour et *al.*, 2010).

Dans une étude menée par Bharti et *al.* (2012), plusieurs huiles essentielles principalement de *Thymus vulgaris* et *Melaleuca alternifolia*, ont inhibé la croissance de plusieurs souches, principalement de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus hominis*, *Pseudomonas aerogenosa* et *klebsiella pneumonia*.

Les essences de *Citrus* en solution sont plus puissantes que les phénols comme désinfectants (Fisher et Philips, 2008).

Sfeir et *al.* (2013) ont évalué *in vitro* l'activité antibactérienne de 18 HE, dont 14 ont montré une activité antibactérienne vis à vis de *Streptococcus pyogenes* et en particulier *Cinnamomun verum*, *Origanum compactum* et *Satureja montana*.

3. Activité antioxydante:

Une substance antioxydante est capable à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Wollinger et *al.*, 2016); les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire (Durackova, 2008).

Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant la notion de «radicaux libres» et de «stress oxydant» est de plus en plus utilisée pour expliquer les différentes atteintes pathologiques, soit comme un facteur déclenchant, soit comme des causes de complication dans leur évolution (Halliwell et Whiteman, 2004; Huang et *al.*, 2004).

De plus la surconsommation d'antioxydants peut entraîner une déficience du système immunitaire et cela peut nuire la santé en altérant de nombreuses fonctions vitales. Certains antioxydants sont responsables aussi des réactions allergiques, des hypersensibilités, des troubles digestifs, etc... (Roberfroid, 2002).

3.1. La bio thérapeutique antioxydante:

Les huiles essentielles extraites à partir de plantes naturelles, présentent des propriétés antioxydantes (Lou et *al.*, 2017). De plus, Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques (Hussain et *al.*, 2010). Elles ont la capacité de piéger les radicaux libres, inhiber la peroxydation lipidique et stimuler l'activité des enzymes antioxydantes (Guo Xu, 2018; Khayyat et Roselin, 2018).

Les huiles essentielles et leurs composants ont été intensément criblés pour leurs activités antioxydantes dans les industries alimentaires, en raison de leur état de sécurité relative et de leur large acceptation par les consommateurs (Mothana et *al.*, 2012).

Parmi les huiles essentielles, celles de la cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (Edris, 2007).

3.2. Méthode de détermination de l'activité antioxydante:

Plusieurs méthodes permettant d'évaluer le pouvoir antioxydant *in vitro* peuvent être divisées en 2 groupes :

- Les méthodes basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT) Tels que: la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Reactive Antioxidant Potential) etc... La plupart de ces méthodes sont dépendantes du solvant utilisé et du pH, tandis que la présence de métaux peut interférer avec ces méthodes (Müller et *al.*, 2011).
- Les méthodes basées sur le transfert d'un électron notamment: La méthode de DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) et FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Shahidi et Zhong, 2015).

3.3. Mécanisme d'action des *Citrus*

Cinq voies sont proposées dans la littérature pour le mécanisme d'action des *Citrus* (Figure 15):

- 1- Inhibition des enzymes oxydantes, réduction de la production cellulaire des ROS (reactive oxygen species) / RNS (reactive nitrogen species);
- 2- Interaction avec les voies de signalisation redox, conduisant à la réponse cellulaire anti-oxydante ;
- 3- Réaction directe avec ROS/RNS comme "piégeur de radicaux libres";
- 4- Chélation avec des métaux de transition produisant moins de dommage oxydatif ;
- 5- Interaction de l'ingrédient de synergie, qui influence l'ensemble du système antioxydant.

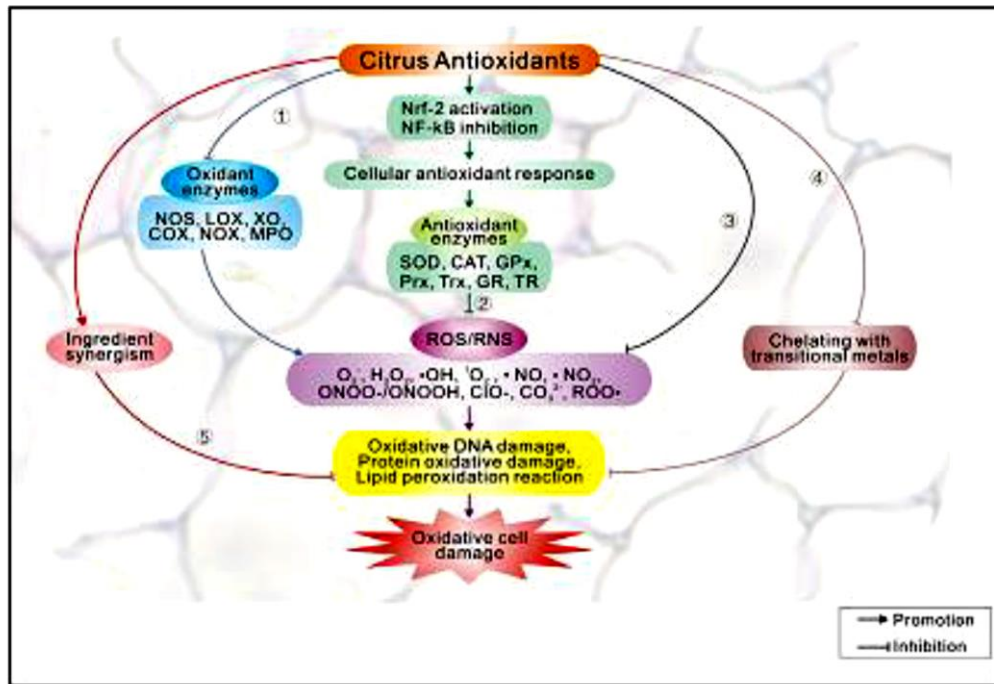


Figure 15: Schéma du potentiel antioxydant et le mécanisme d'action des *Citrus* (Zou et al., 2016).

Les enzymes oxydantes qui produisent des ROS/ RNS sont: NOS (oxyde nitrique synthase), LOX (lipoxygénase), XO (xanthine oxydase), COX (cyclooxygénase), NOX (NADPH oxydase), MPO (myéloperoxydase). Les enzymes antioxydantes sont: SOD (superoxyde dismutase), CAT (catalase), glutathion peroxydase (GPx), Prx (peroxyredoxine), Tr X (thiorédoxine), GR (glutathion réductase), TR (thiorédoxine réductase).

4. Toxicité:

La toxicologie est l'étude des substances toxiques et, plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion ou de toute autre nature (Gilles, 2004).

4.1. Toxicité des huiles essentielles:

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques (Hammer et Carson, 2011). Il est donc capital de connaître la toxicité de ces substances très actives pour bénéficier pleinement de leurs propriétés et non pour subir les effets secondaires ou toxiques liés à un mauvais usage (Festy, 2011; Pierron, 2014).

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous

le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (Pibiri, 2006).

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL₅₀ supérieures à 5g/kg (Bruneton, 1993). De plus l'usage des HE en application locale, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations, allergies voir photosensibilisation. C'est le cas de l'huile essentielle de *Citrus*, Thym, d'Origan, de la Sarriette qui sont connues pour leur pouvoir irritant et agressif (Bakkali et al., 2008).

L'absorption orale des HE riches en monoterpènes sur de longues périodes peut enflammer et détériorer à terme, les néphrons donc conduire à une néphrotoxicité (Pinchuk et al., 2012; Couic Marinier et Lobstein, 2013).

4.2. L'évaluation des effets toxiques

L'évaluation de la toxicité s'appuie sur des études qualitatives ou quantitatives adéquates. Il existe plusieurs types d'études qui nous permettent d'évaluer les effets d'un toxique. Elles peuvent être classées dans quatre catégories (Lapointe, 2004) :

- Les études épidémiologiques, qui comparent plusieurs groupes d'individus ou les études de cas;
- Les études expérimentales *in vivo*, qui utilisent des animaux ;
- Les études *in vitro*, effectuées sur des cultures de tissus ou des cellules ;
- Les études théoriques par modélisation.

I. Matériel

1. Matériel végétal:

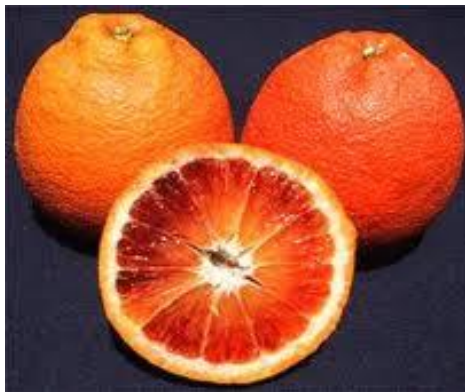
La partie ayant servi à l'extraction par expression à froid des essences est l'écorce (zeste) de quatre espèces de *Citrus*: *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* et *C. aurantium*, (Figure 16), qui sont récoltées de différentes régions de la wilaya de Chlef (Tableau 03) (Figure 17).



Citrus paradisi



Citrus reticulata



Citrus sinensis



Citrus aurantium

Figure 16 : Les espèces de *citrus* étudiées de la région de Chlef

Tableau 03: Les différents espèces de *Citrus*.

Nomenclature scientifique * * *	Espèce	Lieu de récolte	Periode de récolte	Coordonnées géographiques
<i>C. paradisi</i>	Marsh Seedless (Le pomélo)	Oued Sly* (Chlef)	Mars	Latitude: 36.1, Longitude: 1.2 36° 6' 0" Nord, 1° 12' 0" Est
<i>C. reticulata</i>	Le mandarinier	Oued Sly* (Chlef)	Septembre	Latitude: 36.1, Longitude: 1.2 36° 6' 0" Nord, 1° 12' 0" Est
<i>C. sinensis</i>	Tarocco (L'orange sanguines)	Ech Chettia** (Chlef)	Décembre - Janvier	Latitude: 36.1764, Longitude: 1.24778 36° 10' 35" Nord, 1° 14' 52" Est
<i>C. aurantium</i>	bigaradier (L'orange amer)	Oued Fares (Chlef)	Janvier - Février	Latitude: 36.2328, Longitude: 1.24028 36° 13' 58" Nord, 1° 14' 25" Est

* : Investissement agricole ELHBIB GESSAB.

** : Investissement agricole (SANVITI).

* * * : Selon Swingle et Reece (1967)

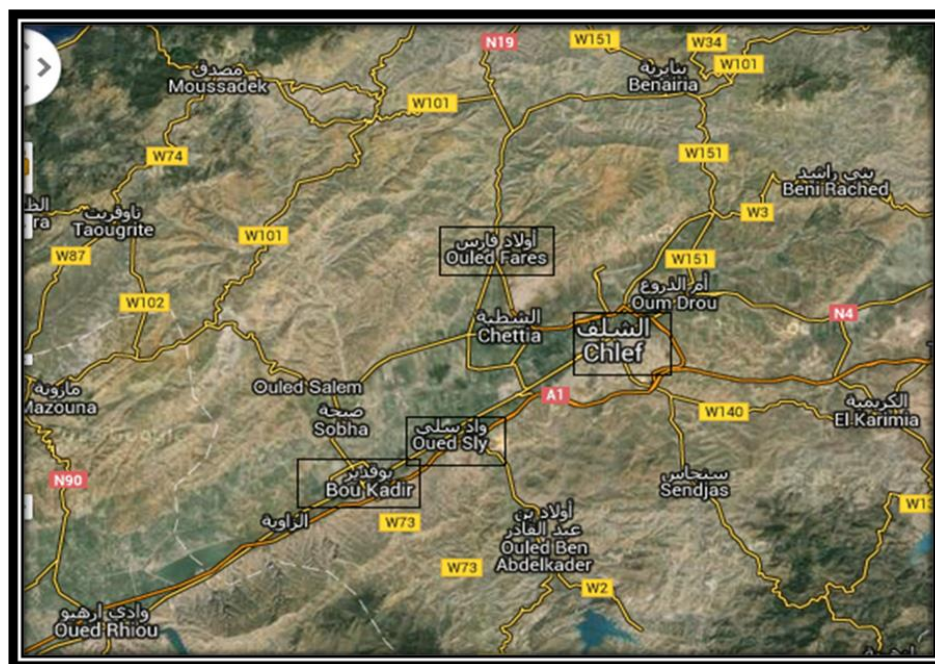


Figure 17 : Localisation des régions de récolte de la wilaya de Chlef

URL : <https://maps.google.com>

2. Matériel animal :

La partie expérimentale (*in vivo*) a été réalisée au niveau du Laboratoire de Toxicologie et Pharmacologie du groupe ANTIBIOTICAL-SAIDAL. MEDEA - Algérie.

La race utilisée est sélectionnée par le laboratoire d'analyse, ayant le qualificatif d'une race albinos, de type NMRI (Naval Medical research institute). Chaque lot étudié comprend 06 souris, 03 femelles (Les femelles doivent être nullipares et non gravides) et 03 mâles, de poids compris entre 18g et 22g \pm 2g, à jeun depuis 18 heures ou la température est égale à 25 \pm 2°C, 12h /12h cycle de lumière / obscurité .

3. Matériel d'étude de l'activité antibactérienne :

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée sur plusieurs bactéries pathogènes qui sont obtenu au niveau de plusieurs laboratoires de microbiologie (tableau 04).

Tableau 04 : La source des bactéries pathogènes étudiées

Les bactéries	Source
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853. <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA+ATCC® 43300.	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Kolea.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25 923.	Laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Ben Boulid Blida
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29737. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633.	Laboratoire de microbiologie de Complexe Antibiotiques -Media- « SAIDAL »
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213. <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> . <i>Proteus vulgaris</i> . <i>Acinetobacter baumannii</i> . <i>Serratia sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	Laboratoire d'analyse biologique d'Ain Defla
<i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Laboratoire de microbiologie de la clinique d'EL Ihsan-Chlef.
<i>Salmonella sp.</i>	Laboratoire de microbiologie moléculaire de faculté de Hassiba Ben Bouali de Université de Chlef.

ATCC: American Type Culture Collection.

Ces bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, des milieux d'isolement, sélectifs ou d'enrichissement, selon les espèces.

II. Méthodes :

1. Procédé d'extraction des essences des *Citrus*

L'expression à froid est la méthode la plus fréquente pour l'extraction des essences à partir des cellules oléifères de l'écorce des *Citrus*, qui a été réalisée à l'aide d'un appareil d'extraction semi-industriel au niveau de conserverie TELLOISE de Chlef. Cette technique se déroule en plusieurs étapes (Figure 18):

- Les fruits frais sont récoltés, pour être ensuite transportés sur les sites de transformation.
- Préparation de fruits: lavage, brossage, sélection et éventuel calibrage.
- Les fruits sont ensuite introduits dans les machines et traités avec les jets d'eau .
- Des mouvements alternatifs verticaux sont lancés, qui poussent et pressent l'agrume.
- Le jus, les pépins et la pulpe, sont propulsés vers un orifice.
- L'essence est extraite de l'écorce par effet de compression exercée par les doigts des coupes inférieures et supérieures et puis emportée par les jets d'eau placés dans la porte coupe.
- Récupération d'une mixture eau/huile essentielle.
- Récupération d'essence par centrifugation.



1. La cueillette des espèces des *Citrus*.



2. Lavage, nettoyage et triage



3. Presse-fruit



4. Transfert Mixture eau/huile



5. Le finissage de mixture eau/huile



6. Centrifugation et récupération des essences

Figure 18: Cycle complet de récupération des essences des *Citrus* au niveau de la TELLOISE de Chlef

2. Le rendement des essences des *Citrus*

Selon la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (1986), le rendement en huiles essentielles, est défini comme étant le rapport entre la masse des huiles essentielles obtenues après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule donnée par Bousbia, 2011:

$$R = (Pe / Pz) \times 100$$

R : rendement en essence en %.

Pe : poids de l'essence en gramme.

Pz : poids du zeste utilisé en gramme.

3. Caractérisation organoleptique et physico chimique des essences :

Cette étape est effectuée au sein du laboratoire physico-chimique du département de biologie (Figure 19), elle consiste à :

- Vérifier les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, Saveur).
- Déterminer des indices physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire), et chimiques (acidité).
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes AFNOR.

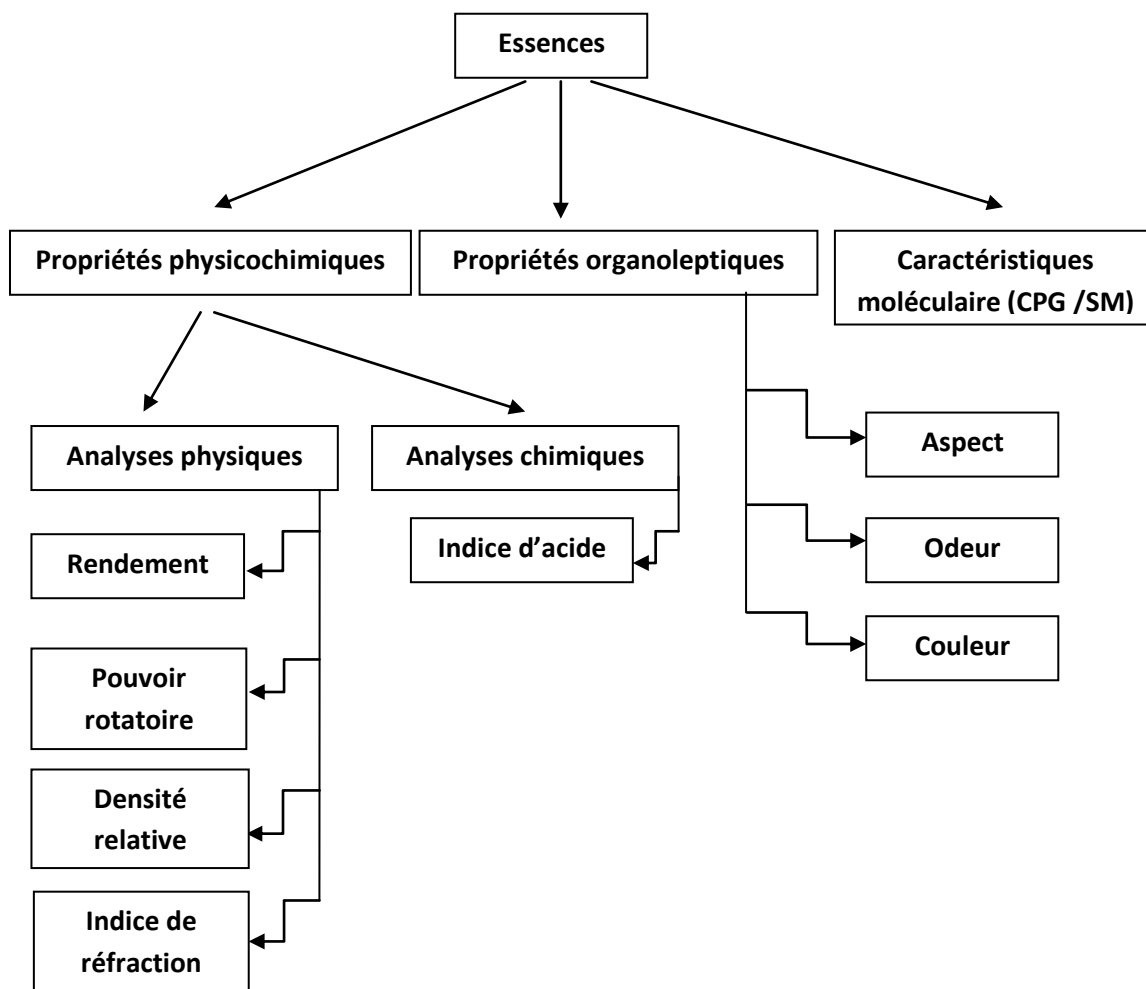


Figure 19: Schéma récapitulatif de la caractérisation des essences

3.1. Mesure de la densité relative à 20°C :

La densité relative de l'essence est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C (norme NF T75 - 111) . La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de volume: 5ml à la température de 20°C.

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où :

m_0 : masse du pycnomètre vide

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

3.2. Mesure de l'indice de réfraction:

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre Nonvex Holland (Figure 41 annexe 01). Quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C (norme NF T 75–112), nous effectuons la correction à 20°C par le biais de la formule :

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

Où :

I_{20} : indice à 20°C.

I_t : indice à la température ambiante ou de mesure.

T : température ambiante.

3.3. Mesure du pouvoir rotatoire

Elle est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type JASCO 1010 (Figure 42 annexe 01) (réglé de façon à donner 0° et 180° avec l'eau).

- Source lumineuse (lampe à vapeur de sodium), permettant d'obtenir une lumière de longueur d'onde $589,3 \pm 0,3$ nm.
- Tube d'observation de $100 \pm 0,5$ mm de longueur.

Mode opératoire (norme NF T 75-113):

- Dilution de l'essence d'écorces d'agrumes : 0,25g/ 100 ml d'éthanol.
- Remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.
- Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil.

3.4. Mesure de l'indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenue dans 1g d'huile essentielle (norme NF T 75-103), l'indice d'acide (IA) est donné par la formule :

$$IA = \frac{5,61 V}{m}$$

Où :

V : est le volume, en millilitre, de solution d'hydroxyde de potassium utilisée

M : est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

4. Détermination de la composition biochimique des essences des *Citrus*:

Des essences des espèces de *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* et *C. aurantium*, ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CG/SM) (Figure 20) pour la détermination de leur composition chimique et l'identification de leurs chimiotype.



Figure 20 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

CPG : Hewlett Packard Agilent6890N piloté par Chemstation (NIST98).

Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

- Injection de 0.5 μ l en mode Split 1/50
- Température de l'injecteur : 250°C
- Colonne capillaire HP5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)
- Programmation de température: 35°C Pendant 10 min; 4°C/min jusqu'à 250°C pendant 10min.
- Débit du gaz vecteur : Hélium (1ml/min)

Spectre de masse: model Agilent 5973

- Températures: interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C)
- L'énergie d'ionisation est de 70 ev

L'identification des différents constituants des essences a été faite sur la base de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse par comparaison avec les données de la littérature (Adams, 2001).

5. Etude de l'activité anti- inflammatoire des essences des *Citrus* :

L'induction de l'inflammation est faite via l'injection de la carragénine sous plantaire de la patte postérieure ce qui provoque l'apparition d'un œdème de la région métatarsienne (Winter et *al.* 1962).

Groupe contrôle négatif : Une solution aqueuse de la carragénine à 1% est injectée sous plantaire de la patte postérieure de la souris (Figure 21), en plus un traitement avec l'eau distillée par injection Intrapéritoniale (IP) (Figure 22), une heure avant la provocation de l'inflammation par la carragénine.

Groupe contrôle positif (le lot de référence): Une solution aqueuse de la carragénine à 1% est injectée sous plantaire de la patte postérieure aux souris (Figure 21), en plus un traitement avec le d'éclophénac de sodium par injection IP (Figure 22), une heure avant la provocation de l'inflammation par la carragénine.

Groupe traité : Une solution aqueuse de la carragénine à 1% est injectée sous plantaire de la patte postérieure aux souris (Figure 21), en plus un traitement avec 50 mg/kg des essences étudiées par injection IP (Figure 22), une heure avant la provocation de l'inflammation par la carragénine.



Figure 21: Injection de la carragénine à 1% sous plantaire de la patte postérieure de la souris



Figure 22: Injection IP des essences ou le d clop n c de sodium

Pour apprécier l'activité anti-inflammatoire, le diamètre transm tarsien, de la cheville et la circonférence de la patte au niveau métatarsien sont déterminés à l'aide d'un pied à coulisse (Figure 23).



Figure 23: Détermination à l'aide d'un pied à coulisse de la patte au niveau métatarsien

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition (%INH) de l'oedème selon la formule:

$$\%INH = \frac{\% AUG \text{ témoin} - \%, AUG \text{ traité}}{\%AUG \text{ témoin}} \times 100$$

Le pourcentage d'augmentation (% AUG) du volume de la patte de souris est calculé (Nongoniermar et *al.*, 2006) par la formule suivante :

$$\%AUG = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Où :

V₀ : représente le volume initial de la patte à T=0 (avant injection de la carragénine)

V_t : représente le volume de la patte à un temps T quelconque.

Les moyennes des groupes traités par les essences des *Citrus* et le diclophénac ont été comparées avec celles du groupe témoin négatif traité par l'eau distillée.

6. Estimation du potentiel antioxydant des essences des *Citrus*

Le test de l'activité antioxydante peut être effectué par bioautographie sur couche mince (test qualitatif) ou par dosage spectrophotométrique (test quantitatif).

6.1. Bioautographie

➤ Protocole expérimental par β carotène

L'activité antioxydante des essences de *Citrus* est mesurée selon la méthode de Koleva et *al.*, 2002, et par Khartal et *al.* (2007). Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) à 0.05% par les produits d'oxydation de l'acide linoléique. Les zones antioxydantes sont observées au visible. La présence d'une activité anti-radicalaire se confirme par l'apparition de spot jaune sur fond blanc.

➤ Protocole expérimental par DPPH

L'activité antioxydante des essences de *Citrus* a été évaluée sur CCM par le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) en suivant un protocole adapté de Takao et *al.* (1994). Les échantillons ont été déposés sur deux plaques de Silicagel 60 F254 sur feuille d'aluminium (Merck), et celles-ci sont développées dans le système d'élution approprié: Hexane / Chloroforme / Acétone (70: 27: 3; v/v). La plaque est révélée par une solution méthanolique de DPPH à 0.2%.

Ce réactif est un radical stable qui, réduit par des capteurs de radicaux, passe du pourpre au jaune, révélant ainsi les composés avec une activité antioxydante.

6.2. Dosage de l'activité anti-radicalaire du radical stable DPPH :

Selon le protocole décrit par Mansouri et *al.* (2005). Les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune; le DPPH, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu a donné des protons (Wollinger et *al.*, 2016).

Cinquante microlitre (μl) de la solution à tester et 1950 μl de la solution méthanolique de DPPH à 6.10^{-5} M sont introduites dans des tubes secs. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à la température ambiante pendant 30 min. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm (Figure 24). Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

Le contrôle positif est représenté par deux antioxydants de référence: le Butylhydroxyanisole (BHA) et la Quercétine dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

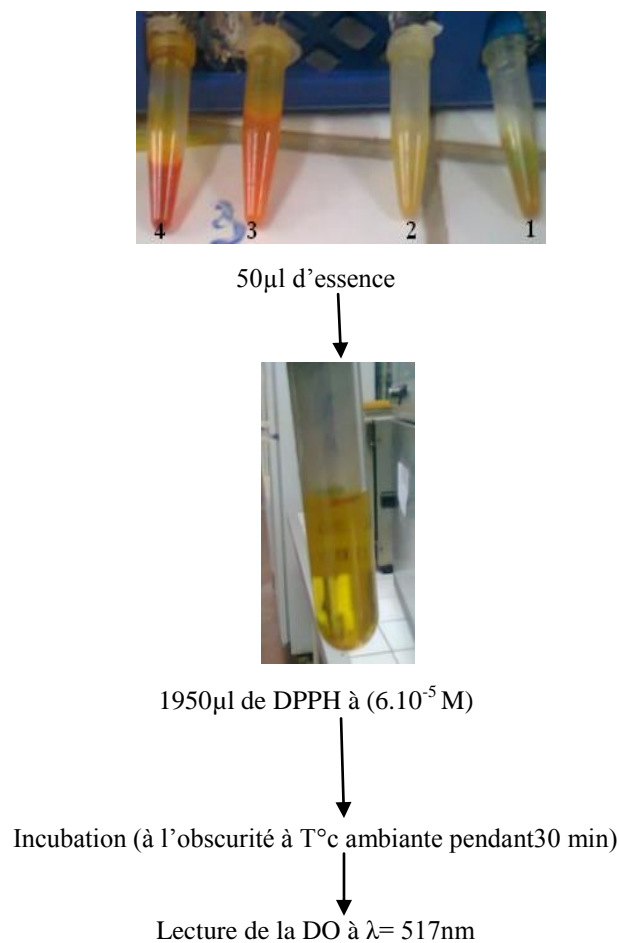


Figure 24: Schéma récapitulatif du dosage de l'activité antioxydante du radical DPPH

6.3.Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration:

Les essences de *Citrus* sont diluées dans le méthanol absolu à la dose de 1%. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour avoir différentes concentrations de 2 à 20 mg/ml (20%, 40%, 60%, 80% et 100%) (Brand-Williams *et al.*, 1995) (Figure 25).

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2 mg de DPPH dans 50 ml de méthanol, puis conservée à l'abri de la lumière dans un flacon opaque pour empêcher sa dégradation (Wu et Ng, 2008).

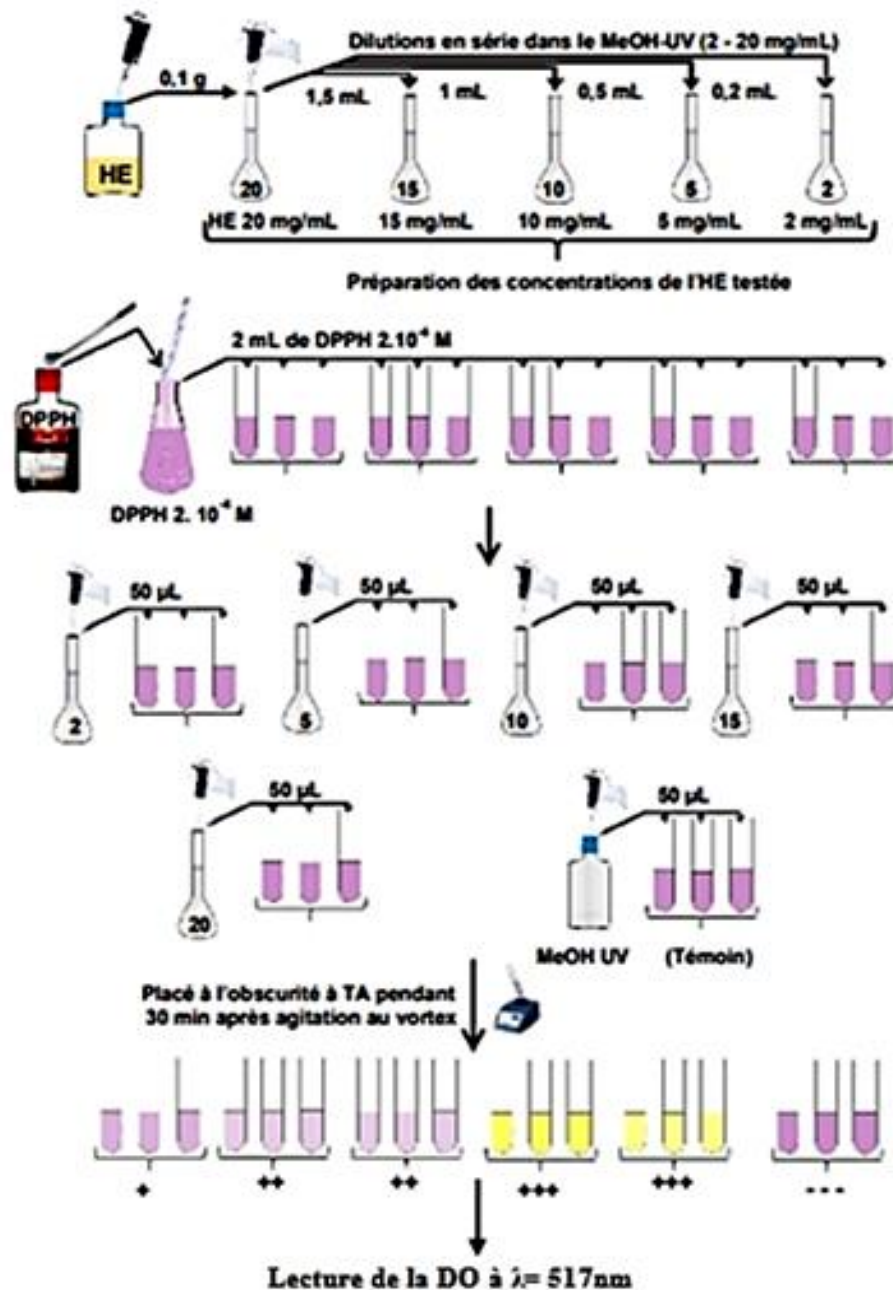


Figure 25: Protocole de la variation du % d'inhibition par DPPH en fonction de la concentration

6.4.L'expression des résultats :

L'activité d'un antioxydant peut être caractérisée par une grandeur appelée l'IC₅₀ (concentration de l'antioxydant qui permet l'inhibition de 50% du signal de référence). L'IC₅₀

permet de comparer l'activité de différents composés antioxydants. Plus l'IC₅₀ est petite, plus l'antioxydant a une activité plus importante (Selaimia et *al.*, 2020).

Pour déterminer l'IC₅₀, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations (Bentabet, 2014). Selon Oyedapo et *al.*, (2015), l'activité antiradicalaire est estimée selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire \%} = \frac{(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle négatif} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon})}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle négatif}} \times 100$$

Le pouvoir antiradicalaire relatif (APR) est inversement proportionnel à l'IC₅₀ ou :
APR = 1/IC₅₀ (Prakash et *al.*, 2007).

7. La mise en évidence de l'activité antibactérienne des essences des *Citrus*

7.1. Tests de confirmation des souches :

7.1.1. Repiquage des bactéries pathogènes :

Les souches utilisées sont sous forme congelée en culture pure. Elles sont activées et maintenues par un repiquage d'un fragment de la gélose nutritive (GN); après avoir décongelé les tubes, en ajoutant 09 ml de l'eau distillée pour avoir une suspension bactérienne. Les tubes à essai sont bien fermés et agités pour rendre le mélange parfaitement homogène. Un ensemencement par la méthode de stries a été fait sur la GN pour obtenir des cultures pures après incubation à 37°/ 24h (De Buyser, 1996).

7.1.2. Purification :

La purification se fait à partir des cultures pures des bactéries à tester, racler à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensemencer le milieu spécifique de chaque bactérie dans les boites de pétrie (Tableau 05). Les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures (Bourgeois et *al.*, 1996).

Tableau 05: Milieux d'identification et conditions de croissance des souches (Guiraud, 2003)

Souches	Milieu d'identification	Conditions de croissance	T° / durée d'incubation
<i>K. pneumoniae</i>	Gélose Hektoen	Aéro-anérobie	37°C / 24h
<i>Staphylococcus sp.</i>	Gélose Chapman	Aérobie	37°C / 24h
<i>E. coli</i>	Gélose EMB	Aéro-anérobie	37°C / 24h
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6 633	Gélose nutritive	Aéro-anérobie	37°C / 24h
<i>Proteus sp.</i>	Gélose Mac Conkey	Aéro-anérobie	37°C / 24h
<i>P. aeruginosa</i>	Gélose cétrimide ou gélose nutritive ordinaire	Aérobie	37°C / 24h
<i>Salmonella sp</i>	Poussent facilement sur milieux ordinaire	Aéro-anaérobie facultatif	35-45°C / 18- 48h
<i>Serratia sp.</i>	milieux ordinaire	Anaérobie facultatif	37°C / 24h
<i>A.baumannii</i>	milieux ordinaire	Anaérobie facultatif	37°C / 24h
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29 212	milieux ordinaire	Anaérobie facultatif	37°C / 24h

7.1.3. Etude des caractères macroscopiques :

La culture des souches purifiées sur gélose appropriée permet d'obtenir des colonies bien séparées et caractéristiques (aspect, taille, couleur, contour...) ce qui nous permet d'effectuer un examen à l'œil nu sur les boîtes de pétri à l'aide d'une loupe binoculaire (Guiraud, 2003).

7.1.4. Etude des caractères microscopiques :

L'étude des caractères microscopiques permet de mettre en évidence la morphologie, l'arrangement des cellules ainsi que le type de la paroi bactérienne grâce à la coloration de Gram (Crosjean et al., 2009).

Les bactéries Gram négatif sont roses et les bactéries Gram positif sont violettes (Singleton, 1999).

7.1.5. Etude des caractères biochimiques :

L'identification des caractères biochimiques spécifiques est réalisée pour contrôler l'appartenance des souches utilisées par ensemencement des galeries biochimiques API® 20 E.

➤ Préparation d'une suspension bactérienne :

A partir des cultures jeunes sur GN, 4 à 5 colonies sont prélevées, bien isolées et identiques dans 5ml d'eau physiologique stérile, puis faire une agitation au vortex pendant quelques secondes (El Hamzaoui et al., 2000). La standardisation de la suspension à

10⁶UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectromètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. Selon Mac Farland, nous admettons qu'une densité optique (DO) comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ germes/ml, la suspension d'inoculum est diluée à 1/10 dans de l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de 10⁶ germes/ml.

➤ **Ensemencement d'une galerie biochimique classique :**

Introduction de la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le coté pour éviter la formation de bulles.

Après incubation à 37°C pendant 18 à 24h, la lecture de la galerie doit se faire après l'addition de certains réactifs (tableau 06).

Tableau 06 : La lecture d'une galerie API [®]20^E (Source: Biomérieux, 2006)

Tests	Compositions actifs	Quantité (mg/cup)	Réactions/Enzymes	Négatif	Positif
ONPG	2- nitophényl	0.223	β -galactosidase	incolore	Jaune(1)
ADH	L-argine	1.9	Arginine Dihydrolase	Jaune	Rouge (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine Décarboxylase	Jaune	Rouge(2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine Décarboxyla	Jaune	Rouge(2)
CIT	Trisodium citrate	0.756	Utilisation de citrate	Jaune/ vert pale	Bleu vert(3)
H2O	Sodium thiosulfate	0.075	Production d'h2o	incolore	Dépôt noir
URE	Urée	0.76	Urease	Jaune	Rouge
TDA	L-tryptophan	0.38	Tryptophan désaminas	Jaune	Marron
IND	L-tryptophan	0.19	Production d'indole	Vert pale	Rose
VP	Sodium pyruvate	1. 9	Production d'acétone	Vp1+Vp2 incolore	10min Rose(5)
GEL	Gélatine	0.6	Gélatinase	Non diffu	Diffusion
GLU	D-glucose	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	0.75	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune
AMY	Amygladine	1.9	Fermentation/oxydation	Bleu-vert	Jaune

- (1) Une très légère couleur est également positive.
- (2) Une couleur orange apparaissent après 36-48 heures d'incubation doit être considérée négative
- (3) Lecture dans la cupule (Zone aérobie).
- (4) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule
- (5) Une légère coloration rose apparait après 10 minutes doit être lue négative.

7.2. L'antibiogramme des souches pathogènes :

➤ Milieu :

- Gélose Mueller Hinton(MH), coulée sur des boîtes de pétri pour une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

➤ Inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 05 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne (Janssen, et *al.*, 1987).
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où plusieurs boîtes de pétri sont ensemencées, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (Courvalin et Leclercq, 2012).

➤ Choix des disques d'antibiotiques :

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012), le choix des antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique. Dans notre travail les disques d'antibiotiques ont été sélectionnés selon leur disponibilité. Nous avons la Gentamycine, Erythromycine, Tétracycline, Oxacilline, Pénicilline G, Vancomycine, Amikacin, Bactrim, Sulphamethoxazole.

➤ **Application des disques d'antibiotiques :**

- Il est préférable de ne pas mettre plus de six disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm.
- Presser les disques à l'aide d'un distributeur des disques d'antibiotiques.
- Une fois appliqués, les disques ne doivent pas être déplacés.

➤ **Incubation :**

- L'incubation des boîtes pendant 18 h à 37°C.
- La durée d'incubation peut être prolongée dans certains cas: Oxacilline, Glucopeptides et Macrolides.

➤ **Lecture :**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied de coulisse, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques des tableaux d'antibiogramme.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire ou résistante.

7.3. Tests de l'activité antibactérienne:

7.3.1. Méthode des Disques:

Cette méthode a pour but de chercher in vitro une concentration active d'une HE donnée, qui permettra d'établir la sensibilité ou la résistance du germe pathogène. Elle repose sur la migration des HE à l'intérieur d'une boîte de pétrie, dans un milieu nutritif solide (Satrani *et al.*, 2007; Boukhatem *et al.*, 2014).

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par l'essence des quatre espèces des *Citrus*.

➤ **Préparation des disques d'aromatogramme:**

- Les disques sont fabriqués à partir de papier Watman n°3 (ou autre type de papier buvard), avec un diamètre de 6 mm.
- Ensuite ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave.

➤ **L'ensemencement:**

- Le milieu de culture utilisé est le MH, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- Les boîtes de pétrie contenant le milieu MH agar sont ensemencées à l'aide d'un écouvillon par la préculture des bactéries.
- Une fois les géloses MH sont ensemencées, les disques imbibés de 20 μ l de l'HE sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen (Rahal, 2003).

➤ **Incubation:**

- Les boîtes de pétri ainsi préparées sont préincubées dans des conditions réfrigérées pendant 2 à 4 heures à +4°C afin de permettre la diffusion de l'agent inhibiteur qui sera suivi par l'incubation pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes.
- Les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition (Figure 26).

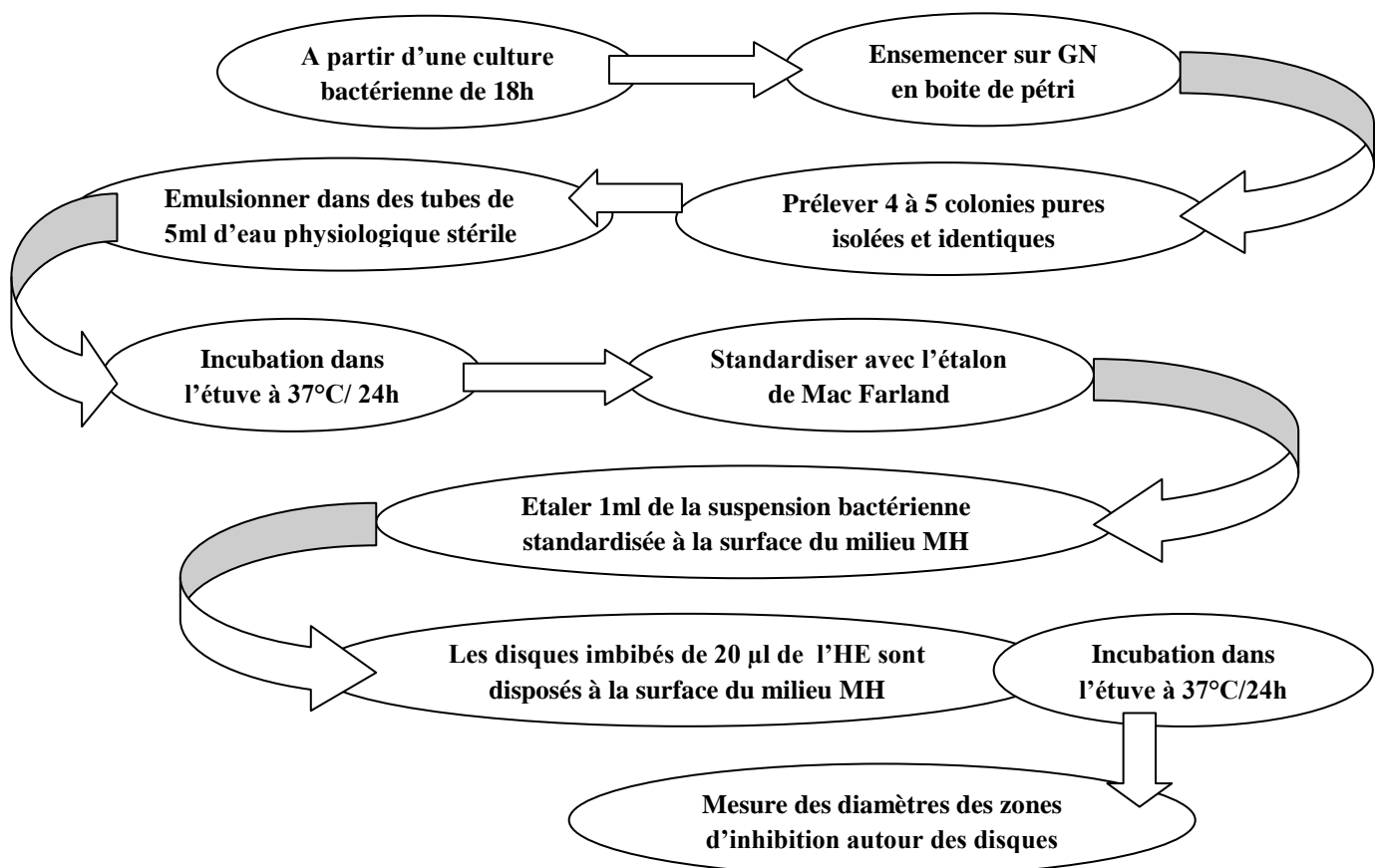


Figure 26: Protocole du test de l'activité antibactérien

➤ **Lecture des résultats:**

La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition (D), qui sont représentées par une auréole claire formé autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (Celikel et *al.*, 2008)

- (-) souche résistante ($D < 8$ mm)
- (+) souche sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$)
- (++) souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)
- (+++) extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

7.3.2. La détermination de la CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée (Denis et *al.*, 2011), Elle consiste à réaliser des dilutions des essences, puis appliquer la méthode de disque afin de déterminer la concentration minimale de l'essence, décrite par Benjlali et *al.* (1986) et rapporté par Billerbeck et *al.* (2002), et qui consiste à disperser l'extrait à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification. Les étapes sont comme suite :

- Une gamme de concentration de l'essence diluée dans 500 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été préparée, en vue d'obtenir un mélange homogène par l'utilisation de vortex.
- chaque dilution d'essence (500 μ l) a été incorporée à 19,5ml de MH maintenu en surfusion. Aussitôt, le mélange a été réparti dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Après solidification du milieu, l'ensemencement a été exécuté par des spots à l'aide d'une pipette Pasteur. Les boîtes de Pétrie sont partagées suivant le nombre de bactéries.
- Ce test nécessite l'utilisation de disques de papier buvard, avec un diamètre de 6 mm, qui sont stérilisés à 110°C, et qui sont pris que par une pince stérile, après ils sont imbibés avec 20 μ l de chaque dilution spécifique à l'essence.
- L'ensemble a été incubé 24h à 37°C°. Un témoin de croissance a été réalisé (Figure 27).
- La lecture consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied de coulisse.

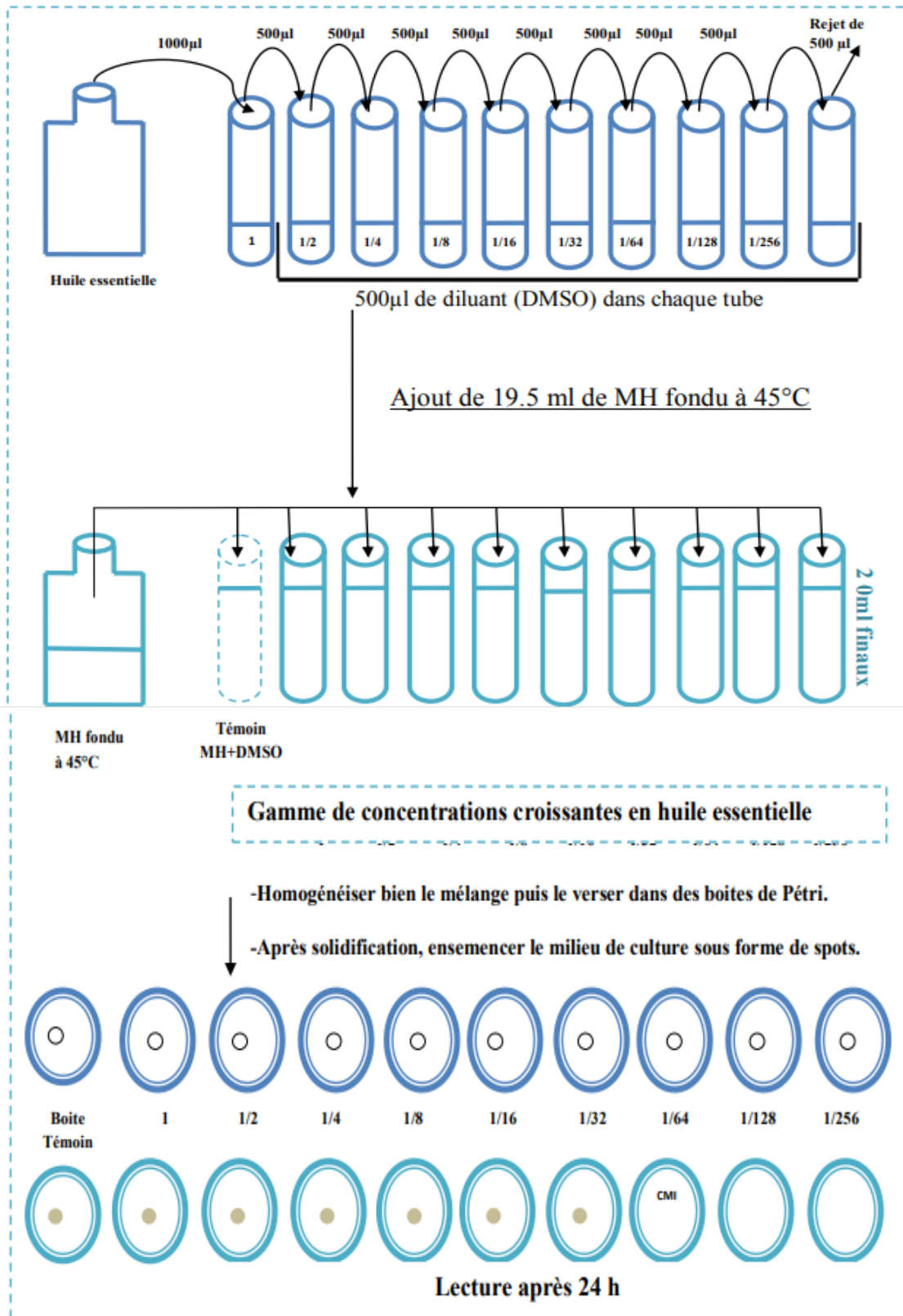


Figure 27: Détermination de la CMI sur milieu solide (Mahfouf, 2017)

8. Détermination de la toxicité aigue des essences des *Citrus*:

La toxicité aigüe est l'étape primordiale qui doit être réalisée sur une substance, lorsqu'on ne dispose que de peu d'information sur sa toxicité. Ce terme est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité et de la DL_{50} . Elle est définie comme la dose déterminée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aiguë, est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée (Oliver, 1986).

Notre travail avait pour but d'évaluer *in vivo* la toxicité des essences de différentes espèces de *Citrus* étudiées, nous avons utilisé différentes voies d'administration intraveineuse (IV), intrapéritonéale (IP) et orale (VO), afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives.

8.1. Protocole :

L'essai consiste à administrer aux animaux plusieurs prises, différentes doses de l'essence testée et noter ensuite l'ensemble des signes toxiques qui surviennent après le traitement. En cas de doses létales, un pourcentage de mortalité et la DL_{50} sont calculés.

Le nombre de souris dépend du nombre de dilutions que nous avons préparé. Pour avoir beaucoup plus de précision, 10 souris de différents sexes sont sélectionnées, 05 mâles et 05 femelles (Les femelles doivent être nullipares et non gravides) ayant un poids de 18-22 g pour chaque lot.

Sachant que nous avons 5 doses à tester pour chaque espèce comprises entre 400 et 5000 mg/kg, il nous faudrait donc 4 lots pour chaque dilution des essences des agrumes, ce qui fait qu'on devrait sélectionner en totalité 200 Souris, auxquelles sont administrées des doses croissantes de la substance à essayer de manière que le pourcentage de mortalité varie entre 0 et 100 %. Ceci parce qu'il est impossible d'obtenir immédiatement 50 % de morts à partir d'un seul groupe.

Chaque souris reçoit 0,5 ml des essences injectée par voie intraveineuse, intrapéritonéale et orale. Ainsi un suivi de 14 jours est assuré pour chaque lot et durant lequel sont notés les paramètres suivants (Turner, 1965):

- Le Comportement de l'animal.

- Le nombre des décès dans chaque lot
- Le pourcentage de mortalité et le calcul de la DL₅₀.

8.2. Observations :

Les animaux doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures; l'observation doit ensuite être quotidienne, pendant 14 jours en tout, sauf dans le cas des animaux qui meurent en cours d'étude ou qui doivent être retirés de l'étude et euthanasiés pour leur épargner des souffrances excessives. Toutefois, la durée d'observation ne doit pas être fixée de manière rigide. Elle doit être en fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire (Chan et Hayes, 1994).

8.3. Expression des résultats:

La DL₅₀ exprimée en mg/kg de poids corporel est déterminée par la méthode par calcul de Dragstedt et lang, (1957). Cette méthode repose sur le postulat suivant :

- Tout animal ayant survécu à une dose qui lui aurait été administrée, survivra à toute dose inférieure à celle-ci ;
- Tout animal ayant succombé à une dose qui lui aurait été administrée, succombera à toute dose supérieure à celle-ci.

Ainsi, pour chaque dose le pourcentage de mortalité est calculé (M %) en cumulant tous les morts observés aux doses inférieures et tous les survivants observés aux doses supérieures.

$$M (\%) = \frac{\text{Nombre de morts cumulés}}{\text{Nombre de vivants cumulés} + \text{nombre de morts cumulés}} \times 100$$

La DL_{50} est calculée par interpolation (Soro et *al.*, 2016):

$$DL_{50} = \frac{50(X_2 - X_1) + (X_1 Y_2 - X_2 Y_1)}{Y_2 - Y_1}$$

X 2 : Dose supérieure encadrant la DL_{50} ;

X 1 : Dose inférieure encadrant la DL_{50} ;

Y 2 : Pourcentage de mortalité correspondant à X2 ;

Y 1 : Pourcentage de mortalité correspondant à X1

9. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart-type. La détermination des taux de signification est effectuée par l'analyse de variance (ANOVA).

Lorsque cette analyse montre des différences significatives, elle est complétée par le test de NEWMAN et KEULS au seuil $P = 5\%$:

- Si $P > 0,05$: Différence non significative
- Si $0.01 < P \leq 0.05$: Différence significative
- Si $0.001 < P \leq 0.01$: Différence hautement significative
- Si $P \leq 0.001$: Différence très hautement significative

1. Extraction des essences de *Citrus* et leurs rendements :

L'extraction des essences des quatre espèces de *Citrus* (*C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantium* et *C. reticulata*) a été réalisée par expression à froid. Dans le cas des zestes d'agrumes (*Rutacées*), les principes volatils sont trop fragiles pour être distillés, donc l'extraction se fait par expression à froid pour obtenir des essences (Roux et al., 2008).

Les rendements obtenus des essences des *Citrus* de notre étude sont faibles, varient entre 0,015 pour *C. paradisi* à 0,095 % pour *C. aurantium* (Tableau 07).

Tableau 07 : Les rendements en essence des quatre espèces des *Citrus*.

espèces	Poids du zeste (g)	Poids de l'essence (g)	Rendement (%)
<i>C. sinensis</i>	6 547	1,547	0,023
<i>C. paradisi</i>	3313	0,497	0,015
<i>C. aurantium</i>	10277	9,764	0,095
<i>C. reticulata</i>	7920	3,088	0,039

D'après nos résultats, les rendements en essences sont faibles par rapport à ceux cités par de nombreux auteurs qui ont rapporté que les rendements en essences chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce (Rega et al., 2003) . Ils sont confirmées par d'autres études qui ont montré des rendements allant de 0,25 à 0,57% pour l'HE de *C. aurantium*; de 0,6 à 0,8% pour *C. sinensis* et de 0,7 à 0,9% pour *C. limonum* (Jeannot et al., 2005; Fuselli et al., 2008). D'autres travaux ont montré des rendements de 0,1% pour l'essence de *Citrus limonum*, de 0,05 - 0,3% pour l'essence de *C. sinensis*, de 0,3 - 0,5% pour l'essence de *C. aurantium* et de 0,4% pour l'essence de *C. paradisi* (Jelen, 2011; Patra, 2012).

Pour expliquer l'impact de la technique d'extraction utilisée sur le rendement en essence obtenu, Ferhat et al. (2010) lors de leur comparaison des techniques d'extraction avec celle de l'expression à froid, ont constaté que le rendement de cette dernière pour une durée d'extraction d'une heure est de 0,05 %. Donc l'expression à froid possède un inconvénient qui est le faible rendement (Laurent et Delerme, 2008).

Bakkali et al. (2008), signalent que le choix du mode d'extraction des huiles essentielles des *Citrus* dépend essentiellement de leur domaine d'application. Dans les

domaines alimentaire et pharmaceutique, il est intéressant de procéder à l'extraction par expression à froid et par hydrodistillation. Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid (Roux, 2008; Ferhat et *al.*, 2010; Fillatre, 2011).

En prenant en considération les données mentionnées précédemment telle que le poids de zeste par rapport au fruit entier, une explication a été trouvée concernant le rendement élevée de l'essence de *C. aurantium* (40,84 %) contrairement au *C. sinensis* avec un pourcentage de 26,19 %.

D'autre part, les résultats obtenus ont démontré que les rendements obtenus sont très faibles dans les parties végétales fraîches. Ceci pourrait être expliqué par la grande proportion d'eau présente dans le végétal (Bendimerad et *al.*, 2005). Ceci est confirmé par les résultats publiés par Kamal et *al.* (2011) qui ont montré des rendements plus élevés des HE extraites par hydrodistillation des écorces séchées à température ambiante de *C. sinensis*.

Ainsi les conditions de transport, l'origine géographique, les pratiques culturelles, le degré de fraîcheur, le stade phénologique et les facteurs environnementaux tels que la température et la qualité du sol, le lieu et la durée de stockage, la technique d'extraction influent énormément sur le rendement (Bourgou et *al.*, 2012; Bennadja et *al.*, 2013; Ghalem et *al.*, 2014; Calo et *al.*, 2015; Mechergui et *al.*, 2016).

Cette différence de rendement entre les quatre espèces peut être expliquée par certains paramètres qui sont plus au moins présents ou réalisés dans l'une ou l'autre des espèces, et qui sont :

- Abondance de zeste par rapport au poids total des fruits.
- Richesse de zeste en poches sécrétoires.
- La durée de conservation qui doit être courte pour éviter le dessèchement de zeste.
- La récolte doit être suivie par l'expression à froid.

2. Caractérisation des essences extraites :

Afin d'évaluer la qualité et la composition d'essences des *Citrus*, des analyses ont été effectuées, tout d'abord en déterminant les caractéristiques organoleptiques, propriétés physico-chimiques, puis des analyses qualitatives et quantitatives par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

2.1. Analyse physico- chimique et organoleptique des essences de *Citrus* :

Les résultats des analyses organoleptiques et physico–chimiques effectuées sur les essences des *Citrus* sont regroupés dans les tableaux 08, 09, 10, 11. Nous avons souligné que les essences sont généralement liquides à température ambiante, mais très volatiles au fait de leur masse moléculaire relativement faible ce qui les différencie des huiles fixes; troubles après refroidissement, d’odeur aromatique, de couleur rouge orangée grâce à la grande teneur en pigments colorés, leur densité est inférieure à celle de l’eau.

Tableau 08: Caractérisation de l’essence de *Citrus sinensis*

Caractéristiques		Echantillon étudié	Norme (NF T 75-203)
Organoleptiques	Odeur	Forte, sucré et très agréable	Douce, sucré, fraîche et fruitée.
	Couleur	Rouge orangée	Jaune à orange
	Aspect	Visqueux mobile	Liquide, mobile qui peut devenir trouble à température basse
	Saveur	Douce	-
Physique	Densité relative à 20°C	0,83	0,850 - 0,870
	Indice de réfraction 20°C	1,489	1,470 - 1,476
	Pouvoir rotatoire	96,6°	+94° - +99°
Chimique	Acidité	2,07	Ne dépasse pas 3

Tableau 09: Caractérisation de l’essence de *Citrus aurantium*

Caractéristiques		Echantillon étudié	Norme (NF T 75-203)
Organoleptiques	Odeur	Fraiche, forte, acidulé, très agréable	Fraiche, hespéridé et zestée
	Couleur	Rouge orangée	Jaune orangé
	Aspect	Visqueux mobile	Liquide, limpide et mobile
	Saveur	Amère	-
Physique	Densité relative à 20°C	0,84	0,854 - 0,886
	Indice de réfraction 20°C	1,481	1,456 - 1,475
	Pouvoir rotatoire	72,4°	+64° - +75°
Chimique	Acidité	2,74	Ne dépasse pas 3

Tableau 10: Caractérisation de l'essence *Citrus paradisi*

Caractéristiques		Echantillon étudié	Norme (NF T 75-338)
Organoleptiques	Odeur	Douce, sucré, très agréable et caractéristique	Caractéristique du zeste de pomélos, acidulé et sucré
	Couleur	Jaune orangé	Jaune
	Aspect	Visqueux mobile	Liquide, limpide et mobile
	Saveur	Amère	-
Physique	Densité relative à 20°C	0,850	0,852 - 0,860
	Indice de réfraction 20°C	1,479	1,474 - 1,479
	Pouvoir rotatoire	96,6°	+94° - +99°
Chimique	Acidité	2,40	Ne dépasse pas 3

Tableau 11: Caractérisation de l'essence de *Citrus reticulata*

Caractéristiques		Echantillon étudié	Norme (NF T 75-203)
Organoleptiques	Odeur	fraîche et aromatique	fraîche et aromatique
	Couleur	orange	Du jaune, verdâtre jusqu'à l'orange rougeâtre, selon le degré de maturité de fruit avec une légère fluorescence bleu
	Aspect	Liquide	Liquide mobile
	Saveur	Douce	-
Physique	Densité relative à 20°C	0,857	0,850 - 0,855
	Indice de réfraction 20°C	1,429	1,473 - 1,477
	Pouvoir rotatoire	71,7°	+64° - +75°
Chimique	Acidité	2,53	Ne dépasse pas 3

Suite à la comparaison des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des essences de notre étude à ceux de la norme (NFT 75-203), nous déduisons qu'elles sont conformes sauf dans les cas suivants :

- Tous d'abord, si le fruit d'agrumes est récolté avant la maturité, il ne pourra jamais acquérir les qualités organoleptiques convenables (Pech et *al.*, 1994).
- Certains résultats ont dépassé modérément les limites telles que l'indice de réfraction, ceci peut être due principalement à la présence des impuretés majoritaires comme les cires, puisque le stockage des essences à basse température provoque la précipitation des substances insolubles qui sont: les monoestères insaturés et les alcools à longues chaînes (Puleo et *al.*, 1994).

Cependant la saveur acide est due à des substances originales contenues dans tous les fruits des *Citrus* comme naringoside, hespiroside et surtout limonoïde (Lefief Delcourt, 2009).

L'odeur typique des HE dépend des organes, des espèces et des origines des plantes (Degryse et *al.*, 2008). L'huile essentielle est un mélange complexe de molécules odorantes. C'est un liquide homogène, bien que constitué d'un assemblage hétérogène sur le plan chimique par la diversité des structures présentes (Endrias, 2006).

Les propriétés physico-chimiques des HE dépendent de plusieurs facteurs, comme les conditions environnementales et climatiques, la saison de la cueillette des plantes, les conditions de stockage, la méthode utilisée pour leur extraction et les conditions d'analyses employées pour l'identification des constituants de ces huiles (Bardeau, 2009).

2.2.Détermination de la composition biochimique des essences par CG/SM

L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour les quatre essences: 29 composés pour l'essence de *C. aurantium* avec un pourcentage de reconnaissance de 99.92% (Tableau 12), 08 composés pour l'essence de *C. reticulata* (99.97%) (Tableau 13), 17 composés pour l'essence de *C. sinensis* (99.55%) (Tableau 14), et 31 composés pour l'essence de *C. paradisi* (97.81%) (Tableau 15).

Cette analyse montre que ces essences présentent d'une part un composé majoritaire qui est le « limonène » avec des pourcentages différents (94.75 % pour l'essence de *C. reticulata*, 87.38 % pour l'essence de *C. sinensis*, 86.29% pour l'essence de *C. aurantium* et 82.98% pour l'essence de *C. paradisi*). Selon Bakkali et *al.* (2008), la composition chimique des huiles de *Citrus* diffère d'une espèce à l'autre. Ces mêmes auteurs ont identifié 25 à 60 composés dont le limonène est le composé majoritaire.

D'autre part, en plus de limonène, l'essence de l'essence de *C. aurantium* présente des composés mineurs: β -pinène (3.59%), α -pinène (1.47%), 2-Furancarboxaldehyde (1.13%) et sous forme de traces: 1,6-octadienol (0,83%), n-Hexadecanoicacid (0.78%), Osthole (0.67 %) (Tableau 12). Les composés mineurs des essences de *C. reticulata* sont représentés par β -pinène (2.44%), et sous forme de traces: 1-5 dimethylvenyl (0.72 %), α pinène (0.70 %), β -phéllandrene (0.61 %) (Tableau 13). Pour *C. sinensis*, des composés mineurs dans l'essence sont représentés par l'acide acétique (2.94 %), Bicycloheptène (2.43 %), β -pinène (2.33 %), et que sous forme de traces α -pinène (0.75 %), et Octanol (0.16 %) (Tableau 14). Pour *C. paradisi*: β -myrcene (2.66%), 2H-1-benzopyranone (2.07 %), Caryophyllene (1.25%), α -pinène (0.91 %) et l'acide n-hexadecanoïque (0.88 %) (Tableau 15).

Tableau 12: Composition chimiques (%) de l'essence de *C. aurantium* par CG/SM

Nombre de pics	Temps de rétention (min)	Composition chimique	% relatif	Taux de reconnaissance
1	17,85	α -pinène	1,47	95
2	20,03	β -phellandrene	0,31	91
3	21,04	β -pinène	3,59	94
4	23,52	D-limonène	86,29	94
5	23,83	1, 3, 7-octatriene	0,36	95
6	24,84	Formicacid	0,19	91
7	26,05	1,6-octadienol	0,83	94
8	29,81	α -terpineol	0,10	91
9	30,24	Decanal	0,20	91
10	31,81	β -myrcene	0,26	90
11	34,84	Cyclohexene	0,07	95
12	36,23	2,6-octadienol	0,15	91
13	37,68	Caryophyllene	0,14	99
14	39,63	Germacrene D	0,24	96
15	41,99	1,6, 10-dodecatrienol	0,33	91
16	48,83	2(3H)-Naphthalenone	0, 55	99
17	52,81	n-Hexadecanoicacid	0,78	99
18	54,87	7H-Furo-benzopyranol	0,28	93
19	56,59	Osthole	0,67	96
20	56,83	9,12-octadecadienoic acid	0,78	99
21	56,94	(z) 6, (z) 9-pentadecadienol	0,36	95
22	57,04	9-octadecenoic acid,	0,15	90
23	58,20	Cobalt	0,08	50
24	58,69	2-Furancarboxaldehyde	1,13	49
25	58,85	N.I.	0,16	35
26	59,64	Auraptanol	0,10	72
27	63,23	N.I.	0,07	27
28	65,03	1H-indole, 5-methyl-2-phenyl	0,21	62
29	65,11	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	0,15	90
Total	/	/	99,92	/

Tableau 13: Composition chimiques (%) de l'essence de *C. reticulata* par CG/SM.

Nombre de pics	Temps de rétention (min)	Composition chimique	% relative	Taux de reconnaissance
1	1.727	Acide formique	0.24	4
2	2.012	Ether éthyle	0.11	91
3	17.907	α pinène	0.70	97
4	20.099	β -phéllandrene	0.61	91
5	21.079	β -pinene	2.44	94
6	23.169	D-limonene	94.75	94
7	26.086	1-5 dimethylvenyl	0.72	49
8	40.103	Naphtalene	0.41	99
Total	/	/	99.97	/

Tableau 14: Composition chimiques (%) de l'essence de *C. sinensis* par CG/SM

Nombre de pics	Temps de rétention (min)	Composition chimique	% relative	Taux de reconnaissance
1	2.50	Hexane	0,11	90
2	5.99	Acetic acid	2,94	91
3	7.65	2-Butanone	1,24	86
4	17.82	α -pinène	0,75	97
5	20.02	Bicyclo (3, 1,1) heptane	2,43	91
6	21.01	β -pinène	2,33	91
7	23.21	Limonène	87,38	93
8	24.81	1-Octanol	0.16	90
9	26.03	1-6-octadienol	0.81	91
10	29.50	4H-pyranone	1.35	81
11	30.24	Decanal	0.40	91
12	30.97	2-Furancarboxaldehyde	0.72	93
13	33.94	2-methoxyvinylphenol	0.19	91
14	35.22	1,2-Cyclohexanediol	0.44	53
15	39.98	Naphthalene	0.25	91
16	52.70	n-Hexadecanoic acid	0.28	98
17	56.69	9,12-octadecadienoic acid	0.20	99
Total	/	/	99.55	/

Tableau 15: Composition chimiques (%) de l'essence de *C. paradisii* par CG/SM.

Nombre de pics	Temps de rétention (min)	Composition chimique	% relative	Taux de reconnaissance
1	1.870	Ethanol	0.61	90
2	17.937	α pinene	0.91	96
3	20.116	β -phellandrene	0.49	90
4	21.114	β -myrcène	2.66	86
5	23.443	Limonene	82.98	93
6	23.840	Octariene	0.38	96
7	24.898	Acide formique	0.20	91
8	26.103	Octadienol	0.19	72
9	29.905	Cyclohexane	0.10	72
10	30.315	Decanal	0.29	86
11	36.331	α -cubebene	0.53	96
12	36.723	1,6 cyclodécadiene	0.42	95
13	37,804	Caryophyllene	1.25	99
14	38.945	Cycloundécatriene	0.17	98
15	39.111	Cycloheptasiloxane	0.08	90
16	39.741	1,6cyclodécadiene	0.31	96
17	40.863	Naphthalene	0.56	94
18	43.958	Sylane	0.19	55
19	48.139	Cyclononasiloxane	0.10	55
20	48.947	Naphthalenone	0.82	95
21	51.863	Cycloheptasiloxane	0.09	52
22	52.927	Acide n-hexadécanoïque	0.88	98
23	55.267	Acide benzèneacétique	0.09	50
24	55.962	Acide 9,12octadécadiénoïque	0.09	99
25	56.674	Osthole	0.21	99
26	58.361	7 chloro-ethyl	0.17	46
27	58.741	2-naphthaldehyde	0.32	50
28	63.933	Cyclononasiloxane	0.16	52
29	65.263	Acide 1-2 benzenedicarboxylique	0.27	80
30	67.003	Acide benzenesulfurique	0.22	56
31	67.538	2H-1-benzopyranone	2.07	46
Total	/	/	97.81	/

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

Nous notons l'absence totale de p-cymène dans toutes les huiles des espèces d'agrumes testées. Quintero et *al.* (2003) ont considéré que le procédé d'extraction est adéquat uniquement lorsque l'huile essentielle obtenue ne contient pas de p-cymène, considéré comme un bon indicateur de l'oxydation des monoterpènes dans les HE d'agrumes.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Rossi (2013) qui a trouvé que le composé majoritaire de *C. sinensis* est le limonène avec un pourcentage de l'ordre de 95,1% et ceux de Dongmo et *al.*, (2001) qui ont obtenu le limonène également comme principal composé avec un pourcentage de 82,36%.

En étudiant la composition chimique des HE de *C. sinensis* et *C. limonum*, Moufida et Marzouk (2003) ont confirmé que ces HE sont constituées majoritairement de limonène. Ce composé varie entre 68 à 98% pour *C. sinensis* et de 45 à 75% pour *C. limonum*, et que le linanol n'est représenté qu'à des taux faibles de 0,2 et de 10,23% respectivement.

Plusieurs travaux ont montré que généralement les HE de *Citrus* sont constituées principalement de composés monoterpéniques, alors que les autres composés comme les alcools, les aldéhydes et les esters ne sont représentés qu'avec des teneurs faibles allant de 1.8 à 2.2 % (Bousbia et *al.*, 2009; Njoroge et *al.*, 2009; Yang et *al.*, 2009; Hosni et *al.*, 2010; Kamal et *al.*, 2011).

Notons aussi que les fruits récoltés à partir des plantes adultes de *Citrus aurantium* par De Moraes et *al.*, 2007 dans un verger à São Paulo State University, ont pu donner une huile essentielle composée par deux monoterpènes: limonène comme constituant majoritaire à 97,83% et le myrcène à 1,43% et un aldéhyde octanal à 0,45%. Le reste de la composition de l'huile (0,29%) n'a pas été identifiée. Ammad et *al.* (2018) ont trouvé que les principaux composés aromatiques de l'huile essentielle d'agrumes sont: limonène, β -myrcène, α -pinène, p-cymène, β -pinène, terpinolène. Une autre étude a montré la composition des Constituants chimiques d'HE de zeste de citron: 90% D-limonène (monoterpène cyclique), β -pinène (11,58 %), gamma terpinène (9,28 %), sabinène (1,83 %), α -terpinéol, linalyl-acétate, acétate de géranyl, coumarine et autres constituants mineurs (Goetz, 2014).

D'autre part, de nombreux facteurs peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles tels que les conditions environnementales, la technique d'extraction, le séchage, la période et le milieu de récolte, les pratiques culturelles et l'âge du matériel végétal

(Ollé et Bender, 2010; Schmidt, 2010; Bourkhiss et al., 2011; Djerrad et al., 2015; Silva et al. 2016).

3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des essences des *Citrus*:

L'administration par voie intrapéritonéale de la carragénine entraîne une augmentation du volume de la patte des souris après une heure. L'évolution de l'œdème de la patte de souris a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse pendant une période allant de 0 à 180 min avec un intervalle de 30 min.

Les résultats obtenus montrent que l'administration de l'anti-inflammatoire diclofénac (50 mg/kg) provoque une diminution hautement significative ($P < 0.001$) du volume de la patte des souris.

Le groupe traité par l'essence de *C. reticulata* a enregistré des pourcentages d'inhibition du volume de l'œdème hautement significatifs ($P < 0.001$) de $17,88 \pm 0,07\%$ au temps 0 min, de $12,24 \pm 0,07\%$ à 60 min, de $12,87 \pm 0,09\%$ à 90 min de $13,34 \pm 0,11\%$ à 120 min, de $13,48 \pm 0,09\%$ à 150 min et de $9,68 \pm 0,16\%$ à 180 min par rapport à celui des souris du groupe du témoin positif (Tableau 16).

Après 90 min de l'injection du carragénine, les pourcentages d'inhibition du volume des pattes des souris traitées par les essences de *C. sinensis*, *C. paradisi* et *C. aurantium* sont respectivement de $5,53 \pm 0,38\%$, de $5,53 \pm 0,12\%$ et de $4,9 \pm 0,13\%$, ils sont hautement significatifs ($P < 0.001$) par rapport à celui des souris traitées par le diclofénac de sodium ($7,37 \pm 0,06\%$) à une dose de 50 mg/kg du poids corporel (Tableau 16).

Au temps 0 min et à 150 min, les pourcentages d'inhibition du volume des pattes des souris traitées par l'essence de *C. paradisi* sont de $20,15 \pm 0,51$ et de $1,23 \pm 0,09\%$ respectivement, ils sont de $20,15 \pm 0,19$ et $1,23 \pm 0,40\%$ respectivement par le traitement de l'essence de *C. sinensis*, et ils sont de $21,14 \pm 0,08$ et $1,51 \pm 0,05\%$ respectivement par le traitement de diclofinac de sodium, ils ne sont pas significativement différents ($P > 0.05$) (Tableau 16).

Tableau 16: Pourcentages d'inhibition du volume de l'œdème en fonction du temps.

Diclofénac, Essences de <i>Citrus</i>	Evolution de l'œdème en fonction du temps						
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Diclofénac	21,14±0,08	13,97±0,13	8,5±0,11	7,37±0,06	5,9±0,07	1,51±0,05	0,63±0,06
<i>C. sinensis</i>	20,15±0,19 ^{ns}	16,5±0,26 ^{***}	6,12±0,33 ^{***}	5,53±0,38 ^{***}	4,13±0,38 ^{**}	1,23±0,40 ^{ns}	00,00 ^{***}
<i>C. paradisi</i>	20,15±0,51 ^{ns}	16,5±0,14 ^{***}	6,12±0,31 ^{***}	5,53±0,12 ^{***}	4,13±0,08 ^{***}	1,23±0,09 ^{ns}	00,00 ^{***}
<i>C. aurantium</i>	15,69±0,17 ^{***}	11,42±0,19 ^{***}	7,02±0,14 [*]	4,9±0,13 ^{***}	1,62±0,08 ^{***}	00,00 ^{***}	00,00 ^{***}
<i>C. reticulata</i>	17,88±0,07 ^{***}	13,34±0,11 [*]	12,24±0,07 ^{***}	12,87±0,09 ^{***}	13,34±0,11 ^{***}	13,48±0,09 ^{***}	9,68±0,16 ^{***}

Les données sont exprimées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (e.s.m.).

* : $P < 0,05$. ** : $P < 0,01$. *** : $P < 0,001$. ns: non significative.

Une différence significative ($P < 0,05$) a été enregistrée des pourcentages d'inhibition du volume de la patte des souris du témoin positif et ceux des souris traitées par les essences des *Citrus* à une dose de 50 mg/kg du poids corporel, après une durée de 120 min pour la espèce de *C. aurantium*, après 150 min pour les deux autres espèces de *C. paradisi* et *sinensis*, et après une durée de 180 min pour la espèce de *C. reticulata*.

La comparaison deux à deux entre les groupes du traitement montrent que la différence n'était pas significative ($P > 0,05$) entre le témoin positif avec *C. paradisi* et *C. sinensis* à 0 min et avec *C. paradisi* et *C. sinensis* à 150 min

L'œdème induit par la carragénine est le model le plus utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire, elle provoque une inflammation typiquement liée à l'activation de la cyclooxygénase (Fall, 2009; Serafini et al., 2015).

Dès sa pénétration dans l'organisme, la carragénine est rapidement détectée par les cellules immunitaires résidentes dans les tissus: macrophages, mastocytes. La reconnaissance de ce corps étranger s'effectue via le récepteur NOD2. L'activation du récepteur déclenche une voie transductionnelle distincte, aboutissant à l'activation du facteur de transcription: kappa B du facteur nucléaire (NF- κ B). Ce dernier étant un déterminant clé de la cascade inflammatoire et occupe un rôle central dans l'activation transcriptionnelle des gènes pro-inflammatoires (IL8, TNF α , IL1 β , histamine...) (Borthakur et al., 2007). D'autres études ont démontré que la carragénine induisait aussi l'inflammation par la synthèse de l'oxyde nitrique synthase inducible (NOSi) et de l'IL8 (Liao et al., 2012).

L'effet tardif du diclofénac sur la formation de l'œdème est en relation direct avec son mode d'action. L'activité des AINS sur la formation d'œdème induit par la carragénine est bien connue. Ceci est en relation direct avec leurs propriétés de puissant inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, et ce par l'inhibition de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) pendant la phase tardive de l'induction à la carragénine (Khabbal et *al.*, 2006; Bose et *al.*, 2007). Les cyclo-oxygénases interviennent dans la formation de prostaglandines à partir du métabolisme de l'acide arachidonique (Araico et *al.*, 2007; Li et *al.*, 2011).

En effet il a été démontré que l'injection de la carragénine induisait dès la 1ère heure la synthèse des COX-2 où elle atteint sa concentration maximale à 3h. Il s'en suit une augmentation des prostaglandines dont le pic maximal est observé à la fin de la phase précoce. Tout ceci expliquerait la forte réponse anti-inflammatoire tardive des AINS (Riahi et *al.*, 2011).

C'est un évènement qui fait intervenir trois phases distinctes, parfois regroupées en 2 phases. En effet, il est connu que, chez l'animal vivant, la carragénine dans une première phase provoque la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation. Dans une seconde phase, cette molécule de référence induit la synthèse de prostaglandines principalement, de protéases et de lysosomes. Cette dernière étape est sensible aux antagonistes de synthèse des prostaglandines et aux anti-inflammatoires naturels ou de synthèse (Goshwami et *al.*, 2013; Reto et *al.*, 2014).

Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec ceux trouvés par Awaad et *al.* (2011) et Amezouar et *al.* (2013) qui suggèrent que l'activité anti-inflammatoire dans la première phase de l'inflammation produite par l'injection de la carragénine, reflète une action inhibitrice de la libération et/ou la production des médiateurs attribués à cette phase (histamine et bradykinine).

L'activité biologique d'un extrait végétale est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leur effets synergiques (Zhiri, 2006; Oussou et *al.*, 2010). En effet, le limonène a la propriété d'inhiber la production d'oxyde nitrique (NO) (qui a un rôle central dans les réponses inflammatoires) (Rufino et *al.*, 2015).

Les essences de *Citrus* sont riches en différents constituants chimiques terpéniques (sesquiterpène, aldehyde et lactone) et le composé oxygénique représenté par la cétone qui peut justifier cette activité. Cette observation est soutenue par plusieurs travaux dont ceux de Deschemaeker, 2004.

4. Estimation du pouvoir antioxydant des essences des *Citrus*

Selon la littérature, les deux méthodes les plus utilisées dans l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles sont celle de la réduction du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et celle de blanchissement du β -carotène dans l'acide linoléique (Gachkar et *al.*, 2007; Eyob et *al.*, 2008; Mayachiew et Devahastin, 2008; Hussain, 2009; Athamena et *al.*, 2010).

Nous avons utilisé ces deux méthodes puisque, les résultats d'une seule méthode ne peuvent donner qu'une suggestion réduite de l'activité antioxydante. La complexité chimique des huiles essentielles est souvent un mélange d'une vingtaine de composés avec des groupes fonctionnels différents, la polarité et le comportement de produits chimiques peuvent mener aux résultats dispersés, selon la méthode utilisée. L'évaluation de l'activité est donc nécessairement réalisée par au moins deux méthodes différentes (Sariburun et *al.*, 2010; Boukhalkhal et *al.*, 2018).

4.1. Bioautographie

Pour la chromatographie sur couche mince (CCM), le système choisi est: Hexane/ Chloroforme/ Acétone (70:27:3; v/v), il a donné la meilleure migration des spots (séparation visible) (Figure 28)

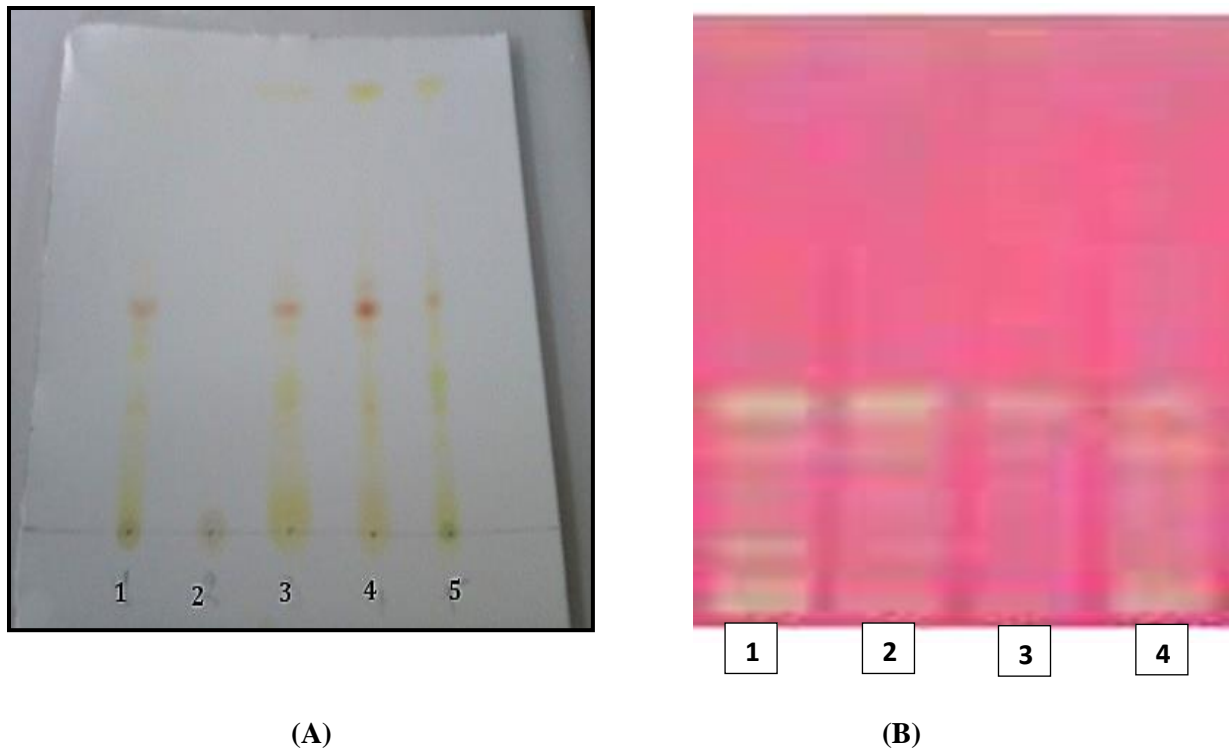


Figure 28: La bioautographie des essences de *Citrus* étudiées par:
A/ à gauche β -carotène B/ à droite DPPH

(A): 1. *C. sinensis*, 2. Contrôle négatif, 3. *C. paradisi*, 4. *C. aurantium*, 5. *C. reticulata*
(B): 1. *C. sinensis*, 2. *C. paradisi*, 3. *C. aurantium*, 4. *C. reticulata*

D'après les résultats obtenus, la méthode de blanchissement du β -carotène serait particulièrement utile pour des investigations des antioxydants lipophiles et serait appropriée pour étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles. En revanche, si des composés polaires sont examinés seulement par cette méthode, ils seraient considérés en tant qu'antioxydants faibles.

La présence d'antioxydants dans le milieu comme ceux présents dans les essences étudiées réduit l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes (radicaux libres produits par l'acide linoléique). Ces derniers formés dans le système seront donc neutralisés par les antioxydants (Dib et *al.*, 2013).

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006), c'est le cas des essences de *Citrus* testées. Un antioxydant primaire est défini comme étant un composé chimique qui retarde ou empêche l'étape d'initiation et interrompt l'étape de propagation de la réaction d'oxydation des lipides (Miliauskas et *al.*, 2004).

La présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Yang et al., 2009).

La réduction du radical de DPPH dépend de la nature, de la structure et de la concentration des composés antioxydants (Basile et al., 2006; Bozin et al., 2006; Kouri et al., 2007). Il peut également être affecté par la lumière, l'oxygène, le pH, et la durée de la réaction (Kozarski et al., 2012; Reis et al., 2012; Shah et Modi, 2015).

L'intérêt de ce test est la mesure de l'activité de balayage d'un radical libre (DPPH°) par les fractions antioxydantes (huile essentielle) (Ho et al., 2010).

4.2. Dosage de l'activité anti-radicalaire:

Les résultats de l'activité antioxydante représentée par la concentration Inhibitrice à 50% (IC₅₀) et le pouvoir anti-radicalaire relatif (ARP) des essences de *Citrus*, du BHA et de la quercetine sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17: Valeurs de l'activité antioxydante des essences des *Citrus* par le test de DPPH et ARP.

Essences de <i>Citrus</i> , Quercetine et BHA	IC ₅₀ (mg/ml)	ARP
<i>Citrus reticulata</i>	1,9068 ± 0,0912 ^f	0,52443 ± 0.015 ^a
<i>Citrus aurantium</i>	6,2086 ± 0,0308 ^e	0,16106 ± 0.025 ^b
<i>Citrus paradisi</i>	12,7662 ± 0,0736 ^d	0,07833 ± 0.086 ^c
<i>Citrus sinensis</i>	19,1567 ± 0,0499 ^b	0,05220 ± 0.098 ^c
Quercetine	15,9938 ± 0,0128 ^c	0,06252 ± 0.125 ^c
BHA	21,9938 ± 0,0128 ^a	0,04083 ± 0.043 ^c

Les données sont exprimées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (e.s.m.).

Les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0.05$).

➤ Test de DPPH

Le Butylhydroxyanisole (BHA) et la quercetine utilisés comme standards dans ce travail ont montré une activité antioxydante puissante avec des IC₅₀ de l'ordre de 21,9938 ± 0,0128 mg/ml et 15,9938 ± 0,0128 mg/ml respectivement. En revanche, cette activité est significativement ($P < 0.05$) inférieure aux valeurs d'IC₅₀ retrouvées avec les essences de *C. reticulata* (1,9068 ± 0,0912 mg/ml), *C. aurantium* (6,2086 ± 0,0308 mg/ml) et *C. paradisi* (12,7662 ± 0,0736 mg/ml).

Parmi les quatre essences testées, l'essence de *C. reticulata* représente l'essence la plus active avec une IC_{50} de l'ordre de $1,9068 \pm 0,0912$ mg/ml et elle est significativement ($P < 0.05$) supérieure aux valeurs retrouvées avec les autres essences, suivi par l'essence de *C. aurantium* ($6,2086 \pm 0,0308$ mg/ml) et l'essence de *C. paradisi* ($12,7662 \pm 0,0736$ mg/ml). Par contre, l' IC_{50} de l'essence de *C. sinensis* ($19,1567 \pm 0,0499$ mg/ml) est significativement ($P < 0.05$) inférieure à celles trouvées pour les autres essences testées (Figure 29).

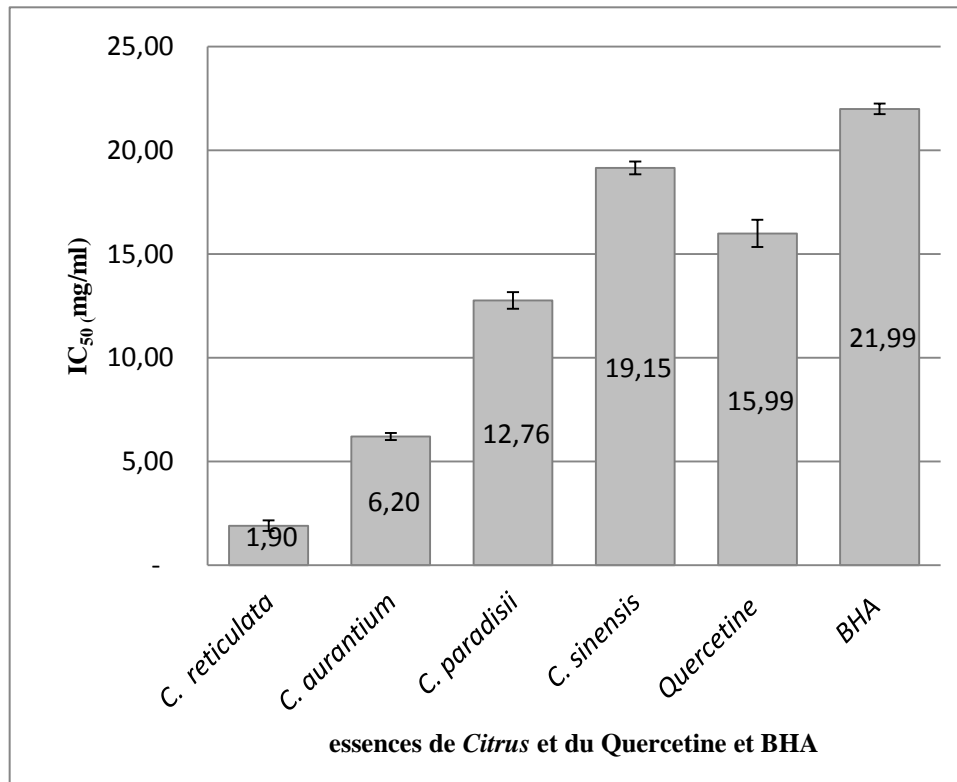


Figure 29: Concentration inhibitrice des essences de *Citrus*, de la Quercetine et du BHA par DPPH

Presque 90% des études sur l'activité antioxydante utilisent la méthode du DPPH (Kulisic et al., 2004). Ce test est très utilisé car il est rapide, facile et non coûteux (Hadbaoui, 2012), mais aussi parce que les mesures de l' IC_{50} exprimées en mg/ml (basses concentrations) sont comparables entre elles et à celle d'une référence (Ozkan et al., 2019).

Pour les essences de notre étude, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur, de la forme libre en solution

dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (Ruiz-Ciau, et *al.*, 2017).

Quelques composés réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet et *al.*, 1997). En présence d'un radical libre DPPH°, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (Villano et *al.*, 2007; Boughendjioua et *al.*, 2017). Cette activité est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle de certains composés de l'essence.

➤ **Pouvoir antiradicalaire relatif (ARP)**

Un autre paramètre qui exprime le pouvoir anti-radicalaire a été calculé à partir du paramètre noté «ARP» (égal à $1/IC_{50}$), plus les valeurs de l'ARP s'éloignent de zéro plus l'activité anti-radicalaire augmente.

Le pouvoir anti-radicalaire des essences de *Citrus* varie de $0,05220 \pm 0,098\%$ à $0,52443 \pm 0,015\%$ (Figure 30). Les essences de *C. reticulata* et *C. aurantium* ont la capacité antioxydante la plus élevée ($P < 0,05$) avec des valeurs de $0,52443 \pm 0,015\%$ et $0,16106 \pm 0,025\%$ respectivement, suivi par l'essence de *C. paradisi* ($0,07833 \pm 0,086\%$) et *C. sinensis* ($0,05220 \pm 0,098\%$).

Le pouvoir anti-radicalaire des essences de *C. reticulata* et *C. aurantium* est significativement ($P < 0,05$) supérieure aux valeurs retrouvées avec le BHA ($0,04083 \pm 0,043\%$) et la quercétine ($0,06 \pm 0,00\%$).

Aucune différence significative ($P > 0,05$) n'a été enregistrée entre le pouvoir anti-radicalaire des essences de *C. paradisi* et *C. sinensis* et celles des standards testés (le BHA et la quercétine).

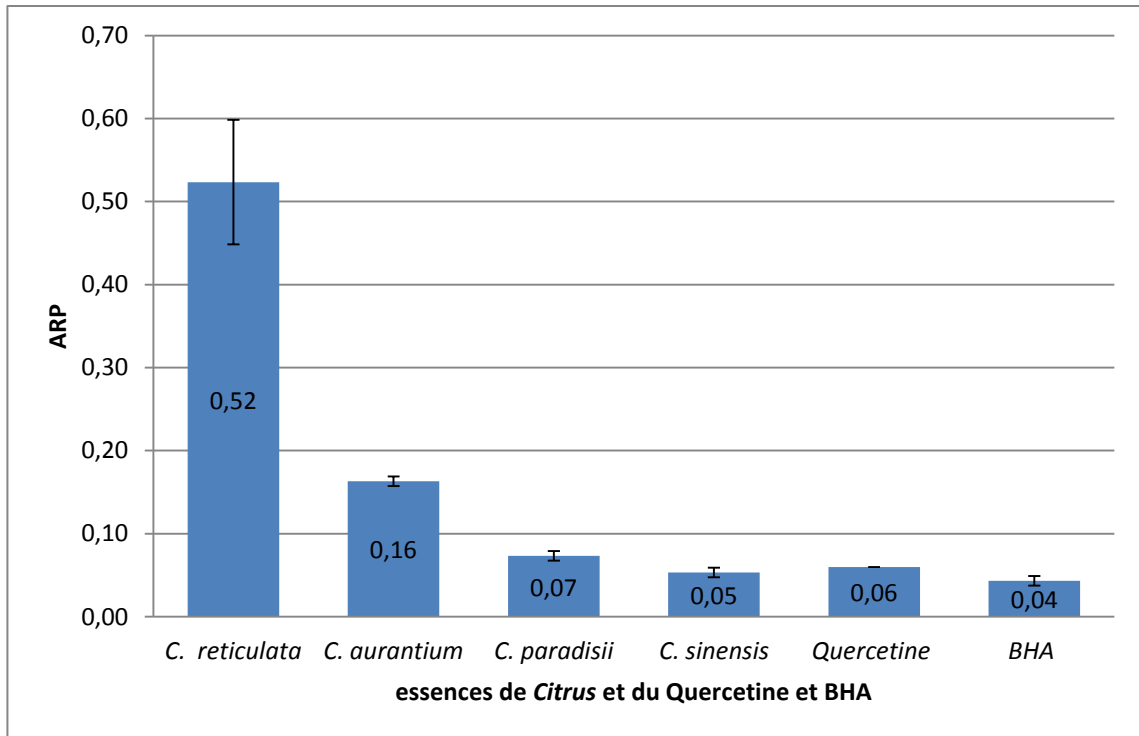


Figure 30: Pouvoir antiradicalaire des essences de *Citrus*, Quercetine et BHA

En plus de la composition chimique différente, la comparaison des résultats reste non fiable en raison des différents paramètres adoptés lors de l'analyse et les protocoles modifiés qui utilisent différentes concentrations de DPPH, différents solvants et aussi différents temps de réaction (Selmi et *al.*, 2016).

D'après les travaux de Sarrou et *al.*, (2013) qui ont porté sur l'étude de l'activité antioxydante de différentes parties de *C. aurantium* (fleurs, feuilles, zeste) cultivé en Grèce, l'HE de cette plante a été caractérisée par une remarquable activité de neutralisation des radicaux libres. Il semble que l'effet antioxydant puissant de certaines espèces appartenant au genre *Citrus* pourrait être attribué à la teneur élevée en D-limonène (Roberto et *al.*, 2010).

Il a été rapporté que l'activité antioxydante des huiles essentielles des agrumes est affectée par sa composition physico-chimique, surtout sa teneur en D-limonène (Wei et Shibamoto, 2007; Yang et *al.*, 2010).

Cependant l'activité oxydante est peut être due à la présence de l'unité isoprénique dans les constituants des huiles essentielles (Mau et *al.*, 2003). Smith et *al.*, (2001) ont attribué cette activité dans les huiles essentielles des oranges au pourcentage élevé (jusqu'à 97%) des monoterpènes et des sesquiterpènes. Ainsi, les huiles essentielles des *Citrus* sont

caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes dont le D-limonene est le constituant majeur, jouant un rôle principal dans l'activité antioxydante (Girenavar et *al.*, 2007; Ao et *al.*, 2008).

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des essences qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Sing et *al.*, 2006). En effet, les composés majeurs testés séparément donnent des résultats inférieurs comparés à l'activité antioxydante de la totalité d'une huile essentielle (Safaei-Ghomi et *al.*, 2009).

Kechar et *al.* (2016), ont rapporté que les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange font que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et de la nature des antioxydants. Les processus oxydatifs sont multiples et la nature de l'activité antioxydante peut être multiforme et attribuée à différents mécanismes (Ozen, 2009).

4.3.Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration:

Pour les essences de *C. reticulata*, *C. aurantium*, *C. paradisi* et le *C. sinensis*, le pourcentage d'inhibition augmente linéairement avec la concentration (figure 31).

À une concentration ≤ 0.00025 mg/ μ l, nous avons remarqué une différence significative ($P < 0.05$) d'effet antioxydant entre les essences étudiées, la Quercetine et BHA, qui se distinguent significativement ($P < 0.05$) avec des efficacités d'inhibition du radical DPPH différentes et importantes (figure 31).

À une concentration ≥ 0.00025 mg/ μ l, les six échantillons ne présentent aucune différence significative ($P < 0.05$) d'effet antioxydant. Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH s'élève avec l'augmentation de la concentration pour la Quercetine, BHA et pour les essences de *Citrus* étudiés (figure 31).

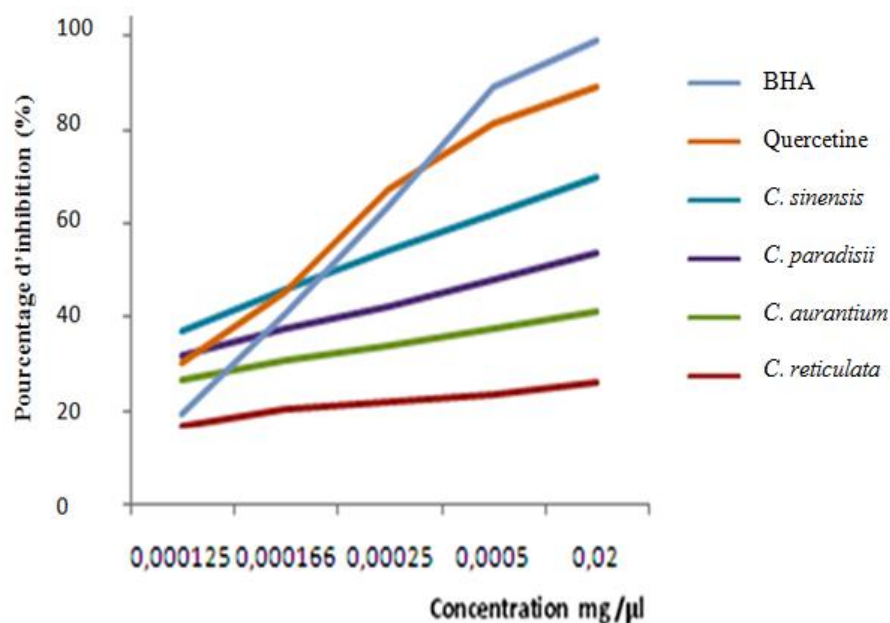


Figure 31: La variation du % d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Frassinetti et *al.*, (2011) sur différentes espèces d'agrumes (orange amère, orange douce, citron et mandarine), les auteurs ont indiqué la présence de propriétés anti-radicalaires intéressantes qui pourraient être corrélées à la présence des monoterpènes, en particulier le β -pinène et le limonène dans les huiles essentielles.

Les essences de notre étude présentent une activité antioxydante; la faculté de piéger le radical libre DPPH est puissante avec les essences de *C. reticulata*, *C. aurantium* et modeste avec celle de *C. paradisi*, *C. sinensis*, la Quercétine et BHA. Récemment des études ont montré que les sous-produits des agrumes pourraient être une source d'antioxydants naturels (Barreca et *al.*, 2011).

5. La mise en évidence de l'activité antibactérienne des essences des *Citrus*

5.1. Etude des caractères macroscopiques :

Ce test se fait par observation directe des colonies des souches étudiées sur géloses sélectives, il permet de renseigner sur la forme, l'aspect, l'odeur, la couleur et le diamètre de la colonie à étudier (tableau 18). Les résultats trouvés de cette étude sont en parfaite concordance avec celles de Nuciel et Vildé, 2005.

Tableau 18: Aspect des colonies des souches étudiées sur géloses sélectives

Bactéries	Aspects des colonies sur milieux sélectifs :
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Colonies à centre noir et à reflets gris métallique sur milieu EMB, et des colonies saumon sur milieu Hektoen.
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	Colonies identiques, 2 à 4 mm d'épaisseur, à bord découpées sur gélose ordinaire.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Colonies larges avec partie centrale bombée et contours irréguliers.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Colonies de couleur jaune pâle, à bord réguliers sur gélose nutritive.
<i>Proteus sp.</i>	Colonies translucides et incolores sur milieu EMB.
<i>Klebsiella sp.</i>	Grandes colonies incolores sur milieu EMB, et des colonies saumon sur milieu Hektoen.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Grande colonies entourées d'un halo jaune et virage du milieu Chapman.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Grande colonies blanchâtres sur milieu Chapman.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Les colonies ont un diamètre de 2-3 mm sur gélose ordinaire, elles sont convexes, à bords réguliers, souvent translucides.
<i>Salmonella sp.</i>	Colonies lisses de 2 à 3 mm de diamètre, régulières légèrement bombées de surface lisse translucide, ayant souvent des reflets bleutés.
<i>Streptococcus sp.</i>	Grandes colonies, blanchâtres sur gélose ordinaire.
<i>Serratia sp.</i>	Des colonies roses de 2 à 3 mm sur milieu gélose nutritif.

5.2. Etude des caractères microscopiques :

L'examen microscopique (Tableau 19) permet de déterminer la morphologie des cellules bactériennes (taille, forme et mode d'association) (Hariri et al., 2009).

Tableau 19: Caractères microscopiques des différentes bactéries étudiées

Caractéristiques Bactérie	Coloration de Gram	Forme	mobilité
<i>Staphylococcus</i>	+	Cocci	Immobile
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	+	Cocci	Mobile
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6633	+	Bacille	Mobile
<i>Streptococcus sp.</i>	+	Cocci, ovoïde ou allongé en fuseaux	Immobile
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	-	Coccobacille	Mobile ou immobile
<i>K. pneumoniae</i>	-	Bacille	Immobile
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	-	Bâtonnet	Mobile
<i>Proteus sp.</i>	-	Bacille	Très mobile
<i>A. baumannii</i>	-	Bacille souvent coccoïde	Immobile
<i>Serratia sp.</i>	-	Bacille	Mobile
<i>Salmonella sp.</i>	-	Bacille	Mobile

L'observation sous microscope optique de la coloration de Gram a confirmé que chacune des souches: *E. coli* ATCC® 25922, *Proteus sp.*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Serratia sp.*, et *Salmonella sp.*, sont des bactéries à Gram négatif d'où une coloration rose. *S. aureus*, *Streptococcus sp.*, *B. subtilis* ATCC® 6633, *E. faecalis* ATCC® 29212 sont des bactéries à Gram positif d'où la coloration violacée (Singleton, 1999).

5.3.L'antibiogramme des souches étudiées :

Le test d'antibiogramme a été réalisé pour le comparer avec l'effet antibactérien des essences de *Citrus* sur les souches pathogènes. Certaines familles d'antibiotiques ont été utilisées comme témoins positives (Tableau 20). L'activité de tous les antibiotiques n'est pas régulière et doit toujours être précisée par l'antibiogramme (Fauchère et Avril, 2002).

Tableau 20 : L'antibiogramme des souches étudiées

Bactéries	Sensibles	Intermédiaire	Résistantes
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	Gentamycine	/	Erythromycine
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	Gentamycine	-Tétracycline	/
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	Gentamicine	-Oxacilline	/
<i>K. pneumoniae</i>	Cefotaxime	/	/
<i>S. aureus</i> ATCC® 43300	Gentamycine	- Pénicilline G	Oxacilline
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923	Gentamicine Oxacilline	/	Vancomycine
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	Gentamicine	- Tétracycline	/
<i>S. aureus</i> ATCC® 29737	Gentamicine	/	/
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12228	Vancomycine Oxacilline	/	/
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6633	Gentamicine	/	/
<i>S. epidermidis</i>	Vancomycine Amikacin Gentamycine	Pénicilline G	Oxacilline Sulphamethoxazole Bactrim
<i>Serratia sp.</i>	Gentamycine	/	/
<i>P. vulgaris</i>	Cefotaxime	/	Sulphamethoxazole Bactrim
<i>P. mirabilis</i>	Gentamycine	/	/
<i>Streptococcus sp.</i>	Pénicilline	Oxacilline	/
<i>A.baumannii</i>	Gentamycine	/	/

Les souches communautaires du genre *Staphylococcus* sont généralement résistantes aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M. Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistines, aux fluoroquinolones (Fauchère et Avril, 2002). Selon l'OMS

(2005), les deux souches de références: *S. aureus* ATCC® 25923 souche sensible à l'oxacilline et *S. aureus* ATCC® 43300 souche résistante à l'oxacilline.

Selon l'OMS (2008), *E. coli* ATCC® 25922 est résistante vis-à-vis de l'antibiotique erythromycine. Ce dernier fait partie des macrolides qui sont des bactériostatiques, il est efficace contre les cocci Gram positif.

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par les huiles d'agrumes, qui sont efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (Tohidpour et al., 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (Fisher et Phillips, 2008).

5.4.Effet antibactérien de l'essence des *Citrus*:

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des essences dans des milieux de culture à base d'eau, c'est leur faible solubilité. Pour cela, nous avons effectué des tests préliminaires sur le choix de l'émulsifiant, le tween 80 (Bassoule et al., 2003) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Firouzi et al. 1998). Les résultats que nous avons obtenus ont révélé que le DMSO permet une très bonne dispersion des essences dans le bouillon MH d'une part, et l'homogénéité du mélange.

Cressy et al. (2003) ont indiqué que l'usage de Tween 80 dans les milieux aqueux présente l'inconvénient d'entraver les observations visuelles dues à la turbidité qu'il provoque et, il pourrait interférer dans l'activité antimicrobienne des HEs et protégeant ainsi, les cellules cibles de son effet.

5.4.1. Effet antibactérien de l'essence du *C. aurantium*

L'activité de l'essence de l'espèce de *C. aurantium* a été testée sur plusieurs souches bactériennes pathogènes (figure 32).

L'essence de l'espèce de *C. aurantium* est un agent antibactérien pour la plus part des souches pathogènes de référence avec un diamètre de zone d'inhibition :

- Egal à 14 mm pour *S. epidermidis* ATCC® 12228 qui est sensible.
- Compris entre 16 et 19 mm pour *S. aureus* ATCC® 29213, *S. aureus* MRSA ATCC® 43300, *S. aureus* ATCC® 29737 qui sont très sensibles.
- Egal à 22 mm pour *B. subtilis* ATCC® 6633, *S. aureus* ATCC® 25923 qui sont extrêmement sensibles.

- Cependant, nous trouvons que *E. coli* ATCC[®] 25922, *E. faecalis* ATCC[®] 29212, *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853, sont résistantes à ces essences.
- Les bactéries isolées testées (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Streptococcus sp.*, *Serratia sp.*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *Salmonella sp.*) sont résistantes à l'essence de *C. aurantium* sauf *S. epidermidis* qui est extrêmement sensible avec un diamètre d'inhibition de 27 mm.

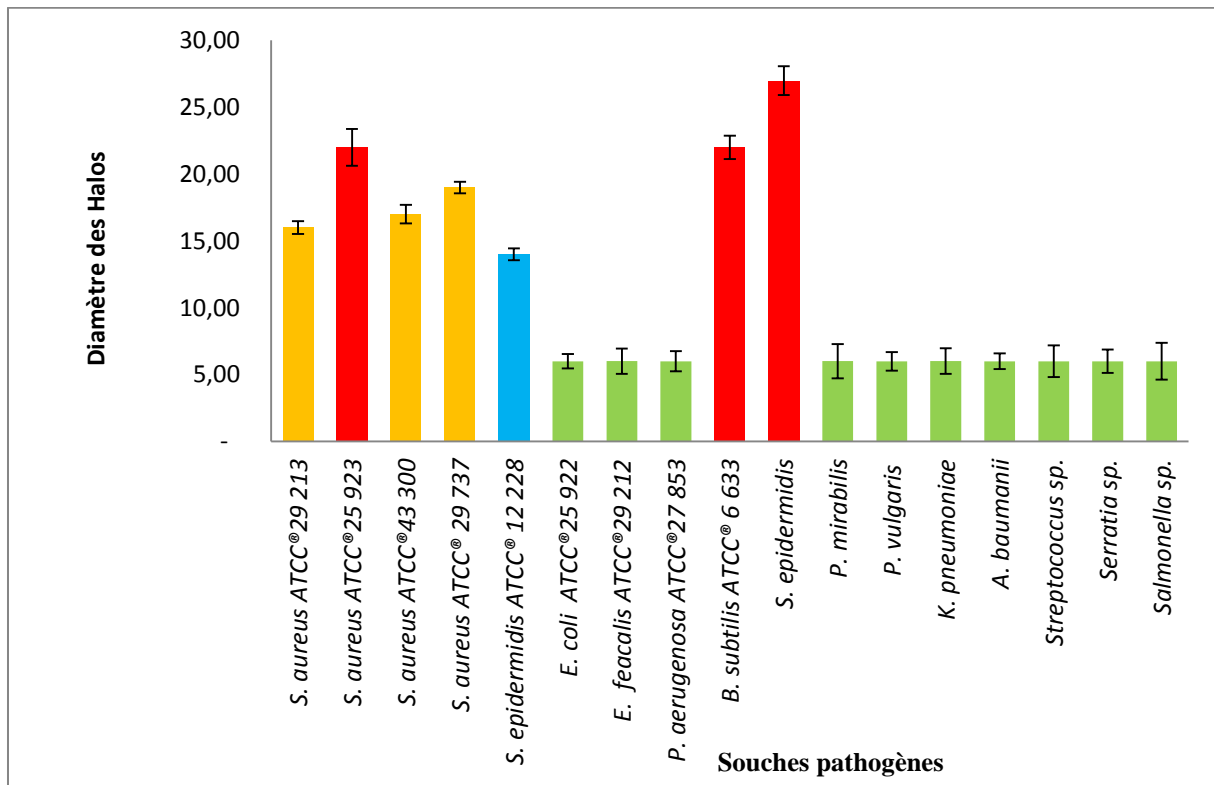


Figure 32 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de *C. aurantium* vis à vis des souches pathogènes testées.

	extrêmement sensible (D > 20 mm)
	souche très sensible (15mm ≤ D ≤ 19 mm)
	souche sensible (9mm ≤ D ≤ 14mm)
	souche résistante (D < 8 mm)

5.4.2. Effet antibactérien de l'essence de *C. sinensis* :

La figure 33 présente des diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'essence de *C. sinensis* vis à vis des bactéries pathogènes testées.

Parmi les 17 bactéries pathogènes testées (de référence et isolées), nous avons noté que l'essence de l'espèce de *C. sinensis* a montré une activité antibactérienne nettement plus prononcée de 24 mm de diamètre de zone d'inhibition pour les deux souches de *S. aureus* ATCC® 29213 et ATCC® 25923 et de 32 mm de diamètre pour *S. epidermidis*.

Les souches *S. aureus* MRSA ATCC® 43300, *B. subtilis* ATCC® 6633, et *S. aureus* ATCC® 29737 ont montré une grande sensibilité à l'essence de *C. sinensis* avec des diamètres de 17 mm, 17 mm et de 18 mm respectivement. Les souches *S. epidermidis* ATCC® 12228, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Streptococcus sp.* et *Serratia sp.* ont montré une sensibilité à l'essence de cette espèce avec des diamètres qui varient de 09 à 14 mm. Six souches pathogènes (*E. coli* ATCC 25922, *E. feacalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *Salmonella sp.*) sont résistantes à cette essence (Figure 33).

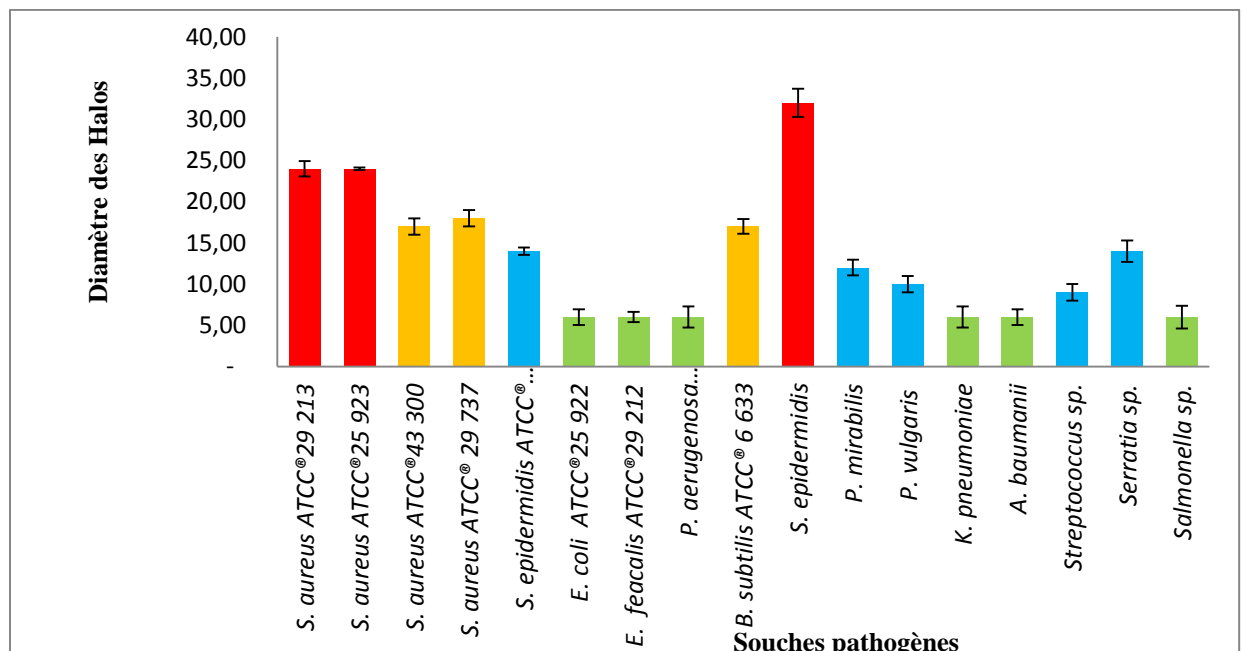


Figure 33: Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de *C. sinensis* vis à vis des souches pathogènes testées.

	extrêmement sensible (D > 20 mm)
	souche très sensible (15mm ≤ D ≤ 19 mm)
	souche sensible (9mm ≤ D ≤ 14mm)
	souche résistante (D < 8 mm)

5.4.3. Effet antibactérien de l'essence du *C. paradisi* :

L'essence de l'espèce de *C. paradisi* présente un large spectre d'inhibition vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes. Les souches testées qui sont sensibles à l'essence de l'espèce de *C. paradisi* présentent un diamètre de 11 mm pour *P. mirabilis*, et de 16 à 19 mm pour les souches très sensibles (*Serratia sp.*, *S. aureus ATCC® 25923*, *S. aureus ATCC® 43300*, *E. coli ATCC® 25922*, *S. epidermidis*) et plus de 21 mm pour les souches extrêmement sensibles (*S. aureus ATCC® 29213*, *P. vulgaris* et *Streptococcus sp.*). Huit souches (*S. aureus ATCC® 29737*, *S. epidermidis ATCC® 12228*, *E. faecalis ATCC® 29212*, *P. aeruginosa ATCC® 27853*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis ATCC® 6633*, *Salmonella sp.* et *A. baumannii*) sont résistantes à l'essence de cette espèce (figure 34).

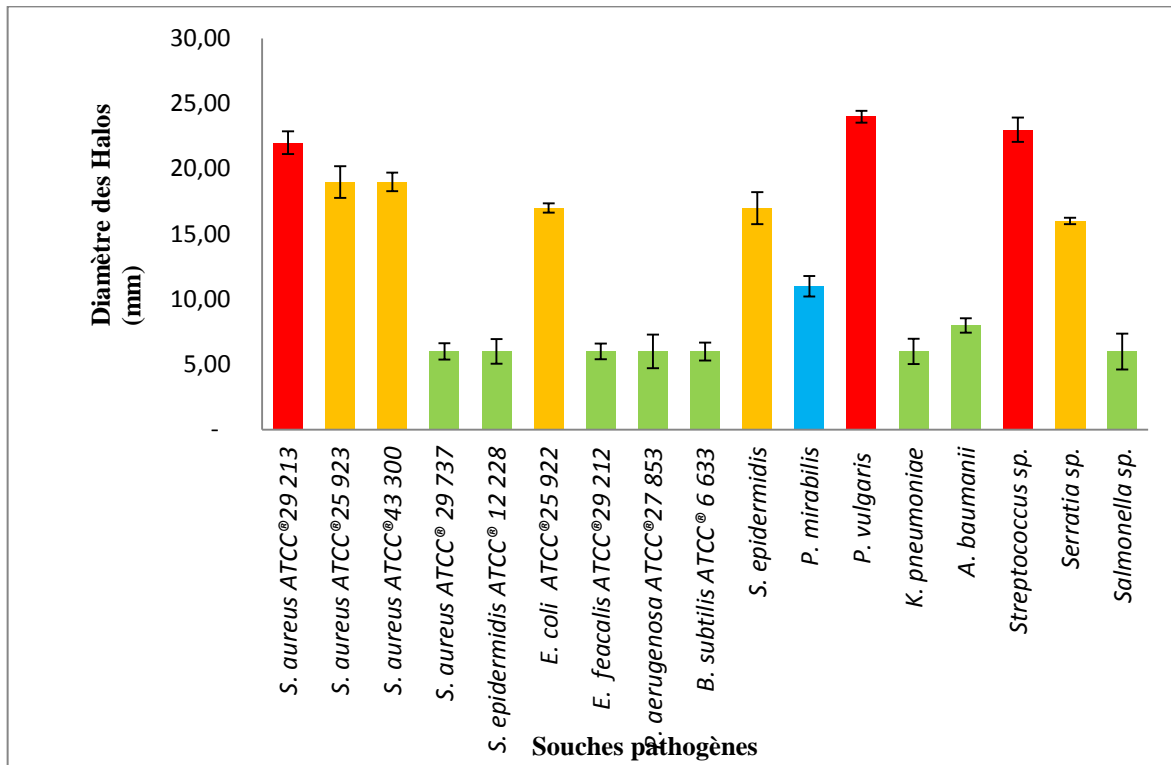


Figure 34: Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de *C. paradisi* vis-à-vis des souches pathogènes testées.

	extrêmement sensible (D > 20 mm)
	souche très sensible (15mm ≤ D ≤ 19 mm)
	souche sensible (9mm ≤ D ≤ 14mm)
	souche résistante (D < 8 mm)

5.4.4. Effet antibactérien de l'essence du *Citrus reticulata*:

L'essence de l'espèce de *Citrus reticulata* a montré une activité antibactérienne positive vis-à-vis de 11 souches testées dont trois sont extrêmement sensibles (*S. aureus* ATCC®25923, *S. epidermidis* et *P. vulgaris*), présentant des diamètres supérieurs à 20 mm, six souches sont sensibles (*S. aureus* ATCC®29213, *E. coli* ATCC®25922, *E. faecalis* ATCC®29212, *P. mirabilis*, *Streptococcus* sp., *Serratia* sp.), montrant des diamètres compris entre 11 et 14 mm et deux souches sont très sensibles (*S. aureus* ATCC®29737 et *B. subtilis* ATCC®6633 avec des diamètres 18 mm et 16 mm respectivement). L'essence de l'espèce de *Citrus reticulata* n'a pas montré d'activité antibactérienne vis-à-vis de 06 souches étudiées (*S. aureus* ATCC®43300, *S. epidermidis* ATCC®12228, *P. aeruginosa* ATCC®27853, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *Salmonella* sp.) (Figure 35).

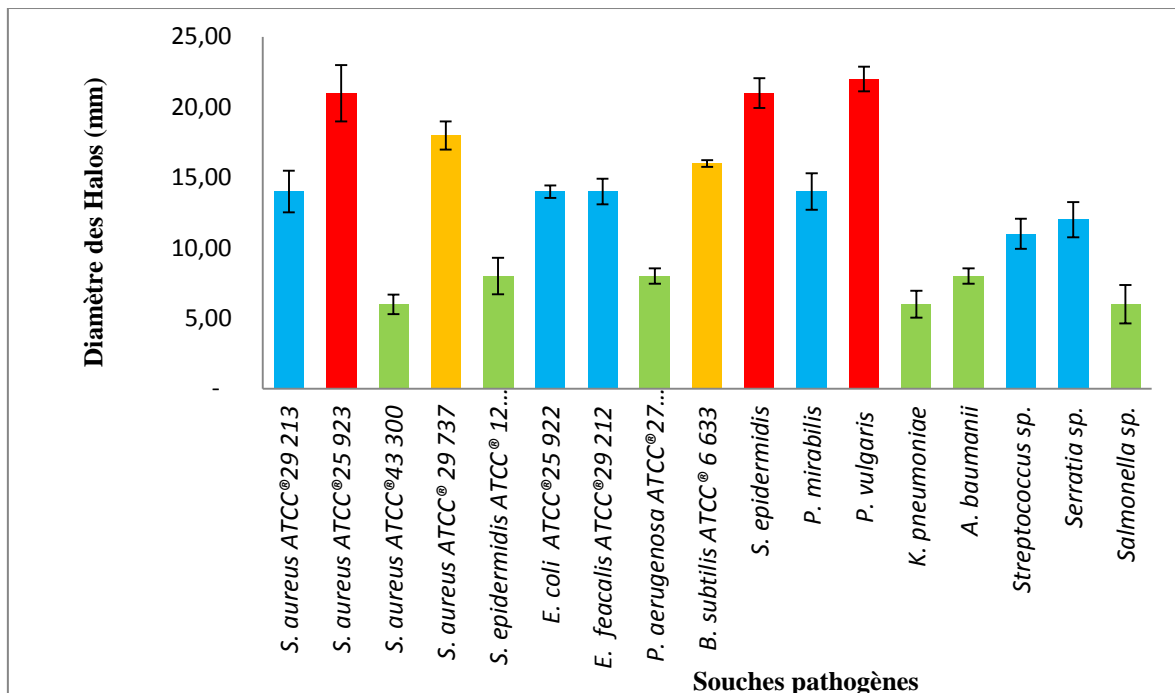


Figure 35: Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'essence de *C. reticulata* vis à avis des souches pathogènes testées.

	extrêmement sensible (D > 20 mm)
	souche très sensible (15mm ≤ D ≤ 19 mm)
	souche sensible (9mm ≤ D ≤ 14mm)
	souche résistante (D < 8 mm)

Les essences des espèces étudiées ont un effet inhibiteur sur les différentes souches de genre *Staphylococcus* (*S. aureus* ATCC[®]29213, ATCC[®]25923, ATCC[®]43300, ATCC[®] 29737, *S. epidermidis* ATCC[®]12228 et *S. epidermidis*) et *B. subtilis* ATCC[®]6633. Ces résultats sont similaires avec ceux d'autres chercheurs qui indiquent que l'huile essentielle d'agrumes inhibe *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (Guo et al., 2018).

En revanche une autre étude algérienne menée par Boughendjioua (2015) a conclu que l'HE de citron (extraction à froid de la partie supérieure du péricarpe ou zeste frais de citron de la région de Collo wilaya de Skikda) ne montre aucune zone d'inhibition vis-à-vis de la souche *Bacillus subtilis*. Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne d'HE de *Citrus*.

Nos résultats sont presque similaires aux travaux cités par de nombreux auteurs, l'huile essentielle des feuilles fraîches de *C. aurantium* a une activité inhibitrice observée pour *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 12 mm (Benabdi, 2019). Le pouvoir antibactérien de cette HE est retrouvé également pour *B. subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 14 mm (Ouedrhiri et al., 2015).

Cependant, L'huile essentielle des fleurs fraîches de *C. aurantium* L. a également une excellente activité contre quelques bactéries pathogènes sauf pour *Staphylococcus aureus* car aucune zone d'inhibition n'a été observée ; pour *E. coli* le diamètre de la zone d'inhibition est de 18 mm et il est de 12mm pour *B. subtilis* (Haj et al., 2012).

Nos résultats sont presque similaires avec ceux de Kaibi, (2016) qui a trouvé que l'huile essentielle des feuilles fraîches de *C. sinensis* est inhibitrice à l'encontre de *Bacillus subtilis* avec un diamètre de zone d'inhibition de 25 mm. Le diamètre de zone d'inhibition à l'encontre de *S. aureus* est de 21.5 mm (Sheila et al., 2012).

Cependant, nos résultats ne concordent pas avec ceux retrouvés par Qingyun et al., (2018) où l'huile essentielle du zeste frais de *C. sinensis* ne montre aucune activité inhibitrice.

L'essence de l'espèce de *C. sinensis* a une activité antibactérienne vis-à-vis des *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*) avec des diamètres des zones d'inhibition différents. Cette différence est due au matériel génétique spécifique de chaque souche. Cette sensibilité a été déjà observée par d'autres auteurs (Cox et al., 2000, Burt, 2004).

L'essence de l'espèce de *C. sinensis* a un effet inhibiteur sur les souches de *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Streptococcus sp.* et *Serratia sp.*, alors que l'essence de *C. aurantium* n'a pas d'activité sur ces souches. Ceci probablement est dû à la présence de certains chémotypes (Hexane, Acide Acétique, Butanone, Bicycloheptane, 1-Octanol, 4-pyranone, 2-methoxyvinylphenol, 1,2-Cyclohexanediol, Naphthalene) dans l'essence de *C. sinensis*. Ces molécules ont des mécanismes d'action spécifiques pour l'inhibition de la croissance de ces souches.

Généralement l'hydrophobicité des molécules qui composent les huiles essentielles, facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Ceci induit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres composants cellulaires (Carson *et al.*, 2006; Oussalah *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2013).

Outre les altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (Cristani *et al.* 2007). Vu la complexité et la diversité moléculaire des huiles essentielles, il est fort probable que leur pouvoir antibactérien soit attribuable à plusieurs mécanismes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Bajpai et Kang, 2010). La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (Dorman et Deans, 2000).

Fondamentalement, les bactéries Gram(-) sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram(+) (Boukhalti *et al.*, 2011; Ruiz et Flotats, 2014; Chi et Holo, 2018; Desislava, 2019). En effet, la plupart des parois cellulaires des bactéries Gram(+) (environ 90% à 95%) sont riches en peptidoglycane. Cette caractéristique peut permettre aux composés hydrophobes de pénétrer facilement dans les cellules et d'agir ensuite au niveau de la paroi cellulaire et le cytoplasme.

Après leur entrée dans la cellule, ces composés peuvent non seulement affecter plusieurs enzymes impliquées dans la production d'énergie à des concentrations plus faibles, mais également dénaturer des protéines à des concentrations plus élevées (Shakeri *et al.*, 2014; Omonijo *et al.*, 2018). De même, l'absence de la membrane externe des bactéries Gram(+) les rend plus sensibles aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels (Boudjema *et al.*, 2018).

La grande résistance des bactéries Gram(-) aux HE est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram(+) (Gilles et *al.*, 2010; Akbali et *al.*, 2016).

De nombreux auteurs sont en désaccord car pour eux, il est très difficile de faire de telles généralisations du fait que chaque essence est unique dans sa composition et chaque bactérie Gram(+) diffère considérablement l'une de l'autre en structure et en fonctionnalité (Elgayyar et *al.*, 2001; Delaquis et *al.*, 2002).

La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (Guinoiseau, 2010).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Lemes Raiane et *al.* 2018).

L'activité d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique (Sipailiene et *al.*, 2006; Zomorodian et *al.*, 2012). Les huiles essentielles sont riches en monoterpènes hydrocarbures, terpinènes qui sont dotés d'une grande activité antibactérienne contre les bactéries Gram(-) et (+) (Oyedeki et *al.*, 2005).

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé, car une HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Khalil et *al.*, 2007).

L'activité bactériostatique de Limonène a été démontré contre plusieurs micro-organismes (Donsi et *al.*, 2011; Sobramenium et *al.*, 2015). Le limonène appartient à la famille des monoterpènes cycliques, qui sont accumulés dans la membrane plasmique microbienne et ainsi provoquer une perte de l'intégrité de la membrane et de la dissipation de la force motrice des protons (Sikkema et *al.*, 1994).

Concernant l'activité antibactérienne des HEs du zeste de *C. reticulata* cultivé en Algérie, le limonène était décrit comme composé majoritaire de l'huile essentielle (67,04%). Sur la base de ces observations, il semble que le limonène contribue à l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle (Boughendjioua et *al.*, 2017).

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des essences qui sont responsables de cette activité antibactérienne, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des bactéries (Jiang et *al.*, 2011; Rahman et *al.*, 2016; El Malki et *al.*, 2018).

La présente étude montre que l'activité antibactérienne des essences étudiées pourrait, en partie, être associée aux composants majoritaires (Limonène, Caryophyllène, β -myrcène, β pinène, α pinène). Une synergie entre le carvacrol et certains hydrocarbures monoterpènes (tels que l' α -pinène, le camphène, le myrcène, l' α -terpinène et le p-cymène) présentant généralement de faibles propriétés antimicrobiennes, a été observée par Bassolé et Juliani (2012).

Des études similaires ont montré que les HEs contenant principalement des aldéhydes ou des phénols, sont caractérisées par une puissante activité antibactérienne, suivies des HEs contenant des alcools terpéniques. Cependant, les HEs contenant des cétones ou des esters, tels que le β -myrcène, l' α -thujone ou l'acétate de géranyl comme composés majoritaires, ont une activité beaucoup plus faible (Zhiri, 2006). Par contre, dans le cas de la présence des hydrocarbures terpéniques, ces huiles sont généralement inactives (Dhifi et *al.*, 2016). Ainsi, la valeur d'une huile essentielle dépend donc de l'intégralité de ses composants et non seulement de ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

Il est à noter aussi, qu'aucune corrélation significative ($P > 0,05$) n'a été observée entre la teneur des composants chimiques et l'activité antibactérienne des HE de *Citrus* testées. En effet, le limonène constitue le composant majoritaire de l'HE de *C. sinensis*. Il s'avère d'après les tests antibactériens « in vitro » que l'HE de *C. sinensis* à chémotype limonène (77,4%) a démontré une efficacité antimicrobienne inférieure à celle de l'HE de *C. aurantium* relativement pauvre en limonène (2,20%). D'après ces observations, il est évident que le limonène n'a exercé aucune influence sur le potentiel antibactérien des HE testées (Ultee et *al.*, 2002).

De nombreux auteurs ont démontré que les HEs de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, et également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que: *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Thyphimurium*, et *Acrobacter butzleri* (Bellti et al., 2004; Fisher et al., 2007).

L'activité antibactérienne des essences des *Citrus* (*C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantium* et *C. reticulata*) sont difficiles à corrélér du fait que chaque essence est unique dans sa composition et chaque bactérie diffère considérablement l'une de l'autre en structure et en fonctionnalité. Confirmé par plusieurs auteurs, le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est en relation directe avec plusieurs paramètres (Malecky, 2007; Chang et al., 2008), à savoir:

- La nature des composés majoritaires.
- La concentration de ces composés.
- La nature et la structure des groupements fonctionnels.

La technique de diffusion sur gélose est un bon moyen pour détecter la sensibilité d'une souche à une huile essentielle, elle permet de tester plusieurs composés contre un seul microorganisme. Cependant l'ajout d'une autre méthode plus précise tel que la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est obligatoire car parfois l'huile essentielle a des polarités des composés naturels différentes qui peuvent affecter la diffusion des composés sur le milieu de culture (Klančnik et al., 2010) En raison de ces préoccupations, la diffusion du disque peut ne pas être appropriée pour déterminer l'activité antimicrobienne des composés naturels sans la détermination de la CMI.

5.5.La détermination de la CMI

Les bactéries montrant une sensibilité à l'huile essentielle sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La variation de l'activité antibactérienne des essences de *Citrus* est classée selon Koba et al., 2004:

- Excellent pouvoir inhibiteur: CMI < 50 µl/ml.
- Pouvoir inhibiteur intéressant: 50 µl/ml < CMI < 250 µl/ml.
- Pouvoir inhibiteur faible: 250 µl/ml < CMI < 500 µl/ml.
- Pouvoir inhibiteur médiocre ou nul: CMI > 500 µl/ml.

Un extrait est considéré comme antibactérien lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (Takwi et *al.*, 2012).

5.5.1. La CMI de l'essence du *C. aurantium*

La majorité des souches bactériennes pathogènes de collection et isolées (*S. aureus* ATCC®25923, *S. epidermidis* ATCC®12228, *S. aureus* ATCC®29213 et *S. epidermidis*) sont inhibées à une CMI de 250 µl d'HE/ml.

D'autre part la souche *S. aureus* ATCC®43300, est inhibée à une concentration de 125 µl d'HE/ml. Un pouvoir antibactérien intéressant (CMI=62,5 µl d'HE/ml) a été enregistré pour les deux souches de *B. subtilis* ATCC®6633 et *S. aureus* ATCC®29737 (Tableau 21).

Tableau 21: Les valeurs de CMI (µl d'HE/ml) de *C. aurantium*

CMI (µl d'HE/ml)	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)
Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
Dilutions (%)	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,5%	0,78%	0,4%	
Souches pathogènes									
<i>S. aureus</i> ATCC®25923	20	15	8	7	7	6	6	0	
<i>S. aureus</i> ATCC®43300	16	10	10	8	8	6	6	0	
<i>B. subtilis</i> ATCC®6633	20	15	10	10	8	8	7	6	
<i>S. epidermidis</i> ATCC®12228	10	10	8	7	6	6	0	0	
<i>S. aureus</i> ATCC®29737	16	16	12	10	8	6	6	0	
<i>S. aureus</i> ATCC®29213	10	10	8	8	7	7	6	6	
<i>S. epidermidis</i>	25	15	8	6	6	0	0	0	

5.5.2. La CMI de l'essence du *C. sinensis*

Un pouvoir inhibiteur faible a été constaté avec l'essence de l'espèce de *C. sinensis* présentant une CMI égale à 500 µl d'HE/ml vis-à-vis des souches *P. mirabilis*, *Streptococcus* sp. L'essence de l'espèce *C. sinensis* inhibe les souches *S. aureus* ATCC®29737, *S. epidermidis* ATCC®12228, et *P. vulgaris* avec une CMI égale à 250 µl d'HE/ml.

Les souches *S. aureus* ATCC®29213, *S. aureus* ATCC®43300, *S. epidermidis* et *B. subtilis* ATCC®6633, sont inhibées avec une CMI égale à 125 µl d'HE/ml qui représente un pouvoir inhibiteur intéressant par l'essence de l'espèce *C. sinensis*. Un pouvoir antibactérien

intéressant (62,5 µl d'HE/ml) a été enregistré avec les souches *S. aureus* ATCC® 25923 et *Serratia* sp. (Tableau 22).

Tableau 22 : Les valeurs de CMI (µl d'HE/ml) de *C. sinensis*

CMI (µl d'HE/ml)	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	Diamètres des zones d'inhibition (mm)
Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
Dilutions (%)	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,5%	0,78%	0,4%	
Souches pathogènes									
<i>S. aureus</i> ATCC® 25 923	20	15	13	10	8	8	8	6	
<i>S. aureus</i> ATCC® 43 300	14	10	10	8	6	6	0	0	
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6 633	14	10	10	8	8	6	6	0	
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12 228	12	10	8	6	6	0	0	0	
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 737	16	16	8	8	6	6	0	0	
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 213	19	15	10	7	7	7	6	6	
<i>S. epidermidis</i>	25	20	10	7	7	6	6	0	
<i>P. vulgaris</i>	12	12	8	8	8	7	6	6	
<i>P. mirabilis</i>	10	8	8	6	6	0	0	0	
<i>Serratia</i> sp.	15	15	12	10	7	6	6	0	
<i>Streptococcus</i> sp.	11	8	8	7	7	6	6	0	

5.5.3. La CMI de l'essence du *C. reticulata*:

Un pouvoir inhibiteur faible a été retrouvé avec l'essence de l'espèce de *Citrus reticulata* montrant une CMI égale à 500 µl d'HE/ml vis-à-vis des souches *E. faecalis* ATCC® 29 212, *S. aureus* ATCC® 25923 et *Streptococcus* sp. Les souches *B. subtilis* ATCC® 6633, *S. aureus* ATCC® 29213, et *P. mirabilis* sont inhibées avec une CMI égale à 250 µl d'HE/ml. La souche *Serratia* sp. est inhibée avec une CMI égale à 125 µl d'HE/ml qui représente un pouvoir inhibiteur intéressant par l'essence de l'espèce *C. reticulata*.

Un pouvoir inhibiteur intéressant a été enregistré dans les souches *E. coli* ATCC® 25922, et *S. aureus* ATCC® 29737 avec une CMI égale à 62,5 µl d'HE/ml. Un excellent pouvoir inhibiteur a été enregistré dans les deux souches *P. vulgaris* et *S. epidermidis* avec des CMI de 31,25 µl d'HE/ml et de 15,62 µl d'HE/ml respectivement (tableau 23).

Tableau 23 : Les valeurs de CMI (μl d'HE/ml) de *C. reticulata*

CMI (μl d'HE/ml)	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
Dilutions (%)	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,5%	0,78%	0,4%	
Souches pathogènes									
<i>S. aureus</i> ATCC [®] 25 923	10	8	7	7	6	6	0	0	
<i>B. subtilis</i> ATCC [®] 6 633	10	10	8	8	6	6	0	0	
<i>S. aureus</i> ATCC [®] 29 737	16	10	10	10	8	6	6	0	
<i>S. aureus</i> ATCC [®] 29 213	15	10	8	8	7	7	6	6	
<i>S. epidermidis</i>	20	18	15	10	10	10	8	6	
<i>E. coli</i> ATCC [®] 25922	15	12	12	10	7	7	6	6	
<i>E. faecalis</i> ATCC [®] 29 212	11	7	7	7	6	6	0	0	
<i>P. vulgaris</i>	14	12	10	10	10	6	6	0	
<i>P. mirabilis</i>	13	11	8	8	7	7	6	6	
<i>Serratia</i> sp.	12	12	10	8	8	6	6	0	
<i>Streptococcus</i> sp.	12	8	8	7	6	6	0	0	

5.5.4. La CMI de l'essence du *C. paradisi* :

La plupart des souches de collection et isolées (*P. vulgaris*, *S. aureus* ATCC[®] 43300, *S. epidermidis* et *P. mirabilis*), sont sensibles à des CMI comprises entre 125 et 250 μl d'HE/ml.

Les bactéries pathogènes. *S. aureus* ATCC[®] 25923, *S. aureus* ATCC[®] 29213 et *Streptococcus* sp., sont les plus sensibles à cette essence avec des CMI inférieures à 62,5 μl d'HE/ml.

Un excellent pouvoir inhibiteur a été enregistré chez les souches *Serratia* sp., *E. coli* ATCC[®] 25922 avec des CMI de 31,25 μl d'HE/ml (tableau 24).

Tableau 24 : Les valeurs de CMI (μl d'HE/ml) de *C. paradisi*

CMI (μl d'HE/ml)	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
Dilutions (%)	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,5%	0,78%	0,4%	
Souches pathogènes									
<i>S. aureus</i> ATCC® 25 923	10	10	10	10	8	6	6	6	
<i>S. aureus</i> ATCC® 43 300	10	10	8	6	6	6	6	6	
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 213	12	10	10	10	8	6	6	6	
<i>S. epidermidis</i>	11	10	7	7	6	6	6	6	
<i>E. coli</i> ATCC® 25922	14	12	12	10	10	8	6	6	
<i>P. mirabilis</i>	13	11	8	8	6	6	6	6	
<i>P. vulgaris</i>	14	12	10	8	7	7	6	6	
<i>Serratia</i> sp.	15	12	12	10	10	7	6	6	
<i>Streptococcus</i> sp.	13	13	12	10	6	6	6	6	

Les résultats montrent que les valeurs de la CMI varient en fonction de trois paramètres: la souche testée, la nature et la dose de l'essence (Caillet et Lacroix, 2007). Ainsi, La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits, ce qui a été constaté par Dordevic et al. (2007).

Cependant, nos résultats ne concordent pas avec ceux retrouvés par Frassinetti et al., (2011) où les souches Gram (-) ont montré une plus grande sensibilité aux huiles essentielles extraites de différentes plantes du genre *Citrus*, en particulier la souche de *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI maximale de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *E. coli* était plus sensible, affichant des CMI de l'ordre de 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les souches Gram(+) *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* et *S. aureus* étaient inhibées à des concentrations d'huiles plus élevées allant de 100 à 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CMI).

6. Détermination de la toxicité aiguë des essences des *Citrus*

6.1.Taux de mortalité selon les différentes voies d'administration

L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son éventuelle introduction en thérapeutique. En effet, en plus de l'efficacité, il ne doit pas se produire pour la dose active des effets toxiques et néfastes pour l'organisme. Il faut donc définir le rapport bénéfice risque dans l'indication thérapeutique de chaque substance. Ceci ne peut être réalisé que par l'intermédiaire de deux types d'étude, d'une part l'efficacité chez

l'animal (pharmacologie expérimentale), d'autre part une étude de sécurité (toxicologie) (Antonius et *al.*, 2006; Buenz, 2006).

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité, pour cela, nous avons administré 0,5ml par différentes voie les essences des *Citrus* aux doses comprises entre 400 et 5000 mg/kg provoquant dès les premiers instants une agitation des souris qui se caractérise par des déplacements fréquents. Ces déplacements sont suivis de torsion du corps et d'un relâchement du train arrière. Ensuite les animaux se blottissent dans un coin et convulsent périodiquement avant de mourir allongé sur le ventre.

Une variabilité des taux de mortalité des différentes voies montre que l'administration par voie IV des essences est très toxique par rapport aux autres voies à différentes concentrations.

A la concentration de 8%, l'essence du *C. aurantium*, n'est pas toxique par les trois voies (IP, VO, IV); à la concentration de 16%, l'essence est toxique par les deux voies (IP, IV) seulement; en revanche avec les concentrations de 32%, 64% et de 100%, l'essence est toxique par ces trois voies (figure 36).

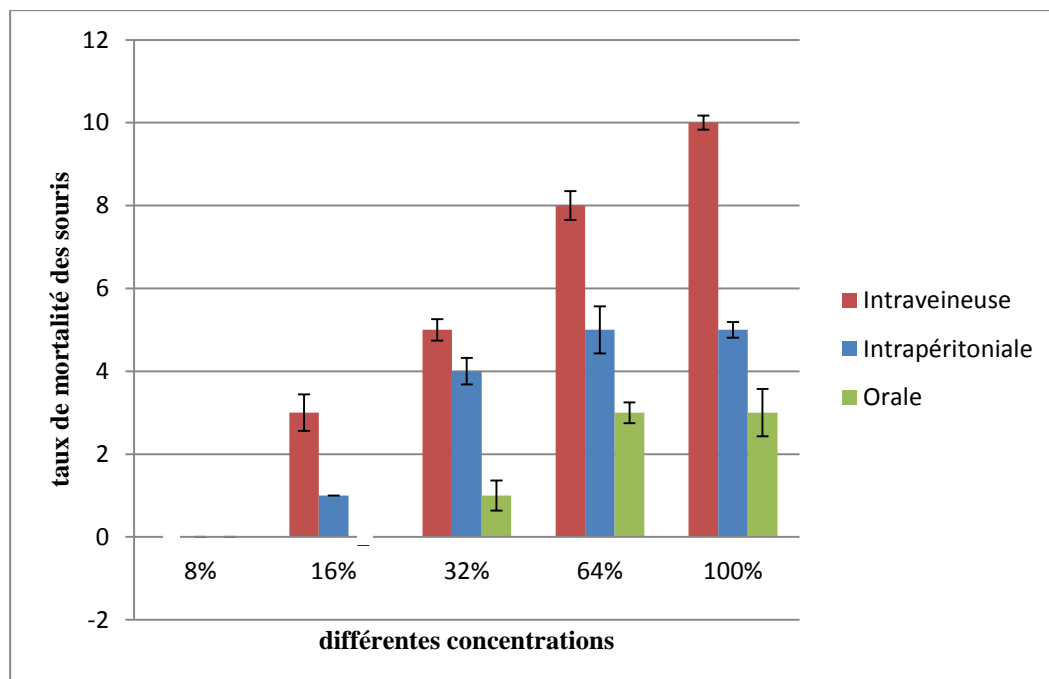


Figure 36: Taux de mortalité des souris après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de *C. aurantium*

L'essence de *C. paradisi* est toxique avec les concentrations de 16%, 32%, 64% et de 100% par les trois voies (IP, VO, IV); tandis que à la concentration de 8%, l'essence est toxique par la voie IV seulement (figure 37).

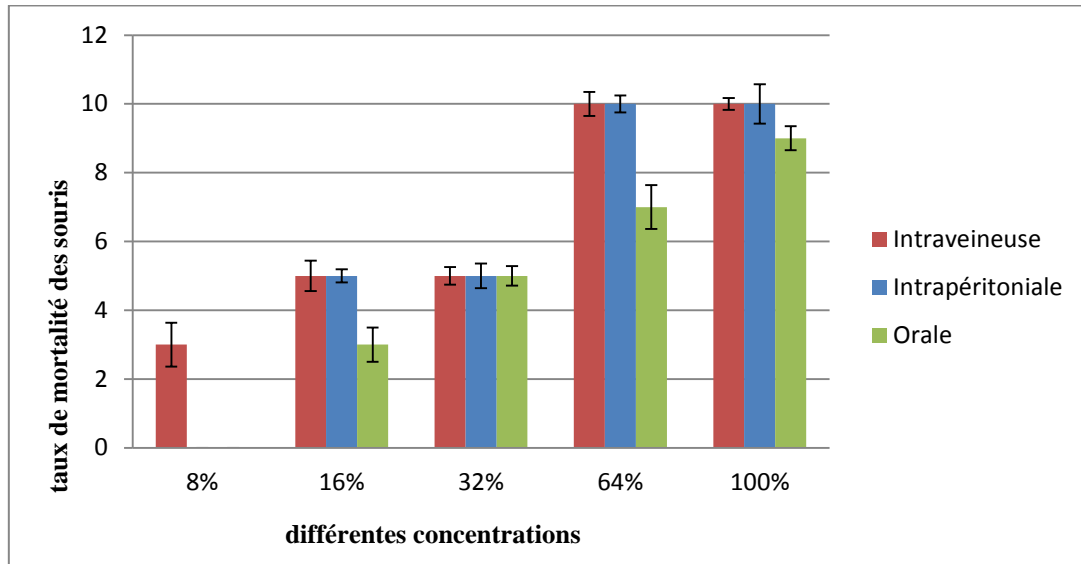


Figure 37: Taux de mortalité des souris après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de *C. paradisi*

La concentration de 8% de l'essence du *C. sinensis* n'est pas toxique par les trois voies (IP, VO, IV); tandis que à la concentration de 16%, l'essence est toxique par les deux voies (IP, IV) seulement et aux concentrations de 32%, 64% et de 100%, l'essence est toxique par ces trois voies (figure 38).

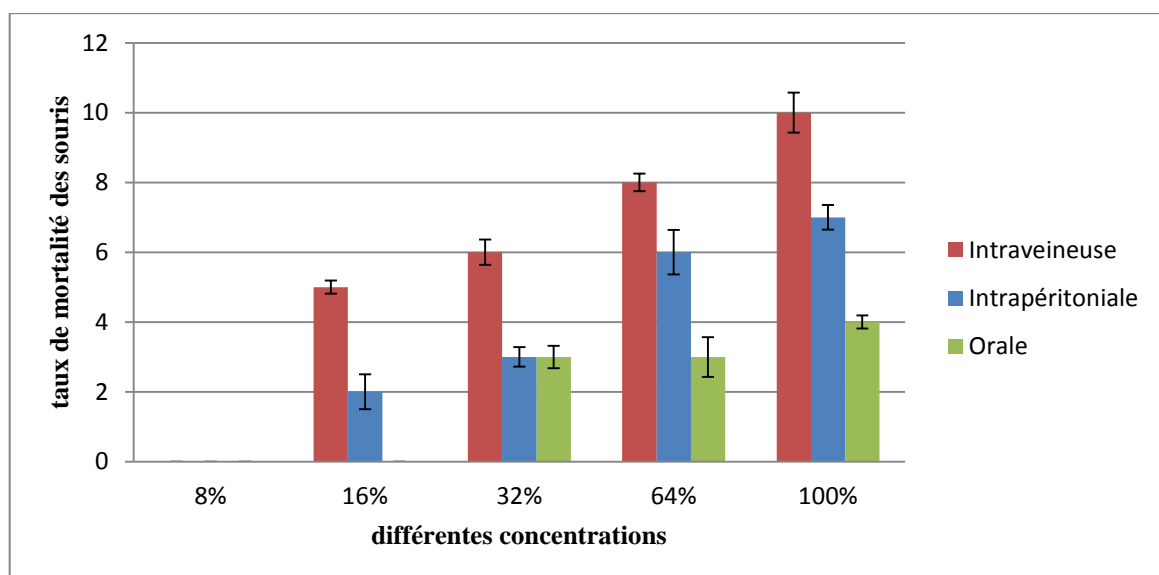


Figure 38: Taux de mortalité des souris après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de *Citrus sinensis*

La concentration de 8% de l'essence du *C. reticulata*, n'est pas toxique par les trois voies (IP, VO, IV); à 16% l'essence est toxique que par la voie IV; tandis que à la concentration de 32%, l'essence est toxique par les deux voies (IP, IV); aux concentrations de 64% et de 100% l'essence est toxique par ces trois voies (figure 39).

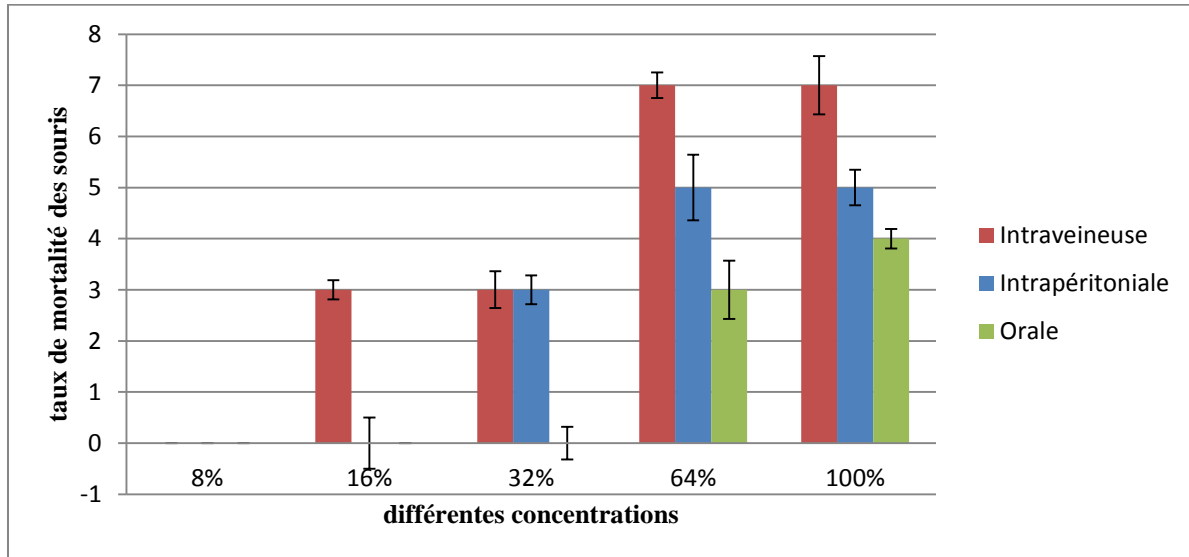


Figure 39: Taux de mortalité des souris après injection par différentes voies à différentes concentrations de l'essence de *C. reticulata*

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise (Degryse et *al.*, 2008).

La dose létale chez les femelles est inférieure à celle chez les mâles mais aussi les signes d'intoxication commencent à apparaître chez les femelles à des doses plus faibles que chez les mâles, ce qui indique que l'effet toxique est dépendant du sexe dont plusieurs chercheurs ont démontré cette dépendance (Baliga et *al.*, 2004). Dans notre étude les femelles étaient plus sensibles à l'intoxication aiguë par l'essence des quatre espèces que les mâles.

6.2. La DL₅₀ selon les différentes voies d'administration

Selon la classification de (Diezi, 1989), lorsque:

- DL₅₀ < 5 mg/kg : la substance est très toxique ;
- 5 mg/kg < DL₅₀ < 500 mg/kg : la substance est toxique ;
- 500 mg/kg < DL₅₀ < 5000 mg/kg : la substance est faiblement toxique ;
- DL₅₀ > 5000 mg/kg : la substance est non toxique.

Les résultats de l'administration des essences de *Citrus*, à des souris à la dose de 1%, par différentes voies (IV, IP, VO), ont montré respectivement des DL₅₀ de 2920, 3560 et 4360 mg/kg avec l'essence de *C. aurantium*, des DL₅₀ de 3400, 3720 et 4520 mg/kg avec l'essence de *C. reticulata*, des DL₅₀ de 2600, 2600 et 3080 mg/kg avec l'essence de *C. paradisi* et des DL₅₀ de 2760, 3560 et 4040 mg/kg avec l'essence de *C. sinensis*. A ces doses, l'essence des *Citrus* s'est révélée faiblement toxique selon la classification de (Diezi, 1989) (Figure 40).

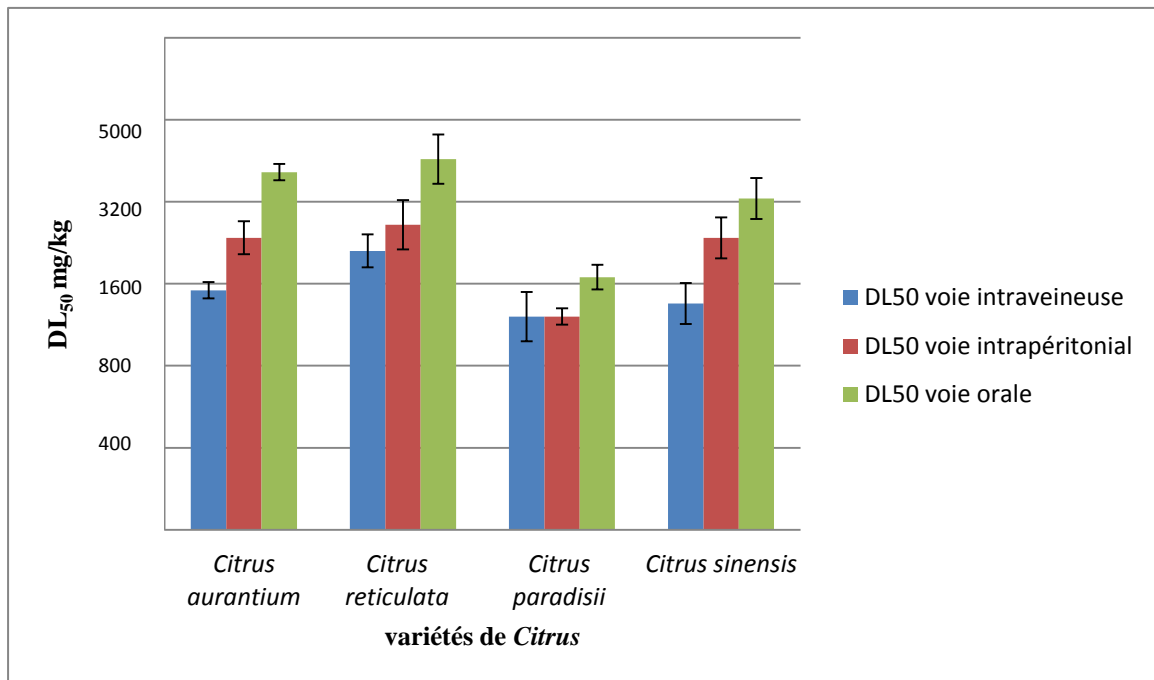


Figure 40: La DL₅₀ après injection par différentes voies des essences de différentes espèces de *Citrus*

L'évaluation du pourcentage de mortalité ou la DL₅₀ de chaque espèce montre que l'administration des essences par voie orale est très toxique par rapport aux autres voies. L'administration de l'essence de *C. reticulata* par les différentes voies (IV, IP et VO) est très toxique par rapport aux autres espèces. Quand la DL₅₀ est faible, la substance testée s'avère toxique (Bonnafous, 2013; Bonneval et Dubus, 2014).

D'après les résultats de la DL₅₀, l'extrait des zestes des *Citrus* est classé dans la catégorie des produits toxiques selon la classification des substances chimiques qui composent les essences (Frank, 1992).

Par ailleurs Robert et Lobstein, (2005) montrent que les animaux qui ont reçu des doses d'essences d'agrumes par voie orale, intraveineuse et intrapéritonéale pendant 14 jours

sont révélées légèrement toxiques. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus* limon extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Teuscher et *al.*, 2005).

Les variations de la DL₅₀ sont en fonction de la voie d'administration et de l'espèce (Lahlou et *al.*, 2008).

La variation de la DL₅₀ des espèces des essences est due aux différences de la structure chimique des substances. Ces différences peuvent affecter la capacité des substances à perturber le fonctionnement de l'organisme. De plus, les caractéristiques physico-chimiques, par exemple la grosseur des poussières, la volatilité et la solubilité dans l'eau, interviennent également dans la réponse toxique (Vigan, 2010).

Les comportements liés à une diminution de la mobilité peuvent laisser préjuger que cette huile présente un effet sédatif (Ondele et *al.*, 2015). Pour connaître l'origine de la toxicité de l'essence de *Citrus*, il serait bien de revenir à sa composition chimique et examiner les composants possédant un pouvoir toxique.

L'application cutanée, des HE contenant des furocoumarines et pyrocoumarines (huile de *Citrus*) ou même leur prise par voie orale, peut provoquer sous l'effet prolongé du soleil, des réactions érythémateuses susceptibles de favoriser la carcinogénèse (Teuscher et *al.* 2005).

Conclusion et perspectives

Au vu de ces résultats obtenus au cours de nos travaux, nous pouvons conclure qu'une meilleure gestion des sous-produits d'agrumes constitue une valeur ajoutée à cette culture et représente un axe de développement pour le secteur agricole et une opportunité économique considérable, car ils peuvent être utilisés dans les industries pharmaceutiques, nutraceutiques, alimentaires et cosmétiques mais cela nécessite d'autres recherches appliquées et approfondies pour compléter ces résultats.

Plusieurs étapes, souvent dépendantes entre-elles, sont nécessaires pour caractériser complètement ces essences de *Citrus*: la détermination de la composition moléculaire, la mise en évidence d'une éventuelle spécificité, le contrôle de la qualité par la valorisation de coproduits d'extraction, la recherche de modes d'extraction plus respectueux de l'environnement.

Les essences se présentent sous la forme de mélanges complexes. Cette complexité résulte de la diversité structurale et fonctionnelle des constituants qui paradoxalement sont construits à partir de la même entité. Notre étude est basée sur la valorisation d'un sous-produit (écorce) de *Citrus* qui représente par la démonstration l'effet bénéfique des essences de *Citrus* lors d'une oxydation.

Les essences de quatre espèces de *Citrus* : *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* et *C. aurantium*, ont été extraites par la méthode d'expression à froid. Le rendement obtenu dans notre travail est faible et différent entre les essences.

Afin d'évaluer leurs qualité, l'extraction a été suivie par les analyses organoleptique et physicochimique. Suite à une comparaison de nos essences à ceux de la norme (NF T 75-203), nous déduisons qu'elles sont conformes. Nous avons souligné que les essences sont généralement liquides à température ambiante, très volatiles, troubles après refroidissement, d'odeur aromatique, de couleur rouge orangée grâce à la grande teneur en pigments colorés, leur densité est inférieure à celle de l'eau. Puis nous avons réalisé des analyses qualitatives et quantitatives par une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotomètre de masse (CG/SM) à fin d'évaluer la composition moléculaire de ces essences. Ces analyses montrent que ces essences présentent d'une part un composé majoritaire qui est le

« limonène » avec des pourcentages différents (94.75 % pour l'essence de *C. reticulata*, 87.38 % pour *C. aurantium*, 86.29% pour *C. sinensis* et 82.98% pour *C. paradisi*).

D'autre part, ces essences présentent d'autres composés mineurs, pour *C. paradisi*: β -myrcène (2.66%), 2H-1-benzopyranone (2.07 %) et sous forme de traces: α -pinène (0.31 %) et l'acide n-hexadécanoïque (0.88 %). Pour *C. sinensis*: β -pinène (2.33 %), Bicycloheptène (2.43 %), Acide acétique (2.94 %), et que sous forme de traces α -pinène (0.75 %), et Octanol (0.16 %). Concernant l'essence de *C. reticulata*, les composés mineurs sont représentés par β -pinène (2.44%), 1-5 diméthylvenyl (0.72 %), α pinène (0.91 %), β -phéllandre (0.61 %). *C. aurantium* présente des composés mineurs: β -pinène (3.59%), α -pinène (1.47%), 2-Furancarboxaldehyde (1.13%) et sous forme de traces: 1,6-octadienol (0,83%), n-Hexadécanoïque (0.78%), Osthole (0.67 %).

L'étude in-vivo de l'activité anti-inflammatoire de ces essences avec la dose de 3 et 4 ml/kg par voie intra-péritonéale après avoir provoqué l'œdème de la patte des souris (MORINI) par la carragénine montrent une différence significative des pourcentages d'inhibition du volume de l'œdème témoin positif (le diclofenac de sodium) et ceux des souris traitées par les essences de *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantium* et *C. reticulata* administrées à une dose de 50 mg/kg du poids corporel. De même, une différence significative a été constatée entre les groupes traités par les essences de *Citrus* et les intervalles du temps. L'activité anti-inflammatoire de ces essences peut être liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leur effets synergiques.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du blanchissement du β -carotène et le test du DPPH a révélé le pouvoir antioxydant des essences suite à une comparaison avec la Quercétine et BHA. D'après les résultats obtenus, les essences de notre étude sont des excellents antioxydants naturels. Elles possèdent des capacités de neutralisation de DPPH puissantes puisqu'elles agissent à de faibles doses. En suivant l'IC₅₀ la capacité de balayage de radical libre DPPH est classée dans l'ordre : *C. reticulata* > *C. aurantium* > *C. paradisi* > Quercétine > *C. sinensis* > BHA. Les résultats obtenus montrent que les essences de *Citrus* réduisent de façon significative le DPPH; ceci peut être expliqué par la présence des monoterpènes, en particulier le β -pinène et le limonène dans ces essences.

Parmi les 17 bactéries pathogènes testées, nous avons noté que les essences des quatre espèces de *Citrus* ont montré une activité antibactérienne nettement plus prononcée pour la plupart des souches. Cependant, certaines souches sont résistantes à quelques essences. Des tests de sensibilité sont réalisés pour évaluer « in vitro » l'activité antibactérienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) des essences extraites sur un ensemble de bactéries pathogènes. L'essence des *Citrus* a un pouvoir inhibiteur « in vitro » sur la plupart des souches bactériennes pathogènes avec différentes concentrations. Cependant, l'activité antibactérienne des essences des *Citrus* étudiées pourrait, en partie, être associée aux composants majoritaires (Limonène, Caryophyllène, β -myrcène, β pinène, α pinène).

L'évaluation in vivo de la toxicité des essences de différentes espèces de *Citrus* étudiées par les différentes voies d'administration intraveineuse, intrapéritonéale et orale pendant 14 jours a montré que ces essences sont légèrement toxiques. L'évaluation du pourcentage de mortalité de la DL₅₀ de chaque espèce montre que l'administration par voie orale est très toxique par rapport aux autres voies. L'essence de *C. reticulata* est très toxique avec les trois voies d'administration par rapport aux autres espèces.

Ces données montrent que ces essences constitueraient une source potentielle de substances naturelles et peuvent être une solution alternative aux solutions synthétiques dans le domaine agro-alimentaire, comme elles peuvent trouver aussi une importante application dans l'industrie pharmaceutique.

D'autres études plus poussées sont souhaitables. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Etudier la synergie intra et intervariétale.
- Isoler, purifier et synthétiser la ou les molécules bioactives.
- Réaliser des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs, celles-ci seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.
- Etudier d'autres effets biologiques et pharmaceutiques (activité antivirale, antalgique, anti hyperglycémiant, anti cholestérolémie, ...).
- Mettre en valeur d'autres espèces de *Citrus*.
- Elargir la gamme des souches microbiennes.

- Evaluer la toxicité sur une période plus longue afin de mettre en évidence les effets nocifs après un traitement plus long.
- Evaluer le pouvoir antioxydant des extraits de *Citrus*, par des études similaires in vivo qui seraient intéressantes et plus prometteuses visant les marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques et érythrocytaires.

(A)

- Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A., et Bouayoune T. 2010. Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica manetti*). Annales de la recherche forestière au Maroc. 34: 110 - 118.
- Aboughe Angone S., Aworet Samseny RR., et Eyele Mve Mba C. 2015. Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. Phytothérapie. 13: 283 - 287.
- Adams RP. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy. Illinois USA: Allured Publishing Corporation. Vol. 3: 9 - 456.
- AFNOR. 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ». Paris. 57 p.
- Akbali M., Rhallabi N., Ait Mhand R., Akssira M., et Mellouki F. 2016. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sciure du bois de loupe de *Tetraclinis articulata* (Vahl), master du Maroc sur des souches d'origine clinique. International Journal of Innovation and Applied Studies. 16(2): 314 - 321.
- Ammad F., Moumen O., Gasem A., Othmane S., Hisashi KN., Zebib B., and Merah O. 2018. The potency of lemon (*Citrus limon* L.) essential oil to control some fungal diseases of grapevine wood. Comptes Rendus Biologie. 341: 97 - 101.
- Amezouar F., Badri W., Hsaine M.N., Bourhim N., et Fougrach H. 2013. Evaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire d'*Erica arborea* L. du Maroc. Pathologie biologique. 6: 228 - 231.
- Antonius GF., Kochhar TS., Jarret RL., and Syder JC. 2006. Antioxidants in hot pepper: variation among accesions. Journal of Environmental Science and Health. Part B. (41): 1237 - 1243.
- Ao Y., Satoh K., Shibano K., Kawahito Y., and Shioda S. 2008. Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from rutaceae. J. Clin. Biochem. Nutr. 43(1): 6 - 12.
- Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., and Stanescu U. 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). Farmacia. 58 (1): 46 - 54.
- Araico A., Terencio M.C., Alcaraz M.J., Domínguez J.N., León C., and Ferrándiz M.L. 2007. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of Me-UCH9, a dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. Life Sciences. 80: 2108 - 2117.
- Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., et Khebri S. 2010. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal. 11 (1): 69 - 81.

- Awaad A.S., El-meligy RM., Qenawy SA., Atta AH., and Soliman AG. 2011. Anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of some desert plants. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15: 367 - 373.

(B)

- Backhouse N., Rosales L., Apablaza C., Goity L., Erazo S., Negrete R., Theodoluz C., Rodriguez J., and Delporte C. 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 263 - 269.
- Bajpai VK., and Kang SC. 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 87(3): 327 - 336.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. 46: 446 - 475.
- Baliga MS., Jagetia GC., Ulloor JN., Baliga MP., Venkatesh P., Reddy R., Rao KM., Baliga BS., Devi S., Raju SK., Veeresh V., Reddy TK., and Bairy KL. 2004. The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of *Sapthaparna (Alstonia scholaris)* in mice and rats. *Toxicology Letters*. 151: 317 - 326.
- Barboni T., 2006. Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat. Ecole doctorale environnement et société. Univ. di Corsica – Pasquale Paoli. 35 - 38.
- Bardeau F. 2009. Les huiles essentielles, propriété et utilisation de l'aromathérapie. Edition François-Xavier Sorlot. Paris
- Barreca D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U. and Gattuso G. 2011. Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia Raf.*) fruit tissues leaves and seeds. *Food Chemistry*. 129: 1504 - 1512.
- Barros H., Ferreira P.D.C., et Genovese M.I. 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of *Citrus* from Brazil. *Food Chemistry*. 134: 1892 - 1898.
- Basile A., Senatore F., Gargano R., Sorbo S., Del Pezzo M., and Lavitola A. 2006. Antibacterial and antioxydant activities in *Sideritis italic* (Miller) Greuter and Burdet essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 10: 240 - 248.
- Bassoule IHN., Ouattara AS., Nebie R., Ouattara CAT., Kabore ZI. and Traore SA. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 62: 209 - 212.

Références bibliographiques

- Bassolé I. Henri Nestor H. and Rodolfo J. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 17: 3989 - 4006.
- Baudoux D. 2017. Aromathérapie: 100 huiles essentielles. Dunod. 544 p.
- Bellti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E. and Lanciotti R. 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of *Citrus* essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal agricultural food chemistry*. 52 (23): 6932 - 6938.
- Benabdi B., et Otmani A. 2019. Evaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*, Thèse de doctorat. Université akli Mohand oulhadj, Bouira. Algérie.
- Benedicte Michel B. 2011. Agrumes (comment les choisir et les cultiver facilement), édition Eugen Ulmer. Paris. 6 (11): 68 - 70.
- Bennadja S., Tlili Ait Kaki Y., Djahoudi A., Hadeif Y. and Chefrou A. 2013. Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. *Journal of Life Sciences*. 7 (8): 814 - 819.
- Bendimerad N., Taleb SA., Bendiab A., Benabadji B., Fernandez X., Valette L. and Lizzani- Cuvellier L. 2005. Composition and antimicrobial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) essential oil from Algeria. *Journal of Agricultur and Food Chemistry*. 53: 2947 - 2952.
- Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïli-Alaoui M. et Ayadi A. 1986. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 20 (2): 155 - 167.
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., et Boucherit K. 2014. Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*. Vol. 12 (6): 364 - 371.
- Berche P., Gaillard JL., et Simonet M. 1991. Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion. Paris: 660p.
- Bernard H., Johnsen PD., Killworth and Robinson S. 1989. Estimating the size of an average personal network and of an event population. In: *The Small World*, M. Kochen, Ed., 159 - 175.
- Bharti P., Bai S., Seasotiya L., Malik A., and Dalal S. 2012. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of ten aromatic plants against selected bacteria. *Int. J. Drug Dev. And Res*. 4(4): 342 - 351.
- Biche M., Siafa A., Adda R. et Gherbi R. 2012. Biologie d'*Aonidiella aurantii* (Homoptera, Diaspididae) sur citronnier dans la région de Rouiba. *Lebanese Science Journal*. Vol. 13 (1) : 59 - 64.

- Biche M., 2012. Les principaux insectes ravageurs des agrumes en Algérie et leurs ennemis naturels. Ed. Institut national de la protection des végétaux et le ministère de l'agriculture et du développement durable et FAO, 36 p.
- Billerbeck VG., Roques C., Vanière P., et Marquier P. 2002. Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. Hygiènes X. 3: 248 - 251.
- Bjarnason P., Scarpignato C., Holmgren E., Olszewski M., Rainsford K D., and Lanas A. 2018. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Gastroenterology. 154(3): 500 - 514.
- Bonnafous C. 2013. Traité scientifique aromathérapie aromathologie et aromachologie. Editions Dangles. France. 95 - 97.
- Bondet V., Williams W.B., and Berset C. 1997. Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 30: 609 - 615.
- Bonneval P. et Dubus F. 2014. Manuel pratique d'aromathérapie au quotidien. Editions Désiris. Paris. 288 p.
- Borthakur A., Bhattacharyya S., Pradeep K., Dudeja and Tobacman J.K. 2007. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292: 829 - 838.
- Bose A., Mondal S., Gupta J.K., Ghosh T., and Dash G.K., Si S. 2007. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. Fitoterapia. 78: 515 - 520.
- Boudjema K., Bouanane A., Gamgani S., Djeziri M., Mustapha M.A., Fazouane F. 2018. Phytochemical profile and antimicrobial properties of volatile compounds of *Satureja calamintha* L. Scheel from northern Algeria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 17: 857 - 864.
- Boukhalkhal S., Gourin N., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S., and Yousfi M. 2018. Variability of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oils of two subspecies of *Artemisia campestris* L. growing in Algeria. J. Food Meas. Charact. 12(3): 1 - 14
- Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F., et Hakim Y. 2010. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Revue Nature et Technologie. 03: 37 - 45.
- Boukhatem M., Kameli A., Ferhat M.A., Saidi F., Tayebi H., et Teffahi D. 2014. Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse. IJIAS. 8(4): 1418 - 1431.

- Bourgeois C. M., Mescle J. F. et Zucca J. 1996. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed.: TEC. et DOC. Lavoisier. Paris. Vol (1): 174 p.
- Bourgou S., Rahali F.Z., Ourghemmi I. and Tounsi MS. 2012. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian *Citrus* during fruit maturation. The Scientific World Journal. 1 - 8.
- Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Boughdad A., Farah A., et Satrani B. 2011. Effet de l'âge et du Stade Végétatif sur la Teneur et la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Thuya de Berbere. Les technologies de laboratoire. 6 (23): 64 - 68.
- Boughendjioua H. 2015. Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse de doctorat. Biologie végétale. Université Annaba. Algérie.
- Boughendjioua H., and Boughendjioua Z. 2017. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oil of Mandarin (*Citrus reticulata*) Cultivated in Algeria. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 44: 179 - 184.
- Boukhabti H., Chaker AN, Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M., Laouer H., and Harzallah D. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. Der Pharm Letters. 3: 267 - 275.
- Bousbia N., Abert V.M., Ferhat MA., Meklati BY. and Chemat F. 2009. A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. Journal of Food Engineering. Vol. 90: 409 - 413.
- Bousbia N. 2011. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger. Algerie. 176 p.
- Bozin B., Mimika- Dukic N., Simin N., and Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oil of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oil. J. Agric Food Chem; 54: 1822 - 1828.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Benset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 28: 25 - 30.
- Brat P. 2001. Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle): La flash-Détente. Journée professionnelle Cirad-flhor – Conservation et transformation des fruits: nouveaux enjeux, nouvelles techniques. Montpellier – France. Fruitrop (Ed. Française). 85: 11 - 13.
- Brune K., and Patrignani P. 2015. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Pain Res. 8: 105 - 118.

- Bruneton J. 1993. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentaire. Lavoisier, 2^{ème} édition. Paris. 915 p.
- Bruneton J. 1993. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition. Technique et documentaire. Lavoisier, 3^{ème} édition, Paris. 634 p.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation. Lavoisier, 3^{ème} édition. Paris. 1120 p.
- Buenz EJ. 2006. Developed countries should be the focus for effectively reducing chronic disease. J. Epidemiol. Community Health. 60(7): 562 - 563.
- Burt S. 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Application in Foods. International Journal of Food Microbiology. 94 (3): 223 - 253.

(C)

- Caillet S. et Lacroix M. 2007. Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA). 1 - 8.
- Caldefie-Chézet F., Fusillier C., Jarde T., Laroye H., Damez M., and Vasson M.P. 2006. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. Phytotherapy Research. 20: 364 - 370.
- Calo JR., Crandall PG., O'Bryan CA. and Ricke S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems-A review. Food Control. Vol. 54: 111 - 119.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozop W., Castillejos L. and Ferret A. 2007. Essential oils for modifying rumen fermentation. 90: 2580 - 2595.
- Carson C. F., Hammer K. A. and Riley T. V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin. Microbiol. Rev., Vol. 19 (1): 50 - 62.
- Celikel N., and Kavas G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech J. Food Sci. 26 (3): 174 - 181.
- Chan PK. and Hayes A.W. 1994. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. Raven Press, Ltd, New York, USA. 579 - 647.
- Chang CW., Chang WL., Chang ST. and Cheng SS. 2008. Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. Water Research. 42: 78 - 286.
- Chemat F., Tomao V., and Viot M. 2008. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In Handbook of Food Analysis Instruments by Semih Ötles. Boca Raton, FL: CRC Press. 85 - 103.

- Chemat, F., Huma, Z., and Khan, M.K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18: 813 - 835.
- Chi H., and Holo H. 2018. Synergistic Antimicrobial activity between the broad spectrum bacteriocin garvicin KS and nisin, farnesol and polymyxin B against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Current microbiology*. 75: 272 - 277.
- Chippada S.C., Volluri S.S., Bammid S.R., and Vangalapati M. 2011. In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan Journal of Chemistry*. 4(2): 457 - 460.
- Chouitah O. 2012. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algérie. 143 p.
- Ciriminna R., Lomeli M., Carà PD., Jose A., Sanchez L. and Pagliaro M. 2014. Limonene: A Versatile Chemical of the Bioeconomy. *Royal Society of Chemistry*. Vol. 50: 15288 - 15296.
- Couic-Marinier F., et Lobstein A. 2013. Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*. Elsevier Masson. 52: 22 - 25.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., and Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. 88: 170 - 175.
- Courvalin P., and Leclercq R. 2012. *Antibiogramme*, Ed.: ESKA ISBN. Paris. 800 p.
- Cressy H.K., Jerrett A.R., Osborne C.M. and Bremer P.J. 2003. A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *Journal of Food Protection*. 66: 390 - 395.
- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro MG., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., and Trombetta D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem*. 55: 6300 - 6308.
- Crosjean J., Clavé D., Archambaud M., and Pasquier C. 2009. *Bactériologie et virologie pratique*. 1^{er} Ed., De Boeck Université Bruxelles. 95 p.
- Crouzilles C., et Siebert C. 2010. *Processus inflammatoires et infectieux*. Italie. Elsevier Masson. 25 - 134.

(D)

- De Buyser ML. 1996. Les staphylocoques. Microbiologie, Tome 1 (C. Bourgeois et J.F. Mesclé, édit.). Technique et documentation. Lavoisier, Paris. 106 - 119.
- De Moraes Barros H. R., De Castro Ferreira T.A.P. and Genovese M.I. 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of *Citrus* from Brazil. Food Chemistry. 134: 1892 - 1898.
- Delaquis P.J, Stanich K, Girard B and Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oil. International Journal of Food Microbiology. 74(1-2): 101 - 109.
- Degryse AC., Delepla I., et Voinier MA. 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé et environnement, EHESP. 1 - 94.
- Denis F.E., Bingen C., Martin M.C., Poly and Quentin R. 2011. Bactériologie Médicale. 2nd Ed., Elsevier Masson, Paris. 640 p.
- Deschemaeker K. 2004. Nutri-phytothérapie: développement récents. Ed: Garant. Amazon. France. 41 - 51.
- Desislava T., Rositsa D., Bogdan Yana H., Aleksandar S., Zapryana D., and Georgi K. 2019. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L. zest against some pathogenic microorganisms, Z. Naturforsch. 74 (5–6): 105 - 111.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N. and Mnif W. 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. Vol. 42 (3): 16 p.
- Dhingra AK., Chopra B., and Bonthagarala B. 2018. Natural Anti-Inflammatory Agents: Recent Progress and Future Perspectives. Annals of Pharmacology and Pharmaceutics. 3(5): 1158 p.
- Diaaz-Reinoso, B., Moure, S., Domianguéz, H., and Parajoa, J.C. 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 2441 - 2469.
- Dib H., Beghdad M.C., Belarbi M., Seladji M. and Ghalem M. 2013. Antioxidant activity of phenolic compound of the cladodes of *Opuntia ficus-indica* MILL. From northwest Algeria. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences. 3: 147 - 158.
- Diezi J. 1989. Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. In : Pharmacologie: Des principes fondamentaux aux applications thérapeutiques. Ed. Slatkine – Genève. 33 - 44.

- Djerrad Z., Kadik L., and Djouahri A. 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Ind. Crops Prod.* 74: 440 - 449.
- Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A. and Menut C. 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am.* 1 (4): 606 - 611.
- Donsi F., Annunziata M., Sessa M., and Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Sci Technol.* 44: 1908 -1914.
- Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S. and Kukic J. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacology.* 109 (3): 458 - 463.
- Dorman H. J. and Deans S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils *Journal of Applied Microbiology.* 88 (2): 308 - 316.
- Dosoky N and Setzer, W. 2018. Biological Activities and Safety of *Citrus spp.* essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences.* 19 (7): 1966.
- Dragsted A., et Lang B. 1957. Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Annales pharmaceutiques Française.* 11 p.
- Du B., Zhu F., and Xu B. 2018. An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms. *Journal of Functional Foods.* 47: 334 - 342.
- Dugo G. and Di Giacomo A. 2002. The genus *Citrus*. Taylor and Francis Publishing, London. 638 p.
- Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., and Avimadj M. 2008. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine* Gvozdjakova A. 19 - 43.
- Dugrand-Judek A. 2015. Contribution à l'étude photochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre *Citrus*. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques. Université de Lorraine, France.

(E)

- Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21: 308 - 323.

- Elgayyar M., Draughon F.A. Golden D.A. and Mount J.R. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protec.* Vol. 64(7): 1019 - 1024.
- El Hamzaoui A., Amara S., Chani M., Dicaumba A. et Azouadelly E. 2000. Analyses bactériologiques des selles, revue biologie- infectiologie. Tome VI: 21 - 33.
- El Haib A. 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. 158 p.
- El Malki F., Eddaraji K., Alloudane R., Greche H., Essalmani H., and Barrijal S. 2018. Antimicrobial activity of essentials oils extracted from leaves of native Moroccan plants against clinical bacterial isolates. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents.* Vol. 8(1): 4: 2174 - 9094.
- Endrias A. 2006. Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdarif* L. et à l'*Artemisia annua*. Thèse de doctorat N° 2340, de l'institut national polytechnique de Toulouse. France.
- Eyob S., Martinsen B.K., Tsegaye A., Appelgren M. and Skrede G. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen). *African Journal of Biotechnology.* 7 (15): 2585 - 2592.

(F)

- Fachini-Queiroz F.C., Kummer R., Estevão-Silva C.F., Carvalho M.D.d.B., Cunha J.M., Grespan R., Bersani-Amado C.A., and Cuman R.K.N. 2012. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine.* Vol. 2. 1-10.
- Fall AD., Sy GY., Fall M., Diatta W., Nicolas JP., Diatta K., Gassama AS., Bassene E., et Faye B. 2009. Étude des activités antalgique et anti-inflammatoire et de la toxicité aigüe des feuilles d'*Aphania senegalensis* (Juss. Ex Poir.) Radlk, Sapindaceae. *Ethnopharmacologia.* 43: 76 - 80.
- Fanciullino AL., Dhuique-Mayer C., Luro F., Casanova J., Morillon R., Ollitrault P. 2006. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54: 4397 - 4406.
- FAO. 2013. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- FAO. 2016. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/fr>
- Fauchère J.L., et Avril L. 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Ed. Paris. 365 p.
- Faucon M. 2015. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale: Fondements et aide à la prescription. Édition sang de la terre. Paris. 39 - 455.

- Ferhat M.A., Meklati B.Y., et Chemat F. 2010. *Citrus* d'Algérie: les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions. Ed. Office des publications universitaires. Alger.157 p.
- Fernandez X. et Chemat F. 2012. La chimie des huiles essentielles. Ed. Vuibert. France. 288 p.
- Festy D. 2011. Les huiles essentielles ça marche avec 78 formules à commander en pharmacie. LEDUC.S Edition. 22 - 26.
- Fillatre Y. 2011. Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat. Université d'Angers. France. 266 p.
- Firouzi R., Azadbakht M. and Nabinedjad AM. 1998. Anti-Listerial activity essential oils of some plants. *Journal of Applied Animal Research*. 14: 75 - 80.
- Fisher K., Rowe C. and Phillips S C. 2007. The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components in vitro and food. *Letters in Applied Microbiology*. 44: 495 - 499.
- Fisher K. and Philips C. 2008. Potentiel antimicrobial uses of essential oils in food. A review. *Trends in Food Science and Technology*. 19: 156 - 164.
- Frank C.LU. 1992 Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris. 73 - 202.
- Franchomme P., Pénéol D. and Reverdy M.E. 1990. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement. R. Jollois. Editeur. Limoges. 2: 73-227.
- Franchomme P. et Penoel D. 1990, Matière médicale aromatique fondamentale, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. R.Jollois Edit., Limoge. 445 - 446.
- Frassinetti S., Caltavuturo L., Cini M., DellaCroce C.M.and Maserti B.E. 2011. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. *Journal of Essential Oil Research*. 23: 27 - 31.
- Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J. and Rosalia F. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Citrus* essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2067 - 2072.

(G)

- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*. 102: 898 - 904.

- Garcia-Lor A., Luro F., Navarro L., and Ollitrault P. 2012. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated *Citrus* genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics*. 287: 77 - 94.
- Gaziano J.M., and Gibson C.M. 2006. Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *Am J Cardiol*. 97: 23 - 29.
- Geng Y., Zhu S., Lu Z., Xu H., Shi JS., and Xu ZH. 2014. Anti-inflammatory Activity of Mycelial Extracts from Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 16 (4): 319 - 325.
- Gilles G. 2004. *Notions de Toxicologie*. Québec. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec. 67 p.
- Gilles M., Zhao J., An M. and Agboola S. 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*. 119 (2): 731 – 737.
- Girenavar B., Jayaprakasha G.K., Jadegoud Y., Nagana Gowda G.A., Patil B.S. 2007. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. *Bio org Med Chem*. 15 (11): 3684 - 3691.
- Ghalem M., Merghache S. and Belarbi M. 2014. Study on the antioxidant activities of root extracts of *Zizyphus lotus* from the western region of Algeria. *Pharmacognosy Journal*. 6: 32 - 42.
- Ghanem N., Mihoubi D., Kechaoua N., and Boudhrioua Mihoubi N. 2012. Microwave dehydration of three *Citrus* peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Industrial Crops and Products*. 40: 167 - 177.
- 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.
- Ghédira K., et Goetz P. 2015. *Citrus aurantium L.* amara Link. *Phytothérapie*. 13: 320 - 327.
- Goetz P. 2014. *Citrus limon L.* Burm. f. (Rutacées) Citronnier. Enseignement de phytothérapie, Paris XIII, F-9017 Bobigny cedex. France. 117 p.
- Goshwami D., Rahman M.d.M., Muhit M.d.A., and Islam M.D.S. 2013. Antinociceptive, Anti-inflammatory and Antipyretic Activities of Methanolic Extract of *Lasia spinosa* Leaves. *International journal of pharmaceutical and chemical sciences*. 2 (1): 118 -122.

- Goulas V., and Manganaris G.A. 2012. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of *Citrus* fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*. 131: 39 - 47.
- Govindappa M., and Poojashri M. N. 2011. Antimicrobial, antioxidant and in vitro antiinflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. 3(3): 43 - 51.
- Guinoiseau E. 2010. Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option: Biochimie - Biologie moléculaire. France. 50 p.
- Guinoiseau E. Luciani A., Serra D.D.R., Quilichini Y., Berti L., Lorenzi V. 2015. Primary mode of action of *Citrus ladaniferus* L. essential oil active fractions on *staphylococcus aureus* strain. *Adv. Microbiol.*, 5: 881 - 890.
- Guiraut J. P. 2003. Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris. 110 - 112.
- Guo J.J., Gao Z.P., Xia J.P., Ritenour M.A., Li G.Y., Shan Y. 2018. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of *Citrus* essential oils from the main cultivated varieties in China. *LWT-Food Sci. Technol.* 97: 825 - 839.

(H)

- Haj Ammar A., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Romdhane M., and Zagrouba F. 2012. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Citrus aurantium* L. Flowers Essential Oil (Neroli Oil). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 15 (21). 1034 - 1040.
- Halliwell B., and Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142: 231 - 255.
- Hamdan D., Mohamed M. and El Sahzly A. 2016. *Citrus reticulata* Blanco cv. Santra leaf and fruit peel: A common waste products, volatile oils composition and biological activities. *Journal of Medicinal Plants Research.* 10: 457- 467.
- Hadbaoui Z. 2012. Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, proteiques et phenoliques de sorgho et de mil locaux. These de Doctorat, Universite de Kasdi Merbah Ouargla. Algérie.
- Haddouchi F., Chaouche TM., Zaouali Y., et al. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. *Food Chem.* 141(1): 253 - 8
- Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology.* 86: 985 - 990.

- Hammer K.A. and Carson C.F. 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Ed. John Wiley and Sons, Ltd, United Kingdom. 255 - 295.
- Hanke M.V. and Flachowsky H. 2010. Fruit crops. In: Kempken F. and Jung C. (eds.), Genetic Modification of Plants, Ed. Springer (Berlin). 307 - 348.
- Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., and Bouhadi D. 2009. Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. Revue Microbiologie Industrielle Sanitaire Environnementale. 5: 37 - 55.
- Hart P.H., Brand C., Carson C.F., Riley T.V., Prager R.H. and Finlay-Jones J.J. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflammation Research. 49: 619 - 626.
- He D., Shan Y., Wu Y., Liu G., and Chen B., Yao S. 2010. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in *Citrus* fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. Food Chem. 127: 880 - 885.
- Hemwimon S., Pavasant P. and Shotiprux A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. Separation and Purification Technology. 54: 44 - 50.
- Ho C.L., Wang E.I.C., Yu H.T., Yu H.M. and Su Y.C. 2010. Compositions and antioxidant activities of essential oils of different tissues from *Cryptomeria japonica* D. Don. 32 (1): 63 - 76.
- Hoare J. 2012. Le guide des huiles essentielles et leurs applications thérapeutiques. Editions le courrier du livre. Paris. 256 p.
- Holley R.A., and Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22(4): 273 – 292.
- Hosni K., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Ben Brahim N., and Sebei H. 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence, Food Chem., 123: 1098 - 1104.
- Huang R., Xia R., Hu L., Lu Y. and Wang M. 2007. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. Scientia Horticulturae. 113: 166 - 172.
- Huang D.J., Lin C.D., Chen H.J. and Lin Y.H. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipouroea batatas*) Lam «Tamong 57» constituents. Botanical Bulletin of Academi. Sinica. 45: 175 - 186.

Références bibliographiques

- Hussain A.I., Anwar F., T.H.S. Sherazi and Przybylski R. 2008. Chemical composition. Antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry. 108: 986 - 995.
- Hussain AI., Anwar F., Chatha SAS., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam PS. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology. 41: 1070 - 1078.

(I)

- Inouye S., et Abe S. 2007. Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. Phytothérapie. Springer-Verlag Paris. Vol. 5, 1.

(J)

- Janati S., Beheshti H., Feizy J., and Fahim N. 2012. Chemical composition of lemon (*Citrus limon* L.) and peels its considerations as animal food. GIDA. 37: 267 - 271.
- Janssen AM. Scheffer JJC and Baerhein Svendsen A. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta Medica. 53: 395 - 398.
- Japon-Lujan R., Janeiro P. and Luque De Castro M.A.D. 2008. Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasoundassisted approach. Journal of agricultural and food chemistry. 56: 7231 - 7235.
- Jeannot V., Chahboun J., Russell D. and Baret P. 2005. Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium*). International Journal of Aromtherapy. 15 (2): 94 - 97.
- Jelen H. 2011. Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties. Ed: CRC Press. 492 p.
- Jiang Y., Wu N., Fu YJ., Wang W., Luo M., Zhao CJ. and al. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environ Toxicol Pharmacol. 32: 63 - 8.
- Jouault S. 2012. La qualité des huiles essentielles et sont influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Faculté de pharmacie. Université de Lorraine. France.

(K)

- Kafeshani M. 2015. Ginger, micro-inflammation and kidney disease. Nutrition. 31: 703 - 707.

Références bibliographiques

- Kaibi FZ., Timizar A. 2016. Etude de quelques activités biologiques antimicrobienne antioxydant et cicatrisante de deux agrumes *Citrus limonum* et *Citrus sinensis*, Thèse de doctorat. Université Saad Dahlab. Blida. Algérie.
- Kalembe D. and Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 10 (10): 813 - 829.
- Kaloustian J., et Hadji-Minaglou F. 2012. La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer-Verlag. France. Paris. 210 p.
- Kamal G.M., Anwar F., Hussain AI., Sarri N. and Ashraf M.Y. 2011. Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*. Vol. 18: 1275 - 1282.
- Kammoun Bejar A., Ghanem N., Mihoubi D., Kechaou N., and Boudhrioua Mihoubi N. 2011. Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. *Journal of Food Engineering*. 7 (5): 1 - 25.
- Karoui I. and Marzouk B. 2013. Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus Aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International*. 8: 1 - 15.
- Karthik K., Kumar B.R.P., Priya V.R., Kumar S. K., and Rathore R.S.B. 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian J Res Pharm Biotechnol*.1(5): 729 - 730.
- Kechar K., et Hellal B. 2016. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Ballota hirsuta* Benth du Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*. 13: 225 - 279.
- Kerdudo A., Dingas A., Fernandez X. and Faure C. 2014. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*. 12 - 19.
- Khabbal Y.M., Cadi Ait E., Alaoui K., Faouzi A., et CherrahY. 2006. Activit anti-inflammatoire de *Zygophyllum goetulum*. *Phytothérapie*. 5: 227 - 229.
- Khalil E.A., Afifi F.U. and Al-Hussaini M. 2007. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 104 - 112.
- Khartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., and Sokmen A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. 100: 584 - 589.
- Khayyat S.A., Roselin L.S. 2018. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *Journal of Saudi Chemical Society*. 22: 855 - 875.

- Khelifi H.S. 2015. Etudes physiologiques et genetiques de caracteres morpho-physicochimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. Montpellier. France. 18 - 31.
 - Kim MJ., Yang KW., Kim SS., Park SM., Park KJ., Kim KS., Choi YH., Cho KK. and Hyun CG. 2014. Chemical composition and anti-inflammation activity of essential oils from *Citrus unshiu* flower. *Natural Product Communications*. 9 (5): 727 - 730.
 - Kimball D.A. 1999. *Citrus processing: A complete guide*. Second edition, Aspen Publication inc. 435 p.
 - Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., and Možina, SS. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods* 81: 121 - 126.
 - Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene YA., Millet J et Chaumont JP. 2004. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 148: 202 - 206.
 - Koh K.J., Pearce A.L., Marshman G., Finlay-Jones J.J., and Hart P.H. 2002. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British Journal Dermatology*. 147: 1212 - 1217.
 - Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P., Groot A.D. and Evstatieva L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*. 13: 8 - 17.
 - Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H. and Oreopoulou V. 2007. Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8: 155 - 162.
 - Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Vrvic MM., Todorovic´ N., Dragica Jakovljevic´, and Van Griensven LJLD. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 26: 144 - 153.
 - Kulisic T., Radonic A., katalinic V. and Milos M. 2004. Use of different methods for the testing activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85: 633 - 640.
 - Kunle O., Okogun J., and *al.*, 2003. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*. Vol. 10 (1): 59 - 61.
- (L)
- Ladaniya MS. 2008. *Citrus Fruit Biology, technology and evaluation*, Academic press. London. UK. 1 - 11.

- Lahlou M. 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18: 435 - 448.
- Lahlou S., Israili Z., and Lyoussi B. 2008. Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 117: 221-227.
- Lakhdar L. 2015. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: étude in vitro, Doctorat Sciences Odontologiques équipe de recherche en écosystème buccal, Faculté de médecine dentaire de rabat, Maroc. 32 p.
- Lapointe G. 2004. Notions de Toxicologie. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec. Québec. 67 p.
- Laurent A. et Delerme C. 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. AFSSAPS. 1 - 17.
- Laurent T. 2016. Le grand livre des automassages chinois pour se soigner: Troubles digestifs, nervosité, insomnie... Le massage des points d'acupuncture pour soulager plus de 70 pathologies. Leducs (Ed.). 344 p.
- Ledesma-Escobar C.A., and Luque de Castro M.D. 2014. Towards a comprehensive exploitation of *Citrus*. *Trends Food Science and Technology*. 39: 63 - 75.
- Lefief-Delcourt A. 2009. Le pamplemousse malin: Tous les bienfaits pour la santé, la beauté et la maison d'un ingrédient 100% naturel. Ed: Leduc. 192 p.
- Lemes Raiane S., Alves Cassia C.F., Estevam Elisângela B.B., Santiago Mariana B., Martins Carlos H.G., and Santos Tainá C.L. 2018. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90 (2): 1285 - 1292.
- Li Y-F., Xian Y-C., Ip S-P., Su Z-R., Su J-Y., He J-J., Xie Q-F., Lai X-P., and Lin Z-X. 2011. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* in animal models. *Fitoterapia*. 82: 1295 - 1301.
- Li Y., Fabiano-Tixier A.S. and Chemat F. 2014. Essential Oils: From Conventional to Green Extraction. *In: Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. 9 - 21.
- Liao J.C., Deng J.S., Lin Y.C., Lee C.Y., Lee M.M., Hou W.C., Huang S.S, and Huang G.J. 2012. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities from *Actinidia callosa* var. *callosa* In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1 p.

- Liyana-Pathirana C.M. and Shahidi F. 2006. Antioxydant propriétés of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. Journal of the Science of Food and Agriculture. 86: 477 - 485.
- Lou Z., Chen J., Yu F., Wang H., Kou X., Ma C., and Zhu S. 2017. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. Food Sci. Technol. 80: 371 - 377.
- Loussert R., 1989. Les agrumes, arboriculture. Vol. 1, Ed. Technique agricoles méditerranéennes. Paris. 39 - 113.
- Lucchesi M.E. 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Sciences. Université de la Réunion. Faculté des Sciences et Technologies. France. 143 p.
- Luque De Castro M.D., Jiménez-Carmona M.M., and Fernandez-Pérez V. 1999. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. Trends in Analytical Chemistry. Vol: 18. 708 - 716.
- Luro F., Gatto J., Costantino G., and Pailly O. 2011. Analysis of genetic diversity in *Citrus*. Plant Genetic Resources. 9: 218 - 221.
- Luro F., Jacquemond C., et Curk F. 2013. La clémentine dans la diversité génétique des agrumes. In: Les clémentiniers et autres petits agrumes. Versailles, France. 17 - 36.

(M)

- M'Hiri N. 2015. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. France.
- Mahfouf N., Bennadja S., Nasri H., Djahoudi A., and Heni S. 2017. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Origanum vulgare* L. against *Escherichia coli* Strains. Journal of Essential Oil Bearing Plants. Vol. 20 (5): 1391-1399.
- Malecky M. 2007. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). Paris. 206 p.
- Marin F.A., Soler-Rivas C., Benavente-Garcio., Castillo J., and Perez-Alvarez J.E. 2007. By-products from different *Citrus* processes as a source of customized functional fibres. Food Chemistry. 100: 736 - 741.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. and Kefalas P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); Food Chemistry. 89: 411 - 420.

- Maruyama N., Sekimoto N. and Ishibashi H. 2005. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of inflammation*. 2: 1 - 11.
- Mau J.L., Ko P.T., and Chyau C.C. 2003. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Res. Int.* 36: 97 - 104.
- Mayachiew P. and Devahastin S. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41: 1153 - 1159.
- Mayer F. 2012. Utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Etude de cas en maison de retraite. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine. France.
- Mazari K., Bendinerad N., BenkhechiCh and Fernandez X. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L and *cupressus sempervirens*. *Medicinal Plant Research*. 4(10): 959 – 964.
- Mebirouk R. 2017. Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et antiangiogénique. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie. 172 p.
- Mechergui K., Jaouadi W., Coelho J.P., and Khouja M.L. 2016. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. *Ind.Crops Prod.* 90: 32 - 37.
- Miliuskas G., Venskutonis P.R. and van Beek T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85: 231 - 237.
- Mohanjain S. and Priyadar Shan P.M. 2009. Breeding plantation tree crops: temperate species. Édition: Springer. 275 p.
- Molina G., Vespermann K-A., Paulino B-N., Barcelos M-C., Pessôa M-G., Pastore M-G., and Molina G. 2017. Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. Vol. 101, 5.
- Mothana R.A., Alsaïd M.S., Hasoon S.S., Al -Mosaiyb N.M., Al -Rehaily A.J., and Al-Yahya M.A. 2012. Antimicrobial and antioxidant activities and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) analysis of the essential oils of *Ajuga bracteosa* Wall. Benth. and *Lavandula dentata* L. growing wild in Yemen. *J. Med. Plants Res.* 6: 3066 - 3071.
- Moufida S. and Marzouk B. 2003. Biochemical characterisation of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*. 62 (8): 1283 - 1289.

- Müller L., Fröhlich K., and Böhm V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 129: 139 - 148.

(N)

- Narishetty STK., and Panchagnula R. 2004. Transdermal delivery of Zidovudine: Effects of terpenes and their mechanism of action. *Journal of Controlled Release*. 95: 367 - 379.
- Nessrien M.N.Y. and Mohamed A.T. 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy and Food Sci.* 2 (1): 01 - 09.
- Nicolosi E., Deng Z., Gentile A., La Malfa S., Continella G., and Tribulato E. 2000. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 1155 - 1166.
- Niki E. 2012. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett.* 586: 3767 - 3770.
- Noack M. 2016. IL-17/Th17 au cours de l'inflammation chronique: criblage des interactions cellulaires. Thèse de doctorat. Immunologie. Université Claude Bernard Lyon. 10 p.
- Njoroge S.M., Phi N.T.L., and Sawamura M. 2009. Chemical composition of peel essential oils of sweet oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda. *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 12 (1): 26 - 33.
- Nongoniermar R., Ndiaye A., Ndiaye M., et Faye B. 2006. Activité anti-inflammatoire des décoctés aqueux et alcoolique des feuilles de *Boscia senegalensis* (Pers) Lam. Ex. poir. Capparidaceae. *Méd Afri Noire*. 53: 557 - 563.
- Nuciel C., et Vildé JL. 2005. Bactériologie médicale. 2^{ème} éd Masson. Paris. ISBN: 2 - 294.

(O)

- Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K. and Imanishi J. 2003. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 8 (3): 207 - 215.
- Okou OC. 2012. Efficacité et spectre d'activité des extraits de *Mitracarpus scaber* Zucc. Ex Schult et Scult.f. (Rubiaceae) et de l'acide fusidique sur les Bactéries Cocci Gram Positif. Thèse de Doctorat. Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire. 229 p.

- Olle M. and Bender I. 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*. 8 (3): 687 - 696.
- Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., and Luro F. 2003. *Citrus*. In: Genetic diversity of cultivated tropical plants. Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C (Eds.). Science publishers Inc. 193 - 217.
- Ollitrault P., Terol J., Garcia-Lor A., Bérard A., Chauveau A., Froelicher Y., Belzile C., Morillon R., Navarro L., Brunel D., and Talon M., 2012. SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the *Citrus* genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics*. 19 p.
- Oliver J.A. 1986. Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies. In *Chemicals testing and animal welfare*. The National Chemicals Inspectorate. Solna, Sweden. 119 - 142.
- Olivero-Verbel J., González-Cervera T., Güette-Fernandez J. Jaramillo-Colorado B. and Stashenko E. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20 (4): 568 - 574.
- Omonijo Faith A., Liju Ni, Joshua Gong, Qi Wang, Ludovic Lahaye, and Chengbo Yang. 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4: 126 - 136.
- Ondel R., Etou Ossibi AW., Bassoueka DJ., Peneme MB., Itou RGE., Massengo AB., et Abena AA. 2015. Toxicité aigue et effet aphrodisiaque de l'extrait aqueux de *rauwolfia obscura* K., Schum (apocynaceae). *Afrique Science*, 11(3): 172 - 180.
- Ouldyyerou K., Ibri K., Bouhadi D., Hariri A., Meddah B. et Tiritouil A. 2016. Effect of orange *Citrus sinensis* peel from Algeria in food. *Banat's Journal of Biotechnology*. 3(14): 97 - 100.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. and Lacroix M. 2006. Mechanism of action of *Spanish oregano*, *Chinese cinnamon*, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69 (5): 1046 - 1055.
- Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. et Casanova J. 2010. Etude chimique bio-guidée de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*. 1: 50 - 59.
- Ouedrhiria W., Bouhdida S., Mounyr B., El OualiLalamib A., Sandrine M., Fouad O C., and Hassane G. 2015. Chemical composition of *Citrus aurantium* L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7(1): 78 - 84.
- Oyedapo O.O., Makinde A.M., Ilesanmi G.M., Abimbola E.O., Akinwunmi K.F., and Akinpelu B.A. 2015. Biological activities (anti-inflammatory and anti-oxidant) of

fractions and methanolic extract of *Philonotis hastata* (Duby Wijk and Margadant). Afr. J. Tradit. Complement Altern Med. 12 (4): 50 - 55.

- Oyedeji OA., Adeniyi BA., Ajayi O. and Konig WA. 2005. Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytotherapy Research*. 19: 326 - 364.
- Ozen T. 2009. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) leaf extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 66 (2): 187-193.
- Ozkan G., Franco P., De Marco I., Xiao J., and Capanoglu E. 2019. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*. 272: 494 - 506.

(P)

- Paena A.T., D'Aquila P.S., Panin F., Pippia P., and Moretti M.D.L. 2002. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. 9: 721 - 726.
- Paggiola G., Van Stempvoort S., Bustamante J., Vega Barbero J. M., Hunt A J. and Clark J H. 2016. Can bio-based chemicals meet demand? Global and regional case study around *Citrus* waste-derived limonene as a solvent for cleaning applications. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. Vol.10: 686 - 698.
- Palou L., Valencia-Chamorro S.A. and Perez-Gago M.B. 2015. Antifungal edible coatings for fresh *Citrus* fruit. *Coatings*. 5: 962 - 986.
- Panda B.B., Kalpesh Gaur M.L., Kori L.K., Nema C.S., and Sharma A.K. 2009. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models. *Global Journal of Pharmacology*. Vol 3 (1): 01 - 05.
- Parray SA., Bhut JU., Ahmed G., Jahan N., Sofi G., and Iqbal SM. 2012. *Ruta graveolens* from traditional system of medicine to modern pharmacology- an overview. *Am J Pharm Tech Res*. 2 (2): 239 - 252.
- Patra AK. 2012. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Ed: Springer. 400 p.
- Pech J.C., Balagué C., Latché A., and Bouzayen M. 1994. Postharvest physiology of climacteric fruits: recent developments in the biosynthesis and action of ethylene. *Sci Alim*. 14: 3 - 15.
- Pibiri M.C. 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat en science. École polytechnique fédérale de Lausanne, suisse. 177 p.

- Pierron C. 2014. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France: exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. France. 256 p.
- Pinchuk I., Shoval H., Dotan Y., and Lichtenberg D. 2012. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*. 165: 638 - 647.
- Pourmortazavi M. and Hajimirsadeghi S.S. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography*. 1162: 2 - 24.
- Prakash Babu N., Pandikumar P., and Ignacimuthu S. 2009. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth, an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 125: 356 - 360.
- Puleo LS., Keunen K., Rit TP. 1994. Orange Peel Wax. *Cosmetics and Toiletries Magazine*. 109: 42 - 48.

(Q)

- Qi Lia Dan-Dan Donga, Qiu-Ping Huanga Jing Lia, Yong-Yong Dua, Bin Lia, Huan-Qing Lib and Ting Huyana. 2017. The anti-inflammatory effect of *Sonchus oleraceus* aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. *Pharmaceutical biology*, vol. 55(1): 799 – 809.
- Qingyun G., Ke L., Weihui D., Balian Z., Wenxia Y., and Jiong C. 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) peel essential oils. *Food Sci. Nutr*. 6(6): 1431 - 1437.
- Quintero A., Gonzalez C.N., Sanchez F., Usubillaga A. and Rojas L., 2003. Constituents and biological activity of *Citrus aurantium amara* L. essential oil. *Acta Horti*, Vol. 597: 115 - 117.

(R)

- Rafiq S., Kaul R, Sofi S.A., Bashir N., Nazir F. and Naik G.A. 2016. *Citrus* peel as a source of functional ingredient. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 30: 1 - 8.
- Rahal K., et al., 2003. Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale Selon les recommandations de l'OMS, 3^{ème} Edition.
- Rahman A., Shanta Z.S., Rashid M.A., ParvinT., Afrin S., Khatun M.K., and Sattar MA. 2016. In vitro antibacterial properties of essential oil and organic extracts of *Premna integrifolia* L., *Arab. J. Chem*. 9: 475 - 479.
- Ramful D., Tarnus E., Aruoma O.I., Bourdon E. and Bahorun T. 2011. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian *Citrus* fruit pulps. *Food Research International*, 44: 2088 - 2099.

- Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M. 2010. Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. Analele University Nii din București – Chimie. Vol. 19 (1): 23 - 30.
- Raza S. A., Rehman A., Adnan A. and Qureshi F. 2009. Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and Butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. Biharean Biol. 3. Vol. 3 (1): 71 - 75.
- Rega B., Fournier N., Guichard E., and Russell R. 2003. *Citrus* flavor. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 117 - 133.
- Reis FS., Martins A., Barros L., and Ferreira IC. 2012. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. Food and Chemical Toxicology. 50(5): 1201 - 1207.
- Reto M., Almeida C., Rocha J., Sepodes B. and Figueira M E. 2014. Green tea (*Camellia sinensis*): Hypocholesterolemic effects in humans and anti-Inflammatory effects in Animal. Pharmacology and Pharmacy. 5: 1113 - 1118.
- Rezzoug S.A., Louka N., Maache-Rezzoug Z., Nouviaire A. et Allaf K. 1998. Présentation du séchage couple à la texturation par détente instantanée contrôlée. Application aux produits agro-alimentaires en morceaux 10^{ème}, rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires, AGORAL, Ed. Lavoisier. 319 - 324.
- Riahi R.C., Tarhouni S., et Kharrat R. 2011. Criblage de l'effet antiinflammatoire et analgésique des algues marines de la mer mediterrannee. Archs. Inst. Pasteur Tunis. 88: 1 - 4.
- Rio J.L., Recio M.C., and Villar A. 1988. Screening methods for natural antimicrobiol products with antimicrobial activity. Review of the literature. J. Ethnopharmacol. 23: 127 - 149.
- Robert A. et Lobstein A. 2005. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec et Doc. Lavoisier. Paris. 522 p.
- Roberto D., Micucci P., Sebastian T., Graciela F., and Anesini C. 2010. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 106: 38 - 44.
- Roberfroid M. 2002. Aliments Fonctionnels. Ed: Lavoisier. Paris. 475 p.
- Rossi Y.E., and Palacios S.M. 2013. Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Muscadomestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor, ActaTropica. 127: 33 - 37.
- Roux SD. 2008. Conseil en aromathérapie. 2^{ème} Ed. Pro-officina Wolters Kluwer France. 187 p.

- Rufino A.T., Ribeiro M., Sousa C., Judas F., Salgueiro L., Cavaleiro C., and Mendes A.F. 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of Ecaryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology*. 750: 141 - 150.
- Ruiz B., and Flotats X. 2014. *Citrus* essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: an overview. *Waste Management*. 34: 2063 - 2079.
- Ruiz-Ciau D., Cuevas-Glory L., Quijano L., and Sauri-Duch E. 2017. Chemical composition and antioxidant DPPH activity of the floral and leaves essential oils of *Montanoa speciosa* DC. *American Journal of Plant Sciences*. Vol.8 (4): 745 – 753.

(S)

- Safaei-Ghomi J., Ebrahimabadi A.H., Djafari-Bidgoli Z., and Batooli H. 2009. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chem*. 115(4): 1524-1528.
- Sariburun E., Şahin S., Demir C., Türkben C., and Uylaşer V. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *J. Food Sci*. 75(4): 328 - 335.
- Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Theriou K., and Therios I. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*. 18: 10639 - 10647.
- Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., et Talbi M.B. 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 146: 85 - 96.
- Satari B. and Karimi K. 2018. *Citrus* processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*. Vol. 129: 153 - 167.
- Sawamura M. 2010. *Citrus* essential oil: flavor and fragrance – édition: John Libbey (USA). 381 p.
- Schimmenti E., Borsellino V. and Galati A. 2013. Growth of *Citrus* production among the Euro-Mediterranean countries: political implications and empirical findings. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 11 (3): 561 - 577.
- Schmidt E. 2010. Production of essential oils. *Science, Technology, and Applications*. CRC Press: Boca Raton, FL. 83 - 120.
- Sfeir J., Lefrançois C., Baudoux D., Derbré S. and Licznar P. 2013. *In vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 1 - 9.

- Shah P., and Modi HA. 2015. Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*. 3(6): 636 - 640.
- Shahidi F., and Zhong Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 18. 757 - 781.
- Selaimia A., Azouz M., Zga N., and Besbes N. 2020. Phytochemical study, antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids and diethyl ether extracts from leaves and seed of medicinal plant of Algeria flora. *Retama monosperma* (L) Boiss. *Ponte International Journal of Sciences and Research*. 76 (4): 42 - 52.
- Selles C. 2012. Valorisation d'une Plante Médicinale à Activité Antidiabétique de la Région de Tlemcen. *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'Extrait Aqueux à l'Inhibition de Corrosion d'un Acier Doux dans H₂SO₄ 0.5M. Thèse Doctorat en Sciences Physiques. Université Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen. Algérie. 214p.
- Selmi S., Rtibi K., Grami D., Hajri A., Hosni K., Marzouki L., and Sebai H. 2016. Antioxidant properties of *Artemisia herba-alba* and *Eucalyptus camaldulensis* essentials oils on malathion-induced reproductive damage in rat. *RSC Adv*. 6: 110661 - 110673.
- Serafini MR., Barreto E.O., Brito FA., Oñáulo Imeida dos Santos J.P.A., Runo osantos Lima B.S., Ristiani Isabel Walker C.I.B., Silva F.A., Ucindo José Quintans-Junior L.J., Gelain D.P., and Souza Araújo A.A. 2015. Anti-inflammatory property and redox profile of the leaves extract from *Morinda citrifolia* L. *Journal of Medicinal Plants Research*. 9: 693 - 701.
- Shakeri A., Khakdan F., Soheili V., Sahebkar A., Rassam G., and Asili J. 2014. Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*. *Ind. Crop. Prod*. 58: 315 - 321.
- Sheila Mello da S., Anildo C.J., Gerson N.S., Fábio L.S., and Cleide Rosana W.V. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against foods spoilage and food borne pathogens, *Ciência Rural*, Santa Maria. 42 (7): 1300 - 1306.
- Sikkema J., de Bont J.A.M. and Poolman B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J.Biol. Chem*. 269: 8022 - 8028.
- Silva J.S. 2016. Synopsis des espèces de *Croton* L. (Euphorbiaceae) dans l'état de Pernambuco, Brésil. *Acta botanica Brasilica*. 2: 441 - 453.
- Simone S., Conidi C., Ursino C., Cassano and Figoli A. 2016. Clarification of orange press liquors by PVDF hollow fiber membranes. *Membranes*. 6 (1): 1 - 15.
- Sing R., Marimuthu P., De Heluani C.S and Catalan Ceser A.N. 2006. Antioxidant and biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 174 - 181.

- Singleton P. 1999. Bactériologie 4^{ème} édition .Ed. DUNOD. Paris. 241 - 415.
- Sipailiene A., Venskutonis PR., Baranauskiene R. and Sarkinas A. 2006. Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. Journal of Essential Oil Research. 18: 698 - 703.
- Smith D.C., Forland S., Bachanos E., Matejka M., and Barrett V. 2001. Qualitative analysis of *Citrus* fruits extracts by GC/MS: an undergraduate experiment. Chem. Educ. 6: 28 - 31.
- Sobramenium G., Christian K., et Pellen N.K. 2015. limonène inhibe la formation de biofilm streptocoque en ciblant les facteurs de virulence associés à surface. J. Med. Microbiol.64(8): 879 - 890.
- Soro Tianga Yaya, Mian Jean Claude, Coulibaly Sirabana, and Nene-Bi Semi Anthelme, Traore Flavien. 2016. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Daniellia oliveri* (Fabaceae). IAIM. 3(2): 1 - 9.
- Souza E.L., Oliveira C.E.V., Stamford T.L.M., Conceição M.L. and Gomes Neto N.J. 2013. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, entérotoxine production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Braz.J.Microbiol. 44 (1): 29 - 35.
- Spicuzza L., Spicuzza A., La Rosa M., Polosa R., and Di Maria G. 2007. New and emerging infectious diseases. Allergy and Asthma Proceedings. 28(1): 28 - 34.
- Spiegel-Roy P. and Goldschmidt E.E., 1996- The Biology of *Citrus*. Éd Cambridge University Press. 81p.
- Su S., Wang T., Duan J-A., Zhou W., Hua Y-Q., Tang Y-P., Yu L., and Qian DW. 2011. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*. Journal of Ethnopharmacology. 134: 251 - 258.
- Swingle WT., and Reece PC. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. The *Citrus* industry, Reuther W., Batchlor L.D., Webber H.J. (Eds). Berckley, Etats-Unis: University of California Press I. 190 - 430.

(T)

- Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A. and Sakata, K. 1994. A Simple scening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fishand shellfish. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1780 - 1783.
- Takwi A.L., Li Y., Buscaglia L.E.B., Zhang J., Choudhury S., Park A K., Liu M., Young K.H., Park W.Y., Martin R.C.G., and Li Y. 2012. A statin-regulated microRNA represses human c-Myc expression and function. EMBO Mol Med. 4 (9): 896 - 909.

- Tanaka T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Studia Citrologica* 14: 1 - 6.
- Tavares J.P.N. 2012. Interaction between vegetation and the atmosphere in cloud and rain formation in the Amazon: A review. *Estudos avançados*. 26 (74): 219 - 227.
- Teuscher E., Anton R., et Lobstein A. 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris. 6 - 77.
- Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., and Nazemi J. 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. 17: 142 - 145.
- Torquato L.D., Pachiega R., Crespi MS., Nespeca MG., De Oliveira J.E., and Maintinguer SI. 2017. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste management*. 59: 181 - 193.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. and Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemo*. 49 (6): 2474 - 2478.
- Tumen I., Süntar I., Keleş H., Akkol E.K. 2012. A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 7: 1 - 7.
- Turner, M.A. 1965. *Screening Methods in Pharmacology*. Academic Press. New York, 26 p.

(U)

- Ultée A., Bennik M. and Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathon *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4): 1561 - 1568.

(V)

- Viaud H. 1993. *Thérapeutiques naturelles - GNOMA* Ed. 924 p.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M and Garcia-Parrilla M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* .71: 230 - 235.
- Vigan M. 2010. Essential oils: renewal of interest and toxicity. *Eur. J. Dermatol*. 20 (6): 685 - 692.
- Vinatoru M., Toma M. and Mason T.J. 1999. Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *Adv. Sonochem.*, Vol. 5: 209 - 247.

- Virbel-Alonso C., 2011. Citron et autre agrumes; Un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé, votre beauté. Groupe Eyrolles. Paris. 220 p.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J. and Pérez-Álvarez J. A. 2009. Chemical Composition of Mandarin (*C. reticulata* L.), Grapefruit (*C. paradisi* L.), Lemon (*C. limon* L.) and Orange (*C. sinensis* L.) Essential Oils, Journal of Essential Oil Bearing Plants. 12 (2): 236 - 243.

(W)

- Walter, A. and Sam, C. 2002. Fruit of Oceania. [trans., P. Ferrar from Fruits d'Océanie.] ACIAR Menographe 85. Australian centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. IRD Editions. 331 p.
- Wang W., Wu N., Zu YG. and Fu YJ. 2008. Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. Food chemistry. 108 (3): 1019 - 1022.
- Watson R.R. and *al.*, 2011. Nutrients dietary supplements and Nutraceuticals: cost analysis versus chemical benefits –édition: Hamana Press. New York. USA. 477 p.
- Wei A. and Shibamoto T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 55: 1737 - 1742.
- Wenqiang G., Li S., Yan R., Tang S., and Quan C. 2007. Comparaison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction méthodes. Food Chemistry. 101: 1558 - 1564.
- WHO (World Health Organization). 2016. List of Critically Important Antimicrobials for Human and Medicine. 5th revision. 1 - 48.
- WHO (World Health Organization). 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva. Switzerland. 1 - 7.
- Wilkinson J.M. 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII. pp. 157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim. 405 p.
- Winter C.A., Risley FA., and Nuss GW. 1962. Carrageenin induced oedema in hand paw of the rat as assays anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111: 544 - 547.
- Wollinger A., Perrin É., Chahboun J., Jeannot V., Touraud D., and Kunz W. 2016. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. Comptes Rendus Chim. 19: 754 - 765.

- Wu S.J., and 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.

(Y)

- Yang E.J., Kim S.S., Oh TH., Baik J.S., Lee N.H., and Hyun C.G. 2009. Essential oil of *Citrus* fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens. Int. J. Agric. Biol. 11: 791 - 794.
- Yang SA., Jeon SK., Lee EJ, Shim CH. and Lee IS. 2010. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. Natural Product Research. Vol. 24: 140 - 151.
- Yougbaré-Ziébro M.N., Ouédraogo N., Lompo M., Bationo H., Yaro B., Gnoula C., Sawadogo W.R., et Guissou I.P. 2016. Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). Phytothérapie. 14: 213 – 219.

(Z)

- Zellner B. A., Dugo P., Dugo G., and Mondello L. 2010. Analysis of essential oils. In Baser K. H. C., Buchbauer G. Handbook of essential oils. Science, Technology and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, New York. 151 - 183.
- Zhang Z., Lv G., Pan H., Wu Y., and Fan L. 2009. Effects of different drying methods and extraction condition on antioxidant properties of Shiitake (*Lentinus edodes*). Food Science and Technology Research. 15 (5): 547 - 552.
- Zhiri A. 2006. Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News Science. Nutrition. Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix. 12: 8p.
- Zomorodian K., Saharkhiz M.J., Shariati S., Paks hir K., Rahimi M. J. and Khas hei R. 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Nepeta cataria* L. against common causes of food-borne infections. Pharm. 1 - 6.
- Zou Z., Xi W., Hu Y., Nie C. and Zhou Z. 2016. Antioxidant activity of *Citrus* fruits. Food chemistry. 196: 885 - 896.

**REGULAR ARTICLE**

Acute oral, intravenous and peritoneal toxicity evaluation of the peel *Citrus* species

Amine Bengag*, Rachida Allem, Malika Meziane

Laboratory of Local and Natural Bio-resources, Faculty of Sciences, Department of Biology, University of Hassiba Ben Bouali, Chlef, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 5 Aug 2020

Revised: 26 Sep 2020

Accepted: 3 Oct 2020

***Corresponding Author:**

Email: ben.amine31@yahoo.fr

Telephone: +213 658710972

Keywords: Peel Citrus, cold expression, toxicity, GC/MS

ABSTRACT

Peel essences of *Citrus* species such as *C.sinensis*, *C.paradisi*, *C.reticulata* and *C.aurantium* were extracted by cold expression. The qualitative and quantitative analyses were evaluated (GC/MS). To evaluate acute toxicity of our species *in vivo*, we administrated our extract by three different routes: oral, intravenous (IV) and intraperitoneal (IP). Under these conditions, mice were treated with different doses, 14 days later the signs of toxicity were recorded. Results show that *C.sinensis*'s essences administration prevents significantly the LD₅₀ (2760 mg/Kg for IV, 3560 mg/Kg for the IP and 4040 mg/Kg for oral); *C.paradisi*'s essence administration by different routes IV, IP, oral prevents LD₅₀ significantly (2600, 2600 and 3080 mg/Kg respectively). The *C.aurantium*'s essence administration by different routes IV, IP and oral, significantly prevents the LD₅₀ (2920, 3560 and 4360 mg/Kg sequentially). *C.reticulata*'s essences administration by different routes IV, IP and oral prevent the LD₅₀ significantly (3400, 3720 and 4520 mg/Kg sequentially). The mortality evaluation else the LD₅₀ for each variety shown that injection of extract from different species of *Citrus* by the IV route is highly toxic compared to other routes. *Citrus* species are rich in different chemical constituents and oxygenic terpene compound supports this purpose or to the presence of high acidity.

1. Introduction

An estimated 100 million tons of *Citrus* fruits are produced annually; thereby making the *Citrus* family the largest contributor to the world's fruit production (Oikeh et al., 2016). *Citrus* is one of the largest plant species known, consisting of 40 species that are distributed around the world (Karimi and al., 2012). The health benefits of *Citrus* fruit have mainly been attributed to the presence of bioactive compounds, such as phenolics (e.g., flavanone glycosides, hydroxycinnamic acids), vitamin

C, and carotenoids (Jabri Karoui and Marzouk, 2013). Botanicals such as *Citrus* are comprised of hundreds of constituents, some of which have the potential to cause toxic effects; for example, bergapten (aka 5-methoxysporalen or 5-MOP) is a naturally occurring furanocoumarin (psoralen) in bergamot oil that causes photo toxicity (Burnett and al., 2016). One particular phytonutrient has attracted attention lately as a health promoting agent. Amazingly, we routinely throw out this most potent part of the orange. In the oil of the peel of citrus fruits is a phytonutrient known as limonene.

Oranges, mandarins, lemons, and limes contain significant amounts of limonene in the peel and smaller quantities in the pulp. Limonene stimulates our antioxidant detoxification enzyme system, thus helping to stop cancer before it can even begin (Saonere Suryawanshi, 2011). Toxicity testing of *Citrus* compounds is essential for drug development process. The preclinical toxicity testing on various biological systems reveals the species-, organ- and dose- specific toxic effects of an investigational product. The toxicity of substances can be observed by (a) studying the accidental exposures to a substance, (b) *in vitro* studies using cells/ cell lines and (c) *in vivo* exposure on experimental animals (Parasuraman, 2011).

The present study aimed at the evaluation of toxicity of *Citrus* peel. The motto is to discuss *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* and *C. aurantium* here; more research attention should be given on this that would increase its use in various chronic and acute diseases.

This work was undertaken to investigate the phytochemical constituents and acute toxicity of *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* and *C. aurantium*, so as to verify or otherwise the traditional claimed on the uses of the plant parts by traditional herbalists.

2. Material and Methods

2.1. Collection of plant material and Extraction procedure

Fresh fruits of four different species of Rutaceae family *C. Sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* and *C. aurantium* (figure 01) (figure 02), free from any insect infestation, infection or damage were collected from different locations in the Chlef, Algeria (Table 01) (figure 03), followed by frequent washes with distilled water and peeled. The peel of different fruits was used fresh. The extraction regime of essences was used by cold expression method.

2.2. GC-MS Analysis and Identification for Volatile Components of Citrus essence

The analysis for volatiles in four *Citrus* essences was performed by the GC/MS instrument (Hewlett Packard, Agilent 6890 N, USA) controlled by ChemStation (NIST98). The chromatography conditions are as follows:

- Injection of 0.5µl Split mode 1/50
- Injector temperature: 250 ° C

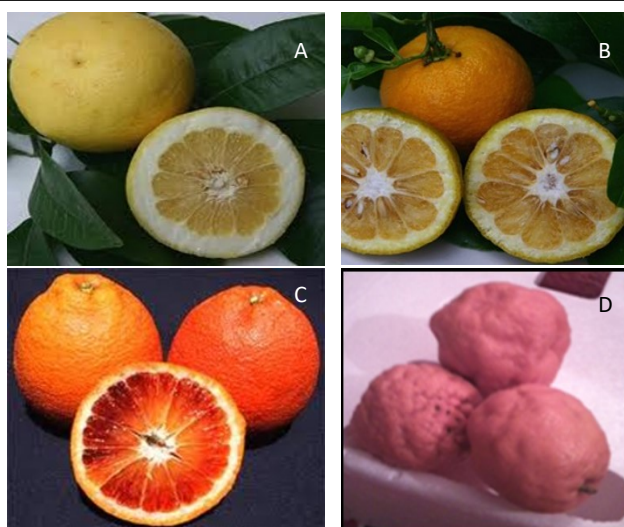


Figure 1: The varieties of citrus studied. A: *Citrus paradisi*; B: *Citrus reticulata*; C: *Citrus sinensis*; D: *Citrus aurantium*



Figure 2: Photograph; the secretory pockets in the zest of *Citrus*.

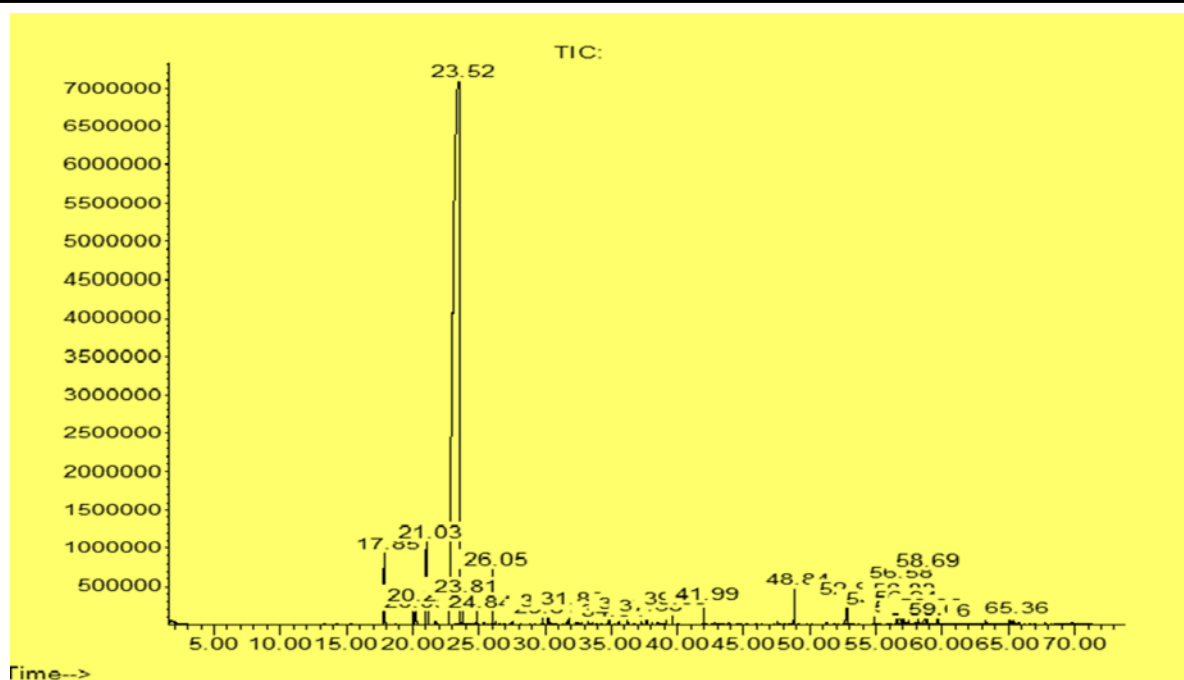
Variety	Place of harvest	Geographical coordinates
<i>C. paradisi</i>	Oued Sly* (Chlef)	Latitude: 36.1, Longitude: 1.2 36° 6' 0" Nord, 1° 12' 0" Est
<i>C. reticulata</i>	Oued Sly* (Chlef)	Latitude: 36.1, Longitude: 1.2 36° 6' 0" Nord, 1° 12' 0" Est
<i>C. sinensis</i>	Ech Chettia** (Chlef)	Latitude: 36.1764, Longitude: 1.24778 36° 10' 35" Nord, 1° 14' 52" Est
<i>C. aurantium</i>	Oued Fares (Chlef)	Latitude: 36.2328, Longitude: 1.24028 36° 13' 58" Nord, 1° 14' 25" Est

Table 1: The different batches of plant material received.

*: Agricultural investment ELHBIB GESSAB.

** : Agricultural investment (SANVITI).

- Capillary Column HP5MS (30 mx 0.25 mm x 0.25µm)

Figure 4: The GC/MS chromatogram of *C.aurantium*.

Peak number	Retention time (min)	Chemical composition	Relative %	Reconnaissance level
1	17.85	α -pinène	1.47	95
2	20.03	β -phellandrene	0.31	91
3	21.04	β -pinène	3.59	94
4	23.52	D-limonène	86.29	94
5	23.83	1, 3, 7-octatriene	0.36	95
6	24.84	Formicacid	0.19	91
7	26.05	1,6-octadien-3-ol	0.83	94
8	29.81	α -terpineol	0.10	91
9	30.24	Decanal	0.20	91
10	31.81	β -myrcene	0.26	90
11	34.84	Cyclohexene	0.07	95
12	36.23	2,6-octadien-1-ol	0.15	91
13	37.68	Caryophyllene	0.14	99
14	39.63	Germacrene D	0.24	96
15	41.99	1,6, 10-dodecatrien-3-ol,	0.33	91
16	48.83	2(3H)-Naphthalenone	0.55	99
17	52.81	n-Hexadecanoicacid	0.78	99
18	54.87	7H-Furo(3, 2-g) (1) benzopyran-7-ol	0.28	93
19	56.59	Osthole	0.67	96
20	56.83	9,12-octadecadienoic acid	0.78	99
21	56.94	(z) 6, (z) 9-pentadecadien-1-ol	0.36	95
22	57.04	9-octadecenoic acid,	0.15	90
23	58.20	Cobalt	0.08	50
24	58.69	2-Furancarboxaldehyde	1.13	49
25	58.85	N,I,	0.16	35
26	59.64	Auraptanol	0.10	72
27	63.23	N,I,	0.07	27
28	65.03	1H-indole, 5-methyl-2-phenyl	0.21	62
29	65.11	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	0.15	90
Total	/	/	99.92	/

Table 2: Components in percentage (%) of *C. aurantium* essence analyzed by GC /MS.

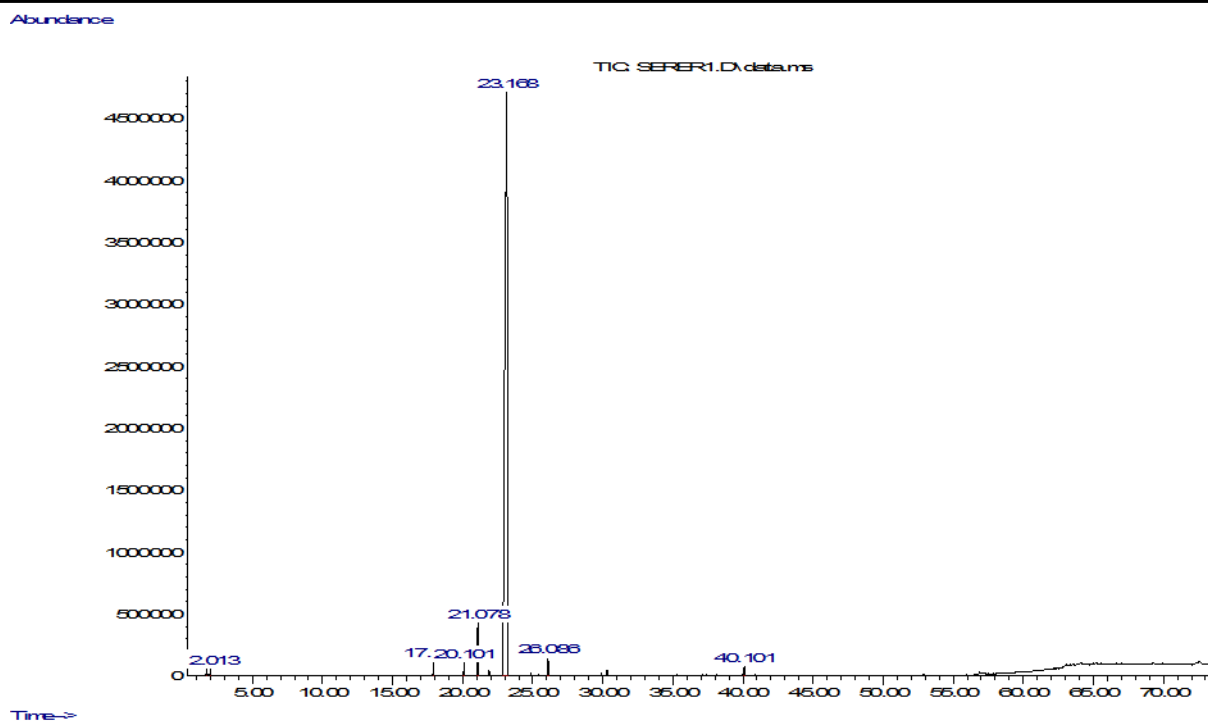


Figure 5: The GC/MS chromatogram of *C. sinensis*.

Peak number	Retention time (min)	Chemical composition	Relative %	Reconnaissance level
1	1.727	Acide formique	0.24	4
2	2.012	Ether éthylye	0.13	91
3	17.907	α pinène	0.70	97
4	20.099	β -phéllandrene	0.61	91
5	21.079	β -pinene	2.44	94
6	23.169	D-limonene	94.75	94
7	26.086	1-5 dimethyl 1venyl	0.72	49
8	40.103	Naphtalene	0.42	99

Table 3: Components in percentage (%) of *C. sinensis* essence analyzed by GC/SM.

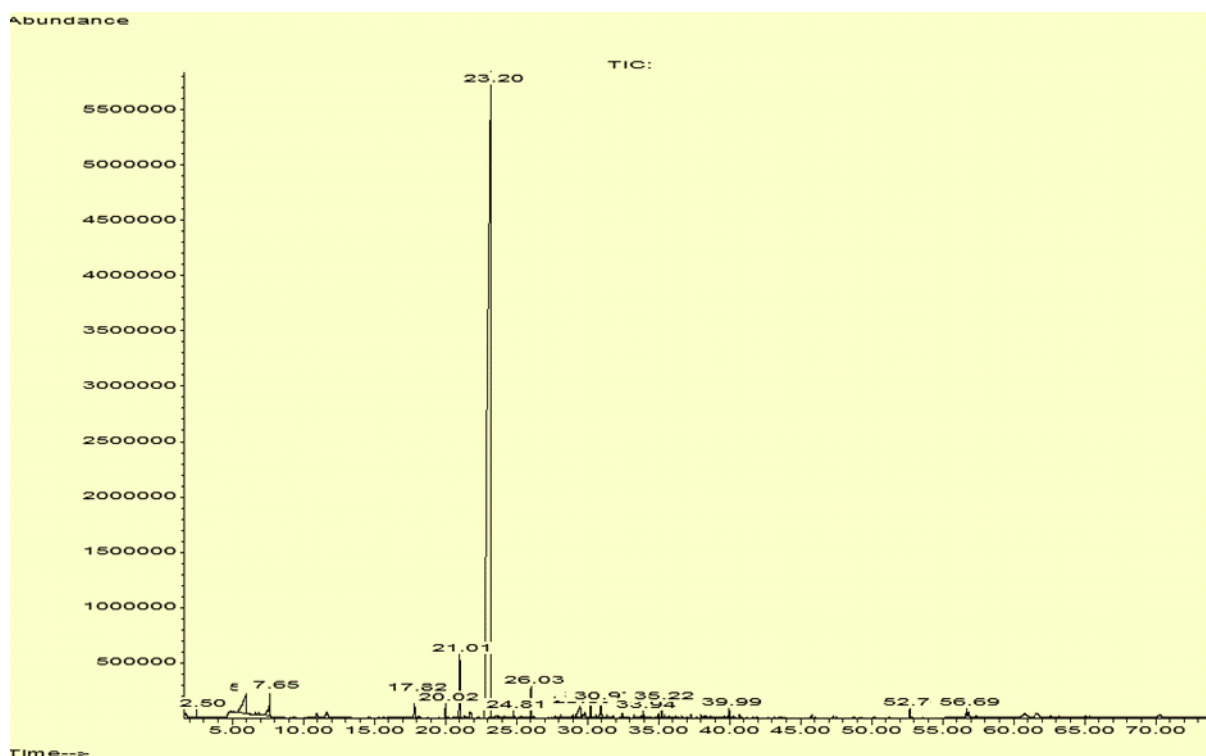
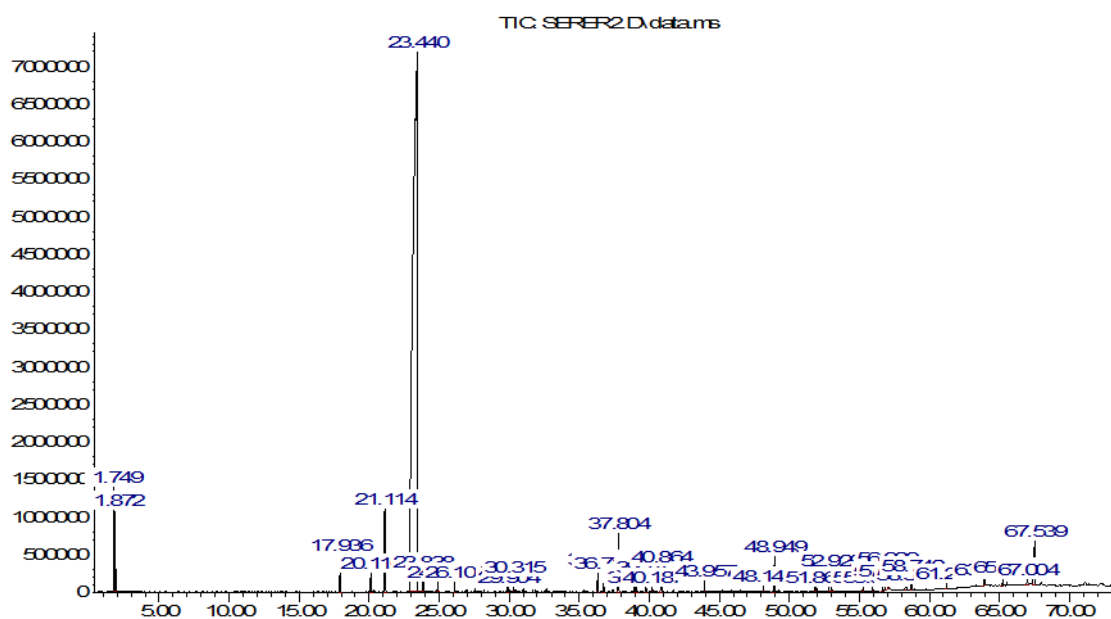


Figure 6: The GC/MS chromatogram of *C. reticulata*.

Peak number	Retention time (min)	Chemical composition	Relative %	Reconnaissance level
1	2.50	Hexane	0.11	90
2	5.99	Aceticacid	2.94	91
3	7.65	2-Butanone	1.24	86
4	17.82	α -pinène	0.75	97
5	20.02	Bicyclo (3, 1,1) heptane	2.43	91
6	21.01	β -pinène	2.33	91
7	23.21	Limonène	87.38	93
8	24.81	1-Octanol	0.16	90
9	26.03	1-6-octadien-3-ol	0.81	91
10	29.50	4H-pyran-4one	1.35	81
11	30.24	Decanal	0.40	91
12	30.97	2-Furancarboxaldehyde	0.72	93
13	33.94	2-methoxy-4-vinylphenol	0.19	91
14	35.22	1,2-Cyclohexanediol	0.44	53
15	39.98	Naphthalene	0.25	91
16	52.70	n-Hexadecanoicacid	0.28	98
17	56.69	9,12-octadecadienoic acid	0.20	99
Total	/	/	99.55	/

Table 4: Components in percentage (%) of *C. reticulata* essence analyzed by GC/SM.

Abundance



Time-->

Figure 7: The GC/MS chromatogram of *C. paradisi*.

and *C. paradisi* (figure 07) essences extract revealed respectively the presence of rich amounts of 30 whether 99.92% (Table 2), 17 whether 99.55% (Table 3), 08 whether 99.92% (Table 4) and 31 whether 99.55% (Table 5) phytochemical compounds.

The major identifiable constituent is **limonene** for *Citrus* species used with different percentages (87.38% for *C. aurantium* essence, 86.29% for the essence of *C. sinensis*, 94.75% for the essence of *C.*

reticulata and 82.98% for the essence of *C. paradisi*). Moreover, minor compound in essence of *C. aurantium* has minor compounds: β -pinene (3.59%), α -pinene (1.47%) and Furrancarboxaldehyde (1.13%), and in traces: phellandene (0.31%) and Cyclohexane (0.7%). In addition to limonene, essence of *C. sinensis* is represented by β -pinene (2.33%), bicycloheptene (2.43%), aceticacid (2.94%), and in trace α -pinene (0.75%) and Octanol (0.16%). Moreover minor compounds essence of *C. reticulata* are represented by β – pinene (2.44%), 1-

Peak number	Retention time (min)	Chemical composition	Relative %	Reconnaissance level
1	1.870	Ethanol	0.61	90
2	17.937	α pinene	0.91	96
3	20.116	β -phellandrene	0.49	90
4	21.114	β -myrcene	2.66	86
5	23.443	Limonene	82.98	93
6	23.840	Octariene	0.38	96
7	24.898	Acide formique	0.20	91
8	26.103	Octadien-3-ol	0.19	72
9	29.905	Cyclohexane	0.10	72
10	30.315	Decanal	0.29	86
11	36.331	α -cubebene	0.53	96
12	36.723	1,6cyclododecadiene	0.42	95
13	37,804	Caryophyllene	1.25	99
14	38.945	Cycloundecatriene	0.17	98
15	39.111	Cycloheptasiloxane	0.08	90
16	39.741	1,6cyclododecadiene	0.31	96
17	40.863	Naphthalene	0.56	94
18	43.958	Sylane	0.19	55
19	48.139	Cyclononasiloxane	0.10	55
20	48.947	Naphthalenone	0.82	95
21	51.863	Cycloheptasiloxane	0.09	52
22	52.927	Acide n-hexadecanoique	0.88	98
23	55.267	Acide benzeneacetique	0.09	50
24	55.962	Acide 9,12octadecadienoique	0.09	99
25	56.674	Osthole	0.21	99
26	58.361	7 chloro-10-ethyl	0.17	46
27	58.741	2-naphthaldehyde	0.32	50
28	63.933	Cyclononasiloxane	0.16	52
29	65.263	Acide 1-2 benzenedicarboxylique	0.27	80
30	67.003	Acide benzenesulforique	0.22	56
31	67.538	2H-1-benzopyranone	2.07	46

Table 5: Components in percentage (%) of *C. paradisi* essence analyzed by GC/SM.

5 dimethyl 1-venyl (0.72 %), α -pinène (0.91 %), β -phéllandrene (0.61 %). Minor compounds of *C.paradisi* essence has β -myrcene (2.66%), 2H-1-benzopyranone (2.07 %) and in trace: α -pinène (0.31 %) and n-hexadecanoique acid (0.88 %).

3.2. Physical signs of toxicity

The administration of *Citrus* essences with route oral, intravenous and intraperitoneal at doses between 400 and 5000 mg/kg BW individually, caused in the first moments, an agitation which is characterized by frequent movement of the mice. These mice showed low locomotion. These displacements are followed of twisting the body. Then the animals snuggle in a corner and convulse periodically before to die lying on their stomachs.

According to the classification of (Diezi, 1989), when:

- LD50 <5 mg / kg: the substance is very toxic;

- 5 mg / kg <LD50 <500 mg / kg: the substance is toxic;

- 500 mg / kg <LD50 <5000 mg / kg: the substance is slightly toxic;

- LD50 > 5000 mg / kg: the substance is non-toxic.

The study of the acute toxicity by different oral, IV, PI showed a significantly anticipating the LD50 for:

Doses 4360, 2920, 3560 mg/Kg bw of the essence of *Citrus aurantium*;

Doses 4520, 3400, 3720 mg/Kg bw of the essence of *Citrus reticulata* ;

Doses 3080, 2600, 2600mg/Kg bw of the essence of *Citrus paradisi* ;

Doses 4040, 2760, 3560 mg/Kg bw of the essence

Species of plant	Lethal Dose for fifty percent LD ₅₀ (mg/kg)			
	<i>C. aurantium</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. paradisi</i>	<i>C. sinensis</i>
Oral	4360	4520	3080	4040
IV	2920	3400	2600	2760
IP	3560	3720	2600	3560

Table 6: The lethal dose for fifty percent (LD50) after different administrations of different concentrations of essences of Citrus species.

IV: Intravenous injection, IP: Intraperitoneal injection

of *Citrus sinensis*.

At these all doses, the essence of *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata*, *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* were found to be slightly toxic (Table 6).

4. Discussion

The results found through this experiment are in agreement with the study of Moufida and Marzouk (2003) which confirmed that limonene is the major compound in *Citrus* essential oil. Hence, it has been found through the chemical analysis of the *Citrus* composition that acyclic compounds like Nerol and Geraniol are absent in the essence of *C. aurantium* and *C. sinensis*. In fact, Gancel *and al.* (2005) reported that these two compounds are present only in the essential oil of *C. limonum*. Several studies (Moufida and Marzouk, 2003; Belletti *and al.*, 2004; Rehman *and al.*, 2004) have demonstrated that generally, essential oil of Citrus were constituents mainly of monoterpene compounds (97%), and other compounds such as: alcohol, aldehyde and esters were presents in weak amounts (1,8 et 2,2 %).

The composition of *Citrus* essences used was determined to be limonene, β -myrcene, α -pinene, and sabinene by chromatographic analysis. As the constituent analyses of the *Citrus* natural flavor complexes (NFCs) have demonstrated, the Aliphatic and alicyclic hydrocarbons. The major constituents from the Aliphatic and alicyclic hydrocarbons group found in *Citrus* NFCs include *d*-limonene, *p*-mentha-1,4-diene, α -pinene, β -pinene, β -myrcene, terpinolene and β -caryophyllene (Cohena *and al.*, 2018).

Evaluation of the percent mortality or LD50 of each variety shows that oral injection is very toxic compared to other routes and that Citrus *reticulata* oil is very toxic either by oral, IV and IP. Variations in LD50 depending on the route of administration and the species have already been reported by Lahlou and al. (2008).

The animals received doses of *Citrus* essences via oral, intravenous and intraperitoneal for 14 days,

results showed slightly toxic. The use of essential oils extracted from lemon, either by hydrodistillation or by cold expression, does not present any risk of toxicity, neither acute nor chronic (Robert and Lobstein, 2005). The toxicity of essential oils depends on their composition, itself variable in depending on the plant species, which may vary depending on the nature of the soil where it grows (chemotype). Other factors are also responsible for the degree of toxicity of EOs such that, the route of administration (oral, cutaneous or air) and the physiological state of the exposed person (penetration and toxicity are maximized when the skin is damaged) (Vigan, 2010). The difference in variation of the LD50 of the different varieties of essences is due to the differences which exist between the chemical structure of the substances. These differences can affect the ability of substances to interfere with the way the body works. In addition, the physico-chemical characteristics, for example the size of the dust, the volatility and the solubility in water, are also involved in the toxic response (Lapointe, 2004).

5. Conclusion

Essences extract prepared from 4 varieties of *Citrus* by the cold pressing confirm presence of aliphatic and alicyclic hydrocarbons group. Establishment of acute oral, intravenous and intraperitoneal toxicities check conducted as per the regulations of OECD showed that the uniform and stable behavior and response of animals throughout the experimentation of two weeks offered the safe and harmless in animals upto dose of even up to 2000 mg/kg.

References

- Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C, Guerzoni ME, Lanciotti R (2004) Evaluation of the antimicrobial activity of *Citrus* essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (23):6932–6938.
- Burnett C (2016) Safety Assessment of *Citrus* Peel-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review* 26.
- Cohena Samuel M, Eisenbrand Gerhard, Fukushima Shoji, Good-

- erhamd Nigel J, Guengeriche Peter F, Hecht Stephen S, Rietjens Ivonne MCM, Davidsen Jeanne M, Harmanh Christie L, Taylori Sean V (2018) Updated procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food. *Food and Chemical Toxicology* 113:171–178.
- Cohen Samuel M, Eisenbrand Gerhard, Fukushima Shoji, Gooderham Nigel J, Guengeriche Peter F, Hecht Stephen S, Rietjens Ivonne MCM, Bastakih Maria, Davidsen Jeanne M, Harmanh Christie L, McGowen Margaret, Taylori Sean V (2019) FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Citrus-derived flavoring ingredients. *Food and Chemical Toxicology* 124 : 192–218.
- Diezi J (1989) *Toxicologie : principes de base et répercussions cliniques*. In: *Pharmacologie: des principes fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Ed Slatkine, Genève., 33–44.
- Gancel AL, Ollitrauet P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F (2005) Leaf volatile compounds of six *Citrus* somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange and grape fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2224 – 2230.
- Gosh MN (1984) *Fundamentals of Experimental Pharmacology*, 2nd ed. Scientific Book Agency, Calcutta.
- Jabri-Karoui I & Marzouk B (2013) Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium L.*) Peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International* ; 1-12.
- Jwanny EW, El-Sayed ST, Salem AM, Mabrouk NA and Shehata AN (2012) Fractionation, identification and biological activities of Egyptian citrus peel extracts. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* .6:34–40.
- Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian A and Jaafar HZE (2012) Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules* 17:1203–1218.
- Lahlou S, Israili Z, Lyoussi B (2008) Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 117: 221-227.
- Lapointe G (2004) *Notions de Toxicologie*. Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, Québec. 67.
- Moufida S et Marzouk B (2003) Biochemical characterisation of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.
- Miller LC and Tainter MC (1944) Estimation of LD50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* ., 57: 261-264.
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H (2006) Flavonoid composition of fruit tissues of *citrus* species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* ., 70: 178–192.
- OECD (2001) Test Guideline 420. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Parry S-A. and al., (2012). *Rutagraveolens: from Traditional System of Medicine to Modern Pharmacology: an Overview- PharmTech Res.* 2(2).
- Parasuraman S (2011) Toxicological screening, *J Pharmacol Pharmacother.* Apr-Jun; 2(2): 74–79.
- Rehman SU, Hussin S, Nawaz H (2007) Inhibitory effect of *Citrus* peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistanian Journal of Nutrition* 558 – 561.
- Robert A et Lobstein A (2005) *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 522.
- Saonere Suryawanshi JA (2011) *African Journal of Plant Science and Biotechnology* . 7 390.
- Soro Tianga Yaya, Mian Jean Claude, Coulibaly Sirabana, Nene-Bi Semi Anthelme, Traore Flavien (2016) Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Daniellia oliveri* (Fabaceae). *IAIM* 3(2), 1-9.
- Vigan, Martine. *Essential oils: renewal of interest and toxicity*. (2010). *Eur J Dermatol.* 20(6):685-92.



ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR). SAJEB is a member of CrossRef.

ANNEXE 01

1. Matériel animal

1.1.Réactifs chimiques :

- KOH 0.1 mol/l.
- Ethanol absolue, éthanol 95°.
- Eau physiologique (0.9%).
- Eau oxygéné.
- Alcool, eau distillé.
- Carragénine (la préparation de la solution de la carragénine (1%) a été faite par une dilution de 50mg de la carragénine dans 5ml d'eau physiologique).

1.2.Appareillage :

- Bain marie.
- Pied de coulisse.
- Balance de précision.
- Réfrigérateur.
- Canule pour gavage de 2ml.

2. Matériel d'étude de l'activité antibactérienne

2.1.Réactifs chimiques :

- KOH 0.1 mol/l.
- Ethanol absolue, éthanol 95°.
- Phénolphtaléine.
- Eau physiologique (0.9%).
- Eau oxygéné.
- Alcool, eau distillé.
- Réactifs (TDA, VP₁, VP₂).
- Violet de gentiane, lugol, Fushine.
- Kovacs.
- Huile d'immersion, huile de paraffine.
- DMSO

2.2.Appareillage :

- Microscope optique.
- Bain marie.
- Pied de coulisse.
- Balance de précision.
- Etuve.
- Un distributeur d'antibiotiques.
- Réfrigérateur

3. Matériel d'étude physico-chimique:

3.1.Réactifs chimiques :

- KOH 0.1 mol/l.
- Ethanol absolue, éthanol 95°.

- Phénolphtaléine.
- Eau physiologique (0.9%).
- Eau oxygéné.

3.2.Appareillage :

- Bain marie.
- Réfractomètre.
- Pycnomètre.
- Balance de précision.
- Polarimètre.
- Pipette graduée
- Burette



Figure 41: Photo de d'un réfractomètre



Figure 42: Photo de polarimètre

4. Matériel d'étude de l'activité antioxydant :

4.1.Réactifs chimiques ;

- Méthanol absolue, éthanol 95°.
- Alcool, eau distillé.
- Hexane.
- Chloroforme.
- Acétone.
- DPPH

4.2.Appareillage :

- Sèche cheveux.
- Tubes à essai.
- Spectrophotomètre.
- Plaques pour CCM.
- Cuve en verre pour la CCM.

ANNEXE 02

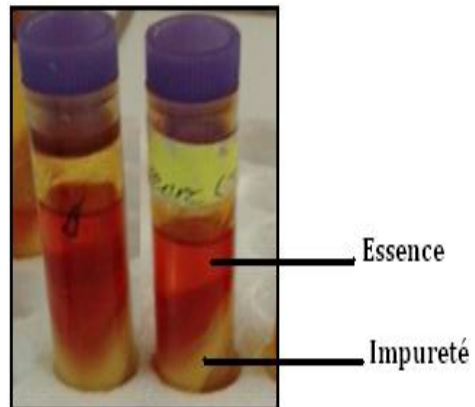


Figure 43: Séparation de l'essence après décantation et centrifugation



Figure 44: Essences obtenues par expression à froid.

1. *Citrus sinensis*.
2. *Citrus paradisi*.
3. *Citrus aurantium*
4. *Citrus reticulata*

ANNEXE 03

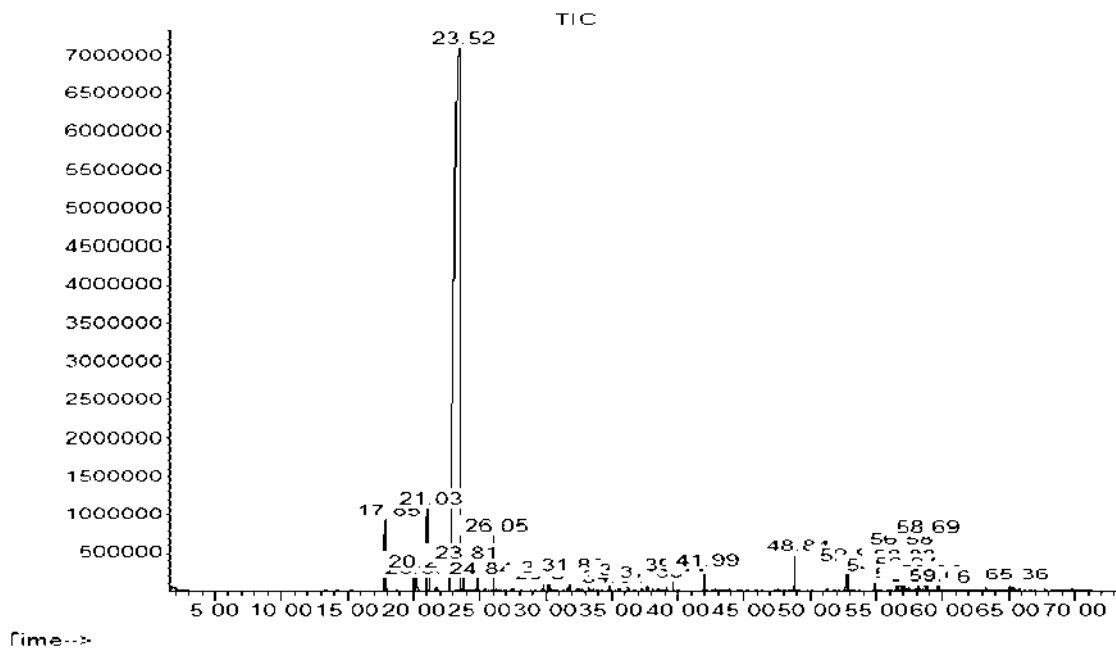


Figure 45: Le chromatogramme GC / MS de *C. aurantium*

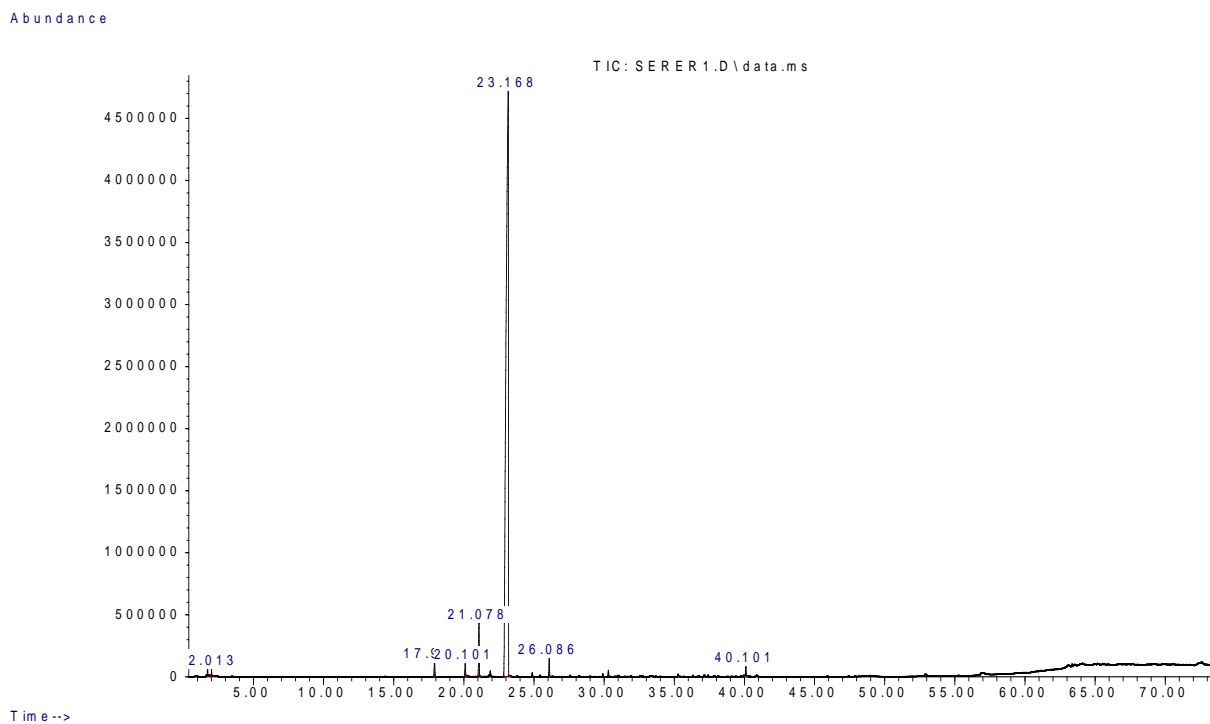


Figure 46: Le chromatogramme GC / MS de *C. sinensis*

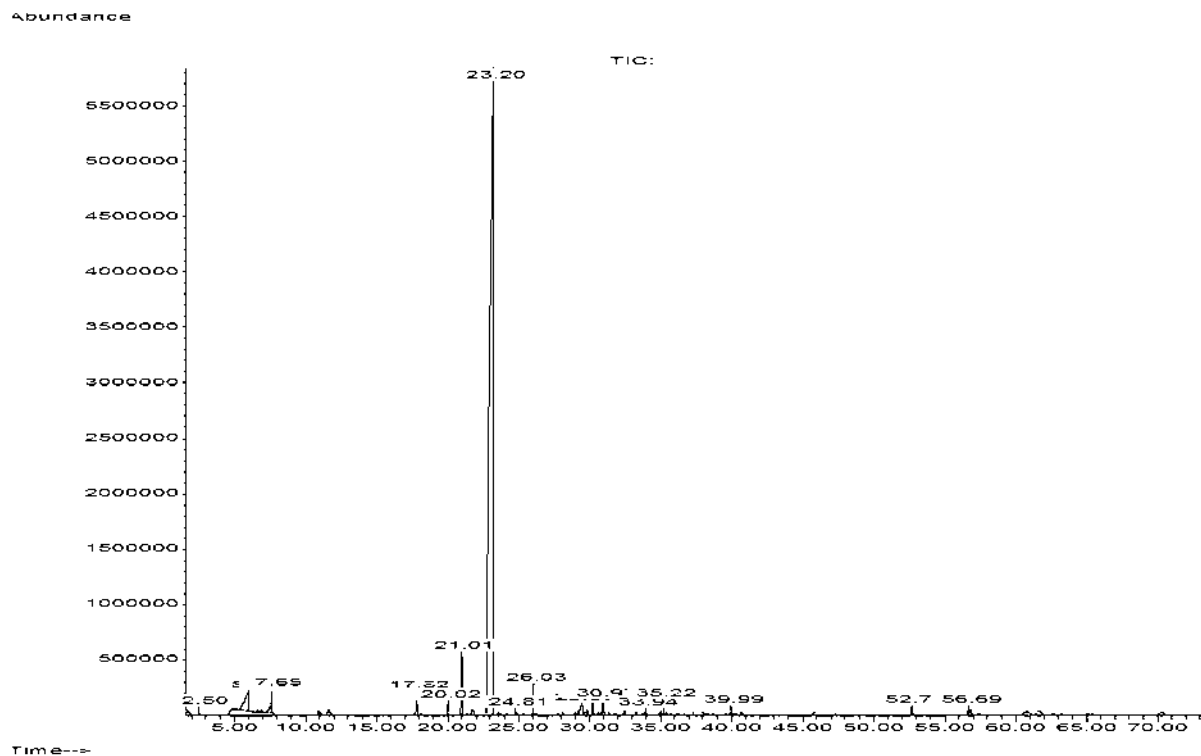


Figure 47: Le chromatogramme GC / MS de *C. reticulata*

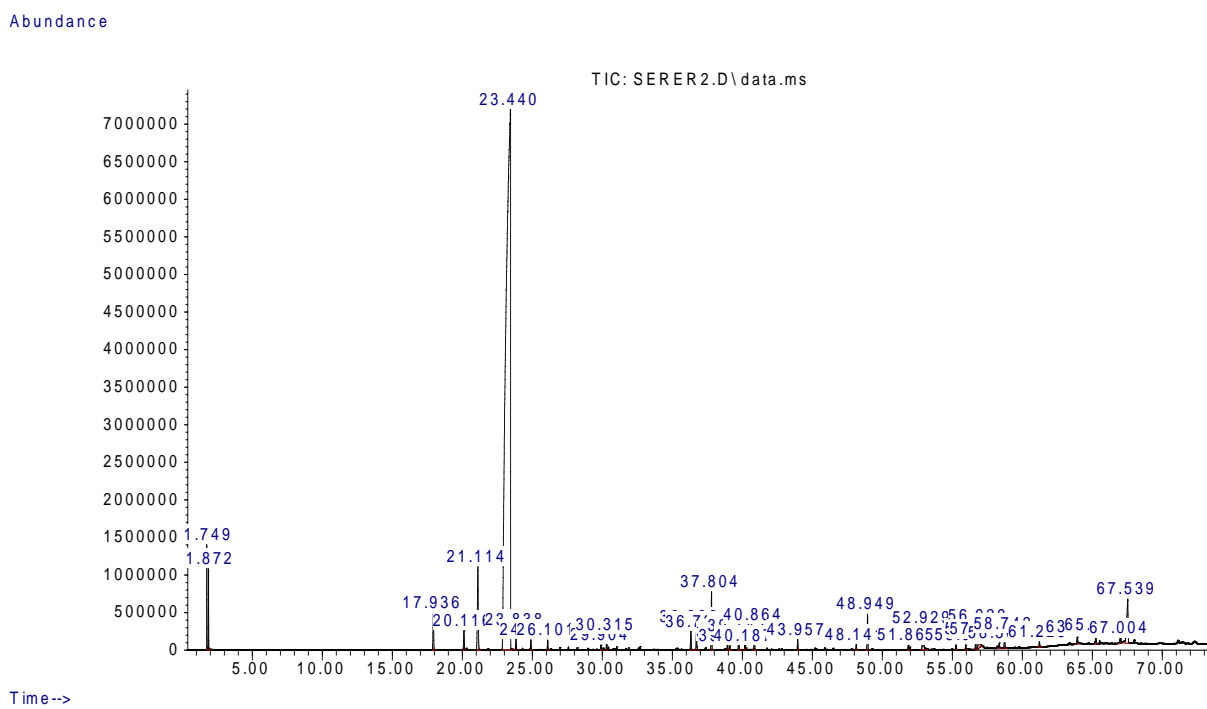


Figure 48: Le chromatogramme GC / MS de *C. paradisi*

ANNEXE 04

Tableau 25: Trois répétitions de l'activité antioxydante par le test de DPPH.

	IC50			MOYENNE	ECARTYPE
	ESSAI 01	ESSAI 02	ESSAI 03		
<i>C. reticulata</i>	1,90	2,16	1,65	1,90	0,26
<i>C. aurantium</i>	6,01	6,33	6,26	6,20	0,17
<i>C. paradisi</i>	12,79	13,15	12,35	12,76	0,40
<i>C. sinensis</i>	19,37	18,80	19,29	19,15	0,31
Quercetine	15,86	16,70	15,41	15,99	0,65
BHA	22,27	21,78	21,92	21,99	0,25

Tableau 26: Trois répétitions de l'activité antioxydante par le test d'ARP.


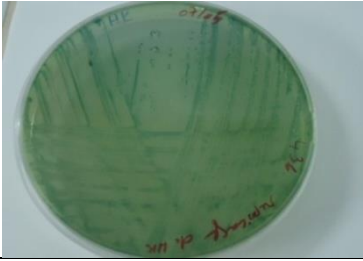


	ARP			MOYENNE	ECARTYPE
	ESSAI 01	ESSAI 02	ESSAI 03		
<i>C. reticulata</i>	0,52	0,45	0,60	0,52	0,08
<i>C. aurantium</i>	0,17	0,16	0,16	0,16	0,01
<i>C. paradisi</i>	0,07	0,08	0,07	0,07	0,01
<i>C. sinensis</i>	0,05	0,05	0,06	0,05	0,01
Quercetine	0,06	0,06	0,06	0,06	0,00
BHA	0,05	0,04	0,04	0,04	0,01

Tableau 27: Le test d'ANOVA pour des données répétées

Time	Comparaison	Différence	p.adj	p.adj.signif
T1	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	5,46	2.16e-06	****
T1	Temoin_/ <i>C. paradisi</i>	0,99	0.3	ns
T1	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	3,27	0.000188	***
T1	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	0,99	0.247	ns
T2	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	2,55	1.8e-05	****
T2	Temoin_pos VS. <i>C. paradisi</i>	-2,53	0.00018	***
T2	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	0,63	0.024	*
T2	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	-2,53	8,00E-05	****
T3	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	1,48	0.019	*
T3	Temoin_/ <i>C. paradisi</i>	2,38	0.000306	***
T3	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	-4,84	2.97e-07	****
T3	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	2,38	0.000234	***
T4	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	2,47	0.00042	***
T4	Temoin_/ <i>C. paradisi</i>	1,84	0.000712	***
T4	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	-5,50	1.4e-07	****
T4	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	1,84	0.000608	***
T5	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	4,29	3.6e-07	****
T5	Temoin_/ <i>C. paradisi</i>	1,77	0.000261	***
T5	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	-7,44	6.76e-10	****
T5	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	1,77	0.001	**
T6	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	1,51	2.54e-05	****
T6	Temoin_/ <i>C. paradisi</i>	0,28	0.768	ns
T6	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	-11,97	3.98e-13	****
T6	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	0,29	0.812	ns
T7	Temoin_/ <i>C. aurantium</i>	0,63	0.000516	***
T7	Temoin_/ <i>C. paradisi</i>	0,63	0.000516	***
T7	Temoin_/ <i>C. reticulata</i>	-9,05	2.36e-11	****
T7	Temoin_/ <i>C. sinensis</i>	0,63	0.000516	***

* : $P < 0,05$. ** : $P < 0,01$. *** : $P < 0,001$. ns: non significative.

ANNEXE 05

	
<i>Serratia sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
	
<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<p>Figure 49: Aspect des colonies des souches étudiées sur géloses sélectives</p>	

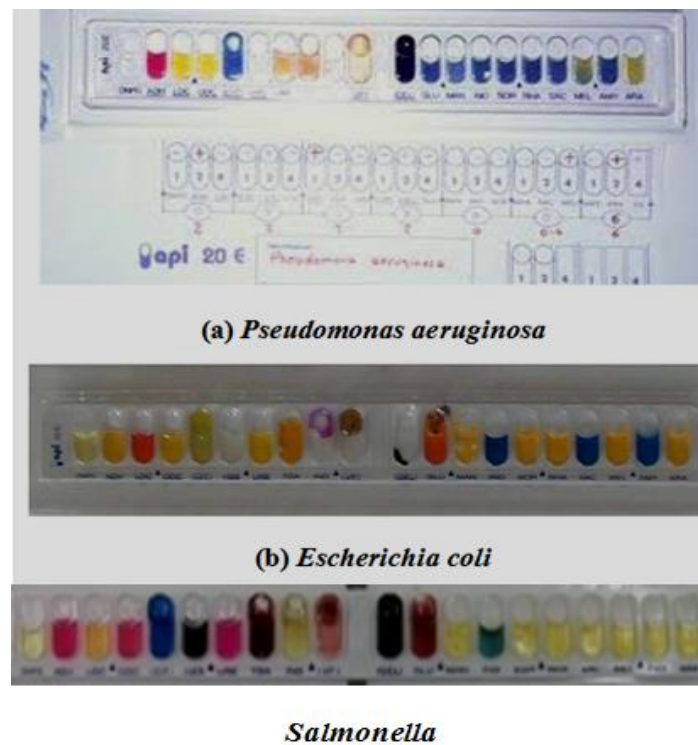


Figure 50 : Illustration des résultats de l'identification des souches par Api 20E.

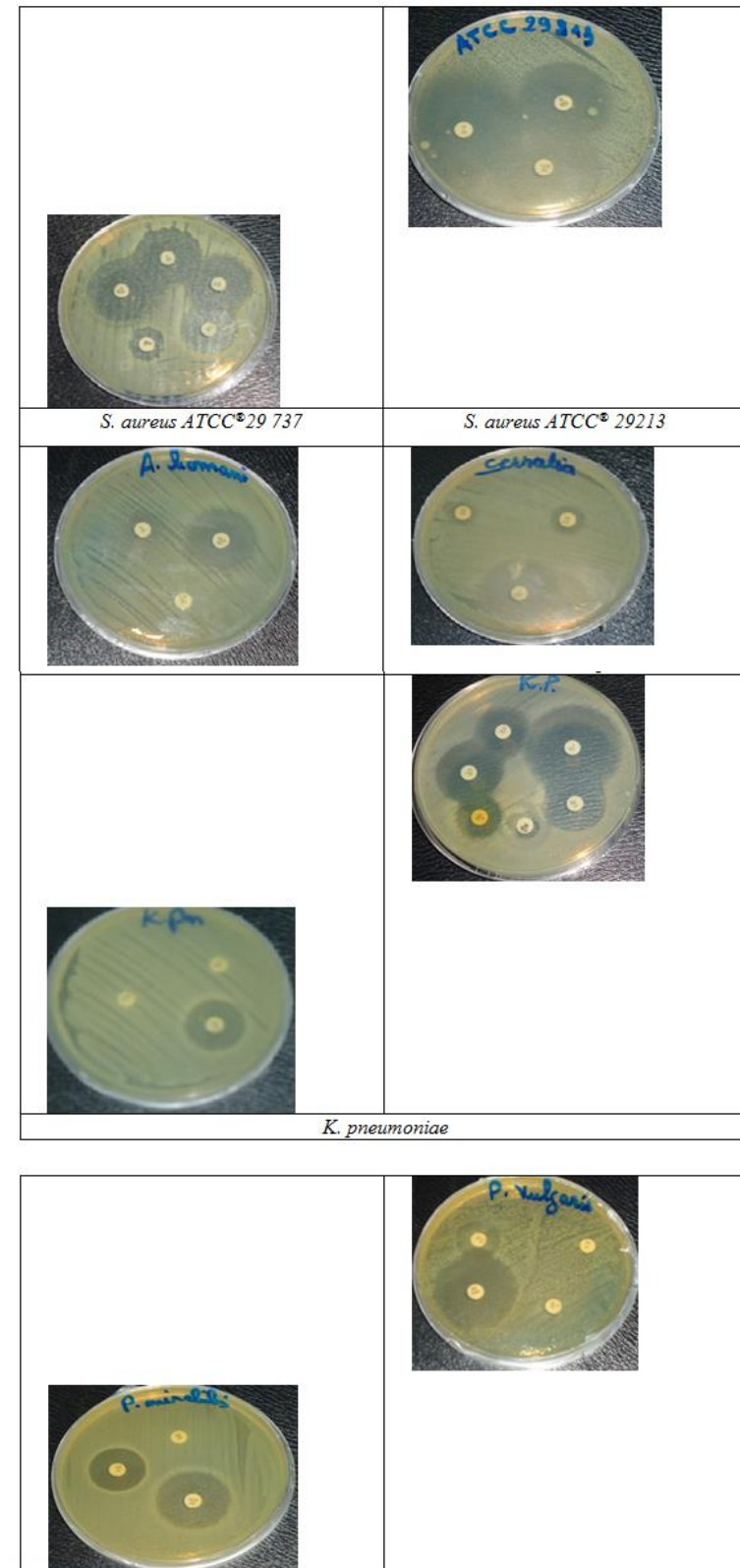


Figure 51: Les résultats de l'antibiogramme des souches étudiées (1)

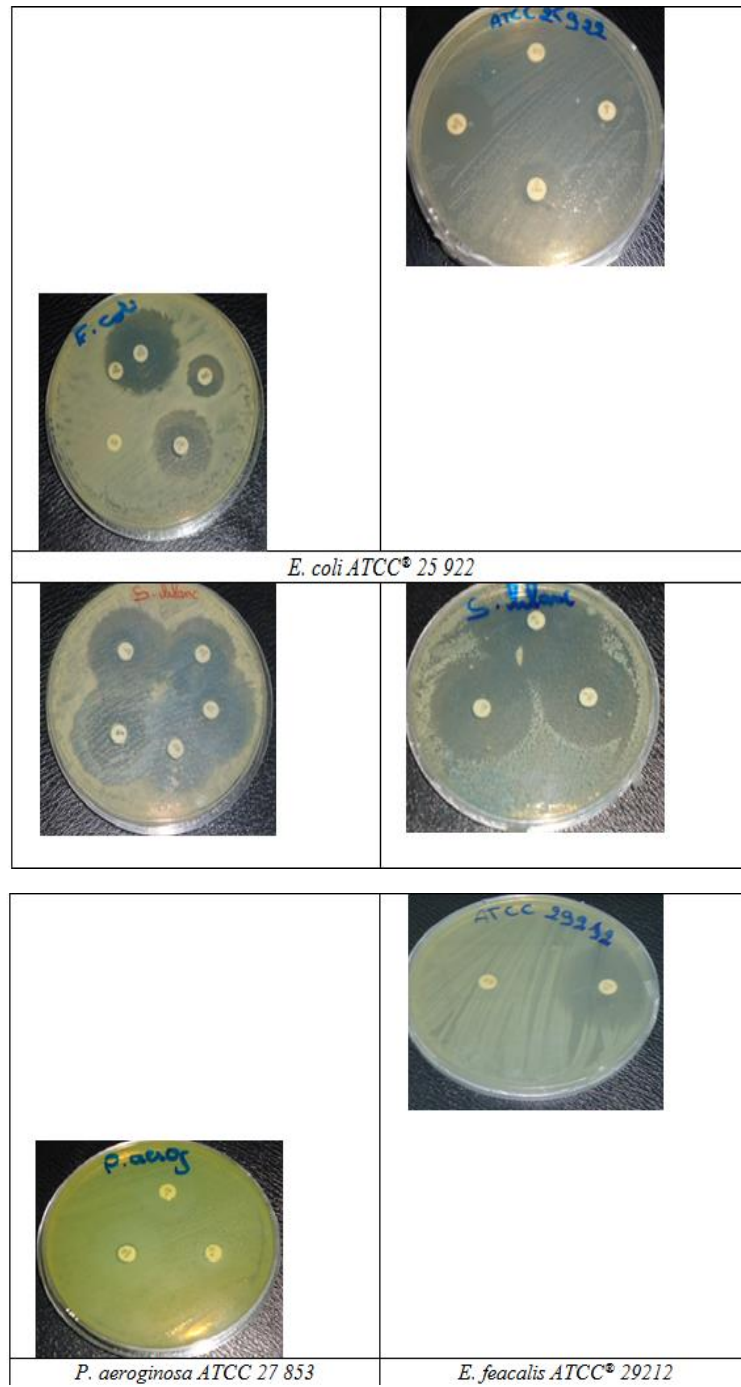


Figure 52: Les résultats de l'antibiogramme des souches étudiées (2)

Tableau 28: Diamètres des zones d'inhibitions de *C. paradisi* sur les bactéries pathogènes

Souches pathogènes	<i>C. paradisi</i>				
	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	MOYENNE	ECARTYPE
<i>S. aureus</i> ATCC®29 213	23	21,4	21,6	22,00	0,87
<i>S. aureus</i> ATCC®25 923	20,4	18,2	18,4	19,00	1,22
<i>S. aureus</i> ATCC®43 300	19,2	18,2	19,6	19,00	0,72
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 737	6,58	6,1	5,33	6,00	0,63
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12 228	5,48	7,1	5,43	6,00	0,95
<i>E. coli</i> ATCC®25 922	17,27	17,12	16,6	17,00	0,35
<i>E. faecalis</i> ATCC®29 212	6,48	6,2	5,32	6,00	0,61
<i>P. aeruginosa</i> ATCC®27 853	7,48	5,1	5,43	6,00	1,29
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6 633	6,58	6,18	5,23	6,00	0,69
<i>S. epidermidis</i>	18,37	16,02	16,6	17,00	1,22
<i>P. mirabilis</i>	10,78	11,87	10,35	11,00	0,78
<i>P. vulgaris</i>	23,55	24	24,45	24,00	0,45
<i>K. pneumoniae</i>	5,58	7,1	5,33	6,00	0,96
<i>A. baumannii</i>	8,55	7,45	8	8,00	0,55
<i>Streptococcus</i> sp.	22,16	22,85	24	23,00	0,93
<i>Serratia</i> sp.	15,76	16	16,25	16,00	0,25
<i>Salmonella</i> sp.	7,58	5,18	5,23	6,00	1,37

Tableau 29: Diamètres des zones d'inhibitions de *C. reticulata* sur les bactéries pathogènes

Souches pathogènes	<i>C. reticulata</i>				
	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	MOYENNE	ECARTYPE
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 213	13,99	12,53	15,49	14,00	1,48
<i>S. aureus</i> ATCC® 25 923	23	21	19	21,00	2,00
<i>S. aureus</i> ATCC® 43 300	6,58	6,18	5,23	6,00	0,69
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 737	19	17	18	18,00	1,00
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12 228	7,65	9,43	6,92	8,00	1,29
<i>E. coli</i> ATCC® 25 922	13,7	14,52	13,78	14,00	0,45
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29 212	15	13,78	13,22	14,00	0,91
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27 853	8,55	7,45	8	8,00	0,55
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6 633	15,76	16	16,25	16,00	0,25
<i>S. epidermidis</i>	22	21,1	19,9	21,00	1,05
<i>P. mirabilis</i>	14,99	12,53	14,49	14,00	1,30
<i>P. vulgaris</i>	23	21,4	21,6	22,00	0,87
<i>K. pneumoniae</i>	5,58	7,1	5,33	6,00	0,96
<i>A. baumannii</i>	8,55	7,45	8	8,00	0,55
<i>Streptococcus</i> sp.	11,06	12,05	9,9	11,00	1,08
<i>Serratia</i> sp.	10,76	12	13,25	12,00	1,25
<i>Salmonella</i> sp.	7,58	5,18	5,23	6,00	1,37

Tableau 30: Diamètres des zones d'inhibitions de *C. aurantium* sur les bactéries pathogènes

Souches pathogènes	<i>C. aurantium</i>				
	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	MOYENNE	ECARTYPE
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 213	15,99	15,53	16,49	16,00	0,48
<i>S. aureus</i> ATCC® 25 923	23,44	21,89	20,67	22,00	1,39
<i>S. aureus</i> ATCC® 43 300	17,58	17,18	16,23	17,00	0,69
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 737	18,5	19,2	19,3	19,00	0,44
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12 228	13,7	14,52	13,78	14,00	0,45
<i>E. coli</i> ATCC® 25 922	6,5	5,42	6,08	6,00	0,54
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29 212	5	6,9	6,11	6,00	0,95
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27 853	5,15	6,25	6,6	6,00	0,76
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6 633	23	21,4	21,6	22,00	0,87
<i>S. epidermidis</i>	26,7	26,1	28,2	27,00	1,08
<i>P. mirabilis</i>	7,48	5,1	5,43	6,00	1,29
<i>P. vulgaris</i>	6,58	6,18	5,23	6,00	0,69
<i>K. pneumoniae</i>	5,58	7,1	5,33	6,00	0,96
<i>A. baumannii</i>	6,16	6,49	5,34	6,00	0,59
<i>Streptococcus</i> sp.	5,5	7,36	5,14	6,00	1,19
<i>Serratia</i> sp.	7	5,53	5,46	6,00	0,87
<i>Salmonella</i> sp.	7,58	5,18	5,23	6,00	1,37

Tableau 31: Diamètres des zones d'inhibitions de *C. sinensis* sur les bactéries pathogènes

Souches pathogènes	<i>C. sinensis</i>				
	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	Diamètre des Halos (mm)	MOYENNE	ECARTYPE
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 213	22,95	24,68	24,37	24,00	0,92
<i>S. aureus</i> ATCC® 25 923	23,85	24	24,15	24,00	0,15
<i>S. aureus</i> ATCC® 43 300	17,87	15,92	17,2	17,00	0,99
<i>S. aureus</i> ATCC® 29 737	19	17	18	18,00	1,00
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12 228	13,7	14,52	13,78	14,00	0,45
<i>E. coli</i> ATCC® 25 922	5,58	7,1	5,33	6,00	0,96
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29 212	6,58	6,1	5,33	6,00	0,63
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27 853	7,48	5,1	5,43	6,00	1,29
<i>B. subtilis</i> ATCC® 6 633	16,12	17,92	16,95	17,00	0,90
<i>S. epidermidis</i>	33,76	31,9	30,35	32,00	1,71
<i>P. mirabilis</i>	13	11,1	11,9	12,00	0,95
<i>P. vulgaris</i>	11	10	9	10,00	1,00
<i>K. pneumoniae</i>	7,48	5,1	5,43	6,00	1,29
<i>A. baumannii</i>	5,58	7,1	5,33	6,00	0,96
<i>Streptococcus</i> sp.	10,06	8,05	8,9	9,00	1,01
<i>Serratia</i> sp.	14,99	12,53	14,49	14,00	1,30
<i>Salmonella</i> sp.	7,58	5,18	5,23	6,00	1,37

ANNEXE 06

Tableau 32: Le taux de mortalité après injection par différentes voies à différentes concentrations des essences de différentes variétés de *Citrus*

Voie d'administration	Concentration administrée (%)	Concentration administrée (mg/kg)	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Citrus paradisi</i>	<i>Citrus sinensis</i>
Intraveineuse	8%	400	00	00	03	00
	16%	800	03	03	05	05
	32%	1600	05	03	05	06
	64%	3200	08	07	10	08
	100%	5000	10	07	10	10
Intrapéritonia	8%	400	00	00	00	00
	16%	800	01	00	05	02
	32%	1600	04	03	05	03
	64%	3200	05	05	10	06
	100%	5000	05	05	10	07
Orale	8%	400	00	00	00	00
	16%	800	00	00	03	00
	32%	1600	01	0	05	03
	64%	3200	03	03	07	03
	100%	5000	03	04	09	04