



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire des « Produits Naturels » (LAPRONA)
Laboratoire : Antibiotiques, antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité
Biologique

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

M^{elle} Boutaayachet Asme & M^{elle} Zazzoua Aicha
Thème

**Contribution à l'étude des rendements et des activités
biologiques des huiles essentielles des zestes du *Citrus
reticulata* (Mandarine) et du *Citrus sinensis* (Orange)**

Soutenu le : 03 / 07 / 2022

Devant le jury composé de :

Président :

M. Azzi R. Professeur Université de Tlemcen

Examineur :

M^{elle} Benariba N. Maître de Conférences « A » Université de Tlemcen

Encadreur :

M^{me} BEKHECHI C. Professeur Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

REMERCIEMENTS

Nous remercions Dieu, le Tout-Puissant, le Sublime de la Vérité, de nous avoir accordé la force et la patience afin de pouvoir réaliser ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements, du fond du cœur, à notre encadreur **M^{me} BEKHECHI Chahrazed**, Professeur à l'université de Tlemcen pour sa gentillesse, sa disponibilité, son soutien, sa confiance, sa patience et ses bons conseils. Qu'elle trouve ici le témoignage de notre respect le plus profond et notre sincère gratitude. Nous prions Dieu, le tout puissant de la protéger.

Nous exprimons nos vifs remerciements à **M^r AZZI Rachid**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'il nous apporte en présidant ce jury.

Nos remerciements s'adressent aussi à notre responsable de spécialité, **M^{lle} BENARIBA Nabila**, Maître de Conférences « A », à l'Université de Tlemcen, d'avoir acceptée d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier également **M^r MALTI Charaf Eddine Watheq**, Maître assistant à l'université de Relizane pour son aide, ses conseils et sa disponibilité au laboratoire durant tout le long de ce travail.

Nous remercions également les propriétaires des vergers **M^r HOUTI Naserdine et M^r Hadeif Ahemed** pour leur aide, pour avoir acceptés de faire la récolte des deux espèces d'agrumes dans leurs vergers.

Enfin, nos remerciements vont aussi à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

***Mes parents** qui n'ont accompagné dans les moments les plus difficiles de ma vie. Pour leur éducation, leur amour et leurs efforts pour faire de moi la personne dont je suis aujourd'hui.*

*À mon amour, ma sœur **Soumicha***

*À mon cher frère, **Ibrahim***

À mon précieuse grand-mère, mes tantes, mes oncles

*À mes petits cousins, **Moussaab, Abd Rahmane et Ahmed***

*À mes cousines **Fatima, Ikram, Imene et mérieme***

*À mon aimé d'enfance **Zahra***

*À ma collègue **Aicha***

*À la famille **Boutaayachet et Saadallah***

Asme

Dédicaces

C'est avec ma profonde gratitude et mes sincères mots

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère

A mes chers parents, source de ma vie, d'amour et d'affection "Abdrahime" et "Salima" qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'étude (2005 à 2022), que Dieu vous protège

*A mes chères sœurs **NIHADE** ; **IMANE** et **FAYZA** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*A ma petite nièce **Meriem***

A ma grand-mère, mes chères tantes & mes cousins, pour leur motivation

*A ma chère binôme **Asma** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.*

Et tous mes chers amis (es) sans aucune exception, Qui m'ont toujours encouragé et je leur souhaite plus de succès.

*A vous cher **lecteur***

Aicha

Nous nous sommes intéressés à la valorisation de deux espèces appartenant à la famille des Rutacées, à savoir : *Citrus reticulata* (mandarine) et *Citrus sinensis* (orange douceâtre) récoltés dans deux stations de région de Tlemcen : Aïn El Hout et Hennaya. L'objectif de cette étude est de déterminer les rendements et les activités biologiques (antioxydante et antifongique) des huiles essentielles.

Nous avons prélevé 20 échantillons sur des pieds individuels pour chaque espèce végétale, soit 10 échantillons par station d'étude. L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par simple hydrodistillation et par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger. Les rendements sont très variables, allant de 0,05 à 0,34% pour *C. reticulata* et allant de 0,15 à 0,68% pour *C. sinensis*. Cependant, les moyennes des teneurs sont comparables entre les deux vergers (Aïn El Hout et Hennaya) pour les deux espèces : 0,16 et 0,18% pour *C. reticulata* 0,36 et 0,43% pour *C. sinensis*, respectivement.

Ensuite, nous avons regroupé l'huile essentielle des différents échantillons, pour avoir suffisamment d'huile essentielle et pouvoir effectuer les activités biologiques. Ainsi, nous avons constitué les échantillons « communelle » suivants : E1 (*C. reticulata* : verger 1 et 2) ; E2 (*C. sinensis* : verger 1, HS) ; E3 (*C. sinensis* : verger 1, HC) ; E4 (*C. sinensis* : verger 2, HS) ; E5 (*C. sinensis* : verger 2, HC) ; ES2 (*C. sinensis* : verger 1, HS et HC) ; ES3 (*C. sinensis* : verger 2, HS et HC).

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'activité antioxydante et antifongique des huiles essentielles des deux espèces. L'huile essentielle de *C. sinensis* E2 présente la plus importante activité antioxydante, avec une CI_{50} de l'ordre de $12,81 \pm 0,09$ mg/ml. Cependant, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé : acide ascorbique, $CI_{50} = 0,02 \pm 0,001$ mg/ml. En revanche, l'échantillon E1 (*C. reticulata*), s'est montré le moins actif, avec une CI_{50} la plus importante, de l'ordre de $38,04 \pm 4,11$ mg/ml. Enfin, le pouvoir antifongique de trois échantillons (E1, ES1 et ES2) a été évalué par 2 méthodes : méthode de diffusion sur disque et la méthode de contact directe, vis-à-vis 3 souches filamenteuses : *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* et *A. flavus*. Nous avons obtenu une activité modérée des échantillons (ES1 et ES2) de *C. sinensis*, vis-à-vis d'*A. fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition de l'ordre de 14,3 et 15,0 mm, respectivement et des CMI de l'ordre de 6 μ l/ml. Par contre, *F. oxysporum* s'est montré sensible à l'échantillon E1 à la même concentration minimale inhibitrice. Cependant, cette sensibilité reste faible.

Mots clés : *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, Huile essentielle, Activité antioxydante, DPPH, CI_{50} , Pouvoir antifongique, Aromatogramme, CMI.

We were interested in the valuation of two species belonging to the Rutaceae family, named : *Citrus reticulata* (mandarin) and *Citrus sinensis* (sweet orange) collected in two stations in the Tlemcen region: Aïn El Hout and Hennaya. The objective of this study is to determine the yields and biological activities (antioxidant and antifungal) of essential oils.

We took 20 samples from individual plants for each plant species, 10 samples per study station.

The extraction of essential oils was carried out by simple hydrodistillation and by hydrodistillation with a Clevenger type apparatus.

Yields are highly variable, ranging from 0.05 to 0.34% for *C. reticulata* and ranging from 0.15 to 0.68% for *C. sinensis*. Nevertheless, the average levels are comparable between the two stations (Aïn El Hout and Hennaya) for the two species: 0.16 and 0.18% for *C. reticulata* 0.36 and 0.43% for *C. sinensis*, respectively.

Then, we grouped the essential oil of the different samples, to have enough essential oil and to be able to carry out the biological activities.

Consequently, we constituted the following “communal” samples: E1 (*C. reticulata*: orchard 1 and 2); E2 (*C. sinensis*: orchard 1, HS); E3 (*C. sinensis*: orchard 1, HC); E4 (*C. sinensis*: orchard 2, HS); E5 (*C. sinensis*: orchard 2, HC); ES2 (*C. sinensis*: orchard 1, HS and HC); ES3 (*C. sinensis*: orchard 2, HS and HC).

The second part was devoted to the study of the antioxidant and antifungal activity of the essential oils of the two species. The essential oil of *C. sinensis* E2 has the highest antioxidant activity, with an IC₅₀ of the order of 12.81 ± 0.09 mg/ml. However, this activity remains low compared to the reference antioxidant used: ascorbic acid, IC₅₀=0.02 ± 0.001 mg/ml. On the other hand, the E1 sample (*C. reticulata*), was shown to be the least active, with the highest IC₅₀, of the order of 38.04 ± 4.11 mg/ml.

Finally, the antifungal power of three samples (E1, ES1 and ES2) was evaluated by 2 methods: disc diffusion method and the direct contact method, against 3 filamentous strains: *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*. We obtained a moderate activity of the samples (ES1 and ES2) of *C. sinensis*, against *A. fumigatus*, with diameters of the zones of inhibition in the order of 14.3 and 15.0 mm, respectively, and MICs in the order of 6 µl/ml. On the other hand, *F. oxysporum* was shown to be sensitive to the E1 sample at the same minimum inhibitory concentration. However, this sensitivity remains low.

Keywords: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, Essential oil, Antioxidant activity, DPPH, IC₅₀, Antifungal power, Aromatogram, MIC.

الملخص

نحن مهتمون بتقييم نوعين ينتمون إلى عائلة حمضيات، وهما *Citrus reticulata* (الماندرين) و *Citrus sinensis* (البرتقال) التي تم جمعها من محطتين في منطقة تلمسان: عين الحوت وحنايا. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد المحاصيل والأنشطة البيولوجية (مضادات الأكسدة ومضادات الفطريات) للزيوت الأساسية.

أخذنا 20 عينة على أقدم فردية لكل نوع نباتي، أي 10 عينات لكل محطة دراسة. تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير المائي البسيط وعن طريق التقطير المائي بجهاز من نوع كليفنجر. المرود متغير للغاية، حيث تتراوح من 0.05 إلى 0.34% لـ *C. reticulata* ومن 0.15 إلى 0.68% لـ *C. sinensis*. ومع ذلك، فإن الدرجات المتوسطة قابلة للمقارنة بين البساتين (عين الحوت وحنايا) لكلا النوعين: من 0.16% إلى 0.18% لـ *C. reticulata* و 0.36% إلى 0.43% لـ *C. sinensis*، على التوالي.

ثم قمنا بتجميع الزيت الأساسي لعينات مختلفة، للحصول على ما يكفي من الزيت الأساسي والقدرة على تنفيذ الأنشطة البيولوجية. وهكذا قمنا بتجميع العينات «المشتركة» التالية:

E1 (*C. reticulata* : البستان 1 et 2) ; E2 (*C. sinensis* : البستان 1, HS) ; E3 (*C. sinensis* : البستان 1, HC) ; E4 (*C. sinensis* : البستان 2, HS) ; E5 (*C. sinensis* : البستان 2, HC) ; ES2 (*C. sinensis* : البستان 1, HS et HC) ; ES3 (*C. sinensis* : البستان 2, HS et HC).

خصص الجزء الثاني لدراسة النشاط المضاد للأكسدة والفطريات للزيوت الأساسية لكلا النوعين. يحتوي الزيت العطري لـ *C. sinensis* E2 على أهم نشاط مضاد للأكسدة، مع IC_{50} في حدود 0.09 ± 12.81 ملغم/مل. ومع ذلك، لا يزال هذا النشاط منخفضًا مقارنة بمضادات الأكسدة المرجعية المستخدمة: حمض الأسكوربيك، $IC_{50} = 0.02 \pm 0.001$ ملغم/مل. في المقابل، كانت (*Citrus reticulata*) E1 هي الأقل نشاطًا، مع أعلى مؤشر IC_{50} ، في حدود 38.04 ± 4.11 ملغم/مل. أخيرًا، تم تقييم القوة المضادة للفطريات لثلاث عينات (E1 و E2 و ES2) بطريقتين: طريقة انتشار القرص وطريقة الاتصال المباشر، ضد ثلاث سلالات خيطية: *Aspergillus* و *Fusarium oxysporum* و *A. flavus* و *fumigatus*. فتحصلنا على نشاط معتدل للعينات (E2 و E1) من *C. sinensis*، مقابل *A. fumigatus* مع أقطار لمنطقتي التثبيط 14.3 و 15.0 مم، على التوالي، و CMI من ترتيب 6 ميكرو لتر/مل. في المقابل، كان *F. oxysporum* حساسًا لعينة E1 بنفس التركيز المثبط الأدنى. ومع ذلك، لا تزال هذه الحساسية منخفضة.

الكلمات الرئيسية: *Citrus sinensis*، *Citrus reticulata*، الزيت الأساسي، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، IC_{50} ، القوة المضادة للفطريات، Aromatogram، CMI.

Table des matières

Remerciements	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Table des matières	
Table des illustrations	
Liste des abréviations	
Introduction	01
PREMIÈRE PARTIE : Synthèse bibliographique	
CHAPITRE I : Généralités sur les agrumes	05
1. Historique et répartition des agrumes	05
2. Définition	06
3. Cycle de développement des agrumes	06
4. La production des agrumes	07
4.1. Dans le monde	07
4.2. En Algérie	08
4.3. A Tlemcen	09
CHAPITRE II : Généralités sur les mandarines et les oranges douceâtres	09
1. Le genre <i>Citrus</i>	09
2. <i>Citrus reticulata</i>	10
2.1. Description botanique	11
2.2. Systématique de la mandarine	11
2.3. Les variétés de mandarinier	12
2.3.1. Mandarinier commun (<i>Citrus Deliciosa</i> Ten)	12
2.3.2. Mandarinier Satsuma (<i>Citrus Unshiu</i> Marocow)	12
2.3.3. Tangerines, Tangors, Tangelos et hybrides (<i>Citrus reticulata</i> Blanco)	12
2.4. Usages thérapeutiques de mandarines	12
2.5. Travaux antérieurs	13
2.5.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i>	14
2.5.2. Activités biologiques de <i>Citrus reticulata</i>	15
3. <i>Citrus sinensis</i>	18
3.1. Description botanique	18
3.2. Classification botanique de <i>Citrus sinensis</i>	19
3.3. Les variétés d'orange	20

3.3.1. Les Navels	20
3.3.2. Les blondes	20
3.3.3. Les sanguines	20
3.3.4. Les ultra-douces	20
3.3.5. Orange panachée	21
3.4. Usage traditionnelle des oranges	21
3.5. Travaux antérieurs	21
3.5.1. Composition chimique de l'huile essentielle <i>Citrus sinensis</i>	21
3.5.2. Activités biologiques de l'orange (<i>Citrus sinensis</i>)	26
DEUXIÈME PARTIE : Partie expérimentale	
1. Matériel végétal	29
2. Extraction des huiles essentielles	29
3. Calcul des rendements en huiles essentielles	30
4. Etude des activités biologiques des huiles essentielles	31
4.1. Activité antioxydante des huiles essentielles	31
4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)	31
4.2. Activité antifongique des huiles essentielles	32
4.2.1. Provenance des germes	33
4.2.2. Mise en culture des germes	33
4.2.3. Méthodes d'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles	33
4.2.3.1. Détermination de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)	34
4.2.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé	35
TROISIEME PARTIE : Résultats et discussion	
1. Extraction des huiles essentielles et calcul des rendements	37
1.1. <i>Citrus reticulata</i>	37
1.2. <i>Citrus sinensis</i>	39
1.3. Comparaison des rendements entre les deux espèces de <i>Citrus</i>	41
2. Etude des activités biologiques des huiles essentielles	42
2.1. Etude de l'activité antioxydante	42
2.2. Etude de l'activité antifongique	46
2.2.1. Détermination de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)	47

2.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé	48
2.2.3. Discussion	50
2.2.3.1. <i>Citrus reticulata</i>	50
2.2.3.2. <i>Citrus sinensis</i>	51
Conclusion	53
Références Bibliographiques	56
Annexes	63

Liste des illustrations

Liste des photos

- Photo 1 :** Vue d'ensemble des rameaux et des fruits d'un mandarinier (Aïn El Hout, 29/01/2022) 11
- Photo 2 :** Vue d'ensemble d'un arbre et des fruits de l'orange douceâtre (Hennaya, 07/02/2022) 19
- Photo 3 :** A : Vue d'ensemble d'un rameau en pleine fructification de *Citrus sinensis* ; B : Pesée des écorces de *Citrus sinensis* ; C : Dispositif d'extraction des HE par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger ; D : Dispositif d'extraction des HE par simple hydrodistillation ; E : Huile essentielle de zeste de *Citrus sinensis* 30
- Photo 4 :** Préparation du milieu de culture gélosé PDA 33
- Photo 5 :** Dépôt des disques imprégnés d'huile essentielle 34
- Photo 6 :** Inhibition faible d'*Aspergillus flavus* par l'échantillon ES1 de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* 48
- Photo 7 :** Inhibition faible d'*Aspergillus flavus* par l'échantillon E1 de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* 48
- Photo 8 :** Sensibilité d'*Aspergillus fumigatus* à l'échantillon ES2 de l'huile essentielle de *C. sinensis* à la concentration de 6 µl/ml 49
- Photo 9 :** Sensibilité d'*Aspergillus flavus* à l'échantillon E1 de l'huile essentielle de *C. reticulata* à la concentration de 6 µl/m 50
- Photo 10 :** Sensibilité de *Fusarium oxysporum* à l'échantillon ES1 de l'huile essentielle de *C. sinensis* à la concentration de 6 µl/ml 50
- Photo 11 :** Sensibilité de *Fusarium oxysporum* à l'échantillon ES2 de l'huile essentielle de *C. sinensis* à la concentration de 6 µl/ml 50

Listes des figures

Figure 1 : Origine géographique des agrumes	05
Figure 2 : Cycle phénologique des agrumes	07
Figure 3 : Production mondiale totale d'agrumes par pays	08
Figure 4 : Classification et diversité des <i>Citrus</i>	10
Figure 5 : Situation géographique des lieux de prélèvement	29
Figure 6 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	32
Figure 7 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans la station d'Aïn El Hout	37
Figure 8 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans la station de Hennaya	38
Figure 9 : Comparaison entre les rendements en huile essentielle du zeste de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans les deux stations d'étude	38
Figure 10 : Moyennes des rendements en huile essentielle du zeste de <i>Citrus reticulata</i> relatives aux deux stations d'étude	39
Figure 11 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de <i>Citrus sinensis</i> récolté dans la station d'Aïn El Hout	39
Figure 12 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de <i>Citrus sinensis</i> récolté dans la station de Hennaya	40
Figure 13 : Comparaison entre les rendements en huile essentielle du zeste de <i>Citrus sinensis</i> récolté dans les deux stations d'étude	40
Figure 14 : Moyennes des rendements en huile essentielle du zeste de <i>Citrus sinensis</i> relatives aux deux stations d'étude	41
Figure 15 : Moyennes des rendements en huile essentielle du zeste des deux espèces de <i>Citrus</i>	42
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de <i>Citrus reticulata</i> (échantillon E1)	43
Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de <i>Citrus sinensis</i> (échantillon E2, HS)	43

Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E3, HC) 43

Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E4, HS) 44

Figure 20 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E5, HC) 44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition de la production agrumicole algérienne par espèce	08
Tableau 2 : Composition chimique de mandarine	14
Tableau 3 : Composition chimique d'huile essentielle de mandarine ou <i>Citrus reticulata</i>	20
Tableau 4 : Composition chimique d'huile essentielle de l'orange douceâtre ou <i>Citrus sinensis</i>	22
Tableau 5 : Origine des souches fongiques utilisées pour l'étude du pouvoir Antifongique des huiles essentielles	33
Tableau 6 : Pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH aux concentrations 128 et 256 mg/ml	45
Tableau 7 : Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'huile essentielle des différents échantillons testés exprimée en CI50	45
Tableau 8 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des trois échantillons relatives aux souches filamenteuses selon la méthode de diffusion sur disque (moyenne \pm écart type)	47
Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle des trois échantillons relatives aux moisissures testées selon la méthode de contact direct	49

Liste des abréviations

BHT : Butylhydroxytoluène

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

HC : Hydrodistillation de type clevenger

HE : Huile essentielle

HS : Hydrodistillation de type simple

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, et certainement bien avant, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'homme. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques (**Schauenberg et Paris, 2006**). Après quelques siècles de domination de la synthèse chimique, la pharmacologie, mais aussi la nutrition et l'agro-alimentaire redécouvrent les vertus des plantes dites médicinales, ce qui est le cas de toutes les plantes. Elles sont de plus en plus considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante demeure une tâche très intéressante et utile en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles (**Pierangeli et Rivera, 2009**).

Pour cela, un grand nombre de recherches sur différents fruits, y compris les agrumes a démontré récemment que les polyphénols des agrumes disposent de plusieurs applications thérapeutiques. Les études épidémiologiques prouvent que la consommation de l'orange et le citron peuvent protéger la santé contre différentes maladies grâce à leur richesse en diverses molécules antioxydantes dont l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les polyphénols (**Kim et al., 2002**). Suite à cette richesse, l'extraction des composés phénoliques à partir des agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (**Ramful et al., 2010**).

Les agrumes, qui représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes dans le monde (**Lagha-Benamrouche et al., 2017**), tels que les oranges, les citrons, et les pamplemousses (**Rock et Fardet, 2014**), sont une bonne source de glucides, de fibres alimentaires, de vitamines, de minéraux et de composés phytochimiques biologiquement actifs tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes, qui fournissent respectivement une activité de provitamine A et des agents antioxydants naturels (**Liu et al., 2012**).

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de

Introduction

la surface du végétal (**Bruneton, 1987**). Les glandes de type poche se rencontrent chez les familles des Rutacées et dans d'autres familles comme, les Astéracées, les Rosacées, les Myrtacées, etc. L'huile essentielle, essence ou également appelé huile volatile, est l'ensemble d'extraits volatils de composition complexe, obtenues des plantes aromatiques. L'Association Française de Normalisation (**AFNOR, Edition 2000**), a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de *Citrus* par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Le but de notre travail est d'une part, de déterminer les rendements en huile essentielle de plusieurs échantillons récoltés à partir de pieds individuels et d'autre part d'évaluer les activités antioxydante et antifongique des huiles essentielles du zeste de deux espèces du genre *Citrus*, à savoir : *Citrus reticulata* (mandarine) et *Citrus sinensis* (orange douceâtre) récoltés dans la région de Tlemcen.

Ainsi, ce manuscrit comportera trois parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui regroupe un aperçu général sur les agrumes, la description botanique de *Citrus reticulata* et de *Citrus sinensis*, leurs utilisations traditionnelles et les travaux antérieurs concernant les rendements, la composition chimique et les activités biologiques.

La deuxième décrit la partie expérimentale, dont laquelle, nous détaillons la récolte du matériel végétal, l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de *Citrus reticulata* et de *Citrus sinensis*. Ensuite, nous présentons les méthodes utilisés pour l'évaluation des activités biologiques : antioxydante et antifongique.

La dernière partie consiste en une interprétation des résultats obtenus et une discussion par comparaison aux données de la littérature.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion et quelques perspectives.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

1. Historique et répartition des agrumes

Comme beaucoup d'arbres fruitiers cultivés sous des climats tempérés, les agrumes sont d'origine d'Asie subtropicale et plus particulièrement d'une zone allant du nord-est de l'Inde jusqu'au nord de l'Indonésie, en passant par le Myanmar (Birmanie) et le sud de Chine (**Figure 1**). La première importation d'un agrume en zone méditerranéenne remonterait au III^{ème} siècle avec J-C, et certains d'autres situent celle-ci lors de l'épopée d'Alexandre le grand en perse, ou le cédratier était cultivé. Appelé à l'époque « pomme de Perse » ou « pomme de Médie », le cédrat rapporté en Grèce, a rapidement conquis le reste de la Méditerranée. Il n'était pas consommé, mais ses utilisations cosmétiques ou pharmaceutiques étaient réputées. Plusieurs siècles se seraient écoulés avant que d'autres variétés d'agrumes soient introduites en Occident. La primauté du cédratier en Occident et l'absence d'autres agrumes sur une période s'étalant de l'antiquité au moyen âge sont controversées chez les historiens et les archéologues. Des représentations d'oranges ont été découvertes lors des fouilles initiées au XVIII^{ème} siècles sur des mosaïques picturales découvertes à Pompéi, ville recouverte de cendres après l'éruption du Vésuve en 79 de notre ère. Des fouilles archéologiques de sépultures romaines et égyptiennes auraient également mis au jour des grains de pollen fossilisés appartenant au citronnier.

La culture des agrumes s'est intensifiée à l'échelon mondial au cours des XIX et XX siècles, et couvre aujourd'hui plusieurs millions d'hectares. L'agrumiculture des pays du bassin méditerranéen est diversifiée tant au niveau des variétés cultivées (clémentines, hybrides de mandarines, oranges, pomelos, citrons, bergamotes, cédrats, etc.) que dans leurs commercialisation (fruits frais, jus, cosmétiques, plants d'ornement) (**Jacquemond et al., 2013**)

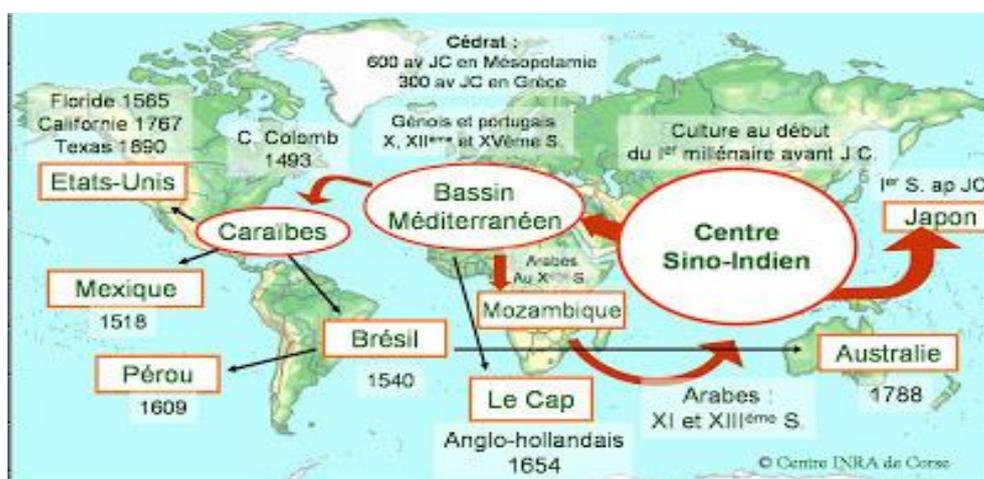


Figure 1 : Origine géographique des agrumes (Anonyme 1)

2. Définition

Le mot Agrume provient du latin « acrumen » qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (**Bachés et Bachés, 2002**).

Les agrumes sont originaires du Sud-est Asiatique (**Ollitrault *et al.*, 1997**). Ce sont des arbres de la famille des Rutacées composés de 156 ou de 16 espèces, selon que les auteurs ont ou n'ont pas pris en compte les hybrides (**Swingle et Reece, 1967**). La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement. Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduits dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. L'introduction des agrumes en Afrique de l'Est a été faite par les commerçants arabes et hindous vers le XVe siècle (**Loussert, 1989 ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996**).

L'expansion dans le sud de l'Europe au XVe siècle est le fait des portugais, qui les ont exportées d'Asie. Au moment de la conquête, l'orange traverse l'atlantique avec le bigarade, la lime et le cédrat. Ces derniers ont été cultivés dans les Antilles, au Mexique et en Amérique du sud (**Loussert, 1989**).

Les agrumes sont pratiquement indispensables de par leur teneur élevée en acide ascorbique (vitamine C). Les agrumes ont une grande importance économique, non seulement au niveau de la production du fruit (80 millions de tonnes par ans) mais également pour d'autres secteurs, par exemple l'industrie des parfums. N'oublions pas non plus leurs caractéristiques ornementales : leur port noble, leurs feuilles persistantes d'un beau vert brillant et le parfum délicat de leurs fleurs (**Colombo, 2004**).

3. Cycle de développement des agrumes

Les agrumes sont des arbres fruitiers à feuilles persistantes, le cycle de vie de ces arbres débute par une phase de dormance suivi par une phase de débourrement ou il y a le gonflement des bourgeons et le développement des feuilles suivis par une phase de floraison (début, pleine et fin). La figure 2 récapitule les différents stades phénologiques des agrumes.

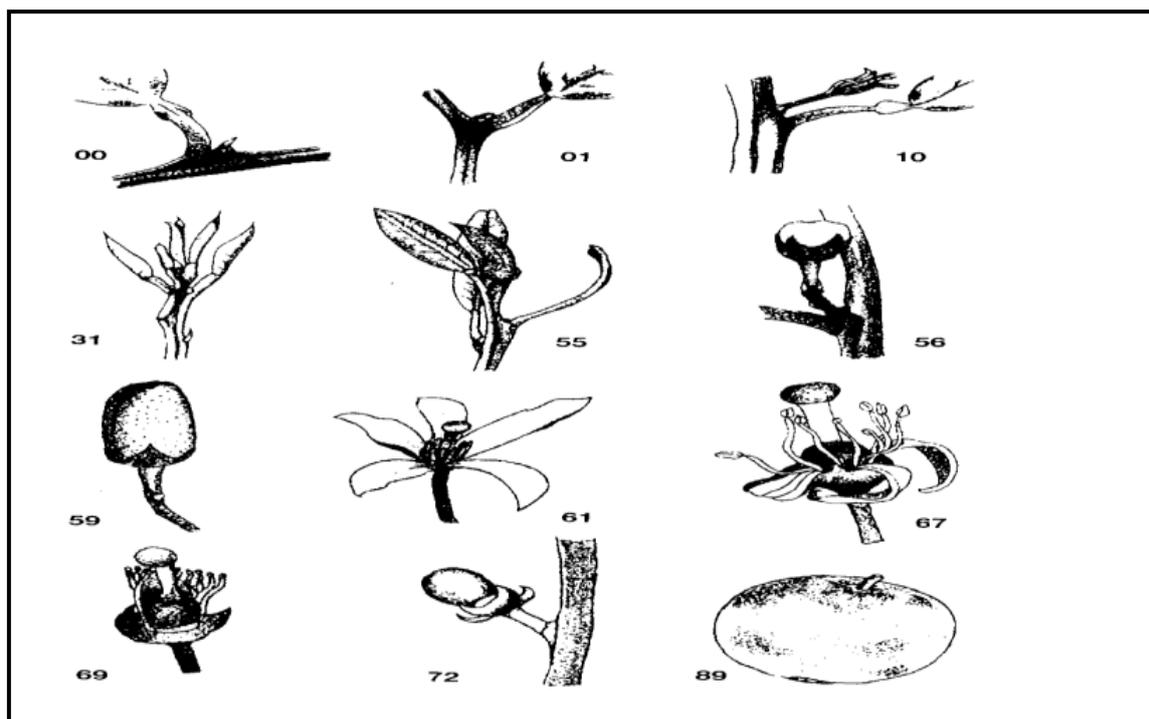


Figure 2 : Cycle phénologique des agrumes (Agusti *et al.*, 1995)

Légende :

00 : Début de dormance : stade de dormance.

01 : Début du gonflement des bourgeons : stade développement des bourgeons.

10 : Séparation des premières feuilles : stade de développement des feuilles.

31 : Début de la croissance des pousses: stade développement des pousses.

55 : Les fleurs sont visibles mais encore fermées : stade d'apparition de l'inflorescence.

56 : Les pétales s'allongent, les sépales entourent la moitié de la corolle (stade bouton blanc) : stade de développement de l'inflorescence.

59 : La plupart des fleurs avec des pétales formant une boule creuse : stade d'apparition de l'inflorescence.

61 : Début de floraison (environ 10% des fleurs sont ouvertes) : stade de floraison.

67 : Les fleurs sont flétries (la majorité des pétales sont tombés) : stade de floraison.

69 : Fin de floraison (tous les pétales sont tombés) : stade de floraison.

72 : Le fruit vert est entouré par les sépales en forme d'une couronne : stade de développement du fruit.

89 : Le fruit a atteint la maturité demandé pour la consommation avec son goût et sa consistance caractéristique : maturation du fruit et de la graine.

3. La production des agrumes

3.1. Dans le monde

La production des agrumes (**Figure 3**) est très diversifiée avec 68 Mt d'oranges, 29 Mt des petits agrumes, 14 Mt de citrons et de limes et 5 Mt de pomélos en 2009 (**Loillet, 2010**). La production mondiale des oranges est de l'ordre de 66,4 millions de tonnes en 2010 ce qui représente une hausse de 14 pour cent par rapport au volume enregistré pendant la période 1997- 1999. Et de 60 millions de tonnes en 2000, dont 18 millions de tonnes produites par le Brésil à lui seul, suivi par la Floride avec 11 millions de tonnes et le bassin méditerranéen avec 10 millions de tonnes (**Anonyme 2**).

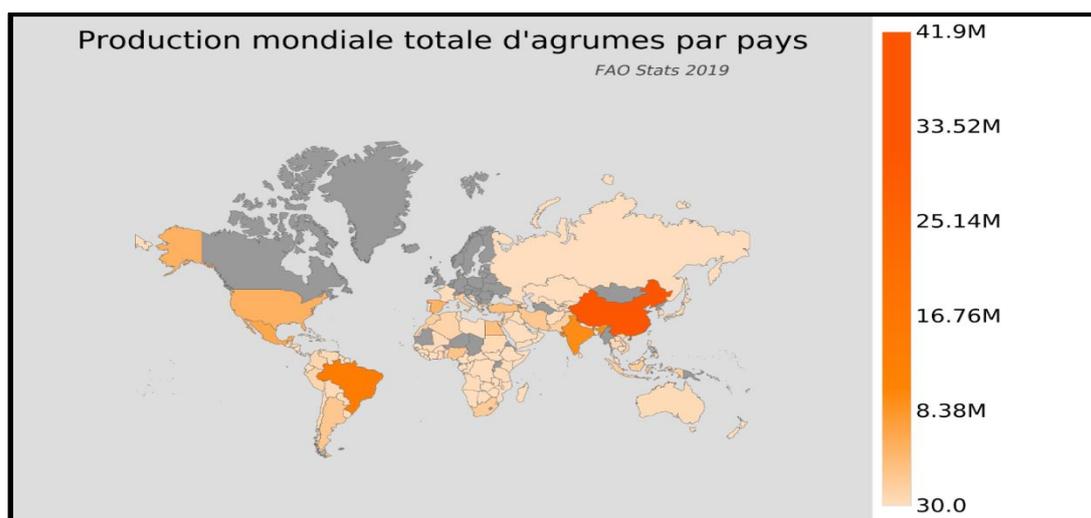


Figure 3 : Production mondiale totale d'agrumes par pays (Anonyme 3)

La production mondiale d'agrumes 2020/2021 des pays et des produits de base inclus dans *Citrus : World Markets and Trade* est estimée en hausse de 4% à 98 millions de tonnes métriques (tonnes). Les oranges représentent la moitié de la production, suivies des mandarines, des citrons verts et des pomelos. La Chine est le plus grand producteur, suivie du Brésil et de l'UE (Anonyme 3).

3.2. En Algérie

Le verger agrumicole national dépasse actuellement les 60 000 ha avec une production de plus de 627 4060 q, une production relativement faible par rapport à l'importance de la superficie agrumicole. En effet, le rendement national moyen est de l'ordre de 14 T/ha (Anonyme 4). La répartition de la production agrumicole par espèce consignée dans le tableau 1 montre que ce sont les oranges qui occupent la première place en Algérie suivi par les clémentines, puis par les autres espèces.

Tableau 1 : Répartition de la production agrumicole algérienne par espèce (M.A.D.R., 2013)

Variétés	Production (q)
Oranges (<i>C. sinensis</i>)	3 270 830
Clémentines (<i>C. clementina</i>)	905 350
Citrons (<i>C. limon</i>)	316 440
Mandarines (<i>C. reticulata</i>)	193 520
Pomelos (<i>C. paradisi</i>)	1160

3.3. A Tlemcen

Une production de 784.560 quintaux d'oranges est prévue dans la wilaya de Tlemcen, auprès de la direction des services agricoles (DSA). Les champs d'agrumes dans la wilaya

Synthèse bibliographique

produisent différentes variétés dont la clémentine (350 ha), Thomson Naval (1 211 ha), Washington Naval (600 ha) outre d'autres orangers d'arrière-saison, selon le même responsable, qui a souligné que la surface plantée en orangers a connu une évolution passant de 2 947 ha en 2018 à 2 997 ha 2021 à la faveur de l'engouement suscité par les agriculteurs résidant à proximité des périmètres irrigués (**Anonyme 5**).

Les agrumes (oranges, mandarines, clémentines et citrons) occupent une superficie de 3 148 hectares dont 2 844 ha sont actuellement en production, selon le chef de service de l'organisation de la production et appui technique de la DSA de Tlemcen, qui précise que la superficie récoltée à ce jour de 500 ha, soit une production de 12 025 quintaux. «L'opération de récolte débute par les petits fruits de clémentine, mandarine et citron et se poursuit pour le reste des autres variétés, tels que la Thomson navel et les oranges sanguines, ce qui devrait permettre un approvisionnement permanent des marchés en ces fruits (**Anonyme 6**).

Chapitre 2 : Généralités sur les mandarines et les oranges douceâtres

1. Le genre *Citrus*

Beaucoup de travaux ont été réalisés au cours du XX siècles afin de classer les différentes variétés et espèces et de proposer des hypothèses quand à leurs évolution.

Le genre *Citrus* (**Figure 4**) regroupe la plupart des espèces d'agrumes cultivées et renferme, suivant les taxonomistes, entre seize (**Swingle et Reece, 1967**) et cent cinquante-six espèces (**Tanaka, 1961**). La complexité relative de ces classifications résulte, entre autres, d'une large diversité morphologique et de la compatibilité sexuelle des espèces de genre *Citrus*. Par ailleurs, certaines variétés cultivées se sont vues élevées au rang d'espèces, bien qu'elles soient issues de croisements entre deux espèces différentes et qu'elles ne puissent se reproduire naturellement par fécondation. La taxonomie de Swingle et Reece est plus en adéquation avec la notion d'espèce, et c'est pourtant celle de Tanaka qui est la plus souvent utilisée. Elle offre en effet à des variétés cultivées une dénomination latine, et donc une précision supérieure à celle de Swingle et Reece, tout en limitant la multiplicité des appellations communes locales. On peut cependant s'interroger sur le bien-fondé d'un tel niveau de précision alors que le principe de la taxonomie est de classer par regroupement des formes ayant des traits communs. A ce titre, une nouvelle proposition de taxonomie des agrumes a été suggérée par **Mabberley (1997)**, dans laquelle la notion de fertilité des croisement est mieux respectée que celle des deux précédentes. Elle regroupe ainsi les six

Synthèse bibliographique

genres des agrumes vrais : *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus*, *Eremocirus*, *Microcitrus* et *Clymenia*, sous une seule dénomination de genre : *Citrus* (Jacquemond *et al.*, 2013).

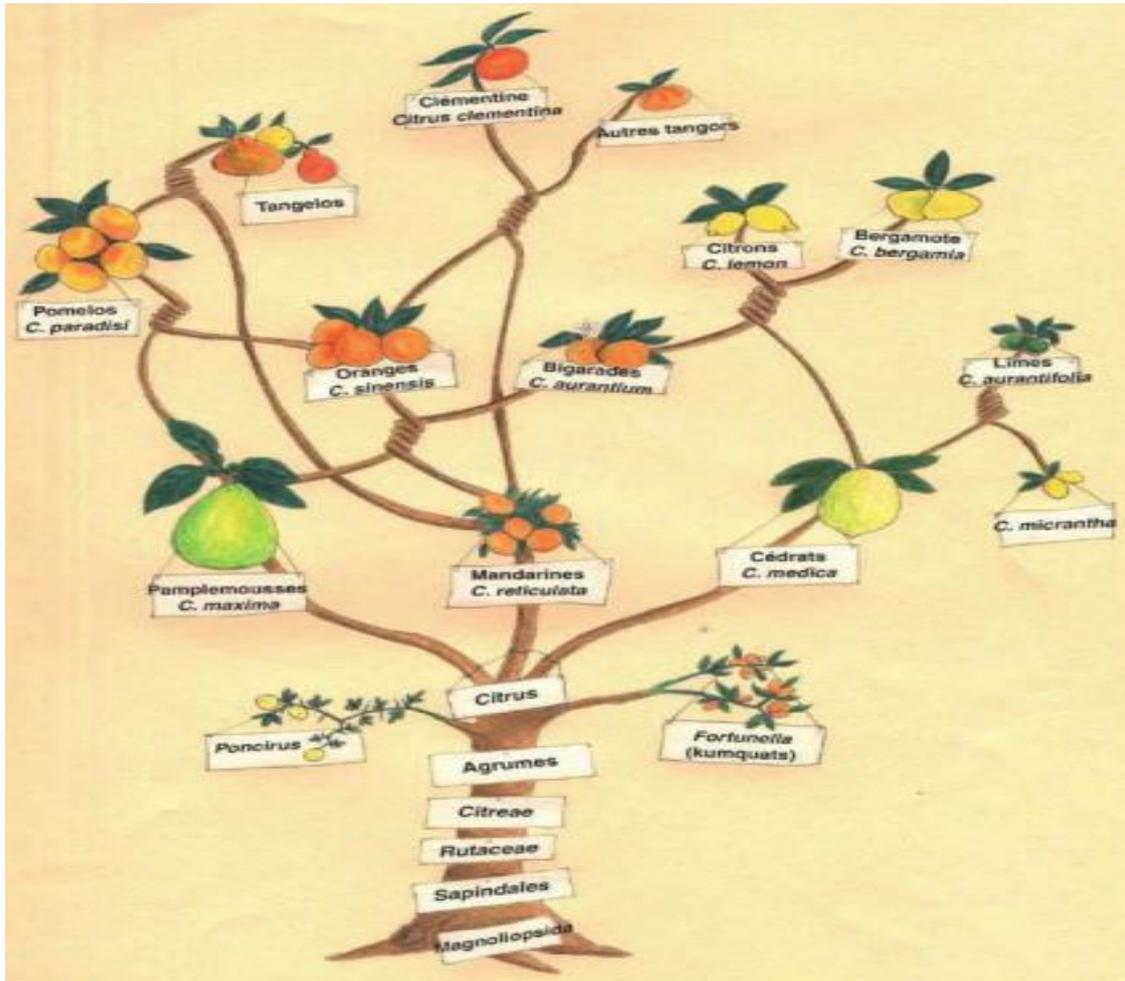


Figure 4 : Classification et diversité des *Citrus* (Jacquemond *et al.*, 2013)

2. *Citrus reticulata*

2.1. Description botanique

La mandarine est un agrume, c'est le fruit du mandarinier, un arbre de la famille des Rutacées. Le fruit d'un diamètre de 5 à 8 cm est sphérique et légèrement aplati. Sa chair, sucrée et parfumée, est l'une des moins acides parmi les agrumes, mais elle a de nombreux pépins. Son écorce est fine, d'une couleur rouge-orangé (Anonyme 7). Il existe plusieurs variétés de mandarine, permis les plus connus sont la Satsuma et la Honey, aussi appelée Tangerine (qui est un hybride). La clémentine est en revanche sans pépins, comme l'Oroval. Toutefois, des variétés dites de mandarines sans pépins font leur apparition sur les marchés (Virbel-Alonso, 2011).

Le mandarinier est un petit arbre épineux. Ses feuilles sont vertes foncées et brillantes. Il se différencie de l'oranger par des feuilles et des fruits plus petits (4 à 7 cm) (Anonyme 8).

Synthèse bibliographique

Les mandarines font partie d'un grand ensemble aux caractéristiques très diverses, qui peuvent se décliner en six groupes :

- ❖ King, *Citrus nobilis*
- ❖ Satsuma, *Citrus unshiu*
- ❖ Tangerine et tangor, *Citrus reticulata*
- ❖ Petits fruits : Cléopâtre : *Citrus reshni* ; Nasnaran : *Citrus amblycarpa* (**Bachés et Bachés, 2002**).

Malgré les différences importantes entre les espèces et leurs variétés quant au port de l'arbre, les feuilles, la floraison et la qualité de leurs fruits, on peut pointer des caractéristiques communes : Arbres assez vigoureux ; Grande fertilité ; Fleurs : petites, blanches, parfumées (**Bachés et Bachés, 2002**).

2.2. Systématique de la mandarine

Les mandarines (**Photo 1**) sont classées botaniquement d'après, **Hallal en 2011** :

Règne : Plantae

Sous-règne : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus* L.

Espèce : *Citrus reticulata*



**Photo 1 : Vue d'ensemble des rameaux et des fruits d'un mandarinier
(Aïn El Hout, 29/01/2022)**

Synthèse bibliographique

2.3. Les variétés de mandarinier

2.3.1. Mandarinier commun (*Citrus Deliciosa* Ten)

Le parfum des ses feuilles, l'arôme et la saveur de ses fruits justifient à merveille le choix de son nom latin : Elle est véritablement délicieuse !

- **Autre variétés** : quelques variétés communes d'Italie : « Avana Apireno », sans pépins et « Tardive de Ciaculli » aux fruits mûrissant de février à avril (**Bachés et Bachés, 2002**).

2.3.2. Mandarinier Satsuma (*Citrus Unshiu* Marcow)

Ce mandarinier parmi les moins gélifs de tous les agrumes nous offre ses fruits à l'aube de l'hiver.

- **Variétés les plus cultivées** :
 - Mandarinier Satsuma « Owari »
 - Mandarinier Satsuma « Okitsu »
 - Mandarinier Satsuma panaché (variegata) (**Bachés et Bachés, 2002**).

2.3.3. Tangerines, Tangors, Tangelos et hybrides (*Citrus reticulata* Blanco)

Six variétés parmi d'autres, appartenant à un grand groupe de mandariniers hybridés et cultivés aux quatre coins du monde. Les tangerines sont des mandarines caractérisées par la couleur rouge de leur peau. Les tangors sont des hybrides de mandarines et d'oranges. Les tangelos, des hybrides de mandarines et de pomélos.

- Tangerine Dancy
- Fortune
- Tangor Murctt
- Tangor Ortanique
- Nova («Clémenville »)
- Tangelo Minneola (**Bachés et Bachés, 2002**).

2.4. Usages thérapeutiques des mandarines

Les mandarines sont très utilisées dans la pharmacologie chinoise. L'écorce des mandarines (*Citrus reticulata*) séchée est la plus utilisée dans différents domaines telle que : la diététique chinoise et le massage Tui Na :

- Améliore la digestion
- Antibiotique
- Augmente le péristaltisme
- Dilate les bronches
- Utilisé pour traiter la mastite (ou mammité)

Synthèse bibliographique

- Bronchite chronique
- Calcul biliaire (lithiase biliaire)
- Utilisé à usage local pour traiter les brûlures

A Tlemcen, et selon une étude ethnobotanique, le zeste des mandarines est utilisé dans les préparations culinaires (gâteaux et entremets), mélangé avec des plantes aromatiques. Par contre, les usages thérapeutiques du zeste des mandarines sont les suivants :

- ✚ Traiter la toux dans le cas d'un état grippal ;
- ✚ Diminue les infections du derme ;
- ✚ Une infusion chaude contenant un mélange de l'écorce séchée de mandarine avec certaines plantes aromatiques est conseillée pour traiter la grippe.

2.6. Travaux antérieurs

2.6.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* a fait l'objet de plusieurs études (**Tableau 2**).

Selon la littérature, l'huile essentielle de *Citrus reticulata* est très riche en monoterpènes, principalement le limonène qui est le constituant très majoritaire, suivi généralement par le γ -terpinène.

Synthèse bibliographique

Tableau 2 : Composition chimique d'huile essentielle de mandarine ou *Citrus reticulata*

Parties utilisées	Composés identifiés	Lieu de récolte	Rendement	Références bibliographiques
En Algérie				
Feuilles fraîches	N-Méthyle anthranilate de méthyle (34,0%), γ -terpinène (26,6%), limonène (22,5%), α -pinène (4,7%), β -pinène (4,3%), α -thujène (2,0%), β -myrcène (1,0%), terpinolène (1,2%)	Chlef (Algérie)	0,51%	Hamdani <i>et al.</i>, 2015
Feuilles fraîches	Limonène (32,0%), γ -terpinène (25,5%), N-méthyle anthranilate de méthyle (24,5%), α -pinène (3,3%), β -pinène (3,3%), α -thujène (2,0%), γ -terpinolène (1,9%), myrcène (1,1%)	Région d'Azzaba willaya de Skikda (Algérie)	Hydrodistillation 0,50 \pm 0,2%	Boughendjioua, 2019
En Tunisie				
Zeste	Limonène (92,6%), γ -terpinène (3,4%), β -pinène (1,6%), α -pinène (0,6%)	Zaghouan (Tunisie)	4,62%	Hosni <i>et al.</i>, 2010
Ecorce (Cycle de développement des fruits)	Limonène (65,4% ; 51,8% ; 69,0%), 1,8-cinéole (0,01% ; 26,4% ; 0,2%), γ -terpinène (12,4% ; 2,5% ; 14,1%), (E)- β -ocimène (0,8% ; 7,9% ; 1,1%)	Elarbi (Tunisie)	0,22% 2,70% 1,13% (à maturité)	Bourgou <i>et al.</i>, 2012
Feuilles séchées	Linalol (73,0%), acétate de linalyle (10,9%), terpinéol-4 (4,9%), isobornéol (3,5%), α -pinène (1,1%)	Zaghouan (Tunisie)	0,41%	Hosni <i>et al.</i>, 2013
Au Maroc				
Parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs)	Limonène (69,2%), γ -terpinène (12,7%), nérol (5,6%), α -pinène (2,8%), β -pinène (1,8%), myrcène (1,5%)	Région de Beni Mellal (Maroc)		Ainane <i>et al.</i>, 2018
Dans le monde				

Synthèse bibliographique

Zeste	Limonène (95,1%), myrcène (2,0%)	Vietnam	0,25%	Minh Tu et al., 2002
Fruit	Limonène (80,3%), γ -terpinène (4,7%), myrcène (2,1%) α -pinène (1,2%)	Japon	Fruit : 0,12%	Sawamura et al., 2004
Zeste			Flavédo : 0,53%	
Ecorce	Limonène (84,8%), γ -terpinène (5,4%), myrcène (2,2%), α -pinène (1,1%)	Burund (Japon)		Njoroge et al., 2006
Ecorce	Limonène (46,7%), géraniol (19,0%), néral (14,5%), acétate de géranyle (3,9%), géraniol (3,5%), β -caryophyllène (2,6%), nérol (2,3%), citronellal (1,3%), acétate de néryle (1,1%)	Inde	0,6 ml/100g	Chutia et al., 2009
Zeste	Limonène (74,7%), γ -terpinène (15,7%), <i>p</i> -cymène (2,0%), α -pinène (2,0%), myrcène (1,4%)	Espagne		Viuda-Martos et al., 2009
Ecorce	Limonène (52,2 - 96,2%), γ -terpinène (tr - 36,7%), linalol (0,1 - 2,5%), α -pinène (0,1 - 2,1%), myrcène (1,3 - 1,8%), sabinène (0,1 - 1,3%)	Corse	0,10 - 0,45%	Lota et al., 2000
Feuilles fraîches	γ -Terpinène (0,2 - 61,3%), sabinène (0,2 - 59,4%), N-méthylanthranilate de méthyle (tr - 58,0%), linalol (0,2 - 54,3%), limonène (1,5 - 44,3%), <i>p</i> -cymène (tr - 20,4%), (<i>E</i>)- β -ocimène (0,6 - 13,7%), β -pinène (0,1 - 10,7%), terpinèol-4 (0,1 - 10,6%)	Corse	0,10 - 0,45%	Lota et al., 2000
Ecorce	Limonène (55,8 - 96,7%), γ -terpinène (tr - 19,9%), <i>p</i> -cymène (tr - 12,0%), myrcène (0,7 - 24,0%), β -pinène (tr - 14,2%), sabinène (0,1 - 8,7%), α -pinène (0,2 - 2,2%)	Corse	0,05 - 0,60%	Lota et al., 2001
Feuilles fraîches	γ -Terpinène (0,1 - 67,4%), sabinène (0,1 - 57,3%), N-méthylanthranilate de méthyle (0,0 - 78,7%), linalol (tr - 59,3%), limonène (1,4 - 15,9%), <i>p</i> -cymène (0,0 - 16,6%), (<i>E</i>)- β -ocimène (0,0 - 14,0%), β -pinène (0,1 -	Corse	0,05 - 0,60%	Lota et al., 2001

Synthèse bibliographique

	15,4%), terpinéol-4 (0,1 - 7,9%)			
Fruit	d-limonène (67,0%), γ -terpinène (17,0%)	Italie		Frassinetti et al., 2011
Ecorce	Limonène (74,4%), oxyde de <i>cis</i> -limonène (2,8%), <i>cis-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol (2,3%), carvone (1,9%), <i>trans</i> -carvéol (1,8%), (<i>Z</i>)-patchéol (1,2%)	Espagne		Espina et al., 2011
Ecorce	D-Limonène (75,7%), Limonène glycol (6,6%), <i>trans-p</i> -mentha-2,8-diéol (4,0%), <i>Z</i> -5-nonadécane (3,2%), Heneicosane (2,4%), eugénol (2,4%), <i>cis-p</i> -mentha-2,8-diéol (1,8%), α -pinène (1,6%), Thujol (1,4%)	Pakistan	Hydrodistillation (0,04%)	Khan et al., 2012
Ecorce	Limonène (91,6%), myrcène (2,8%), α -pinène (0,9%)	Vietnam		Van Hung et al., 2013

Synthèse bibliographique

2.6.2. Activités biologiques de *Citrus reticulata*

En 1998, **Smith-Palmer *et al.***, rapportent que l'huile essentielle de *Citrus reticulata* n'est pas active vis-à-vis des souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* et *Campylobacter jejuni*.

Viuda-Martos *et al.*, 2008 rapportent une faible activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* contre les champignons filamenteux, à savoir : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum* et *Penicillium chrysogenum*. En effet, ils avancent des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 100% mais à concentration très élevée de l'ordre de 0,94%.

Chutia *et al.*, 2009 ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* par deux méthodes (contact direct et micro-atmosphère) contre cinq champignons phytopathogènes : *Alternaria alternata* (Aa), *Rhizoctonia solani* (Rs), *Curvularia lunata* (Cl), *Fusarium oxysporum* (Fo) et *Helminthosporium oryzae* (Ho). Ils avancent des pourcentages d'inhibition du mycélium par contact direct, de 100% à une concentration de l'ordre de 0,2 ml/100ml contre Aa, Cl et Fo et à une concentration supérieure à 0,2 ml/100ml contre Rs et Ho.

En 2012, **Espina *et al.***, ont testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* par deux méthodes (contact direct et diffusion sur disque) contre cinq souches : *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecium*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les souches bactériennes se sont montrées sensibles, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 13,8 et 21,3 mm, à l'exception de *P. aeruginosa* qui s'est révélé résistant. Ils avancent également des CMI's faibles, voir modérées, allant de 1 à 5 µl/ml.

En outre, **Bourgou *et al.*, 2012** ont déterminé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* contre trois bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de la méthode de diffusion sur disque, indiquent que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* étaient les microorganismes les plus sensibles avec des zones d'inhibition variant entre 16,0 et 26,0 mm. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélé très résistant.

En 2013, **Van Hung *et al.***, ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* contre trois champignons filamenteux : *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum* et *Fusarium proliferatum*. Ils avancent des pourcentages d'inhibition du mycélium très faibles, allant de 37,1 à 50,9%, à une concentration de l'ordre de 2000 ppm.

Synthèse bibliographique

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* été testée également par **Hamadi et Allem en 2015**. Ces auteurs rapportent des CMI's très faibles de l'ordre de 1,0 et 0,1 mg/ml contre *Penicelium sp.* et *Alternaria alternata*, avec un effet fongicide. De même, ils ont obtenu des pourcentages d'inhibition des souches fongiques de l'ordre de 100%, à une concentration de l'ordre de 0,05 mg/ml contre *Fusarium oxysporum* et *Fusarium sp.*, 0,1 mg/ml contre *Alternaria sp.* et 1 mg/ml contre *Penicillium sp.*

Récemment, **Boughendjioua, en 2019** ont réalisé une étude sur l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata* collecté à Skikda. L'huile essentielle a exercé une très faible activité inhibitrice vis-à-vis des champignons testés. Les deux souches fongiques ; *Fusarium oxysporum* et *Alternaria sp.* ont été inhibées à partir de la concentration (1/1000, v/v) et (1/2000, v/v), respectivement.

Khan et al., (2012) rapportent une très bonne activité antimicrobienne de l'huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* contre *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, et *Trichophyton album*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 16,62 et 35,81 mm. En revanche, *Aspergillus flavus* et *S. epidermis* se sont montrés résistants, avec des diamètres des zones d'inhibition de 12,40 et 14,50 mm, respectivement. Ils rapportent également une bonne activité antioxydante (DPPH), avec une CI₅₀ de l'ordre de 1,0007 mg/g.

Par ailleurs, **Frassinetti et al., 2011** ont étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* contre dix souches bactériennes (7 à Gram négatif : 3 *Xanthomonas campestris*, 2 *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* et 3 à Gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Enterobacter aerogenes*). Ils rapportent un pouvoir antibactérien important avec des CMI's variant entre 20 et 230 µg/ml. Ces mêmes auteurs, ont déterminé également l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*. Les résultats obtenus par le test de DPPH mettent en évidence un pouvoir anti-radicalaire modéré, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 60%, à une concentration de 1000 µg/ml comparable à celui du composé de référence : le trolox (70% à une concentration de 100 µg/ml).

3. *Citrus sinensis*

3.1. Description botanique

Arbre au port harmonieux et de croissance rapide, il peut atteindre de grande taille en pleine terre (7 à 8 m). Les fleurs sont blanches et immaculées, très parfumées, des feuilles vert profond, légèrement ailées. Les fruits sont de forme et de coloration variable en fonction des différents groupes auxquelles ils appartiennent. La pulpe juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés (**Bachès et Bachès, 2002**).

Synthèse bibliographique

Aranja ou Portugal, Arancio en Italie, Natranja en Espagne. C'est de loin l'espèce du genre *Citrus* la plus importante. La classification horticole des orangers peut se faire sur la base de différents types de caractères, choix toujours arbitraires et par conséquent discutables. Généralement on distingue quatre groupes : les oranges blondes navels, les oranges blondes, les oranges sanguines, les oranges sans acidité (**Praloran et al., 1971**).

L'oranger ou *Citrus sinensis* est tolérant à la Tristeza (tout au moins à certaines souches de cette maladie) et confère vigueur, productivité et longévité aux greffons qu'il supporte.

Les oranges douceâtres (**Photo 2**) sont l'un des agrumes qui ne peut pas vivre dans les pays à des températures trop élevés. D'après **Webber**, la température la plus forte que les agrumes supportent sans dommage ne doit pas être beaucoup plus élevée que 51,1 °C. La résistance au froid des agrumes est encore une question d'espèce et d'après plusieurs auteurs cités par **Praloran**, la liste des principales d'entre elles peut être ainsi établie, par ordre décroissant de résistance au froid, *Citrus sinensis* occupe la cinquième classe parmi neuf classes de genre *Citrus* (**Praloran, 1971**).

3.2. Classification botanique de *Citrus sinensis*

Les oranges sont classés botaniquement selon l'ordre suivant :

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus sinensis* Osbeck



Photo 2 : Vue d'ensemble d'un arbre et des fruits de l'orange douceâtre (Hennaya, 07/02/2022)

3.3. Les variétés d'orange

3.3.1. Les Navels

Elles se caractérisent par la présence au niveau pistillaire d'un petit fruit mal formé appelé « navel ». Fruits d'excellente qualité gustative qui se pèlent bien. Pulpe croquante, quartiers séparés, orangée à maturité.

- Navelina
- Washington Navel
- Thomson Navel
- Navelate
- New Hall Navel
- Lane Late
- Washington Navel Powwel
- Caracara (**Bachés et Bachés, 2002**)

3.3.2. Les blondes

Ce groupe est issu d'oranges dites communes qui se reproduisent par semis et ont servi de porte-greffe.

- Valencia Late
- Salustiana
- Pineapple de Floride
- Shamouti
- Maltaise de Tunisie « Portugaise »
- Hamlin (**Bachés et Bachés, 2002**)

3.3.3. Les sanguines

Elles se distinguent des oranges blondes par un épiderme et une pulpe colorés de pigments rouge (anthocyanes). L'intensité de cette pigmentation varie selon le sol et le climat, notamment l'amplitude thermique entre le jour et la nuit.

- Maltaise de Tunisie
- Moro
- Sanguinelli (**Bachés et Bachés, 2002**)

3.3.4. Les ultra-douces

Ce groupe est quasiment inconnu chez nous. Les fruits sans aucune acidité demandent, pour avoir été élevés très jeunes au pied d'un de ces orangers. Le niveau de sucre est sensiblement identique aux oranges Navel, environ 10% du jus, mais le taux d'acidité atteint à peine 0,1% alors qu'il est de 1% pour une orange Blonde. Il en résulte une impression de

Synthèse bibliographique

saveur fade non représentative de l'orange. Les arbres de ces variétés sont vigoureux et très productifs, les fruits peuvent rester longtemps sur l'arbre.

Variétés : Quelque groupe de ce groupe peu répandu :

- Succari (Egypte), Sucrena ou Imperial (Espagne), Lima (Algérie), Lima Verde (Brésil), Vaniglia (Sicile), Mosambi (Inde), Meski (Afrique du Nord), Orange de Nice (France).

(Bachés et Bachés, 2002)

3.3.5. Orange panachée

De qualité gustative moyenne, ces oranges sont remarquablement décoratives par leur couleur jaune rayée de bandes vertes au milieu d'un feuillage largement panaché de vert et blanc **(Bachés et Bachés, 2002)**.

3.4. Usage traditionnelle des oranges

Citrus sinensis est une riche source de vitamine C, un antioxydant qui soutient l'activité du système immunitaire **(Jehad et Azza, 2015 ; Rafiq et al., 2018)**.

Citrus sinensis a été utilisé traditionnellement pour traiter :

- ✚ Les troubles (tels que crampes, constipation, coliques et diarrhée),
- ✚ Troubles respiratoires (tels que toux, rhume, bronchite et tuberculose), obésité,
- ✚ Troubles menstruels, maladies cardiovasculaires (angine, hypertension), anxiété, dépression et stress **(Favela et al., 2016)**.

3.5. Travaux antérieurs

3.5.1. Composition chimique de l'huile essentielle *Citrus sinensis*

L'huile essentielle de *Citrus sinensis* a fait l'objet de plusieurs études **(Tableau 3)**. Selon la littérature, cette huile essentielle est riche en monoterpènes, principalement limonène, suivi de myrcène et une quantité plus faible en β -pinène, α -pinène, sabinène et en linalol.

Une composition avec le limonène très majoritaire (90 - 97%) a déjà été décrite auparavant dans des échantillons de plusieurs variétés d'orange provenant de plusieurs pays : Algérie **(Aboudaou et al., 2019 ; Youcef-Ettoumi et al., 2021)**, Tunisie **(Hosni et al., 2010 ; Bourgou et al., 2012 ; Farhat et al., 2020)**, Maroc **(Moufida et Marzouk, 2003)**, Vietnam **(Minh Tu et al., 2002 ; Van Hung et al., 2013)**, Venezuela **(Ojeda de Rodríguez et al., 2003)**, Chine **(Sawamura et al., 2005)**, Rwanda **(Njoroge et al., 2009)** et Grèce **(Michaelakis et al., 2009)**.

Synthèse bibliographique

Tableau 3 : Composition chimique d'huile essentielle de l'orange douceâtre ou *Citrus sinensis*

Partie utilisé	Composé identifiés	Lieu de récolte	Rendement	Références bibliographiques
En Algérie				
Ecorce	Limonène (78,5%), myrcène (5,3%), β -pinène (2,7%), linalol (2,0%), decanal (1,7%), α -pinène (1,6%), sabinène (1,2%)	Algérie	0,39%	Ferhat <i>et al.</i>, 2006
Ecorce	Acétate de linalyle (37,3%), β -linalol (23,4%), acétate de géranyle (6,3%), acétate de néryle (4,1%), β -myrcène (3,2%), limonène (2,2%), β -pinéne (1,6%), carène (1,1%)	Algérie	Hydrodistillation 0,58%	Djenane, 2015
Ecorce	Limonène (82,6%), myrcène (1,6%), linalol (5,0%), α -terpinéol (1,1%)	Algérie	Hydrodistillation 0,55%	Ben Miri <i>et al.</i>, 2018
Zeste	Limonène (95,5%), β -myrcène (1,9%)	Metidja	Hydrodistillation 0,40%	Aboudaou <i>et al.</i>, 2019
Ecorce	Limonène (93,3%), β -myrcène (2,3%) Limonène (94,4%), β -myrcène (2,2%)	Mitidja (Nord de l'Algérie)	Hydrodistillation, 2 méthodes : 2,72% 3,77%	Youcef-Ettoumi <i>et al.</i>, 2021
En Tunisie				
Zeste	Limonène (77,5%), myrcène (6,3%), α -farnésène (3,6%), γ -terpinène (3,3%), α -pinène (1,5%), sabinène (1,3%).	Tunisie	2,49%	Tao <i>et al.</i>, 2009
Ecorce Var. Meski	Limonène (96,0 ; 96,6%), β -pinène (1,5 ; 1,8%) Limonène (97,3%), β -pinène (1,5%)	Tunisie	1,49 - 2,2% 2,31%	Hosni <i>et al.</i>, 2010
Ecorce 2 variétés	Limonène (67,9% ; 81,5%), 1,8-cinéole (14,7% ; tr), camphène (tr ; 1,22%), camphre (1,4% ; 4,8%), <i>cis</i> -oxide de linalol (3,4% ; 0,8%), β -pinène (0,1% ; 1,8%), octanol (1,6% ; tr), acétate de		0,12% ; 0,74%	Bourgou <i>et al.</i>, 2012

Synthèse bibliographique

	bornyle (tr ; 1,5%) Limonène (91,0% ; 85,4%), acétate de bornyle (tr ; 4,2%), α -terpinène (1,7% ; 0,9%)		0,46% ; 0,52% (fruits à maturité)	
Feuilles Var. Meski	- Isobornéol (30,7 - 55,8%), linalol (3,1 - 23,1%), oxyde de méthyle de carvacryle (0,0 - 15,9%), citronellol (0,0 - 12,2%), acétate de fenchyle (0,7 - 6,3%), terpinolène (0,0 - 5,1%), γ -terpinène (0,0 - 5%), acétate de linalyle (2,8 - 3,9%), terpinéol-4 (1,1 - 2,9%) - Linalol (45,3%), oxyde de méthyle de carvacryle (27,3%), terpinéol-4 (15,5%), 8-hydroymenthanol (7,9%), <i>p</i> -cymène (1,9%), acétate de fenchyle (2,0%)	Tunisie	0,12 - 0,26% 0,33%	Hosni et al., 2013
Ecorce 6 échantillons	Limonène (83,2 - 93,4%), β -myrcène (1,0 - 2,4%), linalol (1,1 - 3,1%), terpinéol-4 (0,0 - 3,9%)	Tunisie	0,71 - 1,41%	Farhat et al., 2020
Au Maroc				
Ecorce 3 variétés	Limonène (63,1% ; 88,2% ; 90,3%), <i>p</i> -cymène (11,6% ; 2,4% ; 0,8%), α -pinène (2,9% ; 6,4% ; 1,5%), α -terpinéol (4,7% ; 0,7% ; 1,1%), linalol (0,2% ; tr ; 1,5%), terpinéol-4 (1,1% ; 0,0% ; 0,3%)	Maroc		Moufida et Marzouk, 2003
Dans le monde				
Zeste	Limonène (94,7%), myrcène (2,0%)	Vietnam	0,13%	Minh Tu et al., 2002
Ecorce	d-Limonène (94,6%), myrcène (1,2%)	Venezuela		Ojeda de Rodríguez et al., 2003
Ecorce 4 variétés	Limonène (93,6 - 94,4%), myrcène (2,0 - 2,1%)	Chine	0,01 - 0,06%	Sawamura et al., 2005
Ecorce 2 variétés	- Limonène (61,1%), α -pinène (0,8%), α -terpinolène (2,1%), citronellol (4,2%), capraldehyde (5,6%), caprinaldehyde (2,1%), citral (7,7%), bornéol (7,6%), linalol (1,3%)	Pakistan	1,21%	Ahmad et al., 2006

Synthèse bibliographique

	- Limonène (76,3%), α -pinène (1,3%), β -pinène (5,5%), α -terpinolène (1,6%), citral (1,7%), 2-hexene-1-ol (1,3%), linalol (2,3%)		0,98%	
Zeste	Limonène (84,2%), linalol (4,4%), myrcène (4,1%), citronellal (1,9%), terpinène (1,3%), géraniol (1,3%)	Inde	Hydrodistillation 1,8%	Sharma et Tripathi, 2008
Zeste	- Limonène (89,7%), myrcène (2,4%), sabinène (1,6%), octanal (1,3%), linalol (1,2%) - Limonène (92,5 %), α -pinène (2,4 %), myrcène (2,2%), linalol (0,9%)	Uganda Rwanda	0,06% 0,05%	Njoroge et al., 2009
Ecorce 2 variétés	Limonène (96,2% ; 96,7%)	Grèce	Hydrodistillation	Michaelakis et al., 2009
Ecorce	Limonène (85,5%), oxyde de cis-limonène (1,0%), myrcène (0,9%)	Espagne		Espina et al., 2011
Ecorce 3 variétés	- D-Limonène (76,0%), myrcène (7,2%), 5-acétyl-2-méthylpyridine (2,2%), d-carvone (2,2%), heneicosane (1,8%), Z-5-nonadécane (1,7%), thujol (1,4%), 4-méthyle proline (1,2%), <i>trans-p</i> -mentha-2,8-diéniol (1,1%), - D-Limonène (74,4%), myrcène (3,7%), d-carvone (4,5%), heneicosane (3,8%), Z-5-nonadécane (2,9%), limonène glycol (1,9%), thujol (1,4%), <i>trans-p</i> -mentha-2,8-diéniol (1,2%) - D-Limonène (69,1%), limonène glycol (7,7%), d-carvone (3,7%), heneicosane (2,6%), 5-acétyl-2-méthylpyridine (2,3%), 4-méthyle proline (2,2%), Z-5-nonadécane (1,9%), thujol (1,8%), <i>trans-p</i> -mentha-2,8-diéniol (1,6%), <i>cis-p</i> -mentha-2,8-diéniol (1,6%)	Pakistan	Hydrodistillation 0,25% 0,21% 0,19%	Khan et al., 2012
Ecorce	Limonène (88,4%), β -myrcène (3,0%), α -pinène (1,2%), β -pinène (1,3%), sabinène (1,00%)	Italie		Campolo et al., 2014
Ecorce	Limonène (90,4%), myrcène (2,8%), sabinène (1,0%), α -pinène (0,8%)	Vietnam		Van Hung et al., 2013

Synthèse bibliographique

Ecorce	D-Limonène (65,3 – 80,2%), β -pinène (1,7 – 5,6%), 3-carène (0,4 – 4,0%), linalol (0,7 – 2,2%), β -phellandrène (0,7 – 2,1%), décanal (0,0 – 1,6%), D-carvone (0,0 – 1,1%), α -ylangène (0,4 – 1,7%)	USA Chine		Hu et al., 2017
Ecorce	Limonène (74,4%), β -myrcène (4,3%), sabinène (3,3%), β -pinène (1,5 %), linalol (1,5%), α -pinène (1,5%), germacrène (1,1%), Z-carvéol (1,1%), camphène (1,0%)	Mexique		Ayala et al., 2017

3.5.2. Activités biologiques de l'orange (*Citrus sinensis*)

En 1998, **Smith-Palmer *et al.***, rapportent que l'huile essentielle de *Citrus sinensis* ne possède aucune activité antimicrobienne contre les souches suivantes : *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* et *Campylobacter jejuni*.

Viuda-Martos *et al.*, 2008 rapportent une faible activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre les champignons filamenteux, à savoir : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum* et *Penicillium chrysogenum*. En effet, ils avancent des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 100% mais à concentration très élevée de l'ordre de 0,94%. En revanche, d'après, **Sharma et Tripathi (2008)**, l'huile essentielle de *Citrus sinensis* a montré une activité antifongique à une concentration de l'ordre de 3 µg/ml, contre *Aspergillus niger*, avec un pourcentage d'inhibition de 100%.

En 2009, **Tao *et al.***, ont déterminé l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, par la méthode de diffusion sur disque et par la méthode de contact direct vis-à-vis de six souches microbiennes. Ils ont montré que cette l'huile essentielle possède une activité contre tous les micro-organismes testés, avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 14,57 mm à 23,37 mm, à l'exception d'*A. niger* qui s'est révélé très résistant. Cependant, ils rapportent des CMI's très importantes variant entre 4,66 et 18,75 µl/ml. De même, **Khan *et al.* (2012)** avancent une bonne activité de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, contre un panel de souches microbiennes : *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *S. epidermis*, *A. flavus* et *Trichophyton album*. En effet, les diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque sont très importants variant entre 14,43 et 38,46 mm. Ces auteurs avancent également une bonne activité antioxydante déterminée par le test de DPPH, avec une CI₅₀ variant entre 1,005 et 2,180 mg/g.

En 2012, **Espina *et al.***, ont testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* par deux méthodes (contact direct et diffusion sur disque) contre cinq souches : *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecium*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les souches bactériennes se sont montrées résistantes. Ils avancent également des CMI's modérées vis-à-vis de *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecium*, allant de 0,5 à 5 µl/ml. Par contre, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* se sont avérés très résistants, avec des CMI's, allant de 30 à >30 µl/ml.

En outre, **Bourgou *et al.*, 2012** ont déterminé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* contre trois bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de la méthode de diffusion sur disque,

Synthèse bibliographique

indiquent que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* étaient les microorganismes les plus sensibles avec des zones d'inhibition variant entre 8,0 et 17,3 mm.

En 2013, **Van Hung et al.**, ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre trois champignons filamenteux : *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum* et *Fusarium proliferatum*. Ils avancent des pourcentages d'inhibition du mycélium très faibles, allant de 34,9 à 59,5%, à une concentration de l'ordre de 2000 ppm.

Djenane (2015) avance un faible pouvoir antibactérien de l'huile essentielle du zeste de *C. sinensis* contre *S. aureus*, avec un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 11,66 mm.

Par ailleurs, **Ben Miri et al.** en 2018 ont étudié les activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle du zeste de *C. sinensis*. Ces auteurs rapportent une très faible activité antioxydante déterminée par deux tests : le piégeage du radical libre DPPH et le test du blanchiment du β -carotène. En effet, ils rapportent une CI_{50} de l'ordre de $752,26 \pm 6,09$ $\mu\text{g/ml}$, contre $306,15 \pm 4,49$ $\mu\text{g/ml}$ pour le BHT, utilisé comme composé de référence et un pourcentage du blanchiment du β -carotène de l'ordre de $55,56 \pm 0,64\%$ contre $94,77 \pm 1,61\%$ pour le BHT. Par ailleurs, l'activité antifongique de l'huile essentielle du zeste de *C. sinensis* a été testée vis-à-vis de dix souches filamenteuses : *A. flavus*, *A. carbonarus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamari*, *A. terreus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* Ils ont obtenu des CMI variant entre 1,5 et 2,0 mg/ml.

Youcef-Ettoumi et al., 2021 ont déterminé l'activité antioxydante par le test de DPPH, de deux échantillons de l'HE de *C. sinensis* extraite par hydrodistillation. Ces échantillons possèdent un fort pouvoir anti-radicalaire, avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre de 1,89 mg/ml et 3,7 mg/ml. Ces mêmes auteurs ont étudié également l'activité antimicrobienne de ces deux échantillons contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*. Seuls *S. aureus* et *C. albicans* se sont révélés sensibles, avec des zones d'inhibition variant entre 17 et 22 mm, mais avec des CMI très importantes allant de 17,48 à 34,96 mg/ml.

En 2019, **Aboudaou et al.** ont réalisé une étude sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste *C. sinensis*. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle présente un faible pouvoir antioxydant ($CI_{50} = 89,25 \pm 345$ $\mu\text{g/l}$) par comparaison au composé de référence tels que le BHT ($CI_{50} = 11,37$ $\mu\text{g/l}$). L'activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste de *C. sinensis* a été également évaluée par **Toscano-Garibay et al.** en 2017. Ils rapportent aussi une très faible activité par rapport au composé de référence testé. En effet, le pourcentage d'inhibition obtenu par le test de DPPH est de l'ordre de 23% à une concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$ contre 88% pour épigallocatechin-3-gallate, utilisé comme témoin positif, à la même concentration.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Matériel végétal

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées d'une part, de déterminer les rendements en huile essentielle de plusieurs pieds individuels et d'autre part, d'évaluer les activités biologiques (antioxydant et antifongique) de l'huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* et *Citrus sinensis*, récoltés dans la région de Tlemcen.

La récolte des fruits de mandariniers et d'orangers a été effectuée dans deux stations : Aïn El Hout (verger 1) et Hennaya (verger 2), situées dans la wilaya de Tlemcen (**Figure 5**).

Pour chaque espèce végétale, la cueillette a été effectuée comme suit :

- *Citrus reticulata* : verger 1 ; 29/01/2022 et verger 2 ; 31/01/2022.
- *Citrus sinensis* : verger 1 ; 05/02/2022 et verger 2 ; 07/02/2022.

L'échantillonnage a été réalisé sur 10 pieds individuels pour chaque espèce et dans chaque verger.

L'identification de cette plante a été réalisée par le Dr F. Hassani (Laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes, université de Tlemcen).

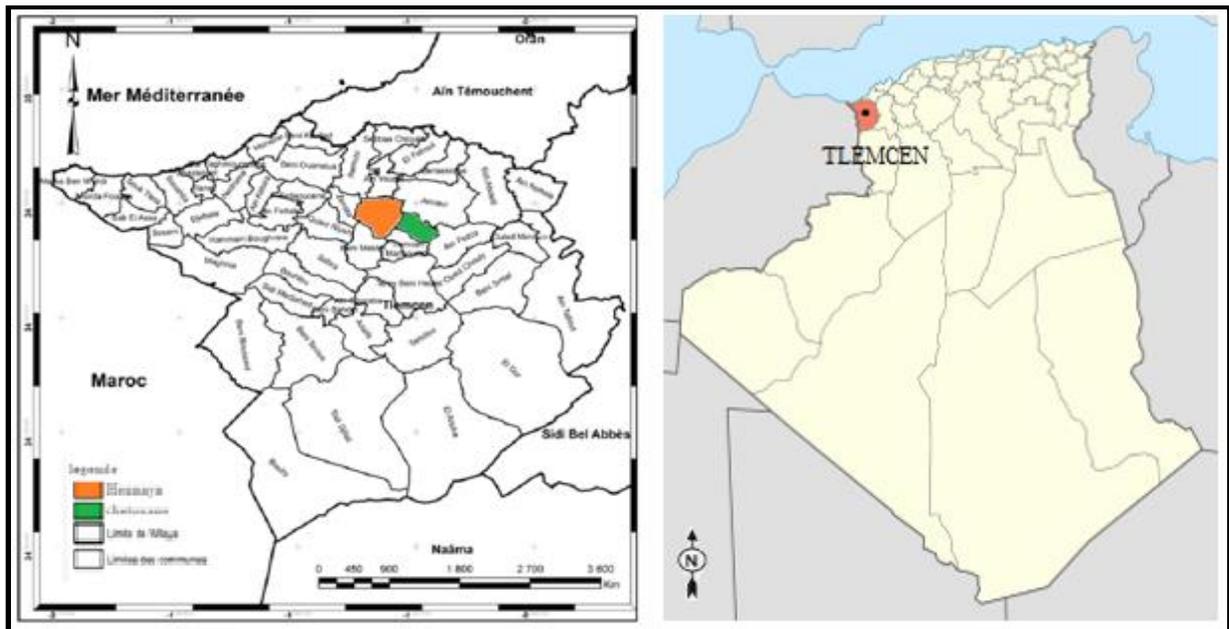


Figure 5 : Situation géographique des lieux de prélèvement

2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de l'écorce des mandarines et de l'écocarpe des oranges douceâtres (**Photo 3 : A, B**) a été effectuée par la méthode hydrodistillation : une simple hydrodistillation (**Photo 3 : D**) et une hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger (**Photo 3 : C**) ou le matériel végétal (écorce) est en contact direct avec le solvant (l'eau), pendant une durée de 2 heures.

Partie expérimentale

Dans un ballon rempli d'eau, nous avons mis le matériel végétal à extraire puis l'ensemble est porté à ébullition. La chaleur permet la libération des composés volatiles sous forme de vapeur qui monte dans la colonne jusqu'à atteindre le réfrigérant. Les vapeurs chargées d'HE, se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation. L'huile (Photo 3 : E) se sépare par la suite de l'eau par la différence de densité.

Pour éviter leur dégradation, due à l'action de l'air ou de la lumière, les huiles essentielles étaient conservées dans des piluliers en verre à $4 \pm 1^\circ \text{C}$ à l'abri de la lumière.

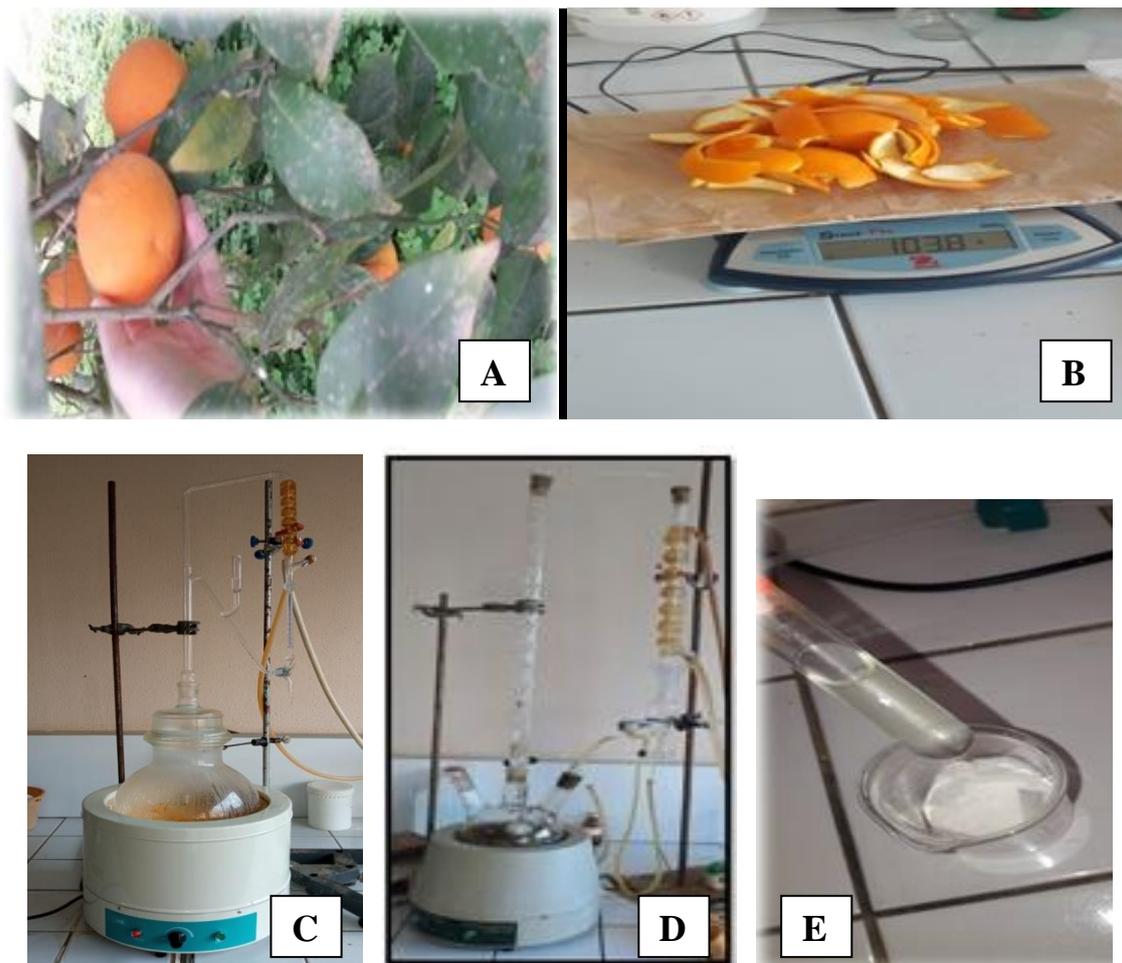


Photo 3 : A : Vue d'ensemble d'un rameau en pleine fructification de *Citrus sinensis* ; B : Pesée des écorces de *Citrus sinensis* ; C : Dispositif d'extraction des HE par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger ; D : Dispositif d'extraction des HE par simple hydrodistillation ; E : Huile essentielle de zeste de *Citrus sinensis*

3. Calcul des rendements en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenu et la masse du matériel végétal sèche à traiter. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \frac{M}{M_0} \times 100$$

- **Rdt %** : Rendement en huile essentielle
- **M** : Masse d'huile essentielle récupéré (g)
- **M₀** : Masse de matière végétale à traiter (g)

4. Etude des activités biologiques des huiles essentielles

Dans cette étude, nous nous sommes proposé d'étudier le pouvoir antimicrobien et antioxydant de l'huile essentielle des zestes de *Citrus*. Ainsi, pour avoir une quantité suffisante afin de pouvoir réaliser les activités biologiques, nous avons mélangé les huiles essentielles des différents échantillons.

4.1. Activité antioxydante des huiles essentielles

Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces et bon marché et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, on a assisté depuis les années 1980 à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydant, qui auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies (**De-Reynal et Multon, 2009**).

Il existe une grande diversité de méthodes pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Parmi ces tests, on peut citer : Capacité antioxydante totale (CAT), Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}), Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), Piégeage du radical-cation ABTS^{•+}, Chélation des ions ferriques...

Dans cette partie, nous avons utilisé la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) pour déterminer l'activité antioxydante de l'huile essentielle d zeste des *Citrus*, en utilisant l'éthanol comme solvant.

4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

L'activité antioxydante des huiles essentielles du zeste des *Citrus* a été évaluée par la mesure de la capacité de réduction d'un radical libre synthétique : le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Ce radical libre présente une coloration violet foncé, lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Talbi et al., 2014**).

Ce dosage spectrophotométrique est basé sur la réduction du radical stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée en DPPH réduit (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) de couleur jaune (**Figure 6**), facilement mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 515 à 520 nm. Cette réduction est due à l'aptitude des composés antioxydants à céder des protons ou des électrons (**Gazi et al., 2004**).

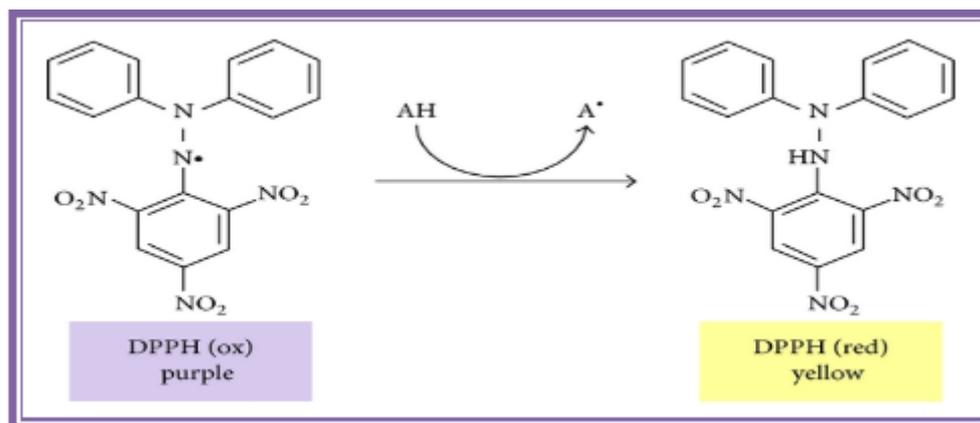


Figure 6 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

➤ Mode opératoire

Le protocole utilisé repose sur la méthode expérimentale rapportée par **Kouame *et al.*** en (2017). 2,5 ml de diverses concentrations (256, 128, 64, 32, 16, 8 et 4 mg/ml) d'huiles essentielles préparées dans de l'éthanol absolu, sont ajoutés à 1 ml d'une solution éthanolique de DPPH à 0,03 mg/ml. Pour chaque concentration, un blanc a été préparé. En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 2,5 ml d'éthanol absolu avec 1 ml d'une solution éthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité de l'huile essentielle a été comparée à l'acide ascorbique en tant que contrôle positif.

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH en pourcentage (%) a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Avec : $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle (nm) ; A_{test} : Absorbance du test effectué (nm). La concentration de l'huile essentielle nécessaire pour la réduction de 50% de la concentration initiale du DPPH•, (CI_{50}), a été calculée à partir du graphique tracé en pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations en huile essentielle.

4.2. Activité antifongique des huiles essentielles

Dans cette étude, nous avons évalué le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Citrus* vis-à-vis de trois champignons, qui sont : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* en utilisant deux méthodes : la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) et la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Partie expérimentale

4.2.1. Provenance des germes

Les souches pathogènes (**Tableau 4**) utilisées ont été choisies pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires, leurs résistances courantes à différents antifongiques et pour leur pathogénicité.

Tableau 4 : Origine des souches fongiques utilisées pour l'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles

Souches fongiques	Code	Origine
<i>Aspergillus flavus</i>	MNHN 994294	MNHN
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MNHN 566	MNHN
<i>Fusarium oxysporum</i>	MNHN 963917	MNHN

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris)

4.2.2. Mise en culture des germes

Une préculture des souches microbiennes est préparée afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. Les suspensions de spores de moisissures, (préparées à partir d'une culture de 7 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, **Photo 4**) sont ajustées à 10^6 spores/ml, ce qui correspond à une transmittance de 68 - 82% ($\lambda = 530$ nm) (**Pfaller et al., 1998**).



Photo 4 : Préparation du milieu de culture gélosé PDA

4.2.3. Méthodes d'étude du pouvoir antifongique des huiles essentielles

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antifongique des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide (**Fernandez et Chemat, 2012**).

Partie expérimentale

4.2.3.1. Détermination de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Cette méthode qualitative teste la sensibilité ou la résistance des micro-organismes par contact direct avec les huiles essentielles. C'est une méthode qui est généralement utilisée pour la présélection de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, car le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité des huiles essentielles mais une indication qualitative de la sensibilité ou de la résistance des germes.

Un disque de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégné de 15 µl d'huile essentielle et de 5 µl de DMSO est déposé sur la surface d'un milieu gélosé en boîte de Pétri (3 disques par boîte, **Photo 5**) préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension (10^4 spores/ml) pendant 10 à 15 min. L'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration.

Le milieu de culture utilisé est le milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis incubées à 25 °C pendant 3 à 5 jours.

Les germes se développent et sont visibles à l'œil nu pendant l'incubation de sorte qu'un halo clair autour du disque indique l'inhibition de la croissance microbienne, dont le diamètre de ce dernier dépend de la sensibilité aux huiles essentielles et est mesuré en mm, disque inclus.

En parallèle, la sensibilité des souches microbiennes, vis-à-vis de : fluconazole (FLU. 25 µg/disque) et l'amphotéricine B (AMB 20 U/disque) a été testée comme contrôle positif et du DMSO (20 µl/disque) comme contrôle négatif.

Les germes se développent sous forme de colonies visibles à l'œil nu pendant l'incubation de sorte qu'un halo clair autour du disque indique l'inhibition de la croissance microbienne, dont le diamètre de la sensibilité aux HEs et est mesuré en mm avec une règle graduée, disque inclus.



Photo 5 : Dépôt des disques imprégnés d'huile essentielle

Partie expérimentale

4.2.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé

En bactériologie médicale, les souches microbiennes sont caractérisées par rapport à leur résistance ou à leur sensibilité aux antimicrobiens par le biais de deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antimicrobien ou d'extrait capable d'inhiber la croissance microbienne. La CMI est la plus faible concentration requise pour l'inhibition complète de l'organisme test en 24 ou 48 heures d'incubation (**Fernandez et Chemat, 2012**).

Pour déterminer les CMI des huiles essentielles vis-à-vis des souches sensibles, nous avons utilisé la méthode de contact direct en milieu gélosé. L'huile essentielle est déposée dans des boîtes de Pétri afin d'effectuer une gamme de concentration de 4 à 6 µl/ml dans le milieu PDA pour les champignons filamenteux, avec pour chaque concentration, son équivalent en DMSO. Le mélange est alors homogénéisé et ensuite refroidi. Après une durée d'incubation de 3 à 5 jours à 25 °C, la lecture des résultats se fait par la présence ou l'absence de la croissance microbienne.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

Les plantes aromatiques ont connu de plus en plus un atout significatif grâce à la valorisation de leurs huiles essentielles dans différentes applications notamment en tant que antioxydant, anti-inflammatoires, antiseptiques, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et tonifiantes,, etc. L'objectif de notre travail indique une évaluation des activités biologique, de deux huiles essentielles des plantes de la famille Rutacée (*Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*), extraites par hydro distillation.

Ainsi, l'objectif de notre travail est d'une part de déterminer les rendements en huile essentielle des zestes de *Citrus* récolté dans stations (Aïn El Hout, verger 1 et Hennaya, verger 2) de la région de Tlemcen et d'autre part d'évaluer les activités biologiques (antioxydante et antifongique) de l'huile essentielle de ces espèces végétales. Nous avons prélevé 40 échantillons sur des pieds individuels, dont 20 échantillons pour chaque espèce :

- *Citrus reticulata* : verger 1 ; 29/01/2022 (E1 - E10) et verger 2 ; 31/01/2022 (E1 - E10).
- *Citrus sinensis* : verger 1 ; 05/02/2022 (E1 - E10) et verger 2 ; 07/02/2022 (E1 - E10).

1. Extraction des huiles essentielles et calcul des rendements

L'extraction des huiles essentielles à partir du zeste des fruits frais des deux espèces de *Citrus* : mandarine (*Citrus reticulata*) et orange douceâtre (*Citrus sinensis*) a été réalisé par une simple hydrodistillation et par une hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger. Les huiles essentielles obtenues sont de couleur jaune clair, avec un aspect liquide et caractérisé par une odeur fraîche, fruitée et acidulée.

Les rendements en huile essentielle sont calculés par rapport à la quantité de la matière végétale fraîche.

1.1. *Citrus reticulata*

Les teneurs en huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* récoltés dans les deux vergers, sont représentés dans les figures 7 et 8, ci-dessous :

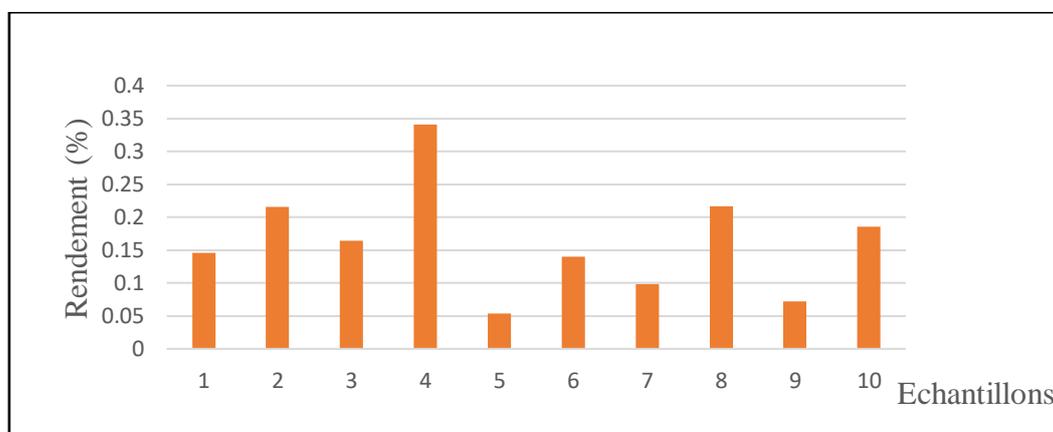


Figure 7 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* récolté dans la station d'Aïn El Hout

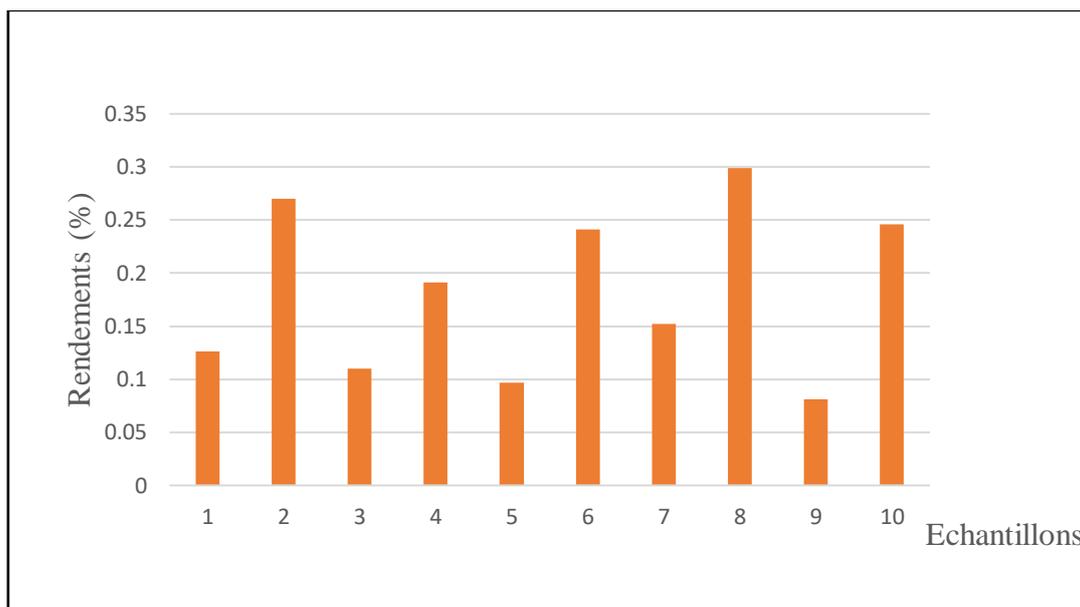


Figure 8 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* récolté dans la station de Hennaya

Selon les figures 7 et 8, les résultats obtenus indiquent que les rendements en huile essentielle sont très variables, allant de 0,05% à 0,34% pour le premier verger et de 0,08% à 0,29% pour le deuxième verger. Cette variabilité existe entre les échantillons récoltés dans la même station d'étude. Par contre, nous avons constaté que la différence des moyennes des rendements entre les deux stations d'étude n'est pas importante (0,16% contre 0,18% ; respectivement) (**Figure 9 et 10**).

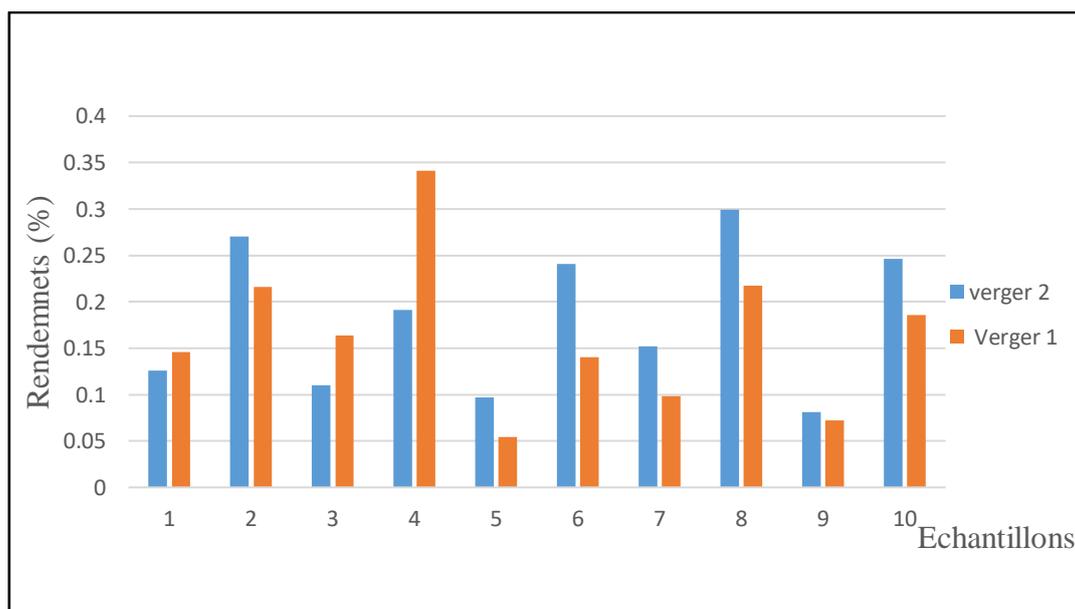


Figure 9 : Comparaison entre les rendements en huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* récolté dans les deux stations d'étude

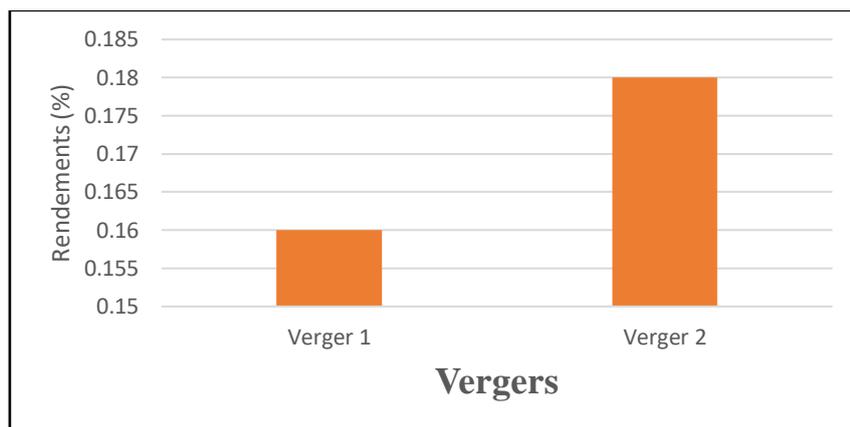


Figure 10 : Moyennes des rendements en huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* relatives aux deux stations d'étude

Par comparaison de nos résultats avec ceux des travaux antérieurs, nous avons constaté que nos rendements (0,05 - 0,34%) sont comparables à ceux cités dans la littérature. En effet, **Khan et al., 2012** rapportent un rendement très faible de l'ordre de 0,04%. De même, **Minh Tu et al., (2002)** avancent une teneur (0,25%) comparable à nos résultats. **Lota et al. en 2000** et en **2001** rapportent également des teneurs faibles, de plusieurs échantillons d'huile essentielle du zeste de *C. reticulata* récoltés en Corse, variant entre 0,05 et 0,60%. De même, **Sawamura et al. (2004)** avancent une teneur de l'ordre de 0,53%. En revanche, selon, une étude rapportée par **Bourgou et al. (2012)**, l'écorce de *Citrus reticulata* originaire de Tunisie est très riche en huile essentielle, avec un rendement largement supérieure à nos teneurs, de l'ordre de 2,70% avant maturité et 1,30% en pleine maturité des fruits.

1.2. *Citrus sinensis*

Les rendements en huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* récoltés dans les deux vergers, sont représentés dans les figures 11 et 12, ci-dessous :

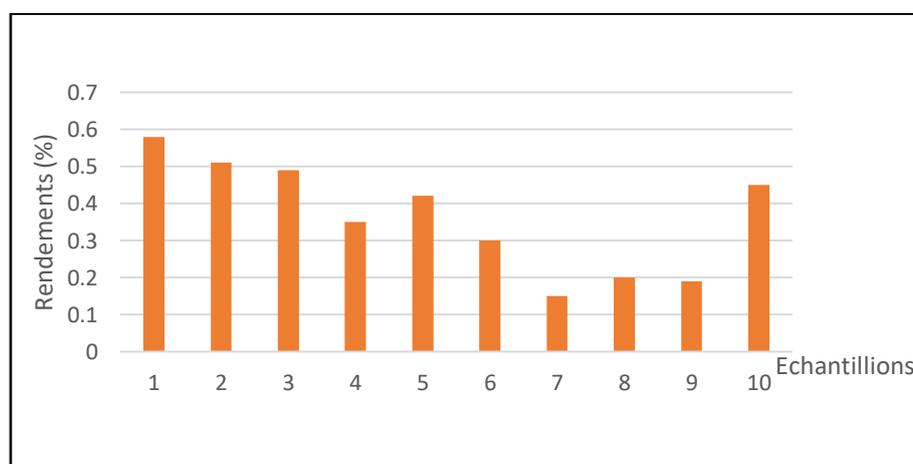


Figure 11 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* récolté dans la station d'Aïn El Hout

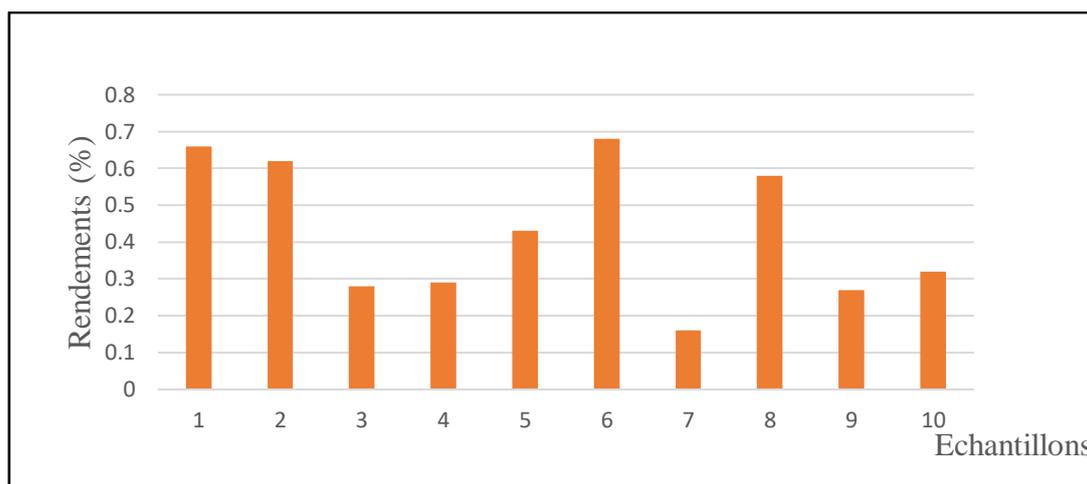


Figure 12 : Rendements (%) en huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* récolté dans la station de Hennaya

Selon les figures 11 et 12, les résultats obtenus indiquent que les rendements en huile essentielle sont très variables, allant de 0,15% à 0,58% pour le premier verger et de 0,16% à 0,68% pour le deuxième verger. Cette variabilité existe entre les échantillons récoltés dans la même station d'étude. Par contre, nous avons constaté que la différence des moyennes des rendements entre les deux stations d'étude n'est pas importante (0,36% contre 0,43%, respectivement) (**Figure 13 et 14**).

Par ailleurs, en comparant les rendements en huiles essentielles des échantillons récoltés dans les deux stations, nous avons constaté que les teneurs en huile essentielle obtenues dans le verger 1 (0,15 - 0,58%) sont légèrement plus importants que celles obtenues dans le verger 2 (0,16 - 0,68%). Cette variabilité est présente entre les échantillons prélevés dans la même station et entre les deux stations d'étude. En effet, la moyenne des rendements obtenue dans le verger 2 est de l'ordre de 0,43%, supérieure à celle obtenue dans le verger 1 (0,36%).

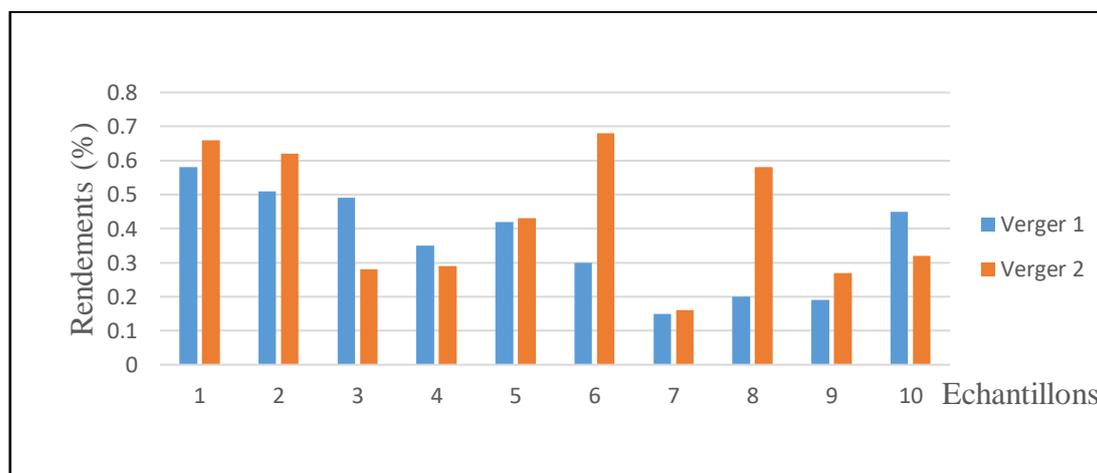


Figure 13 : Comparaison entre les rendements en huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* récolté dans les deux stations d'étude

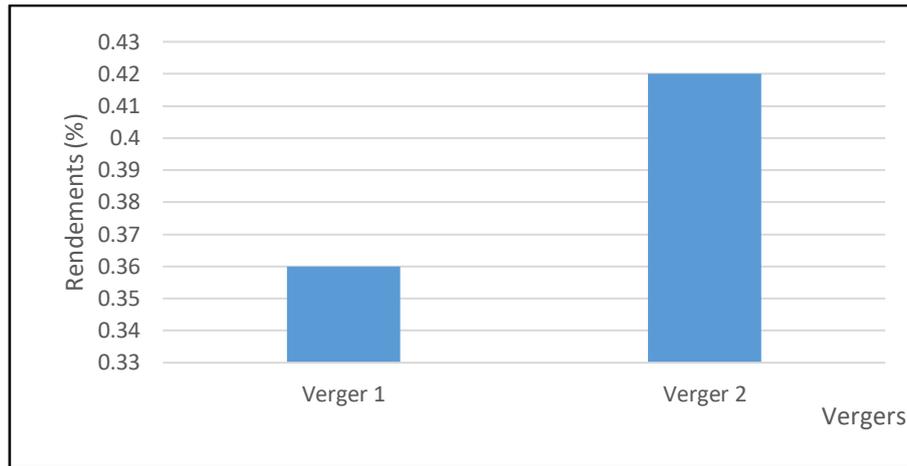


Figure 14 : Moyennes des rendements en huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* relatives aux deux stations d'étude

Par comparaison de nos résultats avec les données de la littérature, nous avons constaté que nos rendements (0,15 - 0,68%) sont comparables à ceux cités dans travaux antérieurs. En effet, ils rapportent des rendements variant entre 0,13 et 0,58% (Minh Tu *et al.*, 2002 ; Ferhat *et al.*, 2006 ; Yáñez Rueda *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2012 ; Djenane *et al.*, 2015 ; Ben Miri *et al.*, 2018 ; Aboudaou *et al.*, 2019). En revanche, certains auteurs avancent des rendements largement supérieurs aux nôtres. Ainsi, Blanco-Tirado *et al.* (1995), ont obtenu une teneur en huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis*, de l'ordre de 0,71%. En 2006, Ahmad *et al.*, rapportent des teneurs plus importante de l'ordre de 0,98 et 1,21% pour deux variétés de *C. sinensis*. Une étude réalisée par Hosni *et al.* en 2010 qui ont travaillé sur plusieurs variétés de *Citrus sinensis*, a montré que les rendements sont très élevées, allant de 1,49 à 2,31%. Ils rapportent également que la variété Meski est la plus riche en huile essentielle, avec une teneur de l'ordre de 2,31%. En revanche, Njoroge *et al.*, 2009, rapportent des rendements très faibles de l'ordre de 0,06 et 0,05% de deux échantillons originaires de Uganda et Rwanda, respectivement. De même, Sawamura *et al.*, 2005 rapportent également des teneurs très faibles variant entre 0,01 et 0,06%, obtenus à partir de l'écorce de 4 variétés de *Citrus sinensis*.

3. Comparaison des rendements entre les deux espèces de *Citrus*

Nous représentons sur la figure 15, les moyennes des rendements en huile essentielle de *Citrus reticulata* et *Citrus sinensis*.

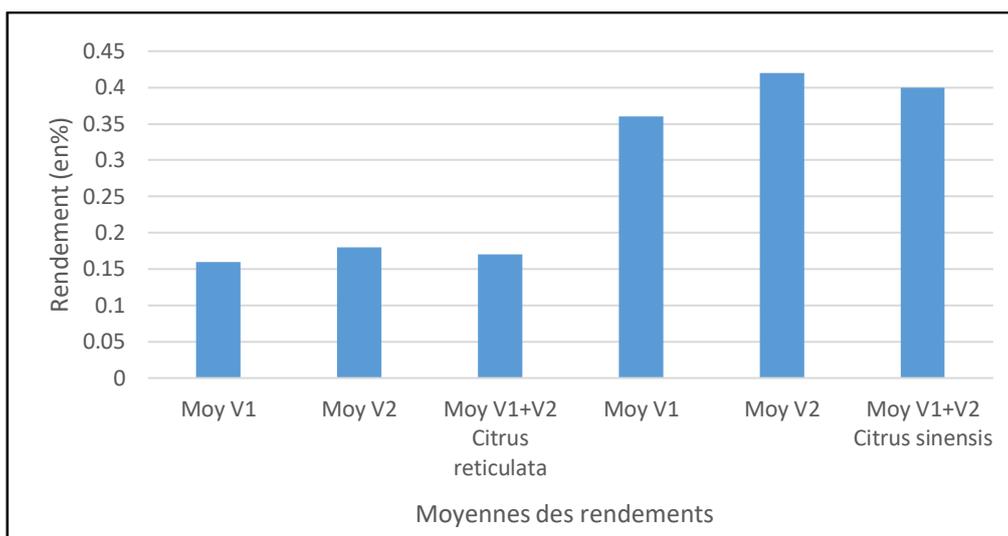


Figure 15 : Moyennes des rendements en huile essentielle du zeste des deux espèces de *Citrus*

Selon la figure, nous avons constaté que le zeste de *Citrus sinensis* est plus riche en huile essentielle que celui de *Citrus reticulata* : 0,40% contre 0,17%.

A l'ombre de ces résultats, nous pouvons conclure que les rendements en huiles essentielles sont influencés par plusieurs paramètres : le climat, la région géographique, la méthode d'extraction de l'huile essentielle, la nature de la matière végétale et la variété cultivée.

2. Etude des activités biologiques des huiles essentielles

Cette partie concerne l'activité antioxydante et l'activité antifongique de l'huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* et de *Citrus sinensis*. Nous avons regroupé les huiles des différents échantillons, afin de disposer de quantités suffisantes pour pouvoir effectuer la totalité des tests. Les échantillons « communelle » sont les suivants : E1 (*Citrus reticulata* : verger 1 et 2) ; E2 (*Citrus sinensis* : verger 1, HS) ; E3 (*Citrus sinensis* : verger 1, HC) ; E4 (*Citrus sinensis* : verger 2, HS) ; E5 (*Citrus sinensis* : verger 2, HC).

2.1. Etude de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle des cinq échantillons (E1, E2, E3, E4 et E5) a été testé par la méthode du piégeage du radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyle (DPPH[•]), en utilisant l'éthanol comme solvant. La mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations. Les résultats sont reportés sur les figures 16, 17, 18, 19 et 20, respectivement.

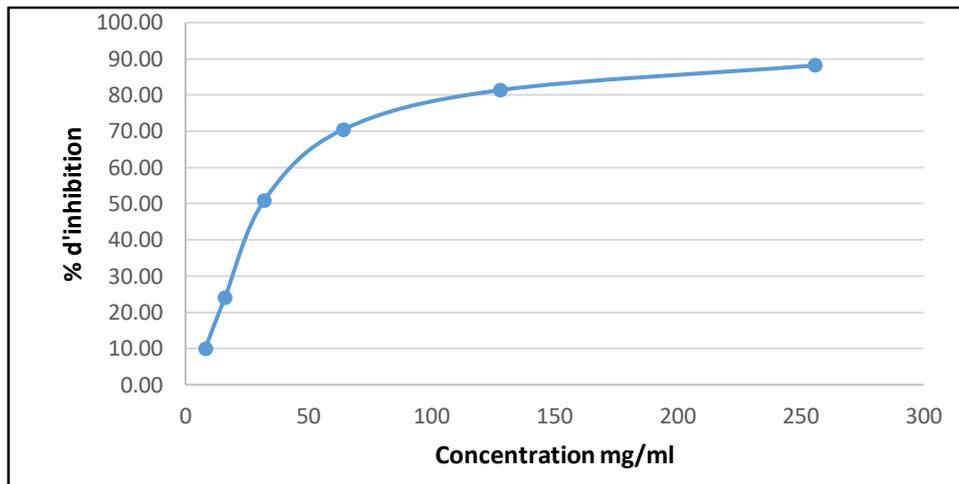


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus reticulata* (échantillon E1)

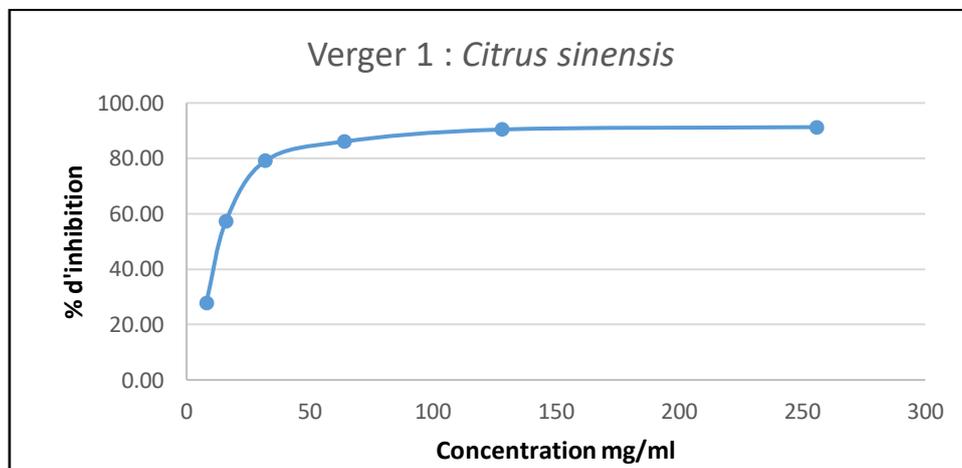


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E2, HS)

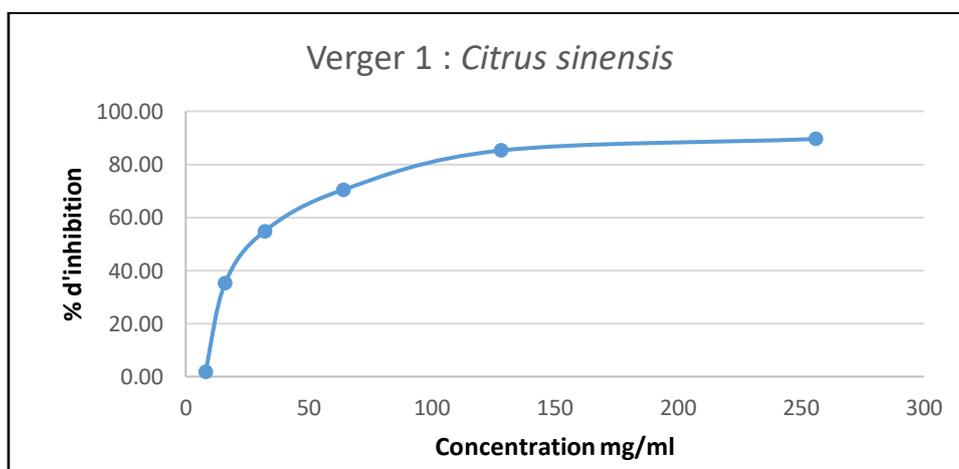


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E3, HC)

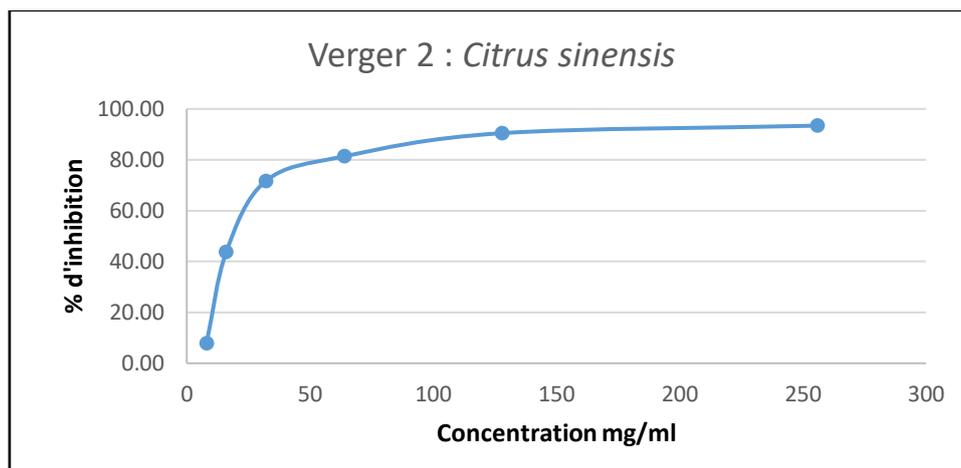


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E4, HS)

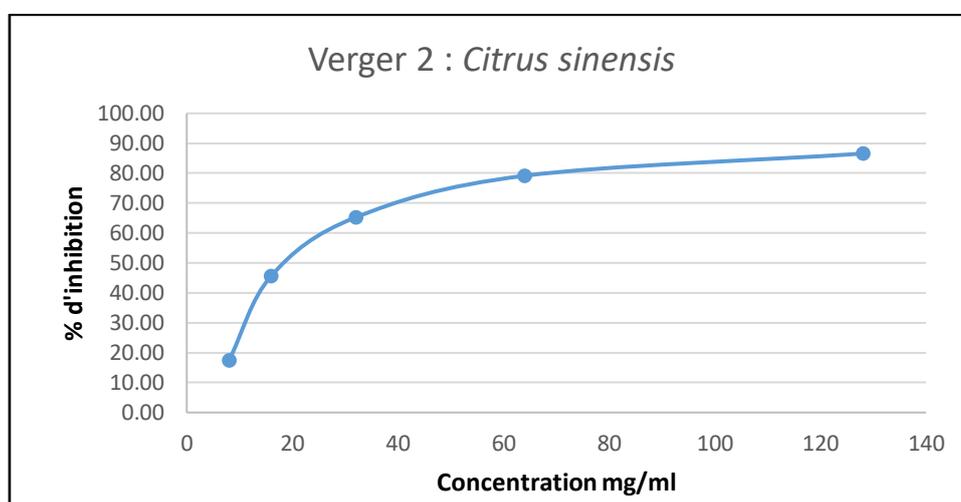


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* (échantillon E5, HC)

Selon les graphes, les échantillons d'huile essentielle de *Citrus sinensis*, obtenue par simple hydrodistillation (E2 et E4) sont les plus actifs, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 91,30% pour le verger 1 et 93,41% pour le verger 2, à une concentration de l'ordre de 256 mg/ml. En revanche, à cette même concentration, nous avons obtenu des pourcentages d'inhibition (89,57% et 86,52%, respectivement) moins important pour les échantillons d'huile essentielle de *Citrus sinensis*, obtenue par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger (E3 et E5). De même, l'échantillon de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* (E1), s'est montré moins actif, avec un pourcentage d'inhibition (88,18%) comparable à ceux des échantillons E3 et E5.

Résultats et discussion

Par ailleurs, nous avons constaté que les pourcentages d'inhibition sont comparables entre les deux concentrations 128 et 256 mg/ml et ceci pour les différents échantillons testés (Tableau 5).

Tableau 5 : Pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH aux concentrations 128 et 256 mg/ml

Echantillons	128 mg/ml	256 mg/ml
E1 (<i>C. reticulata</i>)	81,36	88,18
E2 (<i>C. sinensis</i>, V1 HS)	90,43	91,30
E3 (<i>C. sinensis</i>, V1 HC)	85,22	89,57
E4 (<i>C. sinensis</i>, V2 HS)	90,45	93,41
E5 (<i>C. sinensis</i>, V2 HC)	79,13	86,52

V1 et V2, Verger 1 et 2, respectivement ; HS : simple hydrotistillation ; HC : Hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger

Par comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons constaté que notre échantillon (E1, *C. reticulata*) présente une activité antioxydante moins importante. En effet, **Frassinetti et al.** en **2011** rapporte un fort pouvoir antioxydant comparable à celui du composé de référence testé. Ainsi, le pourcentage d'inhibition obtenu par le test de DPPH* est de l'ordre de 60% à une concentration de 1000 µg/ml contre 70% pour le trolox.

Les valeurs des CI_{50} (Tableau 6), expriment la quantité d'un antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Elles nous permettent de comparer l'efficacité des huiles essentielles des différents échantillons. Nous rappelons que plus la valeur de la CI_{50} est faible plus l'huile essentielle possède un potentiel pour le piégeage des radicaux libres.

Tableau 6 : Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'huile essentielle Des différents échantillons testés exprimée en CI_{50}

Echantillons	CI_{50} (mg /ml)
E1 (<i>C. reticulata</i>)	38,04 ± 4,11
E2 (<i>C. sinensis</i>, V1 HS)	12,81 ± 0,09
E3 (<i>C. sinensis</i>, V1 HC)	35,35 ± 2,56
E4 (<i>C. sinensis</i>, V2 HS)	24,44 ± 1,05
E5 (<i>C. sinensis</i>, V2 HC)	22,45 ± 2,87
Acide ascorbique	0,02 ± 0,001

Résultats et discussion

Conformément à ces données, l'huile essentielle de *Citrus sinensis* E2 présente la plus importante activité antioxydante, avec une CI_{50} de l'ordre de $12,81 \pm 0,09$ mg/ml. Cependant, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé : acide ascorbique, $CI_{50} = 0,02 \pm 0,001$ mg/ml. En revanche, l'échantillon E1 (*C. reticulata*), s'est montré le moins actif, avec une CI_{50} la plus importante, de l'ordre de $38,04 \pm 4,11$ mg/ml.

Par ailleurs, nous avons obtenu des CI_{50} comparables pour l'huile essentielle des deux échantillons (E4 et E5) du verger 2, obtenue par deux types extraction différentes, CI_{50} de l'ordre de $24,44 \pm 1,05$ et de $22,45 \pm 2,87$ mg/ml, respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Aboudaou et al. (2019)**, qui ont réalisé une étude sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste *C. sinensis*. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle présente un faible pouvoir antioxydant ($CI_{50} = 89,25 \pm 345$ µg/l) par comparaison au composé de référence tels que le BHT ($CI_{50} = 11,37$ µg/l). L'activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste de *Citrus sinensis* a été également évaluée par **Toscano-Garibay et al. en 2017**. Ils rapportent aussi une très faible activité par rapport au composé de référence testé. En effet, le pourcentage d'inhibition obtenu par le test de DPPH* est de l'ordre de 23% à une concentration de 80 µg/ml contre 88% pour épigallocatechin-3-gallate, utilisé comme témoin positif, à la même concentration. **Ben Miri et al. en 2018** rapportent également une très faible activité antioxydante de l'huile essentielle du zeste de *C. sinensis* déterminée par le piégeage du radical libre DPPH. En effet, ils rapportent une CI_{50} de l'ordre de $752,26 \pm 6,09$ µg/ml, contre $306,15 \pm 4,49$ µg/ml pour le BHT, utilisé comme composé de référence.

En revanche, **Youcef-Ettoumi et al., 2021** rapportent possèdent un fort pouvoir anti-radicalaire de deux échantillons, avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre de : 1,89 mg/ml et 3,7 mg/ml. Ces auteurs ont déterminé l'activité antioxydante par le test de DPPH, de deux échantillons de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* extraite par hydrodistillation selon deux méthodes. De même, **Khan et al. (2012)** rapportent des CI_{50} très faibles variant entre 1,007 et 2,180 mg/g. Ces auteurs ont testé l'activité antioxydante par le test de DPPH, de trois échantillons de *C. sinensis* et un échantillon de *C. reticulata*.

2.2. Etude de l'activité antifongique

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* et de *Citrus sinensis* a été testée contre 3 souches filamenteux : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *Fusarium oxysporum* en utilisant deux méthodes : la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) et la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Résultats et discussion

2.2.1. Détermination de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Nous avons testé trois échantillons « communelle » : E1 (*Citrus reticulata* : verger 1 et 2) ; ES1 (*Citrus sinensis* : verger 1, HS et HC) ; ES2 (*Citrus sinensis* : verger 2, HS et HC).

Les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle des trois échantillons sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des trois échantillons relatives aux souches filamenteuses selon la méthode de diffusion sur disque (moyenne \pm écart type)

Champignons filamenteux	Contrôle positif	Huile essentielle (15 μ l//disque)			Contrôle négatif DMSO 20 μ l//disque
	AMB 20 U/disque	E1	ES1	ES2	
<i>Aspergillus flavus</i>	6,0 \pm 0,0	9,0 \pm 1,0	10,6 \pm 1,0	7,0 \pm 1,7	6,0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11,5 \pm 2,1	6,0 \pm 0,0	14,3 \pm 1,0	15,0 \pm 0,0	6,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,0 \pm 0,0	8,5 \pm 0,5	6,0 \pm 0,0	6,0 \pm 0,0	6,0

AMB : Amphotéricine B

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Selon le tableau 7, nous avons constaté une activité antifongique faible, voire modérée des trois échantillons testés.

Les deux échantillons (ES1 et ES2) de *Citrus sinensis* se sont montrés actifs contre *Aspergillus fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition de l'ordre de 14,3 et 15,0 mm. Cependant, cette activité reste modérée.

Nous avons remarqué aussi une faible sensibilité (10,6 mm et 9,0 mm) d'*Aspergillus flavus* vis-à-vis de l'échantillon ES1 (**Photo 6**) et de l'échantillon E1 (**Photo 7**). De même, **Khan et al. (2012)** rapportent une faible activité de l'huile essentielle de *C. reticulata* contre *Aspergillus flavus*, avec une zone d'inhibition de l'ordre de 12,40 mm. Par contre, ils avancent que l'huile essentielle de *C. sinensis* est très active vis-à-vis d'*Aspergillus flavus*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 27,88 et 30,81 mm.

En revanche, *Fusarium oxysporum* s'est montré le plus résistant, en particulier vis-à-vis des deux échantillons de *Citrus sinensis*.



Photo 6 : Inhibition faible d'*Aspergillus flavus* par l'échantillon ES1 de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*



Photo 7 : Inhibition faible d'*Aspergillus flavus* par l'échantillon E1 de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*

2.2.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé

Nous avons également déterminé les concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé. La CMI correspond à la plus faible concentration en agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'un micro-organisme donné. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 8.

Résultats et discussion

Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle des trois échantillons relatives aux moisissures testées selon la méthode de contact direct

Champignons filamenteux	Echantillon E1 (µl/ml)	Echantillon ES1 (µl/ml)	Echantillon ES1 (µl/ml)
<i>Aspergillus flavus</i>	> 6	> 6	> 6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 6	6	6
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	> 6	> 6

Selon le tableau 9, les trois échantillons possèdent une très faible activité antimicrobienne vis-à-vis des souches fongiques testées. Seul *Aspergillus fumigatus* (Photo 8) s'est révélé sensible aux échantillons de *Citrus sinensis* (ES1 et ES2), mais avec une CMI élevée de l'ordre de 6 µl/ml.

Nous avons constaté également une très faible croissance d'*Aspergillus flavus* (Photo 9), vis-à-vis de l'échantillon E1, à la concentration de 6 µl/ml. De même, nous avons remarqué également une très faible croissance de *Fusarium oxysporum* (Photo 10 et 11), vis-à-vis des échantillons ES1 et ES2, à la même concentration.



Photo 8 : Sensibilité d'*Aspergillus fumigatus* à l'échantillon ES2 de l'huile essentielle de *C. sinensis* à la concentration de 6 µl/ml



Photo 9 : Sensibilité d'*Aspergillus flavus* à l'échantillon E1 de l'huile essentielle de *C. reticulata* à la concentration de 6 µl/ml

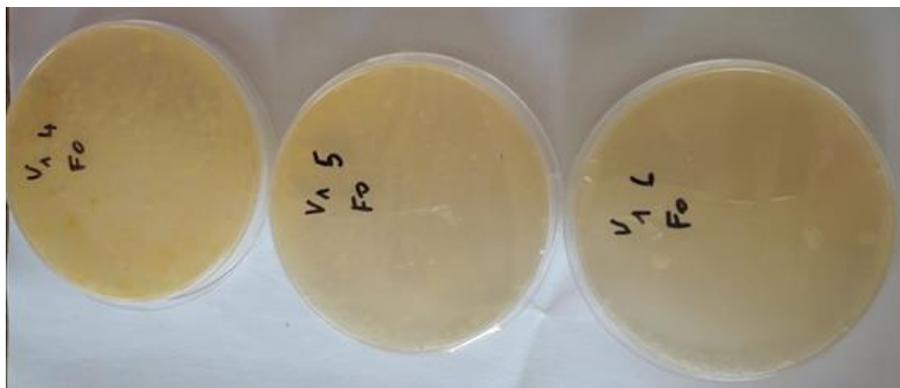


Photo 10 : Sensibilité de *Fusarium oxysporum* à l'échantillon ES1 de l'huile essentielle de *C. sinensis* à la concentration de 6 µl/ml



Photo 11 : Sensibilité de *Fusarium oxysporum* à l'échantillon ES2 de l'huile essentielle de *C. sinensis* à la concentration de 6 µl/ml

2.2.2. Discussion

2.2.2.1. *Citrus reticulata*

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, **Viuda-Martos et al., 2008** rapportent aussi une faible activité antifongique de l'huile essentielle de

Résultats et discussion

C. reticulata contre les champignons filamenteux, à savoir : *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium verrucosum* et *P. chrysogenum*. En effet, ils avancement des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 100% mais à concentration très élevée de l'ordre de 0,94%.

Chutia et al., 2009 avancement également des pourcentages d'inhibition du mycélium par contact direct, de 100% à une concentration de l'ordre de 0,2 ml/100ml contre *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata* et *Fusarium oxysporum* et à une concentration supérieure à 0,2 ml/100ml contre *Rhizoctonia solani* et *Helminthosporium oryzae*.

En 2013, **Van Hung et al.**, ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* contre trois champignons filamenteux : *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum* et *Fusarium proliferatum*. Ils avancement des pourcentages d'inhibition du mycélium très faibles, allant de 37,1 à 50,9%, à une concentration de l'ordre de 2000 ppm.

Récemment, **Boughendjioua**, en 2019 ont réalisé une étude sur l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata* collecté à Skikda. L'huile essentielle a exercé une très faible activité inhibitrice vis-à-vis des champignons testés. Les deux souches fongiques ; *Fusarium oxysporum* et *Alternaria sp.* ont été inhibées à partir de la concentration (1/1000, v/v) et (1/2000, v/v), respectivement.

En revanche, l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* été testée également par **Hamadi et Allem en 2015**. Ces auteurs rapportent des CMI's très faibles de l'ordre de 1,0 et 0,1 mg/ml contre *Penicelium sp.* et *Alternaria alternata*, avec un effet fongicide. De même, ils ont obtenu des pourcentages d'inhibition des souches fongiques de l'ordre de 100%, à une concentration de l'ordre de 0,05 mg/ml contre *Fusarium oxysporum* et *Fusarium sp.*, 0,1 mg/ml contre *Alternaria sp.* et 1 mg/ml contre *Penicillium sp.*

2.2.2.1. *Citrus sinensis*

Nos résultats sont également en accord avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, **Viuda-Martos et al., 2008** rapportent une faible activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre les champignons filamenteux, à savoir : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum* et *Penicillium chrysogenum*. En effet, ils avancement des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 100% mais à concentration très élevée de l'ordre de 0,94%.

En revanche, d'après, **Sharma et Tripathi (2008)**, l'huile essentielle de *Citrus sinensis* à montré une activité antifongique à une concentration de l'ordre de 3 µg/ml, contre *Aspergillus niger*, avec un pourcentage d'inhibition de 100%.

Résultats et discussion

De même, en 2013, **Van Hung et al.**, ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* contre trois champignons filamenteux : *Mucor hiemalis*, *Penicillium expansum* et *Fusarium proliferatum*. Ils avancent des pourcentages d'inhibition du mycélium très faibles, allant de 34,9 à 59,5%, à une concentration de l'ordre de 2000 ppm.

En 2009, **Tao et al.**, ont déterminé l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. sinensis* par la méthode de diffusion sur disques et par la méthode de contact direct vis-à-vis de six souches microbiennes. Ils ont montré que cette l'huile essentielle possède une bonne activité contre tous les micro-organismes testés, avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 14,57 mm à 23,37 mm, à l'exception d'*Aspergillus flavus* qui s'est révélé très résistant. Cependant, ils rapportent des CMI's très importantes variant entre 4,66 et 18,75 µl/ml, ce qui correspond à un très faible pouvoir antifongique.

En revanche, l'activité antifongique de l'huile essentielle du zeste de *C. sinensis* a été testée vis-à-vis de dix souches filamenteuses : *A. flavus*, *A. carbonarus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochracus*, *A. tamari*, *A. terreus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*. Ils avancent une bonne activité antifongique, des CMI's variant entre 1,5 et 2,0 mg/ml (**Ben Miri et al., 2018**).

Conclusion

Conclusion

La nature est pleine de ressources naturelles aux vertus bénéfiques pour l'être humain. En Algérie, la médecine traditionnelle et plus particulièrement les traitements à base de plantes est bien développé.

Dans le but de la valorisation de plantes aromatiques médicinales appartenent à la famille de Rutacées, nous nous sommes intéressées à deux espèces végétales, à savoir : *Citrus reticulata* (mandarine) et *Citrus sinensis* (orange douceâtre), récoltés dans deux stations (Aïn El Hout, verger 1 et Hennaya, verger 2) de la région de Tlemcen, en déterminant les rendements en huiles essentielles du zeste (épicarpe), ainsi que leurs pouvoir antioxydant et antifongique.

Nous avons récolté 20 échantillons sur des pieds individuels pour chaque espèce de *Citrus* (10 échantillons par station). L'extraction des huiles essentielles à partir de zeste par hydrodistillation avec un appareil du type Clevenger et du type simple.

Dans premier axe, nous avons déterminé les rendements en huile essentielles des deux espèces. Les résultats obtenus indiquent que les rendements en huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* sont très variables, allant de 0,05% à 0,34% pour le premier verger et de 0,08% à 0,29% pour le deuxième verger. Par contre, nous avons constaté que la différence des moyennes des rendements entre les deux stations d'étude n'est significative (0,16% contre 0,18%, respectivement). Les teneurs en huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* sont également très variables, allant de 0,15% à 0,58% pour le premier verger et de 0,16% à 0,68% pour le deuxième verger. Par contre, nous avons constaté que la différence des moyennes des rendements entre les deux stations d'étude n'est significative (0,36% contre 0,43%, respectivement). Cependant, cette variabilité existe entre les échantillons récoltés dans la même station d'étude pour les deux espèces. En revanche, nous avons constaté que le zeste de *Citrus sinensis* est plus riche en huile essentielle que celui de *Citrus reticulata* : 0,40% contre 0,17%, respectivement.

Ensuite, nous avons regroupé l'huile essentielle des différents échantillons, pour avoir suffisamment d'huile essentielle et pouvoir effectuer les activités biologiques. Ainsi, nous avons constitué les échantillons « communelle » suivants : E1 (*C. reticulata* : verger 1 et 2) ; E2 (*C. sinensis* : verger 1, HS) ; E3 (*C. sinensis* : verger 1, HC) ; E4 (*C. sinensis* : verger 2, HS) ; E5 (*C. sinensis* : verger 2, HC) ; ES2 (*C. sinensis* : verger 1, HS et HC) ; ES3 (*C. sinensis* : verger 2, HS et HC).

Dans le deuxième axe, nous avons étudié les activités antioxydant et antifongique de plusieurs échantillons appartenant aux deux espèces du genre *Citrus*. L'évaluation du pouvoir antioxydant (E1, E2, E3, E4 et E5), par la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH a

Conclusion

montré que les huiles essentielles étudiés ont tous une activité antiradicalaire. Cependant, l'huile essentielle de *C. sinensis* E2 présente la plus importante activité antioxydante, avec une CI_{50} de l'ordre de $12,81 \pm 0,09$ mg/ml. Cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé : acide ascorbique, $CI_{50} = 0,02 \pm 0,001$ mg/ml. En revanche, l'échantillon E1 (*C. reticulata*), s'est montré le moins actif, avec une CI_{50} la plus importante, de l'ordre de $38,04 \pm 4,11$ mg/ml.

Enfin, l'activité antifongique de trois échantillons (E1, ES1 et ES2) a testé vis-à-vis de trois souches filamenteuses : *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*, en utilisant 2 méthodes : la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) et la méthode de contact direct en milieu gélosé. Nous avons constaté une activité antifongique faible, voire modérée des trois échantillons testés. Seuls, les deux échantillons (ES1 et ES2) de *Citrus sinensis* se sont montrés actifs contre *Aspergillus fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition de l'ordre de 14,3 et 15,0 mm, mais avec une CMI élevée de l'ordre de 6 μ l/ml. Cependant, cette activité reste modérée. Nous avons constaté également une très faible croissance d'*Aspergillus flavus* vis-à-vis de l'échantillon E1, à la concentration de 6 μ l/ml. De même, nous avons remarqué également une très faible croissance de *Fusarium oxysporum* vis-à-vis des échantillons ES1 et ES2, à la même concentration.

Toutefois, il serait intéressant aussi de compléter cette étude par :

- La caractérisation chimique de l'huile essentielle du romarin des différents échantillons ;
- Une analyse statistique de la composition des différents échantillons afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique ;
- L'évaluation d'autres activités biologiques : anti-inflammatoires ... ;

Il serait intéressant aussi d'isoler les molécules bioactives pour la recherche d'un remède naturel et trouver de nouvelles applications thérapeutiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aboudaou, M., Ferhat, M. A., Hazzit, M., Ariño, A., & Djenane, D. (2019).** Solvent free-microwave green extraction of essential oil from orange peel (*Citrus sinensis* L.): effects on shelf life of flavored liquid whole eggs during storage under commercial retail conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 3162-3172.
- Ahmad, M.M., Rehman, S., Iqbal, Z., Anjum, F.M. & Sultan, J.I. (2006).** Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pak. J. Bot.*, 38: 319-324.
- Ainane, A., Khammour, F., Talbi, M., Charaf, S., Elabboubi, M., El Kouali, M., Bricha, M.R., Abba, El-H., Cherroud, S., Ainane, T. (2018).** Chemical characterizations of the aromatic compositions of two *Citrus* species: *Citrus aurantium* and *Citrus reticulata*. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, 2(3), 80-83.
- Arriaga-Alba, M., Rivera-Sánchez, R., Parra-Cervantes, G., Barro-Moreno, F., Flores-Paz, R., & García-Jiménez, E. (2000).** Antimutagenesis of β -carotene to mutations induced by quinolone on *Salmonella typhimurium*. *Archives of medical research*, 31(2), 156-161.
- Association Française de normalisation (AFNOR). (2000).** 12973 Management par la valeur—Principes—Mise en œuvre—Outils. Paris, AFNOR Editions.
- Ayala, J. R., Montero, G., Campbell, H. E., García, C., Coronado, M. A., León, J. A., & Pérez, L. J. (2017).** Extraction and characterization of orange peel essential oil from Mexico and United States of America. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(4), 897-914.
- Bachès, B., Bachès, M. (2002).** Agrumes : comment les choisir et les cultiver facilement. Editeur : Ulmer, Paris, 96p.
- Ben Miri, Y., Arino, A., & Djenane, D. (2018).** Study of antifungal, anti-aflatoxicogenic, antioxidant activity and phytotoxicity of Algerian *Citrus limon* var. *eureka* and *Citrus sinensis* var. *valencia* essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(2), 345-361.
- Bruneton, J. (1987).** Drogues à sapogénines triterpéniques pentacycliques. *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*. Ed. Lavoisier, Paris, 585p.
- Boughendjioua, H., Hafsa, A., & Kadach, A. (2019).** Antiacetylcholinesterase activity of sweet Orange (*Citrus sinensis*) essential oil from Algeria. *Algerian Journal of Natural Products*, 7(2), 701-705.
- Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I., & Saïdani Tounsi, M. (2012).** Changes of peel essential oil composition of four Tunisian *Citrus* during fruit maturation. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/528593
- Campolo, O., Romeo, F. V., Malacrinò, A., Laudani, F., Carpinteri, G., Fabroni, S., & Palmeri, V. (2014).** Effects of inert dusts applied alone and in combination with sweet orange essential oil against *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) and wheat microbial population. *Industrial crops and products*, 61, 361-369.
- Chutia, M., Bhuyan, P. D., Pathak, M. G., Sarma, T. C., & Boruah, P. (2009).** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 777-780.

Références bibliographiques

- Colombo, A. (2004).** La culture des agrumes. Ed. Vecchi S.A, Paris, 133p.
- De-Reynal, B., Multon, J.L. (2009).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 4^{ème} édition Tec & Doc Lavoisier, Paris, 736p.
- Djenane D (2015).** Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian *Citrus* essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4, 208-228.
- Farhat, I., Hammami, M., Cherif, M., & Nasraoui, B. (2020).** Chemometric analysis of geographic origins and compositions of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Maltaise demi sanguine' essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 216-226.
- Favela-Hernández, J.M.J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M.A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M.D.R. (2016).** Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*, 21(2), 247.
- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006).** An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112, 121-126.
- Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Cini, M., Della Croce, C.M., & Maserti, B.E. (2011).** Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1), 27-31.
- Gazi, M.R., Kanda, K., Yasuda, M., Kato, F. (2004).** Optimization of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *Sporobolomyces salmonicolor*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 1365-1370.
- Hamdani, F. Z., Allem, R., Meziane, M., Setti, B., Ali, A.S., Bourai, M. (2015).** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian *Citrus*. *African Journal of Biotechnology*, 14(12), 1048-1055.
- Hellal, Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou.
- Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., & Sebei, H. (2010).** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.
- Hosni, K., Hassen, I., M'Rabet, Y., Sebei, H., & Casabianca, H. (2013).** Genetic relationships between some Tunisian *Citrus* species based on their leaf volatile oil constituents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 65-71.
- Hu, W., Zhang, N., Chen, H., Zhong, B., Yang, A., Kuang, F., & Chun, J. (2017).** Fumigant activity of sweet orange essential oil fractions against red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, 110(4), 1556-1562.

Références bibliographiques

- Jehad, M. Y., & Azza, M.M. (2015).** Prophylactic role of B vitamins against bulk and zinc oxide nanoparticles toxicity induced oxidative DNA damage and apoptosis in rat livers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 175-184.
- Jacquemond, C., Curk, F., Heuzet, M. (2013).** Les clémentiniers et autre petits agrumes. Ed. Quae, France, 368p.
- Kim, H.J., Chang, W.K., Kim, M.K., Lee, S.S., & Choi B.Y. (2002).** Dietary factors and gastric cancer in Korea: a case-control study. *International journal of cancer*, 97, 531-535.
- Khan, M. M., Iqbal, M., Hanif, M. A., Mahmood, M. S., Naqvi, S. A., Shahid, M., & Jaskani, M. J. (2012).** Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 972-979.
- Kouame, C., Ouattara, Z.A., Konan, M.K., N’Gaman-Kouassi, C.K.C., Tomi, F., Mamyrbekova-Bekro, J.A., & Bekro, Y.A. (2017).** Quantitative organic composition and antioxidant potential of the essential oil from *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae) acclimated in Cote d’Ivoire. *Int. J. Curr. Res.*, 10, 73602-73605.
- Lagha-Benamrouche, S., Addar, L., Boudershem, H., Tani, S., & Madani, K. (2017).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology*, (18), 28-35.
- Lim, T.K. (2012).** *Citrus reticulata* Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. *Springer sciences et Business Media*, 4, 695-715.
- Loeillet, D. (2010).** Agrumes et jus d'orange. In : Cyclope 2010 : les marchés mondiaux. "La renaissance du Palais d'Eté". Paris : Economica, 421-424.
- Lota, M.L., de Rocca Serra, D., Tomi, F., & Casanova, J. (2000).** Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(1), 61-78.
- Lota, M.L., de Rocca Serra, D., Tomi, F., & Casanova, J. (2001).** Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(1), 77-104.
- Loussert, R. (1989).** Les agrumes volume 2 : production. Edition Lavoisier, Paris, 157p.
- Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S.A. (2012).** History, global distribution, and nutritional importance of *Citrus* fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, 11(6), 530-545.
- Mabberly, D.J.(1997).** A classification for edible *Citrus*. *Telopea*, 7, 167-172.
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G., & Liu, D. (2008).** Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(3), 227-232.
- Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Conforti, F., De Luca, D., Statti, G. A., & Tundis, R. (2011).** Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic

Références bibliographiques

potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1549-1555.

Minh Tu, N.T., Thanh, L.X., Une, A., Ukeda, H., Sawamura, M. (2002). Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerines and lime peel oils. *Flavour Fragr. J.*, 17(3): 169-174.

Maurice, N. (1997). De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIème siècle. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 12-14p.

Moufida, S., & Marzouk, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62(8), 1283-1289.

Mukhtar, R.A.S.H.I.D., Khan, M.M., Fatima, B., Abbas, M., & Shahid, A.D.N.A.N. (2005). *In vitro* regeneration and multiple shoots induction in *Citrus reticulata* (Blanco). *Int. J. Agric. Biol*, 7(3), 414-416.

Njoroge, S.M., Phi, N.T.L., & Sawamura, M. (2009). Chemical composition of peel essential oils of sweet oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(1), 26-33.

Ollitrault, P., Dambier, D., Teisson, C., & Bakry, F. (1997). Somatic hybridization for triploid easy peeler *Citrus* breeding. In : ISHS. Commission B. *International symposium on biotechnology of tropical and subtropical species. Conference handbook and abstracts*. s.l. : Commission Biotechnology, p. 98-98, 1, 1997-09-29/1997-10-03, Brisbane (Australie).

Papachristos, D.P. Stamopoulos, D.C. (2002). “Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae)”, *Journal of Stored Products Research*, 38, 117-128.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Karlsson, Å., Bolmström, A. (1998). Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2586-2589.

Pierangeli, G. Vital., Windell L. Rivera., (2009). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L.f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *J. Medicinal Plants Res*, 3(7), 511-518.

Praloran, J.C. (1971). Les agrumes, techniques agricole et productions tropicale. Ed. Maisonneuve et Larousse, Paris, 561p.

Phillips, C.A., Laird, K., Allen, S.C. (2012). The uses of Citri-V™ - Year antimicrobial *Citrus* essential oil vapor for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. *Food Res. Int.*, 47, 310-314.

Rapisarda, P., Fabroni, S., Peterek, S., Russo, G., & Mock, H.P. (2009). Juice of new citrus hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. × *C. sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants. *Food chemistry*, 117(2), 212-218.

Références bibliographiques

- Rashid, U., Ibrahim, M., Yasin, S., Yunus, R., Taufiq-Yap, Y. H., & Knothe, G. (2013).** Biodiesel from *Citrus reticulata* (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock. *Industrial Crops and Products*, 45, 355-359.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S.A., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G.A. (2018).** *Citrus* peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
- Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O.I. (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian *Citrus* fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278, 75-87.
- Rincón, A.M., Vasquez, A., & Padilla, M. (2005).** Chemical composition and bioactive compounds of flour of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela. *Archivos latino americanos de nutricion*, 55(3), 305-310.
- Rock, E., & Fardet, A. (2014).** Les antioxydants des agrumes: action en solitaire ou matricielle? *Phytothérapie*, 12(2), 66-75.
- Sawamura, M., Minh Tu, N.T., Yu, X., Xu, B. (2005).** Volatile constituents of the peel oils of several sweet oranges in China. *J. Essent. Oil Res.*, 17(1): 2-6.
- Schauenberg, P., Paris, F. (2006).** Guide des plantes médicinales. Ed. Dalachaux et Nieslé, Paris, 330p.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008).** Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological research*, 163(3), 337-344.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998).** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 26(2), 118-122.
- Spiegel-Roy, Goldschmidt E.E. (1996).** Horticultural classification of cultivated *Citrus*. In: *Biology of Citrus*. Ed. Cambridge university press, 19-44.
- Swingle, W.T., Reece, P.C. (1967).** The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J., (Eds.). *The Citrus Industry* (Vol. 1). University of California Berkeley, 130-190p.
- Talbi, H., Boumaza, A., El-Mostafa, K., Talbi, J., Hilali, A. (2014).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.*, 6(4), 1111-1117.
- Tanaka, T. (1961).** Citrologia: Semi Centennial Commemoration Papers on *Citrus* Studies. *Citrologia Supporting Foundation*, Osaka, Japan, 114p.

Références bibliographiques

Tao, N. G., Liu, Y. J., & Zhang, M. L. (2009). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *International journal of food science & technology*, 44(7), 1281-1285.

Tirado, C. B., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., & Martinez, J. R. (1995). Comparative study of Colombian *Citrus* oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 697(1-2), 501-513.

Toscano-Garibay, J.D., Arriaga-Alba, M., Sánchez-Navarrete, J., Mendoza-García, M., Flores-Estrada, J.J., Moreno-Eutimio, M.A., & Ruiz-Pérez, N.J. (2017). Antimutagenic and antioxidant activity of the essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia*. *Scientific Reports*, 7(1), 1-9.

Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 104(2), 466-479.

Tumbas, V.T., Ćetković, G.S., Đilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M., Vulić, J.J., Knez, Ž., & Škerget, M. (2010). Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Acta periodica technologica*, (41), 195-203.

Van Hung, P., Thi Lan Chi, P., Thi Lan Phi, N. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese *Citrus* essential oils. *Nat Prod. Res.*, 4-5: 506-508.

Vinson, J.A., Liang, X., Proch, J., Hontz, B. A., Dancel, J., & Sandone, N. (2002). Polyphenol antioxidants in citrus juices: *in vitro* and *in vivo* studies relevant to heart disease. *In Flavonoids in cell function*, Springer, Boston, 113-122p.

Virbel-Alonso, C. (2011). Citron et autres agrumes : Un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé, votre beauté. Ed. Groupe Eyrolles. 142p.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & 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.

Youcef-Ettoumi, K., Zouambia, Y., Moulai-Mostefa, N. (2021). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Algerian *Citrus sinensis* essential oil extracted by hydrodistillation assisted by electromagnetic induction heating. *Journal of Food Science and Technology*, 58(8), <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04808-5>.

Anonyme 1 : <https://maisondesagrumes.com/2011/12/11/origine-et-histoire/>

Anonyme 2 : <https://www.echoroukonline.com/previsions-en-baisse-de-la-production-agricole-en-2011-12>

Anonyme 3 : <https://www.atlasbig.com/fr-fr/pays-par-production-totale-d-agrumes>

Anonyme 4 : <https://agronomie.info/fr/production-des-agrumes-en-algerie>

Anonyme 5 : <https://www.dknews-dz.com/pdf/index.html>

Anonyme 6 : <https://www.djazairss.com/fr/lqo/5309213>

Anonyme 7 : <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Mandarine.html>

Anonyme8 : [https://www.agripedia.nc/ressources-vegetales/plantes alimentaires/fruits/mandarines/mandarine](https://www.agripedia.nc/ressources-vegetales/plantes_alimentaires/fruits/mandarines/mandarine)

Annexe

Tableau 1 : Rendement (en%) en huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* de station de récolte (Hennaya et Ain El Hout)

V1 : Station d'Ain El Hout				V2 : Station de Hennaya			
Echantillons (V1)	Poids H(g)	Poids MV(g)	Rdt(%)	Echantillons (V2)	Poids H(g)	Poids MV(g)	Rdt(%)
E1 (HC)	3,7	634,4	0,58	E1 (HC)	2,8	422,2	0,66
E2 (HS)	2,4	465,8	0,51	E2 (HS)	2,8	449,1	0,62
E3 (HC)	2,1	423,0	0,49	E3 (HC)	1,0	354,9	0,28
E4 (HS)	2,1	598,2	0,35	E4 (HS)	1,0	340,1	0,29
E5 (HS)	2,2	521,7	0,42	E5 (HC)	2,1	477,8	0,43
E6 (HC)	1,8	596,6	0,30	E6 (HS)	2,5	367,1	0,68
E7 (HC)	0,8	528,8	0,14	E7 (HC)	0,6	306,1	0,16
E8 (HS)	0,9	442,5	0,18	E8 (HS)	2,1	358,8	0,58
E9 (HC)	1,2	609,3	0,19	E9 (HC)	0,9	329,0	0,27
E10 (HS)	2,4	533,2	0,45	E10 (HS)	1,0	311,1	0,32
Moy			0,364	Moy			0,429

H : huile, **MV** : matériel végétal ; **Rdt** : rendement(en%), **Moy** : moyenne, **V1** : verger 1, **V2** : verger 2, **E** : échantillon, **HC** : hydrodistillation par appareil de type Clevenger, **HS** : simple hydrodistillation

Tableau 2 : Rendement (en%) en huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* de 2 stations de récolte (Hennaya et Ain El Hout)

V1 : Station d'Ain El Hout				V2 : Station de Hennaya			
Echantillon (V1)	Poids H(g)	Poids MV(g)	Rdt(%)	Echantillon (V2)	Poids H(g)	Poids MV(g)	Rdt(%)
E1 (HC)	0,5	342,3	0,146	E1 (HC)	0,8	633	0,126
E2 (HS)	0,7	323,6	0,216	E2 (HS)	1,4	518	0,270
E3 (HC)	0,7	425,9	0,164	E3 (HC)	0,6	545	0,110
E4 (HS)	0,9	263,7	0,341	E4 (HS)	0,9	417	0,191
E5 (HC)	0,2	370	0,054	E5 (HC)	0,5	514	0,097
E6 (HS)	0,3	213,6	0,140	E6 (HS)	1	415	0,241
E7 (HC)	0,5	506	0,098	E7 (HC)	1	659	0,152
E8 (HS)	0,7	322	0,217	E8 (HS)	1	355	0,299
E9 (HC)	0,3	411	0,072	E9 (HC)	0,5	614,9	0,081
E10 (HS)	0,6	322	0,186	E10 (HS)	0,8	324,9	0,246
Moy			0,1634	Moy			0,1813

H : huile, **MV** : matériel végétal ; **Rdt** : rendement(en%), **Moy** : moyenne, **V1** : verger 1, **V2** : verger 2, **E** : échantillon, **HC** : hydrodistillation par appareil de type Clevenger, **HS** : simple hydrodistillation