

Faculté des Sciences Exactes et d'Informatique
Département de chimie
Filière : chimie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master en chimie
Option : **chimie appliquée**

THEME :

Etude des propriétés physico-chimiques et biologiques des
feuilles (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*) et la plante (*Ammi
visnaga*) par différentes méthodes d'extraction

Etudiant(e) : **MEDDAHI Fouzia**

BENABBOU Asmae

Encadrant(e) : **Dr N. MESSAOUDI**

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant qui nous a donné le courage, La volenté et la patience pour réaliser ce travail .Nous remerciant les parents pour leurs encouragements.

Je remercie chaleureusement M^{me} N.Messaoudi, Docteur à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de m'encadrer, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail, pour sa disponibilité, et ses remarques pertinentes.

Je remercie toute l'équipe de laboratoire pédagogies de la faculté des sciences exacte et de l'informatique Mostaganem. (M^R H.Gheribi, MR T. M^{me} T.Rahmani, M^R A.Bengandouz.

A M^R A.Belouatek et son équipe, M^{me} Djahira, M^{lle} A. tahlyati de laboratoire de recherche pour leurs disponibilités, gentillesse, patience, et pour leurs orientations.

Je remercie tendrement ma famille, et mes proches amies qui m'ont toujours soutenues et encouragée même dans les périodes les plus difficiles, merci pour votre soutien inépuisable.

Je ne serai oublier mes collègues de promotion (2018/2019

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents, ma mère **Mansourai** et mon père **Djilali** pour leurs sacrifices et leurs soutiens tout au long de mes études.*

A mes sœurs et mes frères Amel, Kamilia, Sarah, Ahmed, Dadi Pour votre soutien moral et encouragements vous m'avez appris la patience et la concentration sur mon travail. Je vous souhaite un avenir plein d'amour, de bonheur et de succès.

A mes nièces: Romayssa, Lénawafaa

A mon beau-frère : Rachid

A ma chère tante: Fatima Zohra

A Tous mes cousins et cousines

*A mon binôme **Fouzia***

Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail, Je vous dédie le fruit de nos efforts.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université: Asmaa, khadidja, Sarah, Hafida, Soulef, dalila, souhila, Amina, Sabah, Samia, Meriem.

A mes collègues : Abdelwahab, mohamed amine, salah .

A tous mes amies de la promotion de master en chimie appliqué

Asmae

Dédicace

Je dédie ce travail à Mes très chers parents de m'avoir encouragé et que dieu les protège.

*A Mes chères sœurs : **Fatiha, Amel, Halima.***

*A Ma collègue de travail (**Asmae Benabbou**) et sa toute famille*

A Tous mes amis (es) (Mohamed Amine, Abedlwahab ,Krimo, Asma ,Jija,sabah, Samia ,Hafida , Soulef)

Toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail et

A Toute la promotion 2014/2015

Fouzia

Résumé

L'objectif de cette étude est porté sur l'étude des activités chimiques et biologiques des extraits des trois plantes les feuilles d'oranges douce (*Citrus sinensis*), les feuilles d'oranges amère (*Citrus aurantium*) et noukha (*Ammi visnaga*). Récoltées dans la wilaya de Mostaganem. Nous avons utilisé trois méthodes d'extraction de type Clevenger, entraînement à la vapeur d'eau et Soxhlet (l'eau comme solvant) afin de voir quelle méthode est adaptée pour quelle plante, on arrive dire que la méthode d'extraction l'huile essentielle la plus adaptée pour les feuilles *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* est la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, et Pour *l'Ammi visnaga*, les deux méthodes clevenger et entraînement à la vapeur d'eau ont donné presque le même résultat. L'étude des propriétés physicochimiques telles que la densité, le pH et l'indice de réfraction donne des résultats normaliser selon AFNOR-ISO3140. L'activité antioxydante par le teste de DPPH par spectrophotometrique et la teneur de polyphenols donne un taux élevé pour l'huile essentielle *d'ammii visnaga* par les deux méthodes (entraînement à la vapeur d'eau et clevenger) para port les feuilles *citrus sinensis* et *citrus aurantium* ,pour l'activité biologique l'huile *d'ammii visnaga* par la méthode d'entraînement a la vapeur donne une activité antibactérienne importante que l'huile par clevenger avec toutes les souches bactériennes (*Escherichia coli* ,*condidaalbicans*, *pseudomonas aeruginosa* et *bacillus cereus*) . Huile des feuilles *citrus sinensis* et *citrus aurantium* possède un effet antibactérien pas mal avec toutes les souches bactériennes. la méthode soxhlet donne des extraits a une activité chimique et biologique moins que les huiles.

Mots clés : *Ammi visnaga*, les feuilles *citrus sinensis*, les feuilles *citrus aurantium*, activité antioxydante ,activité antibactérienne ,huile essentielle ,extrait

Liste des Abréviations

HE : huile essentielle

EX : Extrait

°C : degré Celsius

% : pourcentage

m : mètre

mm : millimètre

cm : centimètre

nm : nanomètre

g : gramme

mg: milligramme

H : heur

min : minute

t_{max} : temps maximale

t_{in} : temps initiale

µl : microlitre

DPPH: 2,2 diphenyl-picryldrazyl

UV : ultra-violet

HCl : acide chlorhydrique

NaOH: hydroxyde de sodium

EtOH : Ethanol

NH₄OH: ammoniacque

HOCl : acide hypochloreux

HgCl₂ : chlorure de mercure

AlCl₃: Chlorure d'aluminium

Na₂S₂O₃ : thiosulfate de sodium

I₂ : iode

KI : iodure de potassium

Eq : équivalent gramme.

L : litre

ml : millilitre

V_E : volume équivalent

pH : potentiel d'hydrogène

I% : pourcentage d'inhibition

C.M.I : concentration minimale inhibitrice

NaCl : chlorure de sodium

H₂SO₄ : acide sulfurique

R : rendement

UFC : Unité FormColonie

Liste des tableaux

Tableau1 : Carte d'identité d'orange amère (<i>Citrus aurantium</i>)... ..	5
Tableau2 : Carte d'identité d'orange douce (<i>Citrus sinensis</i>)... ..	6
Tableau3 : Carte d'identité d' <i>Ammi visnaga</i>	7
Tableau 4 : Représente les matériels et les méthodes utilisés pour l'extraction.....	26
Tableau5 : Représente les souches utilisées et leurs références.....	38
Tableau6 : Représente les étapes de la méthode de disque	39
Tableau 7 : Représente les étapes de la méthode des puits.....	40
Tableau8 : Représente les étapes de la technique C.M.I.....	41
Tableau9 : Rendement d'huile essentielle et d'extraits des trois plantes par trois méthodes d'extraction étudiées.....	45
Tableau 10 : la densité des huiles essentielles (<i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>Ammi visnaga</i>).....	47
Tableau11 :L'indice de réfraction des huiles essentielles et des extraits des feuilles <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus aurantium</i> et la plante d' <i>Ammi visnaga</i> par trois méthodes d'extraction étudiées.....	48
Tableau 12 : Résultat de pH des huiles essentielles et des extraits des trois plantes (<i>Citrus sinensis</i> ; <i>Citrus aurantium</i> et <i>Ammi visnaga</i>) par trois méthodes étudiées	49
Tableau13 : Résultat obtenu de vitamine C des feuilles (<i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus aurantium</i>) et la plante d' <i>Ammi visnaga</i>).....	50
Tableau14 : Résultats phytochimique de l'extrait des plantes (<i>Citrus aurantium</i> ., <i>Citrus sinensis</i> et de <i>Ammi visnaga</i>).....	50

Tableau15 : Résultats de quantité des polyphénols totaux des extraits et des huiles essentielles des (<i>Ammi visnaga</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>Citrus sinensis</i>) par les trois méthodes d'extraction utilisées.....	52
Tableau 16 : Concentration d'inhibition à 50% (mg/ml) des extraits et des huiles essentielles des (<i>Ammi visnaga</i> , <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus aurantium</i>) par les trois méthodes d'extraction utilisées... ..	56
Tableau17 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D)	60
Tableau18 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus (Extraits)... ..	60
Tableau19 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus (Huiles essentielles).....	61
Tableau20 : Resultat de concentration minimale inhibitrice de (<i>Ammi visnaga</i> , <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus aurantium</i>) pour les trois methodes d'extraction étudiées.....	63

Liste des figures

Figure 1 : Feuilles d'oranger.....	3
Figure 2 : Fleur d'oranger.....	4
Figure3 : Fruit d'oranger.....	5
Figure4 : Orange amère (<i>Citrus aurantium</i>).....	5
Figure5 : Orange douce (<i>Citrus sinensis</i>).....	6
Figure6 : (<i>Ammi visnaga</i>).....	7
Figure7 : Formules chimiques de la khelline, visnadine et visnagine.....	8
Figure8 : Montage soxhlet	10
Figure9 :L'appareille rotavapeur.....	11
Figure10 : Schéma du principe de distillation à vapeur d'eau.....	11
Figure11 : Montage d'extraction de type Clevenger.....	12
Figure12 : Schéma du principe de distillation par solvant.....	13
Figure13 : Extraction par hydro diffusion.....	13
Figure14 : Structures chimiques des composés aromatiques.....	15
Figure15 : Structures chimique de composés phénoliques.....	17
Figure16 : Structure de base des flavonoïdes.....	17
Figure17 : Structures chimique d'Alcaloïde.....	18
Figure18 : Strecture chimique de l'acide ascorbique (vitamine C).....	19
Figure19 : Arbre (<i>Citrus sinensis</i>).....	23
Figure20 : Arbre (<i>Citrus aurantium</i>).....	23
Figure21 : La plante <i>Ammi visnaga</i>	24
Figure22 : Les feuilles <i>Citrus sinensis</i> avant séchage	24

Figure23 : Les feuilles <i>Citrus aurantium</i> après séchage	24
Figure24 : <i>Ammi visnaga</i> fraîche	25
Figure25 : <i>Ammi visnaga</i> sèche.....	25
Figure26 : Le refractomètre	30
Figure 27 : Creuset tare+ la matière sèche.....	31
Figure28 : protocole de dosage des polyphénols totaux.....	33
Figure 29 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant	34
Figure30 : Milieu Mueller Hinton... ..	36
Figure31 : Flacon de bouillon nutritif.....	37
Figure32 : La cinétique d'extraction (<i>Ammi visnaga</i>)... ..	42
Figure 33 : La cinétique d'extraction (<i>Citrus sinensis</i>)	43
Figure34 : La cinétique d'extraction (<i>Citrus aurantium</i>)... ..	43
Figure35 : La cinétique d'extraction (<i>Ammi visnaga</i>)... ..	44
Figure36 : Taux humidité des feuilles (<i>Citrus sinensis</i>)	46
Figure37 : Taux humidité des feuilles (<i>Citrus aurantium</i>).....	46
Figure38 : Taux humidité d' <i>Ammi visnaga</i>	46
Figure39 : Droite d'étalonnage d'acide gallique.....	52
Figure 40 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique	54
Figure41 : Courbe de pourcentage d'inhibition d'extrait (<i>Ammi visnaga</i>).....	54
Figure42 : Courbe de pourcentage d'inhibition d'extrait (<i>Citrus sinensis</i>).....	54
Figure43 : Courbe de pourcentage d'inhibition d'extrait (<i>Citrus aurantium</i>)... ..	55
Figure44 : Courbe de pourcentage d'inhibition d'huile essentielle (<i>Ammi visnaga</i>).....	55

Figure45 : Courbe de pourcentage d'inhibition d'huiles essentielle (<i>Citrus sinensis</i>).....	55
Figure46 : Courbe de pourcentage d'inhibition d'huiles essentielle (<i>Citrus aurantium</i>).....	55
Figure47 : Courbes de pourcentage d'inhibition d'huile essentielle (<i>Ammi visnaga</i>).....	56
Figure 48 : Etude de l'activité antibactérienne de trois extraits brute en présence de quatre souches (<i>P.S, E.coli, B.C</i> et <i>condida</i>)... ..	57
Figure49 : Etude de l'activité antibactérienne de trois l'huiles essentielles brute en présence de (<i>P.S, E.coli B.C</i> et <i>condida</i>).....	58
Figure50 : Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau en présence de (<i>P.S, E.coli B.C</i> et <i>condida</i>)	59

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste d'abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

I. Partie I: synthèse bibliographique

I.	les plantes médicinales	1
	1. Généralité... ..	1
	2. Définition	1
	3. Principes actifs des plantes médicinales.....	2
	4. Domaines d'application des plantes médicinales.....	2
	5. Phytothérapies.....	3
II.	Présentation de l'espèce végétale	3
	1. Définition.....	3
	1.1. Feuilles d'oranger.....	3
	1.2. Fleurs d'oranger	4
	1.3. Fruits d'oranger.....	4
	2. Type d'orange.....	5
	2.1. Orange amère (<i>citrus aurantium</i>).....	5
	2.2. Orange douce (<i>citrus sinensis</i>).....	6
	3. Présentation de (<i>Ammi Visnaga</i>).....	6
	3.1. Définition	6
	3.2. Étude phytochimique de (<i>Ammi visnaga</i>).....	8

III. huiles essentielles.....	8
1. Définition	8
2. Propriétés physico-chimiques des Huiles Essentielles.....	9
3. Méthodes d'extraction	9
3.1.Soxhlet.....	9
3.2.Extraction par hydro distillation.....	11
3.2.1. Entraînement à la vapeur d'eau	11
3.2.2. Extraction par Clevenger.....	12
3.3.Extraction aux solvants volatils	12
3.4.D'autre méthode...	13
3.4.1 Extraction au CO ₂ supercritique.....	13
3.4.2 Hydrodiffusion.....	13
4. Composition chimique des huiles essentielles	14
4.1- Huiles essentielles des agrumes	14
4.1. 1 Utilisation de l'huile essentielle (<i>citrus sinensis</i> et <i>citrus aurantium</i>).15	
4.2.1 Utilisation de l'huile essentielle de (<i>Ammi Visnaga</i>).....	16
5. Les composés phénoliques	16
5.1.Définition	16
5.2.Structure chimique.....	16
6. Propriétés biologiques des polyphénols	17
6.1. flavonoïdes	17
6.1. 1 Définition.....	17
6.2.Tannins.....	18
6.3.Alcaloïdes	18
6.4.Saponosides.....	18

7. Toxicité des huiles essentielles	18
8. Vitamine C.....	19
9. Activités biologiques des huiles essentielles.....	19
9.1.Activité pharmaco-thérapeutique	19
9.2.Activité anti-oxydante	20
9.3.Activité antimicrobienne.....	20
9.3.1. Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	21
a. L'aromatogramme	21
b. Méthode du puits ou cylindre.....	21
c. Méthode de dilution	21
d. Méthodes de C.M.I.....	22

Partie II : Matériels et méthodes

1. Matériels végétales	23
2. La région et la période de la récolte des matériels végétaux étudiés... ..	23
2.1. feuilles d'oranges (<i>citrus sinensis</i> , <i>citrus aurantium</i>)	23
2.2. <i>Ammi visnaga</i> (noukha).....	24
3. Conservation les matériels végétaux.....	24
3.1. Les feuilles <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus aurantium</i>	24
3.2 <i>Ammi visnaga</i>	25
4. Mode opératoire	25
5. La cinétique des huiles essentielles	27
6. Les tests phytochimiques	27
7. Analyses chimiques et physiques des extraits et des huiles essentielles obtenus.....	29
7.1. Rendement.....	29
7.2. Indice de réfraction	30
7.3. Mesure de pH	30

7.4. La densité	30
7.5. Mesure la matière sèche et humidité.....	31
7.6. Dosage polyphénols totaux	32
7.7. Dosage de la vitamine C par iodométrie.....	33
7.8. Teste du DPPH.....	34
8. Analyses biologiques des extraits et des huiles obtenu.....	35
8.1. Matériels biologiques.....	35
8.1.1 Milieux de culture utilisés.....	35
8.1.2. Les boites pétris.....	37
8.1.3. Les microplaques.....	37
9. Evaluation activité antibactérienne.....	37
9.1. Isolement des souches	37
9.2. Préparation l'inoculum.....	38
9.3. Origine des souches microbiennes utilisées.....	38
10. Techniques activités antibactériennes utilisées.....	38
a. technique de disque pour les huiles essentielles.....	38
b. technique de diffusion en puits pour les extrait.....	39
c. Détermination la concentration minimal d'inhibition (CMI) des extraits et les huiles essentielle.....	40

Partie III : résultat et discussion

1. Cinétique d'extraction des huiles	42
a-par clevenger.....	42
b-par entrainement a vapeur.....	42
2. Détermination du rendement	44
3. Détermination de la teneur en eau.....	46

4. détermination de la densité	47
5. Détermination de l'indice de réfraction.....	47
6. Mesure de pH.....	48
7. Optimisation de dosage de la vitamine C... ..	49
8. Tests phytochimiques.....	50
9. Dosage des polyphenols totaux.....	51
10. Piégeage du radical libre DPPH (2.2-diphényle-1-picryl-hydrazil).....	53
11. Activité antimicrobienne des extraits et des huiles essentielles.....	57
12. Détermination de la concentration minimale inhibition minimale (C.M.I).....	62

Conclusion générale

Référence bibliographe

Les annexes

Introduction

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours pour but de résoudre ses problèmes de santé. Les plantes médicinales forment la base de la médecine traditionnelle grâce à leur richesse en métabolites secondaires utilisées comme composés actifs. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire [1].

Le recours à la médecine traditionnelle est due à diverses raisons comme par exemple : le coût des plantes médicinales qui est faible par rapport aux médicaments conventionnels, la disponibilité de ces plantes surtout dans les régions les plus éloignées et au sein des populations les moins favorisées, les effets secondaires indésirables des médicaments, l'envie de consommer « bio » et ses effets bénéfiques sur la santé, l'existence des maladies pour les quelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace [2].

Les propriétés préventives des plantes médicinales et des aliments d'origine végétale sont dues à la présence de vitamines C, E et A, de caroténoïdes et des composés phénoliques qui sont des molécules dotées d'un pouvoir antioxydant [3].

Actuellement, les huiles essentielles des plantes aromatiques possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés médicinales: antibactériennes, anti inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antioxydantes, anti-tumoral, insecticides, insectifuges...etc, ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique tels que la cosmétique, la parfumerie, l'aromathérapie et l'agroalimentaire [4].

L'oranger fait partie de la famille des Rutacées, et du genre Citrus. Il est originaire de Chine. Il existe plusieurs espèces d'oranger, dont les plus connues sont *Citrus aurantium* (oranger amère), aussi appelé *bigaradier*, et *Citrus sinensis* L (oranger douce).

C'est un arbre de 8 à 10 mètres haut, il est le plus cultivé au monde pour ses fruits. Il est présent dans les régions chaudes et peut se cultiver en France, en région méditerranéenne. Sa culture nécessite des températures comprises entre 10 et 35 °C et un sol neutre.

Le domaine d'application des huiles essentielles sont diversifiés malgré l'arrivée sur le marché des composés de synthèse ; C'est ainsi qu'elles trouvent de nombreuses applications

Dans l'industrie chimique et dans le domaine de l'agroalimentaire (condiments, épices, aromatisants,...) et l'aromathérapie (parfumerie, cosmétique et savonnerie) [5].

Ce travail est développé en trois chapitres:

- ❖ le premier est consacré à une étude bibliographique sur les plantes médicinales et les différents groupes des principes actifs.
- ❖ Le deuxième chapitre concerne la partie expérimentale qui traite en deux axes :
 - ✓ d'une part dans le premier axe, on trouve les différentes méthodes du travail expérimental ainsi que les matériels utilisés, dont on a réalisé l'extraction et la détermination des composés comme les polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes.
 - ✓ D'autre part, le deuxième axe, on est intéressé à évaluer le pouvoir de la phytochimique, les caractéristiques physico-chimique, l'activité antibactérienne et anti oxydant des trois plantes par trois techniques d'Extraction des huiles essentielles à partir des feuilles d'orange douce (*Citrus sinensis*) et d'orange amère (*Citrus aurantium*) et la plante (*Ammi Visnaga*).
- ❖ dans la troisième partie, on a rapporté les résultats obtenus de l'étude de la phytochimique, les caractéristiques physico-chimique, l'activité antibactérienne et anti oxydante des différentes plantes (*Citrus sinensis*), (*Citrus aurantium*) et la (*Ammi Visnaga*) suivi par une discussion et on termine avec une conclusion générale.

I. Plantes médicinales

1. Généralité

En général, le corps humain est mieux adapté à un traitement de base de plantes qu'à une thérapeutique exclusivement chimique. L'homme est habitué à consommer et à digérer différentes espèces de plantes, qui sont bien souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicinales que nutritives. Le citron (*Citrus limon*) possède une teneur élevée en vitamine C, favorisant la résistance aux infections, ce qui en fait un allié précieux contre le rhume et la grippe ; la papaye (*Caricapapaya*) est parfois utilisée comme vermifuge; l'oignon (*Allium cepa*) prévient les affections des bronches ; l'avoine (*Avenasativa*) augmente l'énergie. De ce fait, la phytothérapie prend tout son sens lorsque la frontière entre aliments et médicaments disparaît [6].

2. Définition

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [7]. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [8].L'intégration de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles et/ou l'apparition des effets secondaires ont mené les chercheurs à étudier et à mettre en évidence les effets thérapeutiques des plantes médicinales [9].

➤ **Intérêt de l'étude des plantes médicinales**

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus [10]. La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés[11].Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques,

mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs [12]. Ces plantes, connus depuis l'antiquité, sont généralement utilisées en médecine traditionnelle comme agents antibactériens et antifongiques. Ces propriétés antifongiques ont été confirmées par de nombreux travaux sur les souches de levures, dermatophytes et *Aspergillus* [13].

3. Principes actifs des plantes médicinales

Le métabolisme de la plante verte produit avant tout des glucides (sucres) et des protéides. Une fraction des glucides est ensuite transformée en composés divers dont les lipides sont les plus importants pour la plante, mais le métabolisme fournit aussi plusieurs corps secondaires que l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique, il s'agit des alcaloïdes, des hétérosides, des huiles essentielles et des tanins, les végétaux nous fournissent également des vitamines, des oligoéléments, et des antibiotiques [14].

4. Domaines d'application des plantes médicinales

✓ **En alimentaire :**

Différentes espèces médicinales sont utilisées comme épices pour aromatiser et augmenter la durée de vie des aliments. En effet, ces espèces contiennent des huiles essentielles dotées d'activités antimicrobiennes intéressantes et peuvent servir d'agents de conservation alimentaires [15].

✓ **En cosmétologie :**

Les plantes aromatiques sont utilisées dans la formulation des produits de beauté. Les huiles essentielles de la lavande (*Lavandula officinalis*) sont utilisées dans les préparations pour bains calmants ou relaxants [16].

✓ **En médecine :**

Certaines plantes sont utilisées pour le traitement des troubles nerveux et des troubles liés au stress telles que *Angélica archangélica* et *Valériane officinalis* [17].

- D'autres, telles que l'Aunée officinale (*Inula helenium*), Origan (*Origanum vulgare*) et l'Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) ont prouvé leur efficacité dans le traitement des problèmes respiratoires et les bronchites [18].

5. phytothérapies

Ce mot vient du grec « phytos » qui signifie plante et « therapeuo » qui signifie soigner. C'est l'une des formes de traitement les plus anciennes qui continue à jouer un rôle important en Afrique et en Asie par l'usage de plantes médicinales. La phytothérapie est le traitement (médecine parallèle ou respectant les traditions) par les plantes, c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation en voie externe, des produits préparés à partir des plantes, sans passer par une étape de sélection des molécules ; on ne consomme par conséquent pas que le principe actif, mais tout ce que contient la plante. La phytopharmacie sert à désigner la totalité des substances utilisées pour traiter les plantes : pesticides, fongicides, herbicides [19].

II. présentation de l'espèce végétale :

1. Définition

L'oranger est un petit arbre ou arbuste, pouvant atteindre 10 à 15 m de hauteur environ. L'arbre est à rameaux nombreux ; formant une cime touffue, avec un feuillage vert sombre, glabre, persistant et légèrement ailé. Les feuilles sont persistantes, cireuses, coriaces et alternes, la floraison blanche très parfumée, Le fruit est une baie, ronde ou allongée, souvent pourvue d'un mamelon proéminent du côté opposé au pédoncule fructifère [20].

1.1. Feuilles d'oranger

Nous connaissons bien les bienfaits des fleurs d'oranger ainsi que des oranges. Ceux des feuilles d'oranger (figure 1) restent moins célèbres, mais sont pourtant multiples[21].



Figure 1: Feuilles d'oranger

➤ **Les feuilles d'oranger ont des propriétés** [22]

- sédatives (entraîne une relaxation)
- antispasmodiques (lutte contre les spasmes musculaires)

- sudorifiques (augmente la transpiration)
- fébrifuges (fait fuir la fièvre)
- cicatrisantes antibactériennes
- anti-inflammatoires

1.2. Fleurs d'oranger

Dans l'Antiquité, on utilisait traditionnellement la fleur d'oranger (figure 2) pour orner les couronnes des jeunes mariées.



Figure 2 : Fleur d'oranger

À la fin du 17^e siècle, la coquette et mondaine duchesse de Braccio et princesse de Néroli Anne-Marie Orsini se servait de la fleur d'oranger pour parfumer son bain et ses effets. L'huile essentielle de fleur d'oranger est reconnue pour ses propriétés à la fois tonifiantes, sédatives et antidépressives. Elle aide par ailleurs à l'endormissement, de par ses effets relaxants [23].

1.3. Fruits d'oranger

Les orangers peuvent être considérés comme des plantes médicinales. On utilise en phytothérapie des extraits de leurs fleurs, de leurs feuilles et de leurs fruits et en aromathérapie les huiles essentielles distillées à partir des fleurs (huile essentielle de Néroli), des feuilles et des jeunes rameaux (huile essentielle de petit-grain), des écorces des fruits (figure 3) (huile essentielle d'orange). Ces huiles essentielles sont digestives et apaisantes, mais elles peuvent provoquer une photo-dermite quand on les applique sur la peau et que l'on s'expose au soleil [24].



Figure 3 : Fruit d'orange [25].

2. Type d'orange

2.1. Orange amère (*Citrus aurantium*)

L'oranger amer ou *Citrus aurantium*, var. amara de la famille des Rutaceae, est un petit arbre originaire de l'Inde et de la Chine, représenté dans la (figure 4) apporté en France au retour des Croisades. Introduit sur la Côte d'Azur, il y pousse en plein air tandis qu'au nord de la Loire, on a créé des orangeries pour l'abriter l'hiver. Le bigaradier est largement cultivé en région méditerranéenne et dans les régions chaudes des États-Unis. [26]



Figure 4 : Orange amère (*Citrus aurantium*. L)

Tableau 1 : Carte d'identité d'Orange amère (*Citrus aurantium*)

Nom commun :	Petit grain bigarade, petit grain bigaradier, orange amère
Nom latin :	<i>Citrus aurantium</i>
Famille botanique :	Rutacées
Partie distillée :	Feuille du bigaradier
Origine (pays) :	Paraguay, Espagne
Modes d'utilisation privilégiés :	Voie cutanée, voie respiratoire

2.2. Orange douce (*Citrus sinensis*)

L'orange douce est un fruit délicieux, juteux, riche en vitamine C. *Citrus sinensis* est un arbre de moyen développement, originaire de Chine, qui se développe en région subtropicale (figure5). C'est-à-dire en région chaude et humide, mais connaissant une saison plus fraîche. En France, *Citrus sinensis* n'est cultivé en pleine terre que dans les régions épargnées par le gel. Les oranges cueillies sur l'arbre ont un goût extraordinaire par rapport à celles que



Figure 5: Oranges douce (*Citrus sinensis*)

L'on achète car ces dernières subissent divers traitements qui permettent leur conservation, mais qui ont malheureusement un impact sur leur goût. [27]

Tableau 2 : Carte d'identité d'Orange douce (*Citrus sinensis*)

Nom latin :	<i>Citrus sinensis</i> . L
Famille botanique :	Rutacée
Partie exprimée :	les feuilles
Origine :	Italie, Espagne, Brésil
Nom commun :	Orange douce
Origine (pays) :	Italie

3. Présentation d'*Ammi Visnaga*

3.1. Définition

Le nom Ammi vient du grec ammos, qui signifie «sable», en rapport avec le terrain où pousse la plante. *Visnaga*, le nom de la variété, dériverait de «bis acutum» qui veut dire «à double pointe». Les vieux noms latins étaient *Cuminum alexandrinum*, *C. aethiopicum* et *C. regium* (cumin alexandrin, éthiopien ou royal). *Khella*, le nom arabe de la plante, est utilisé dans tout le Moyen-Orient et souvent aussi en Europe [28].

L'herbe annuelle ou bisannuelle pousse au printemps sous la forme d'une tige dressée, ronde et cannelée, atteignant de 80 à 120 cm de hauteur. Les feuilles gris vert ont environ 20 cm de long ; elles sont disposées en chevrons et pennées. Le haut de la tige est ramifié et légèrement recourbé. Les grandes ombelles terminales réunissent parfois jusqu'à une centaine de pédicelles portant à leur tour de petites ombelles à fleurs blanches (figure 6). A maturité, les pédicelles épais et rigides sont rétractés et forment comme un nid. Leur goût est agréable et après leur lignification, on les utilise comme cure-dents. Les petits fruits lisses et ovales tombent quand ils sont secs; à la déhiscence, ils donnent deux graines d'un brun grisâtre, d'environ 2 mm de long [28].



Figure 6 : (*Ammi visnaga.L*) [29]

Tableau 3 : Carte d'identité d'*Ammi visnaga*

Nom latin :	<i>Ammi visnaga.L</i>
Synonyme :	<i>Visnaga daucoides</i>
Famille :	Apiacées, Ombellifères
Origine :	Europe, Afrique, Asie
Période de floraison :	été
Couleur des fleurs :	blanc
Type de plante :	fleur

3.2. Étude phytochimique d'*Ammi visnaga*

Les études phytochimiques d'*Ammi visnaga* L. ont révélé sa richesse en Diverses molécules tel que : **Furanochromones** (-py-ones) (2-4%) : comprenant la khelline (0,3- 1,2%), visnagine (0 ,05-0.3) son glucoside, visammiol, khellino ; ammiol et son glucoside visammiol ,khellinonrt la visnaginone, **pyranocoumarines** (visnagan (0.2;0,5%)comprenant la visnadin, samidine et dihydrosamidin ,**furanocomarines** , trace de xanthotoxine et de l'ammoidin , **flavonoïdes** (0.02 -0.03%) comprenant la quercetine, bisorhamnetine et leurs 3-sulphates, et le kaempferol , **volatiles** : camphre, carvone (terpinéol, terpinène-4-ol, linalol, cis et trans oxyde de linalol) , **Huile fixe** (12-18 %) , **Protéines** :14% [30].

La khelline, la visnagine et la visnadine (figure7) sont les principes actifs des fruits d'*Ammi visnaga*. Ils sont ainsi utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour le traitement de l'angine et de l'asthme [31].

- La teneur de ces composés dans les fruits secs varie largement selon les facteurs génétiques et les conditions environnementales [32].
- **La khelline** est la chromone présentant des propriétés spasmolytiques. **La visnadine** a des propriétés antispasmodique et vasodilatatrice des coronaires.

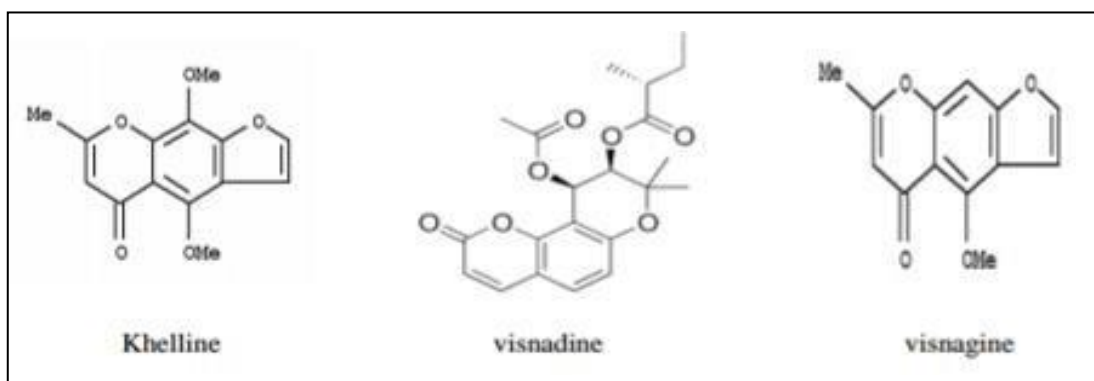


Figure 7 : Formules chimiques de la khelline, visnadine et visnagine [31].

III. Les huiles essentielles

1. définition

Une huile essentielle comme « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans

chauffage. Une huile essentielle est souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de composition» [33].

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce que les différencie des huiles dites fixes. Ce sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, très odorantes et de densité généralement inférieure à celle de l'eau. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Leur conservation nécessite de l'obscurité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée [34].

2. Propriétés physico-chimiques des Huiles Essentielles :

On trouve généralement les huiles essentielles (HEs) incolores ou jaune pâles à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HEs volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules HEs officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques [35].

- ✓ Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation.
- ✓ Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées d'un pouvoir rotatoire.
- ✓ Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240.

3. Méthodes d'extraction

3.1. Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Le schéma d'appareil Soxhlet est représenté sur la (figure 8) Il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire

est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant [36].

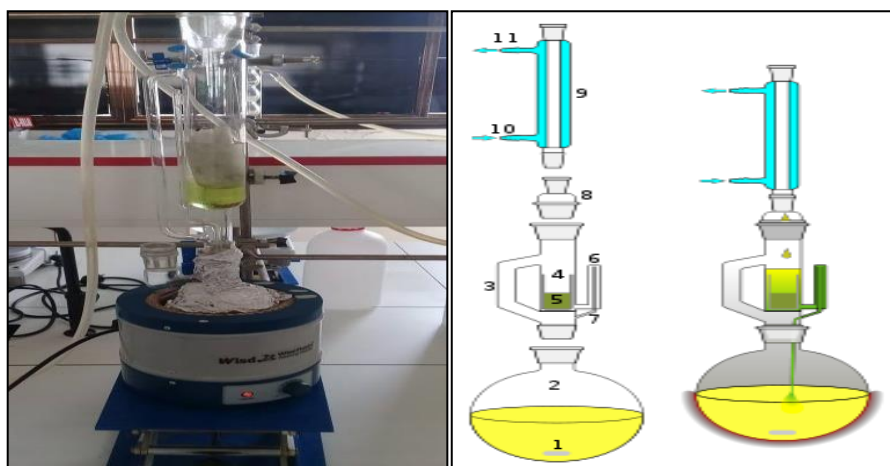


Figure8 : Montage soxhlet

- | | |
|---|--|
| 1: Agitateur magnétique, | 6 & 7: Entrée et sortie du syphon |
| 2: Ballon en verre pour extraction | 8: Accessoire-adaptateur (facultatif) |
| 3: Piste de distillation, | 9: Condensateur |
| 4: Cartouche cellulosique, | 10: Entrée d'eau pour le refroidissement du système |
| 5: Solide/sédiments à extraire | 11: Sortie d'eau pour le refroidissement du système |

- ✓ La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide de l'appareil appelé Rotavapeur (figure 9). Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide.

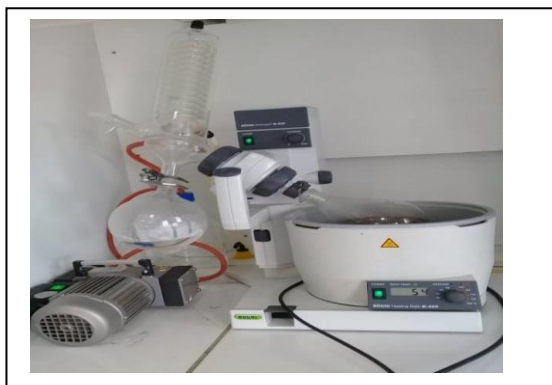


Figure 9 :L'appareille de rota- vapeur

L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite, évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés. C'est une méthode d'évaporation simple, utile, douce et rapide.

3.2. Extraction par hydrodistillation:

3.2.1. Entrainement à la vapeur d'eau

Largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Elle présente l'avantage d'abaisser la température de distillation; les composés volatils sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition. La distillation est le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes. [37] la (Figure 10) représente le Schéma du principe de distillation à vapeur d'eau.

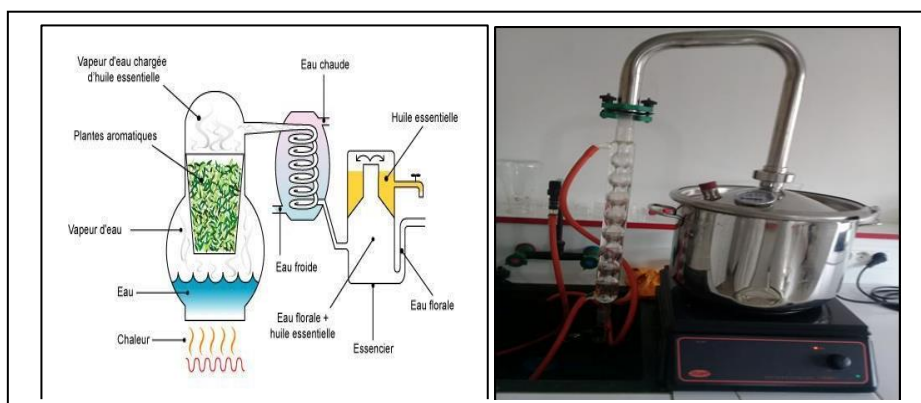


Figure10 : Schéma du principe de distillation à vapeur d'eau

3.2.2. Extraction par Clevenger :

Le montage Clevenger est désigné par le nom de son inventeur, Joseph Franklin Clevenger, qui l'a publié en 1928. Quelques modèles existent. Le plus commun (figure 11) est une pièce de verrerie modifiée, celle que l'on voit au-dessus du ballon, qui est de taille variable. Après 2 h d'extraction, on peut mesurer directement dans la burette le volume d'huile recueilli [37].

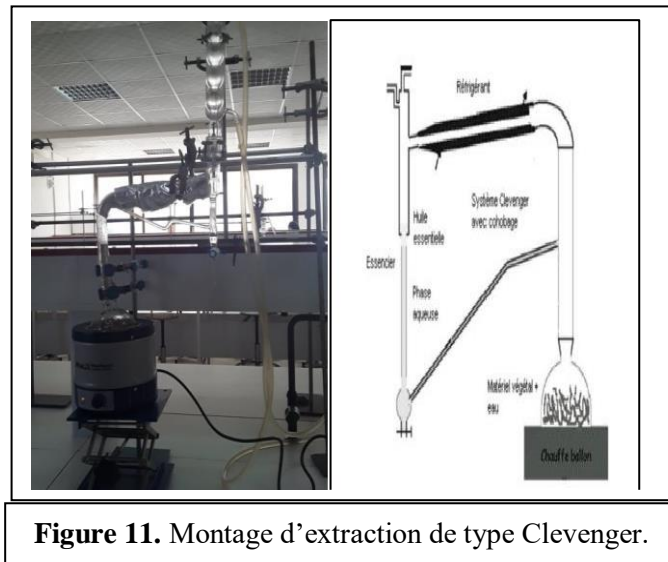


Figure 11. Montage d'extraction de type Clevenger.

Parfois, le montage de type Clevenger fournit des rendements plus élevés que l'hydrodiffusion. Le choix de la bonne méthode à utiliser dépendra de l'objectif du projet et des capacités d'extraction planifiées par le client.

3.3. Extraction aux solvants volatils :

C'est un procédé qui consiste à recueillir tout ce qui se dissout dans la plante, lorsqu'elle est en contact avec un solvant particulier. Une fois que l'on enlève le solvant, on récolte l'huile essentielle ainsi que les résines, cires et autres substances éventuelles provenant de cette extraction (figure12). On utilise l'extraction aux solvants volatils sur le même principe que l'extraction par les corps gras, c'est-à-dire, en cosmétique, surtout pour la création de parfums [38].

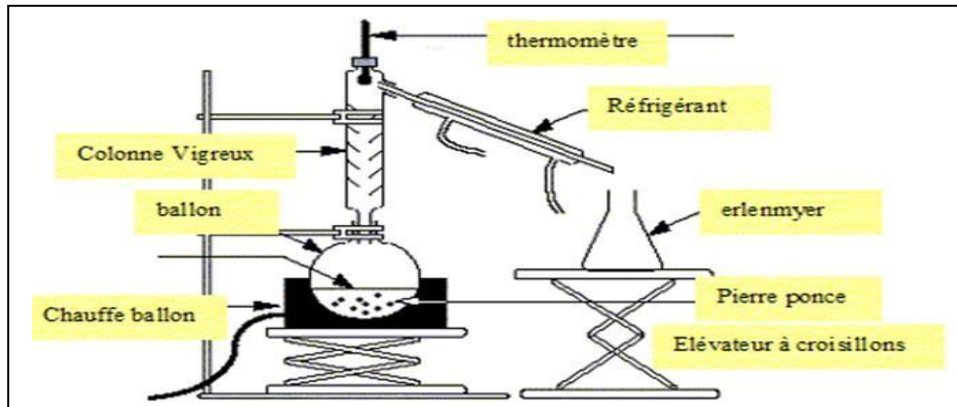


Figure12 : Schéma du principe de distillation par solvant [38].

3.4. D'autre méthode :

3.4.1. Extraction au CO₂ supercritique

Cette méthode est récente .Elle est basée sur l'utilisation d'un fluide supercritique qui possède les propriétés des gaz et des liquides. Ce qui lui permet de pénétrer dans les matrices d'échantillon solides. Le principe de cette technique correspond à une distillation répétée du solvant extrayant un soluté de l'échantillon solide [37].

3.4.2.Hydrodiffusion :

Cette technique (figure13) est particulière Elle consiste à faire passer du haut vers le bas et a pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatiles [38].

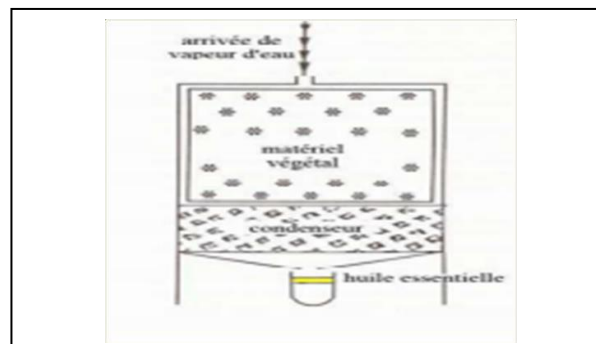


Figure13 : Extraction par hydro diffusion.

4. Composition chimique des huiles essentielle

4.1- Huiles essentielles des agrumes

Les huiles essentielles constituées principalement des métabolites secondaires lipophiles volatils tels que les hydrocarbures (terpènes et sesquiterpènes) et les composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, phénols, éthers, esters, lactones et éthers phénoliques). Ils sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 80 % de l'huile, tandis que d'autres composants sont présentés seulement comme trace [39].

1. Les terpènes : ce sont des molécules les plus répandues dans les huiles essentielles.

a) Les monoterpènes: sont les composés majeurs des huiles essentielles avec des teneurs comprises entre 89,8 % et 99,08%. Le limonène est en général le composé le plus abondant, et d'autres composants monoterpéniques comme α -pinène, α -thujène, β -pinène, α -terpinène, β -terpinène, p-cymène...etc[40].

b) Les sesquiterpènes: ce sont des terpènes présents en faible quantité dans les plantes, sauf dans le bois des arbres.

c) Les diterpènes: molécules assez rares dans les huiles essentielles, et présentes en faibles quantités (cypres, thuya, mélèze).

d) Les triterpènes: leur présence est aléatoire dans les huiles essentielles. Car, plus la molécule contient un nombre important de carbones, plus elle est lourde. Et donc plus il est difficile de l'extraire par distillation à la vapeur d'eau.

2. Phénols et terpénols (Monoterpénols, Sesquiterpénols et Diterpénols): molécules possédant une fonction alcool.

1. Aldéhydes : il existe des aldéhydes terpéniques et des aldéhydes aromatiques.

2. Lactones : esters intramoléculaires non aromatiques très actifs, non toxiques, à l'état de traces dans les huiles essentielles.

3. Coumarines : ce sont des esters intramoléculaires aromatiques, très souvent présentés dans les essences, en particulier les essences de Citrus. Toujours en faible concentration dans les huiles essentielles.

4. **Phtalides** : famille chimique apparentée aux coumarines, d'odeur puissante et caractéristique.
5. **Composés azotés** : ce sont des composés peu courants au sein des huiles essentielles.
6. **Les composés soufrés** : ces composés se rencontrent souvent à l'état de traces dans les huiles essentielles.
7. **Les acides, les esters, cétones, oxydes terpéniques, éthers** [41].
8. **Composés aromatiques** :

Le groupe des composés aromatiques renferme les molécules de parfum comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol et l'estragol (Figure 14). Ces composés sont abondants dans les huiles essentielles [42].

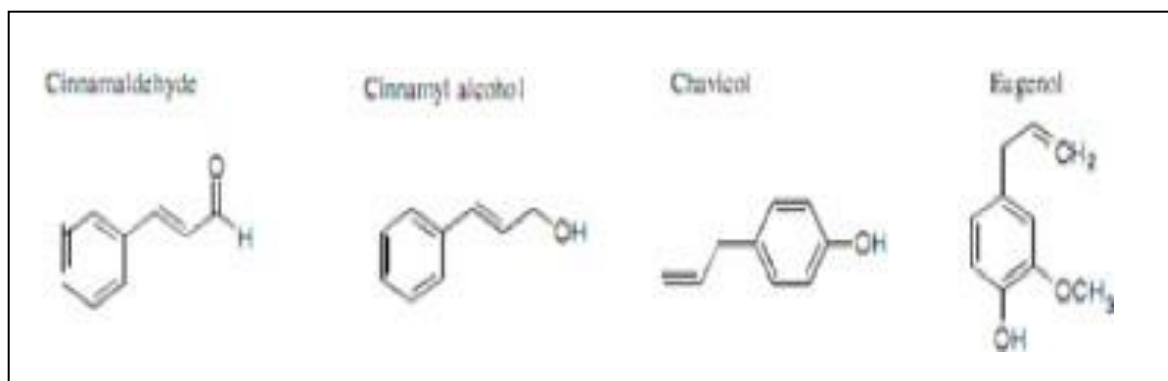


Figure 14 : Structures chimiques des composés aromatiques [42].

4.1. 1 Utilisation de l'huile essentielle de (*Citrus aurantium* et *Citrus sinensis*)

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* peut être utilisée différemment pour un large spectre de maladies et symptômes. L'huile essentielle de *Citrus sinensis* est utilisée dans les troubles digestifs, stress et état dépressif, grossesse : douleurs de l'accouchement, bien-être et plaisir.

4.2 L'huile essentielle d'*Ammi Visnaga*

L'huile essentielle d'*Ammi Visnaga* doit sa propriété anti-spasmodique à sa grande teneur en linalol, qui fait partie des alcools mono-terpéniques, très connus par leurs propriétés antiseptiques et immunostimulantes. Scientifiquement connu sous le nom d'*Ammi Visnaga*, l'*Ammi Visnaga* est une plante herbacée de la famille des Apiaceae. La taille de cette plante

glabre varie de 20cms à 1mètre et elle se spécifie par sa tige cylindrique dressée qui se ramifie vers le haut, ses feuilles bi ou tri-penné en segment linéaires, et son inflorescence en ombelle dans toute sa blancheur [43].

4.2.1 Utilisation de l'huile essentielle d'*Ammi Visnaga*

L'huile essentielle d'*Ammi visnaga* peut être utilisée de façons très différentes pour un large spectre de maladies et symptômes.

5. Les composés phénoliques

5.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction [44]. Les composés phénoliques jouent un rôle fondamental, car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. Une alimentation équilibrée fournit à l'Homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E [45].

5.2. Structure chimique

Les polyphénols caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relie [46].

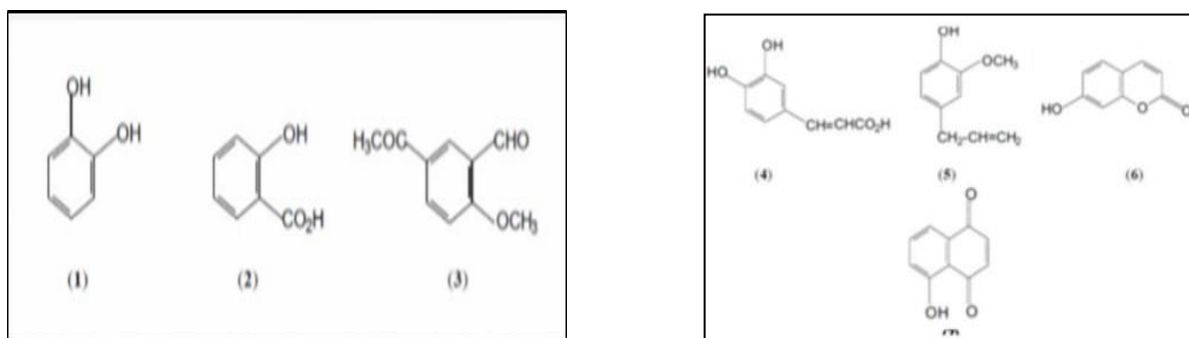


Figure 15 : Structures chimiques de composés phénoliques [46].

6. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées, en raison de leurs divers propriétés physiologiques, comme les activités -antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire [47].

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire [48].

6.1. Les flavonoïdes

6.1.1 Définition

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [49]. Les flavonoïdes constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [50].

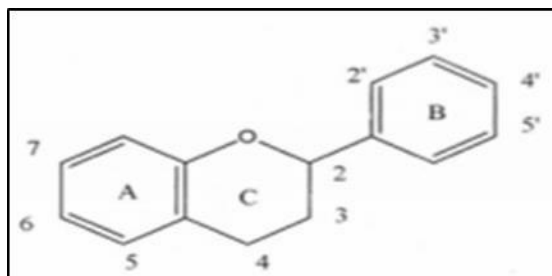


Figure 16: Structure de base des flavonoïdes [51].

6.2. Tannins

Tanin et un terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait les extraits des plantes pour tanner les peaux d'animaux [52]. On distingue deux catégories : les tanins condensés et les tanins hydrolysables [52].

6.3. Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe (noyau hétérocyclique), on les trouve dans plusieurs familles des plantes, la plupart des alcaloïdes (figure 17) sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer. Certains alcaloïdes sont utilisés comme moyen de défense contre les infections microbiennes (nicotine, caféine, morphine, lupinine) [52]. Des anticancéreuses (vincristine et la vinblastine) [10]. Fortement toxiques [53].

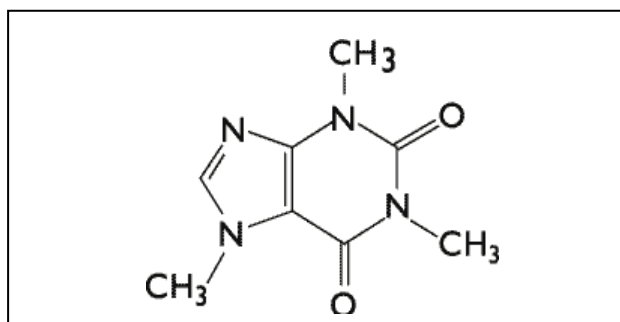


Figure 17: Structures chimiques d'Alcaloïde [54].

6.4. Saponosides

Le terme saponosides est dérivé du mot savon, sont des terpènes glycosylés comme ils peuvent aussi se trouver sous forme aglycones, ils ont un goût amer et acre [52]. Ils existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes [10].

7. Toxicité des huiles essentielles

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

et des allergies. Les essences d'agrumes (pamplemousse, citron...etc) sont photosensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil [34].

8. Vitamine C

La vitamine C, ou (acide ascorbique), est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain. Il doit être apporté par les aliments (fruits et légumes). Il a un rôle antioxydant multiple : il inhibe le brunissement enzymatique, protège contre l'oxydation, comme il est connu pour ses effets antiradicalaires et réducteurs des métaux de transition [55].

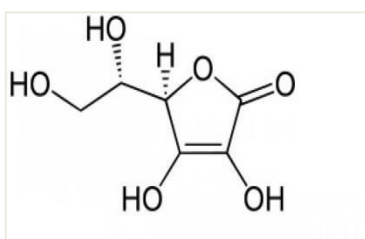


Figure18 : Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C) [56]

9. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles par leurs propriétés nombreuses et variées sont utilisées dans différents secteurs : en parfumerie, en cosmétologie, en conserverie et dans les industries pharmaceutiques.

9.1. Activité pharmaco-thérapeutique

Depuis longtemps, les HE's sont utilisées en thérapeutique, leurs applications sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et le bon fonctionnement du corps humain car si leur pouvoir antiseptique est indiscutable, leur toxicité l'est aussi [57]. L'usage des HE's en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte des processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables [58].

9.2. Activité anti-oxydante

Dans le cadre de la toxicité des antioxydants synthétiques et la demande des consommateurs pour les produits naturels, l'utilisation des produits végétaux comme source d'antioxydants deviendrait plus exigée du fait que ces produits sont moins toxiques. Parmi ces différents produits végétaux, les huiles essentielles ont une activité antioxydante de grand intérêt car elles peuvent préserver les aliments des effets toxiques des oxydants et jouent un rôle important dans la prévention de certaines maladies [59]. Les monoterpènes oxygénés, tels que le thymol, le carvacrol et le α -terpinéol, sont principalement responsables du potentiel antioxydant des huiles végétales qui les contiennent. Le monoterpène β -caryophyllène possède également une activité de piégeage des radicaux libres, donc les plantes médicinales ayant une activité antioxydante intéressante constitueraient une source de traitement des maladies où sont impliquées les Espèces Oxygénées Réactives (EOR) et les Espèces Azot Réactives (EAR) [60].

9.3. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielle et des extraits a été déterminée par deux méthode, des puits et de diffusion en milieu gélosé [61, 62].

Huit souches bactériennes ont été testées : (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Entérobacter sp* (CHN+BLSE), *Entérobacter sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella pneumoniae sp* (BLSE) et *Streptocoque sp* et 3 souches fongiques : (2 levures : *Candida albicans* et *Candida kefyr* et un champignon : *Aspergillus niger*).

Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de McFarland (10^7 UFC/ml). Par la suite la surface entière de la gélose a été établie par cette suspension microbienne. Les disques stériles imprégnés de concentrations croissantes d'extraits à raison de 10 μ l par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C. L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

10. Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des HE's sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur [63].

Les méthodes d'évaluation les plus utilisées sont la méthode de diffusion sur l'Agar et la méthode de dilution. Dans la première méthode les huiles essentielles sont déposées sur des disques de papier ou dans des puits creusés dans l'Agar. Dans la seconde méthode, les HEs sont incorporées dans le bouillon de culture ou d'autres liquides dans lesquels les bactéries sont présentes. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans différentes publications [64]. C'est ce qu'on appelle l'aromatogramme.

a. L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Le contact se fait par l'intermédiaire du disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée des extraits de plante. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [65]. L'aromatogramme se réalise aussi sur un milieu liquide par la méthode des disques [66].

b. Méthode du puits ou cylindre

Proposé par Cooper et Woodman en 1946, reprise par Shroder et Messing (1949), elle mesure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique [67].

c. Méthode de dilution

Les huiles essentielles à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide sans oublier que les

techniques de dilutions exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et après incubation on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu [68].

d. Méthode de CMI

La CMI (Concentration minimale inhibitrice) définie par la concentration la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée [69].

1. Matériels végétaux:

Nous avons choisi trois plantes pour notre travail concernant les feuilles d'oranges amère (*Citrus aurantium*) et les feuilles d'oranges douce (*Citrus sinensis*) et la troisième plante est *Ammi visnaga* (noukha). On a choisi les feuilles amère et douce pour avoir la différence entre elles, et le choix d'ammî en raison de ses nombreuses avantages thérapeutiques dans notre population.

2. La région et la période de la récolte des matériels végétaux étudiés

2.1. Feuilles d'oranges (*Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*)

L'orange est le fruit de l'oranger. C'est un arbuste à feuilles persistantes qui ne supporte pas les hivers rigoureux et qui se plaît sous le climat méditerranéen une température inférieure à 2⁰c fait dégâts sur les feuilles [70]

On a récoltées les feuilles durant le mois février au mois de mars Les feuilles d'oranges douce (*Citrus sinensis*) avec lesquelles nous avons travaillé récoltées dans la région de **MESRA** wilaya de **MOSTAG ANEM**. Les feuilles d'oranges amère (*Citrus aurantium*) récoltées au centre de la wilaya de **Mostaganem**



Figure19 : Arbre (*Citrus sinensis*)



Figure20 : Arbre (*Citrus aurantium*)

2.2. *Ammi visnaga* (noukha) :

Les ombelles d'*Ammi* récolté en mois mai dans la région **sidi Ali** wilaya de **Mostaganem**.



Figure21 : La plante *Ammi visnaga*

3. Conservation les matériels végétaux

3.1. feuilles oranges *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis*

Une fois le tri les feuilles orange est terminé, notre plante est lavée soigneusement à l'eau froide puis séchées l'ombre et à température ambiante dans un endroit aérée. Pour faciliter le séchage, les échantillons sont brassés chaque jour, surtout au début du celui-ci. L'étape de séchage séjourne environ de 15 à 20 jours, puis conservé dans des sacs en papier et transporté au laboratoire pédagogique de chimie de notre faculté, par la suite avant le broyage , la plante est chauffée dans l'étuve à température 40°C pendant 24h .les figures (22et23) représente les feuilles oranges avant et après séchage .



Figure22 : Feuilles d'orange avant séchage



Figure23: Feuilles d'orange après séchage

3.2. *Ammi visnaga*

On a procédé de la même façon que pour les feuilles d'oranger .Le séchage a pris environ 20 jours, conservée dans des sacs en papier et transporté au laboratoire jusqu'au jour de l'extraction.



Figure24 : *Ammi visnaga* fraîche







Figure25 : *Ammi visnaga* sèche

4. Mode opératoire :

Le tableau4 représente les matériels et les méthodes utilisés dans ce travail pour l'extraction des plantes qu'on a utilisées les feuilles oranges, *Citrus sinensis*, et les feuilles oranges *Citrus aurantium* , *Ammi visnaga*).

Tableau 4 : Les matériels et les méthodes utilisés pour l'extraction

matières végétales	matériels utilisés	méthodes utilisées
Les feuilles oranges <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>ammi visnaga</i>	<ul style="list-style-type: none"> -100g de matière végétale sèche -1000ml de l'eau distillée -Chauffe ballon -Ballon de 1000ml -Élévateur -Erlen -Balance 	<p>Méthode de clewenger</p> 
Les feuilles oranges <i>Citrus aurantium</i> , <i>Citrus sinensis</i> et <i>ammi visnaga</i>	<ul style="list-style-type: none"> -1000g de matière végétale sèche -2000 ml l'eau distillée -balance -plaque chauffante -flacon -récupérer l'extrait 	<p>Méthode entrainement à la vapeur</p> 
Les feuilles oranges <i>Citrus aurantium</i> , <i>Citrus sinensis</i> et <i>ammi visnaga</i>	<ul style="list-style-type: none"> 30g de matière végétale sèche -300ml d'eau distillée -ballon de 300ml -chauffe ballon -élévateur -balance -verre de montre -appareil évaporateur rotatif 	<p>Méthode de soxhlet(l'eau comme solvant)</p>  <p>Appareil évaporateur rotatif</p> 

5. La cinétique des huiles essentielles

La cinétique d'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles oranges *citrus aurantium* *citrus sinensis* et *ammi visnaga* est basée sur le contrôle du volume (ml) de l'extrait par rapport au temps (min), pour déterminer le temps maximal (tmax) nécessaire d'extraire une quantité maximale de l'huile.

6. Les tests phyto-chimiques :

Dans le but de vérifier la présence ou l'absence de quelques composants photochimiques, nous avons réalisé quelques tests classiques en utilisant des réactifs chimiques spécifiques.

- **Tanins**

2ml d'extrait plus 2 à 3 gouttes de FeCl₃ (1%) sont incubés pendant 15 min à 50°C, leur présence est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir. [71]

- **Flavonoïdes**

1ml d'extrait est mélangé à 1 ml d'acide chlorhydrique concentré plus 3 ou 4 copeaux de Magnésium. L'apparition d'une coloration rouge, orange ou rose indique la présence des flavonoïdes. [71]

- **Les sucres réducteurs**

A 1 ml de chaque extrait on ajoute 2ml de solution Fehling puis les tubes sont incubés au bain marie pendant 20 min. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique. [71]

- **Les coumarines**

5 ml de l'extrait est évaporé à sec, le résidu est dissout dans l'eau chaude (2 ml) ensuite le mélange est partagé en deux parties égales. La première représente un témoin, la deuxième est traitée avec 0,5 ml NH₄OH à 10 %. Une goutte de chaque tube est prélevée puis déposée sur le papier filtre. Examiner sous la lumière UV. L'observation d'une fluorescence confirme la présence de coumarines. [71]

- **Les alcaloïdes**

Deux réactifs sont utilisés : Réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés

- **Réactif de Mayer** : 5g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.
- **Réactif de Wagner** : 2g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

- **Sur l'extrait éthanoïque :**

0,5g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml, ajouter 10 ml de H₂SO₄ dilué au 1/10 (10 ml). Agitation et macération pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire.

- ✓ Filtration sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 10 ml de filtrat.
- ✓ 1 ml de filtre + 5 gouttes du réactif de Mayer s'il apparaît un précipité blanc- jaunâtre c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.
- ✓ 1 ml de filtre + 5 gouttes du réactif de Wagner s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes [72]

- **Sur l'extrait aqueux :**

Dans un bain-marie on mélange 0,2 ml de l'extrait aqueux avec 5 ml d'une solution aqueuse de HCl préparée à 1% (en utilisant un agitateur avec barreau magnétique) Après filtration un volume de 1 ml du filtrat est traité par 3 gouttes du tétra-iodo-mercurate de potassium connu sous le nom du réactif de Mayer, alors que l'autre quantité est traitée par le réactif de Wagner. Toute turbidité ou précipitation indique la présence des alcaloïdes. [73]

- **Amidon**

L'amidon est caractérisé par un réactif spécifique connu sous le nom de réactif d'amidon. Ce dernier a été préparé comme Suit :

Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium.

- Chauffer pendant 5min; Diluer jusqu'à 500 ml.
- La détection de l'amidon s'effectue comme suit

Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ; ajouter le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue- violacée. [74]

- **Les saponosides**

Dans un tube à essai, 10 ml de l'extrait aqueux est agité énergétiquement pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min [72]. Et la teneur en saponosides est évaluée. [75]

- + Pas de mousse = test négatif
- + Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- + Mousse de 1-2 cm = test positif
- + Mousse plus de 2 cm = test très positif

➤ **Tannins galliques et cathéchiques:**

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée (1%). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (Tannins galliques), verte ou bleu-verte (Tannins cathéchiques). [75]

7. Analyses chimiques et physiques des extraits et des huiles essentielles obtenus :

7.1. Rendement

➤ **Définition :**

Le rendement les extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter.

- **Méthode de mesure :**

Le rendement exprime en pourcentage est calculé par la formule suivante (Mohammedi, et al) [76]

$$R\% = \frac{\text{Masse d'extrait sec}}{\text{Masse de la matière végétale}} \times 100$$

7.2. Indice de réfraction :

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'extrait maintenu à une température constante. [77]

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le refractomètre la figure 26 qui est instrument optique servant à déterminer l'indice de réfraction d'une substance c'est à dire la mesure dans laquelle la lumière est déviée en traversant la substance.



Figure26 : Le refractomètre

7.3. Mesure de pH

pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène, mesure l'activité des ions hydrogène (H⁺) en solution plus couramment, le ph mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. [78]

7.4. La densité

On pèse une certaine quantité de l'huile étudiée à l'aide d'un pycnomètre, puis on calcule la densité par la formule suivante :

$$d_{\theta} = \frac{m_1 - m_0}{m_2 - m_0}$$

m₀ : poids du pycnomètre

m₁ : poids du pycnomètre rempli d'eau distillée.

m₂ : poids du pycnomètre rempli d'HE.

d_θ : Densité à température ambiante

$$d_{20} = d_{\theta} + (\theta - 20)0.00068$$

θ : Température ambiante.

d_{20} : Densité à 20°C

0.00068: la variation de la densité quand la température varie de 1°C [79]

7.5. Mesure la matière sèche et humidité

Mesure La matière sèche est déterminée selon la norme NFB51-004 à partir d'une masse E de matière végétale introduite dans un creuset taré, puis séché dans une étuve à 105 C° jusqu'à poids constant. Après refroidissement le creuset est pesé. Le taux de matière sèche (MS%) est :

$$MS(\%) = S/E \times 100$$

S : Masse du creuset taré après dessiccation

E : Masse de la matière végétale

À partir du pourcentage de la matière sèche on peut calculer l'humidité en pourcentages

H(%) :

$$H(\%) = 100\% - MS\%$$

MS% : du pourcentage de la matière sèche



Figure27: Creuset tare+ la matière sèche

7.6. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec la méthode de folin-ciocalteu selon la méthode décrite par (Nagi p,et al) [80]

En milieu basique et avec la présence des composés phénoliques, Le mélange Phosphotungstique ($H_3PWO_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) est réduit en bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}) lors de L'oxydation des polyphénols la coloration bleu est proportionnelle à la teneur en polyphénols, qui peut être dosée par spectrophotométrie UV-visible. [81]

Une gamme étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 μg /ml).

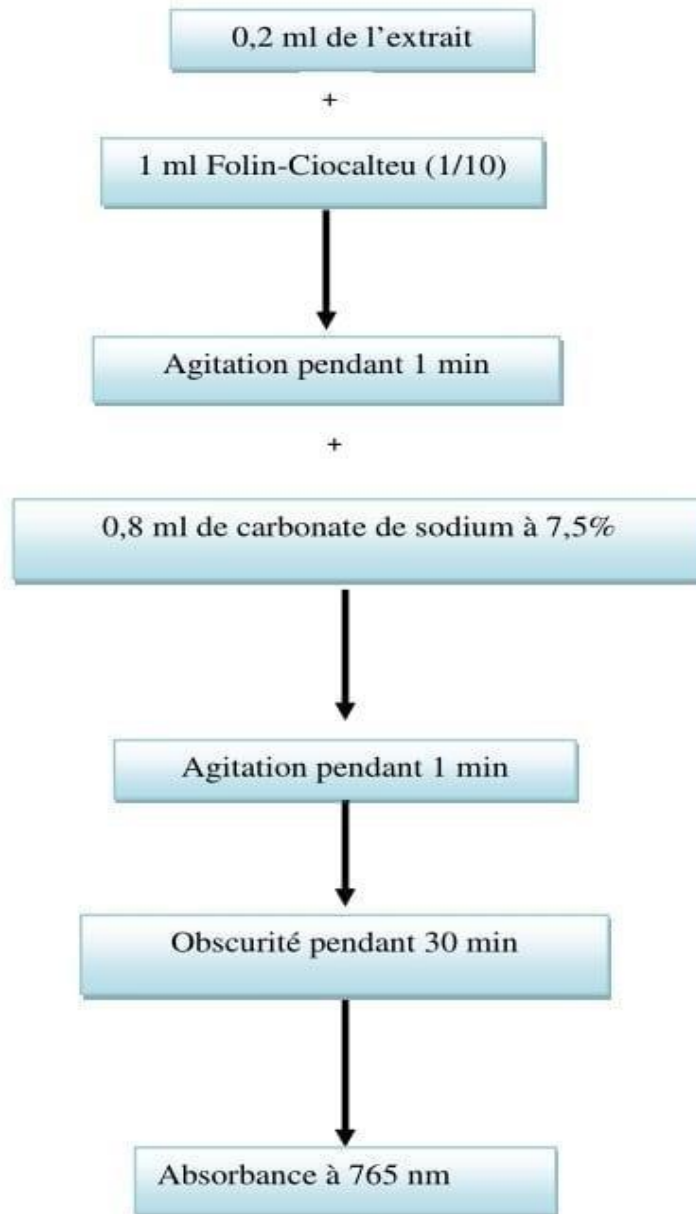


Figure28: protocole de dosage des polyphenols totaux. [80]

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500ug/ml)

7.7.Dosage de la vitamine C par iodométrie :

La méthode de titrage indirecte de la vitamine C par iodométrie a été décrite par plusieurs Auteurs [82]. La technique utilisée est celle du dosage redox par retour. Un volume connu d'extrait des plantes après l'infusion.

Des aliments sont mis en présence d'une quantité connue de diode en excès. La totalité de la

vitamine C réagit avec le diode en excès et le diode restant est dosé par une solution de Thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Dans un bécher, On introduit un volume $V_1 = 5$ ml de l'extrait à partir de sa brique, puis

On ajoute quelques gouttes d'empois d'amidon, et un volume $V_2 = 10$ ou $V_2 = 5$ ml d'iode de Concentration C_2 . La solution est alors noire, à cause de l'excès d'iode.

On remplit une burette graduée avec la solution de thiosulfate de sodium à $C_1 = 5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Et on titre la solution de diode restant jusqu'à disparition complète de la coloration noire, puis

On note le volume V_{EQ} de thiosulfate de sodium versé à l'équivalence.

Le témoin de ce dosage est un mélange de l'extrait, de diode et quelques gouttes d'empois d'amidon.

7.8. Teste du DPPH:

Le principe de ce test se résume en la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée qui se transforme en coloration jaunâtre (après réduction). Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie.

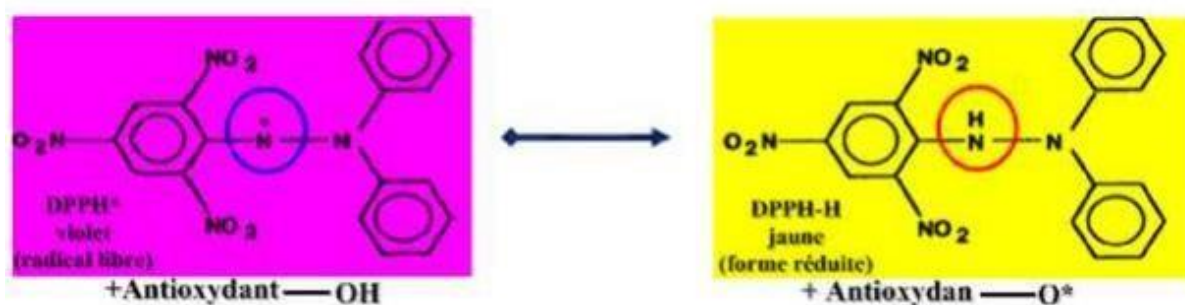


Figure29: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant [83]

Le test de DPPH a été réalisé suivant la méthode décrite par **Chen et al [84].et Leitao et al. [85]**.

La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 4 mg de la poudre (0.004%) dans 100 ml de l'éthanol (EtOH).

Les échantillons des huiles essentielles ont été préparés par dissolution dans l'éthanol (EtOH) à raison de 20 µg/2ml. Ces solutions, dites solutions mères, ont subi ensuite des dilutions pour avoir les concentrations suivantes : 1,25; 2,5; 5; 10; 20 et 40 µg/ml. Le test s'effectue en mélangeant 4 ml de la solution précédente de DPPH avec 1ml de l'huile à tester à différentes concentrations. L'antioxydant de référence ou le contrôle positif (l'acide ascorbique) La mesure de la variation de l'absorbance a été faite 30 min après l'introduction des cuves dans le spectrophotomètre et l'absorbance a été lue à 517nm. Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante **[85,86]** :

$$I\%=100\times (A \text{ Témoin}-A_{\text{test}})/A_{\text{Témoin}}$$

Les concentrations des extraits en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 20%

Une gamme étalon a été réalisée en utilisant 0.0176g acide ascorbique à différentes concentration (0.2 ; 0.25 ; 0.33 ; 0.5 ; 0.66 ; 0.75g/ml).

8. analyses biologiques des extraits et des huiles essentielles obtenus :

▪ Activité antimicrobienne :

Pour avoir l'antibactérienne des extraits obtenus on a fait une analyse biologique appelée activité antibactérienne

8.1. Matériels biologiques :

✓ 8.1.1. Milieux de culture utilisés :

Les milieux de culture utilisés dans cette étude, sont :

- Gélose Nutritive pour la conservation des souches bactériennes.

- Bouillon Nutritif pour l'enrichissement de l'inoculum.

Gélose de Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits.

✓ Milieu Mueller Hinton

Le Muller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'extrait (Sabouraud + Gentamycine) et Extrait de Malt pour l'isolement et l'entretien des champignons et l'étude de leurs sensibilités à l'extrait.

➤ Les compositions de milieu Mueller Hinton :

Infusion de viande de bœuf...300ml

Peptone de caséine17.5g

Amidon de maïs....1.5g

Agar.....17g

Ph final=7.41



Figure30 : Milieu Mueller Hinton

✓ Milieu de bouillon nutritif :

Le bouillon nutritif constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières. [87]

➤ Préparation de bouillon nutritif

- Mettre en solution 20,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
 - Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. [87]

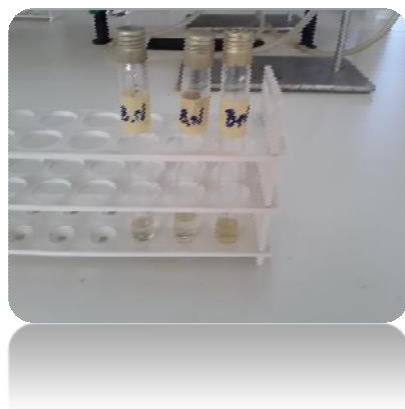


Figure31 : Flacon de bouillon nutritif

➤ **les compositions de milieu nutritif**

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 10,0 g
- Extrait de viande..... 5,0 g
- chlorure de sodium.....5.0 g [87]

8.1.3. Les boîtes pétris :

Des boîtes de Pétri en polystyrène transparent de haute qualité pour la culture de micro-organismes. Leur grande stabilité permet leur utilisation dans les automates de versement pour plaque et leur empilage facile.

8.1.4. Les microplaques

Des microplaques en polystyrène transparent à 96 puits, à surface traitée pour la culture cellulaire. Stérilisée par rayons gamma

9-Evaluation activité antibactérienne :

9.1. Isolement des souches :

Chaque souche a été ré-isolée sur son milieu de culture spécifique, repiquée sur un milieu de conservation, et incubée à 37°C pendant 24 heures. L'évaluation de l'activité antimicrobienne

de l'extrait s'est faite selon la méthode de diffusion sur disques de papier filtre et la méthode de diffusion en puits (**la méthode de Barefoot et kaenhammer**)

9.2. Préparation l'inoculum :

L'inoculum a été préparé en transférant 10 µl de culture conservé a 10 ml de bouillon nutritif de chaque bactérie pathogène testé et incubée 37° C pendant 24h. Puis ajuster la Densité optique entre 0,080 à 0.1 avec un spectrophotomètre a la longueur d'onde de 600nm qui correspond à 10^7 ufc/ml. [88]

9.3. Origine des souches microbiennes utilisées :

Dans notre travail nous avons utilise les souches pathogène ça veut dire capable de provoquer des maladies chez l'homme ou les animaux, le tableau 5 indique la nature et l'origine des souches utilisées.

Tableau5 : Represente les souches utilisées et leurs références

Les souches	Références
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC278553
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10876
<i>Condidaalbicans</i>	ATCC10231

10. techniques activités antibactériennes utilisées :

a. technique de disque pour les huiles essentielles :







➤ Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée de sang. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance des souches bactériennes seront déduits.

➤ **Etapes de la méthode (diffusion de disque)**

Le test de l'aromatogramme que nous avons réalisé par les étapes dans le tableau 6

Tableau6 : Représente les étapes de la méthode de disque

					
1-préparation Des concertations des souches bactériennes.	2-chaque souche est ensemencée par Inondation sur Les boites pétris	3--ajouter le milieu Mueller Hinton tiède dans les boites.	4-imbibé le disque dans l'huile.	5-mettre le disque sur la surface de milieu	6-mettre les boites pétris dans étuve à 37°C pendant 24h

b. Technique de diffusion en puits pour les extraits :

- ✓ **L'activité antibactérienne des extraits a été étudiée pour chaque souche bactérienne :**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme)




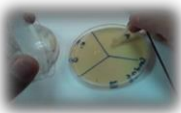


Repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (Gélose molle) l'effet

Du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du Microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la Technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé [89].

Cette méthode consiste à couler 21 ml Muller Hinton molle avec 100µl d'une culture Jeune de 18h d'incubation de nombre de 10^7 ufc/ml (la densité optique 0.08-0.1) sur une Boite de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits Sont creusé à l'aide d'un embout stérile. Généralement on réalise un puits par boite de 6mm de diamètre.

Un volume de 80ul de l'extrait brut est mis dans les puits. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de La substance antibactérienne (pré-diffusion) [90]. La présence de zone d'inhibition formée autour des puits est examinée après 18 à 24h d'inhibition [91]. La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre des zones d'inhibition. Les étapes de cette méthode dans le tableau 7

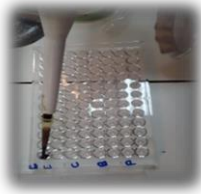


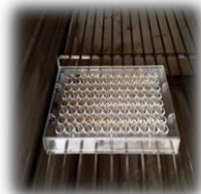
Tableau7 : Représente les étapes de la méthode des puits

					
1-préparation des concentrations des souches bactériennes de l'inoculum de 10^7 ufc/ml	2-mettre chaque souche dans une boîte pétri	3-mettre le milieu (Mueller Hinton) tiède dans une boîte pétri	4-faire des puits a la surface de milieu à l'aide des embouts	5-mettre l'extrait dans les puits précédant	6-mettre les boîtes pétris dans étuve à 37°C pendant 24h

C .Détermination la concentration minimale d'inhibitrice (C.M.I) pour les huiles essentielles et les extraits :

Une plaque de 96 puits permet la détermination de la CMI des extraits ou les huiles essentielles vis-à-vis des souches qui ont présentées les diamètres d'inhibition les plus importants. Généralement la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la plus faible concentration de substance antimicrobienne capable d'inhiber la croissance visible d'un microorganisme donné après un temps d'incubation de 24h. La détermination de la C.M.I a été réalisée par la méthode de micro dilution sur milieu liquide selon CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [92]. Les étapes de cette méthode dans le tableau 8.

Tableau8: Représente les étapes de la technique C.M.I

			
<p>1-200μl de l'extrait brut à tester sont introduits dans premier puits</p>	<p>2-100 μl de bouillon nutritif est déposé dans chaque puits</p>	<p>3-Puis une dilution jusqu'au 11 ème puits, après100ul inoculum est ajouté dans chaque puits</p>	<p>4-En fin l'incubation à 37°C pendant 24h puis la lecture mesure les zones d'inhibition</p>

1. cinétique d'extraction :

La cinétique d'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis* et la plante d'*Ammi visnaga* par hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger et Entraînement à la vapeur d'eau, est représenté sur les (figures 32- 35).

a. Par Clevenger :

□ *Ammi visnaga*

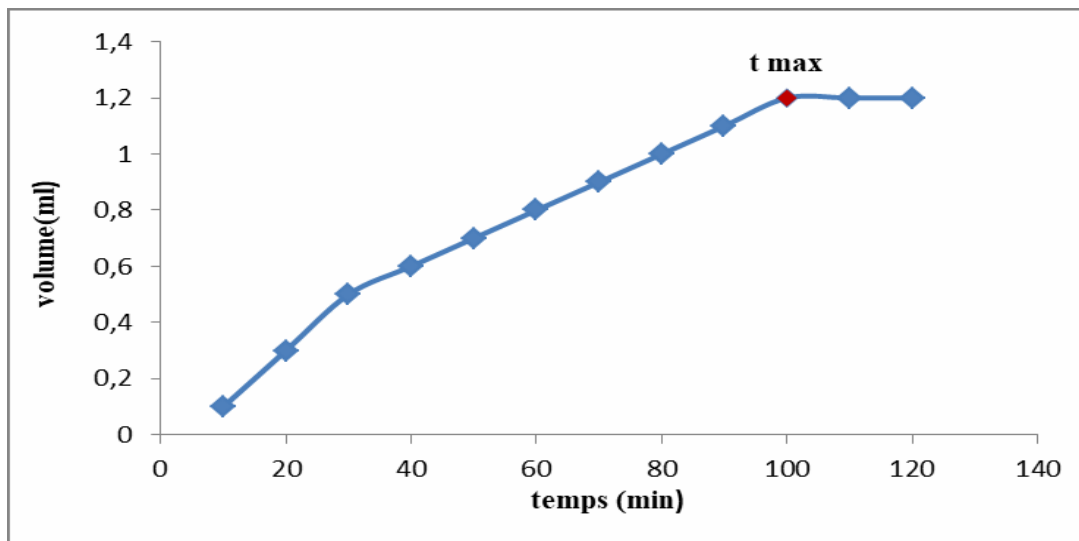


Figure32 : La cinétique d'extraction (*Ammi visnaga*)

Après plusieurs essais, la cinétique d'extraction *Ammi visnaga* par Clevenger est représenté sur la figure 32. On aboutit à la formation des premières gouttes d'huile essentielle dès les premières minutes, avec un maximum d'extraction à un temps de 80 min.

- **Les feuilles d'Oranges douce** (*Citrus sinensis*) et **Les feuilles d'oranges Amère** (*Citrus aurantium*) n'on donner aucune goutte d'huile essentielle après plusieurs essais.

b. Par Entraînement à la vapeur d'eau :

□ (*Citrus sinensis*)

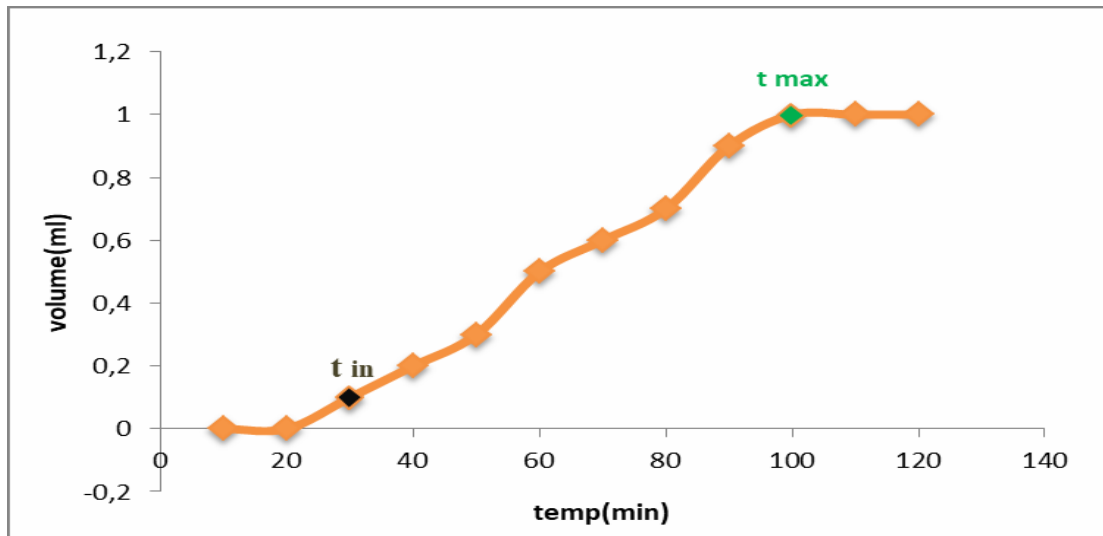


Figure33 : La cinétique d'extraction (*Citrus sinensis*)

Après plusieurs essais, la cinétique d'extraction de *Citrus sinensis* par Entraînement à la vapeur d'eau est représenté sur la figure 33. Cela nous a permis de définir le temps nécessaire à la formation des premières gouttes d'huile essentielle en 30 minutes, et le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile, ceci est à 100 minutes.

□ (*Citrus aurantium*)

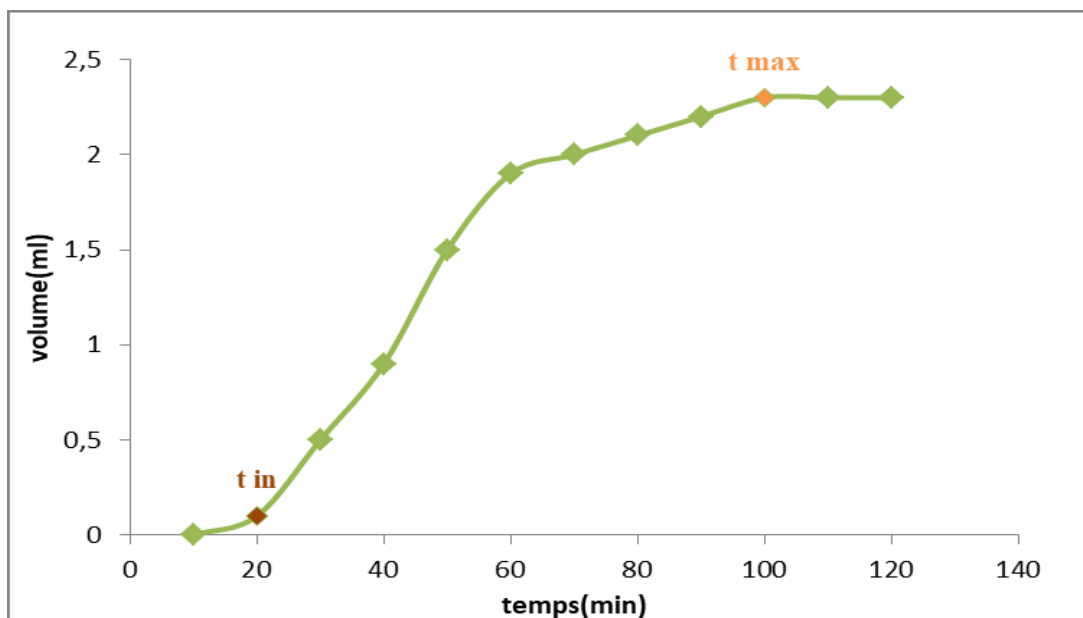


Figure34 : La cinétique d'extraction (*Citrus aurantium*)

Après plusieurs essais, la cinétique d'extraction *Citrus aurantium* par Entraînement à la vapeur d'eau est représenté sur la figure 34. Cela nous a permis de définir le temps nécessaire

à la formation des premières gouttes d'huile essentielle à 20 minutes, et le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile essentielle à 100 minutes après plusieurs essais.

- *Ammi visnaga*

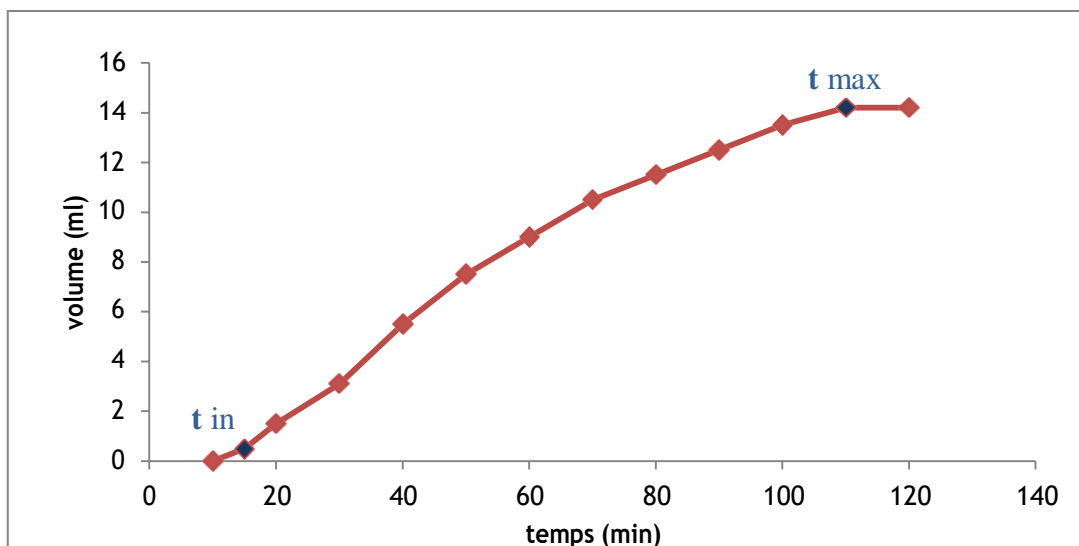


Figure35 : La cinétique d'extraction (*Ammi visnaga*)

Après plusieurs essais, la cinétique d'extraction *Ammi visnaga* par Entraînement à la vapeur d'eau est représenté sur la figure 35 .Cela nous a permis de définir le temps nécessaire à la formation des premières gouttes d'huile essentielle en 15 minutes, et le temps nécessaire pour extraire le maximum à 110 minutes.

2. Détermination du rendement :

Le tableau 9 donne les rendements moyens d'huile essentielle (HE) et d'extrait(EX) pour des quantités de plantes 100 g de matière végétale utiliser pour la méthode de clevenger et 1000g pour la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau et 50g pour la méthode de soxhlet (ceci dépend de la cartouche utilisée).

Tableau 9 : Rendement des huiles essentielles et des extraits des trois plantes par trois méthodes d'extraction étudiées.

Les plantes Mode D'extraction	<i>Ammi visnaga</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>
Clevenger	H.E=3.33%	H.E=0%	H.E=0%
Entraînement à la vapeur d'eau	H.E=1.2%	H.E=0.1%	H.E=0.25%
Soxhlet	EX=28.41%	EX=6.59%	EX=16.16%

➤ Les résultats obtenus (tableau9) par:

la méthode de clevenger montrent que le rendement le plus élevé est celui d'huile essentielle d'*ammi visnaga* (R=3.33%). En comparant avec les travaux de (KHALFALLAH et, al) [93] qui a donné un rendement d'huile essentielle de 1.33% pour 200g par la méthode de clevenger, on remarque que notre plante est plus rentable. Le rendement pour les feuilles de *citrus sinensis* et *citrus aurantium* est nul par la même méthode.

La méthode d'entraînement à la vapeur donne un rendement d'huile essentielle de *citrus sinensis* égale à 0.1% et pour *citrus aurantium* R=0.25%.

Les extraits obtenue par la méthode de soxhlet d'*ammi visnaga* (28.41%) est plus grand que celui de *citrus aurantium*(16.16%) et de *citrus sinensis* (R=6.59%).

3. Détermination de la teneur en eau

Les figures (36- 38) représentent la teneur en eau de (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* , *Ammi visnaga*) respectivement.

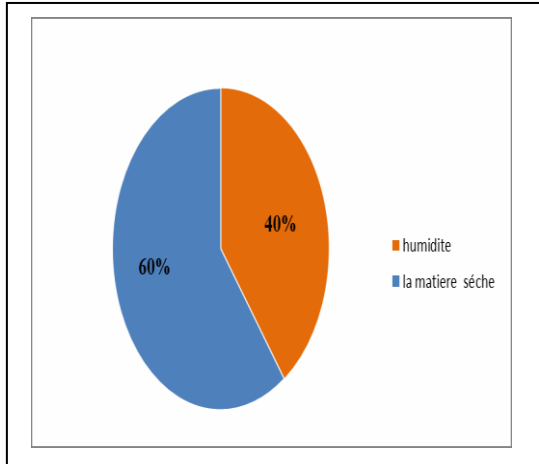


Figure 36: Taux d'humidité des Feuilles (*Citrus sinensis*).

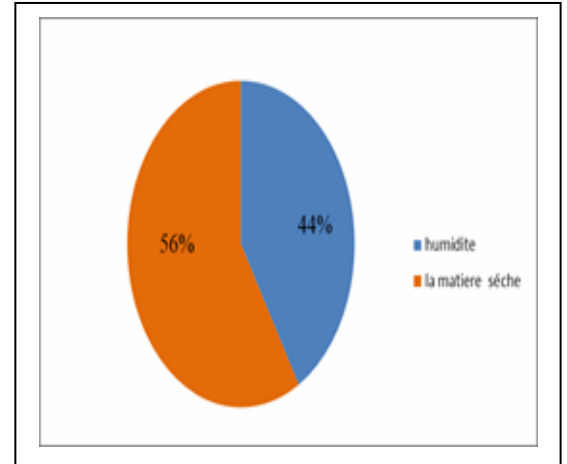


Figure 37: Taux d'humidité des feuilles (*Citrus aurantium*).

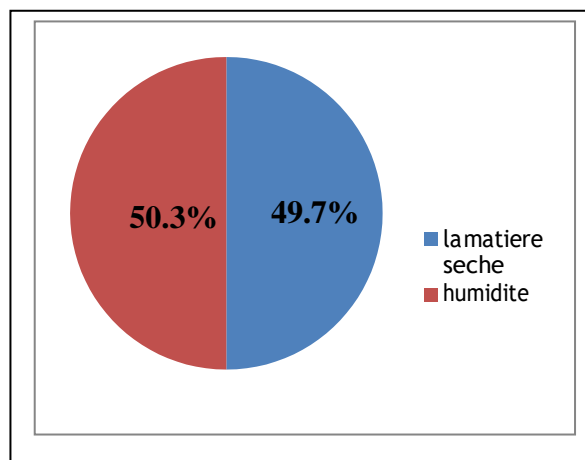


Figure 38: Taux d'humidité (*Ammi visnaga*).

Les végétaux sont riches en eau, la mesure de la quantité d'humidité de nos échantillons (les feuilles de *Citrus sinensis* ; *Citrus aurantium*) et plante (*Ammi visnaga*) ont révélé un taux de 40%, 44%, 50.3 % successivement cela signifié que presque la moitié du poids de la plante fraiche est constituée d'eau. Nous constatons que *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* ont des proportions presque équivalentes de matière sèche et d'eau.

4. Détermination de la densité :

La détermination de la densité d'une huile essentielle nous renseigne sur sa pureté. Elle est en fonction de la composition chimique des huiles. Les résultats sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Rendement d'huile essentielle et d'extraits des trois plantes par trois méthodes d'extraction étudiées.

Mode d'extraction	<i>clevenger</i>	<i>Entrainement à la vapeur d'eau</i>	<i>soxhlet</i>
Plante			
<i>Citrus sinensis</i>	-	0.844	0.983
<i>Citrus aurantium</i>	-	0.850	0.984
<i>Ammi visnaga</i>	0.876	0.880	0.985

Dans notre étude, nous avons déterminé ce critère de pureté à la température 20°C, chez toutes les huiles essentielles et les extraites. Les résultats révèlent que les valeurs moyennes des densités sont inférieures de celle de l'eau 0.998.

5. Détermination de l'indice de réfraction :

Cet indice indique la capacité de l'HE à réfléchir la lumière. Ce rapport est généralement élevé, il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.335. Il dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température, il varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en mono terpènes donne un indice élevé. Les indices de réfraction des HEs et des EX, ont été calculés et ramenés à 20°C à l'aide d'un réfractomètre. Les résultats sont représentés dans le tableau 11

Tableau11 :L'indice de réfraction des huiles essentielles et des extraits des feuilles citrus sinensis, citrus aurantium et la plante d'ammi visnaga par trois méthodes d'extraction étudiées

Mode d'extraction plante	Clevenger (HE)	Entrainement à la vapeur d'eau (HE)	Soxhlet (EX)
<i>Citrus sinensis</i>	-	1.474	1.472
<i>Citrus aurantium</i>	-	1.456	1.470
<i>Ammi visnaga</i>	1.436	1.445	1.450

L'indice de réfraction de nos huiles essentielles est de 1.436 à 1.474. Il est normatif selon les AFNOR-ISO 3140. On comparant avec les résultats obtenue par **Peryanayagm et al [94]** qui ont obtenu un indice de réfraction de huile essentielle des feuilles *Citrus aurantium* égale 1.457 et pour *Citrus sinensis* : **Uchechinekwenye et al [95]** ont obtenu un indice de réfraction égale 1.473 on peut dire que nos résultats sont similaire.

6. Mesure de pH :

pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H⁺) (appelés aussi couramment protons) en solution. Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH papier. Les résultats sont représentés sur le **tableau 12**

Tableau12 : Résultat de pH des huiles essentielles et des extraits des trois plantes (*Citrus sinensis* ; *Citrus aurantium* et *Ammi visnaga*) par trois méthodes

palnte	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Ammi visnaga</i>
Mode d'extraction			
Clevenger (HE)	-	-	4.8
Entrainement à la vapeur d'eau (HE)	5	4.8	5

D'après les résultats obtenus (tableau 12), nous remarquons que les valeurs de pH des huiles essentielles sont normatif (4-6) selon AFNOR-ISO (3140).

7. Optimisation de dosage de la vitamine C :

Le protocole expérimental suivi pour la détermination de la teneur en vitamine C dans 5ml d'extraits par le dosage indirect [84]

Calcul de la masse de Vitamine C :

$$m(\text{Vitamine C}) = n(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)_{\text{Total}} \times M(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$$

Le tableau 13 donne la différente masse de vitamine C des plantes étudié.

Tableau 13 : Resultats obtenus de vitamine C des feuilles *citrus aurantium*, *citrus sinensis* et la plante *ammi visnaga*

	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Ammi visnaga</i>
n(C₆H₈O₆) Total (mol)	0.0047	0.003	0.017
La masse de vitamine C (g) (10⁻⁴)	0.266	0.017	0.965

8. Tests phytochimiques :

Les résultats des tests phytochimiques des feuilles d'oranger (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*) et la plante (*Ammi visnaga*) sont représentés sur le tableau 14.

Tableau14 : Résultats phytochimique de l'extrait des plantes : *Citrus aurantium*., *Citrus sinensis* et d' *Ammi visnaga* .

extraits aqueux / Famille chimique	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Ammi visnaga</i>
Amidon	-	-	-
Tannins	+	+	+++
Saponosides	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+
Alcaloïdes (extrait éthanolique)	+	+	+

Alcaloïdes : extrait aqueux	-	-	-
Coumarines	-	-	-
Les tannins galliques	-	-	-
Les tannins cathechique	+	+	++
Les composés réducteurs	-	-	-

Les résultats sont interprétés comme suit :

- (+) présence.
- (++) Présence moyenne.
- (+++) Présence fort.
- (-) absence.

L'étude photochimique de l'extrait des feuilles *Citrus sine sis*, *Citrus sinensis* et *Ammi visnaga* montre que ces plantes contiennent : les tanins, les flavonoïdes et les tanins cathechique, Et ne contiennent pas l'amidon, les alcaloïdes, les coumarines et les tanins galique. La teneur des tanins plus grande dans *d'Ammi visnaga* que les feuilles de *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*. Nos résultats d'*ammi visnaga* a été presque similaire avec (**Jaradat nidal amin et, al**)[96].ou ils ont trouvé l'extrait *Ammi visnaga* est riche en flavonoïdes et les tanins mais pauvre en alcaloïdes.

9. Dosage des polyphénols totaux :

Dosage des polyphénols totaux, en équivalent d'acide gallique, les extraits et des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* et les feuilles (*Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*) Sont mesurés d'après le protocole donné [80] à une longueur d'onde 765nm, La quantité des polyphénols totaux est déterminée par l'équation ($y=ax+b$) de la droite d'étalonnage d'acide gallique (figure 39). Les résultats obtenus sont dans les tableaux 15.

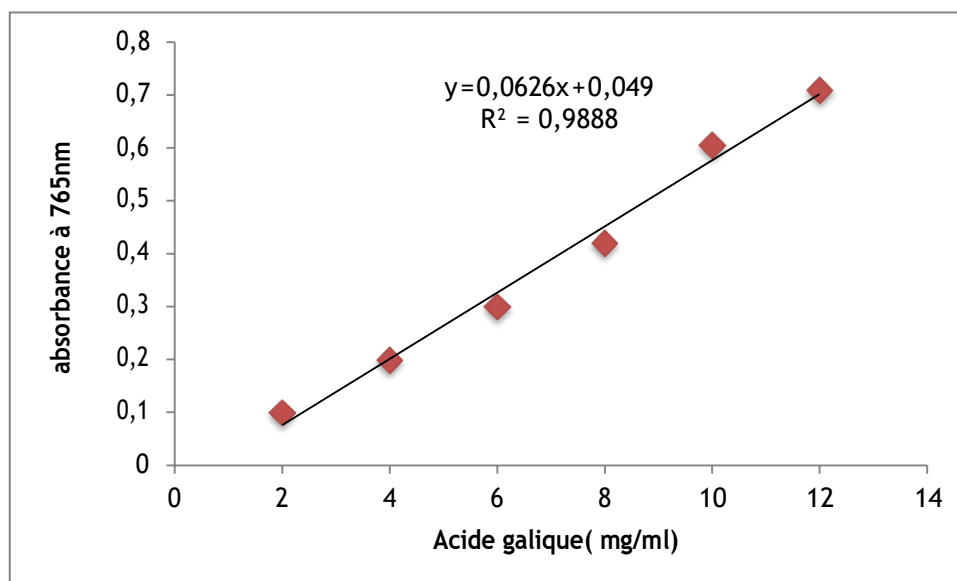


Figure39: Droite d'étalonnage d'acide gallique.

Tableau15 : Résultats de quantité des polyphénols totaux des extraits et des huiles essentielles des (*Ammi visnaga*, *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis*) par les trois méthodes d'extraction utilisées.

Extraits	<i>Ammi visnaga</i>		<i>Citrus aurantium</i>	<i>Citrus sinensis</i>
mode d'extraction	Soxhlet		soxhlet	soxhlet
Absorbance	1.613		0.897	1.143
Concentration mgEAG/mg d'extrait	3.235		1.782	2.282
Huile essentielle	<i>Ammi visnaga</i>		<i>Citrus aurantium</i>	<i>Citrus sinensis</i>
Mode d'extraction	clevenger	Entrainement à la vapeur d'eau	Entrainement à la vapeur d'eau	Entrainement à la vapeur d'eau
Absorbance	3.097	4.000	2.276	2.194
Concentration mgEAG/mg (H.E)	5.577	6.311	4.239	4.411

Les teneurs en polyphénols totaux qui sont représenté dans le tableau15 montrent que l'extrait d'*Ammi visnaga* représente la teneur la plus élevée de l'ordre de 3.235mgEAG /mg d'extrait (mg équivalent acide gallique par mg d'extrait) par la méthode d'extraction soxhlet et leur huile essentielle de (5.577 mg EAG/mg d'HE et 6. 311mg EAG/mg d'HE) (mg équivalent acide gallique par mg d'huile) par les méthodes de celevenger et entrainement à la vapeur d'eau respectivement. Puis la teneur de *Citrus sinensis* de l'ordre de 2.282 mgEAG /mg d'extrait et 4.239 mg EAG/mg d'HE, tandis que la teneur la plus basse a été obtenue avec l'extrait des feuilles de *Citrus aurantium* de l'ordre de 1.782mgEAG /mg d'extrait et 4.239mgEAG /mg d'huile essentielle. On remarque que les feuilles d'*Ammi visnaga* renferment plus des composés phénoliques que les feuilles *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*. Si on compare nos résultat pour les feuilles *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis* avec ceux de (Samira lagha-Benamrouche et, al) [97] qui a trouvé une concentration de 19.54 et 44.4mg EAG/mg pour les feuilles (*Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*) respectivement, On remarque que les quantités des polyphénols totaux de [97] plus grande que nos résultat obtenus.

10. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazil) :

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm, à partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer la courbe qui représente les variations de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (IC50) de l'extrait et de l'huile essentielle dans la figure (41-47). La détermination graphique d'IC50 se fait à partir de la courbe qui constitue l'activité antioxydante de l'extrait et d'huiles essentielle.

La figure 40 représente la concentration d'acide ascorbique mg /ml en fonction de pourcentage d'inhibition.

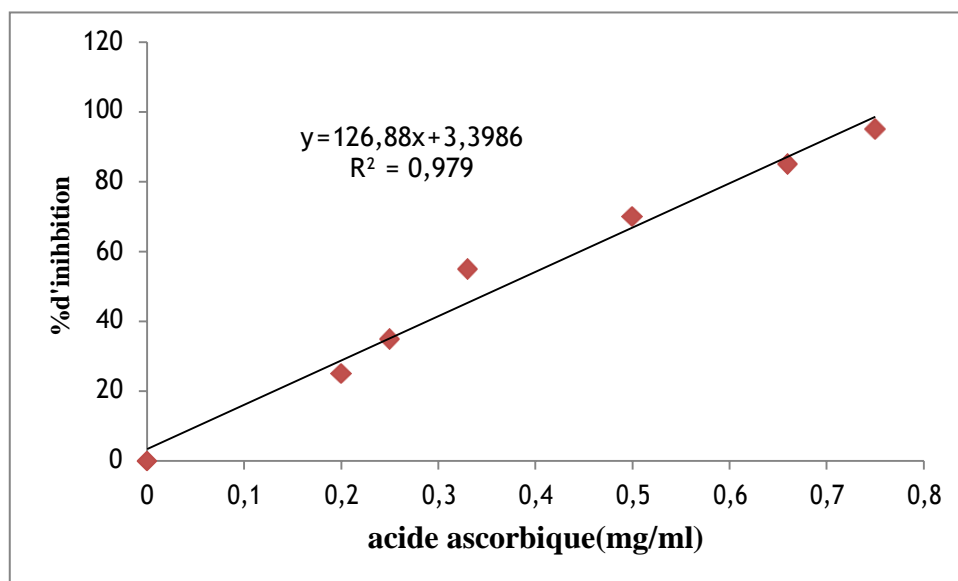


Figure 40: Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique

les figures (41-47) sont représentés les courbes de pourcentage d'inhibition des différents d'extraits et d'huiles essentielles de (*Ammi visnaga*, *citrus sinensis*, *citrus aurantium*) par différente méthode d'extraction (soxhlet , clevenger , entrainement à la vapeur d'eau) .

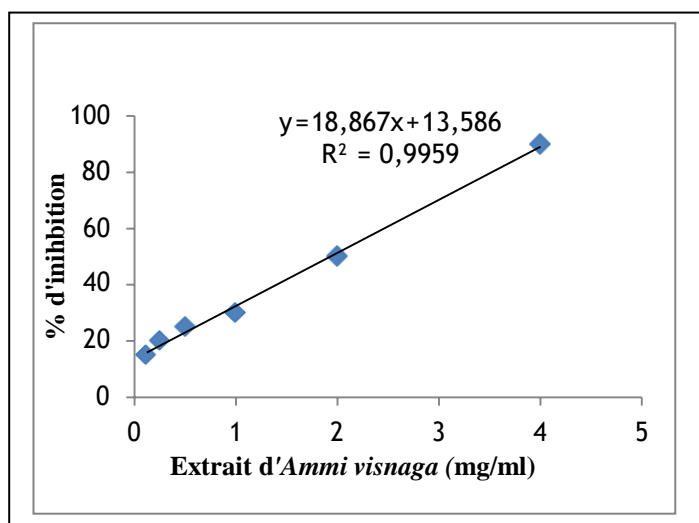


Figure41 : courbe de pourcentage d'inhibition d'extrait (*Ammi visnaga*).

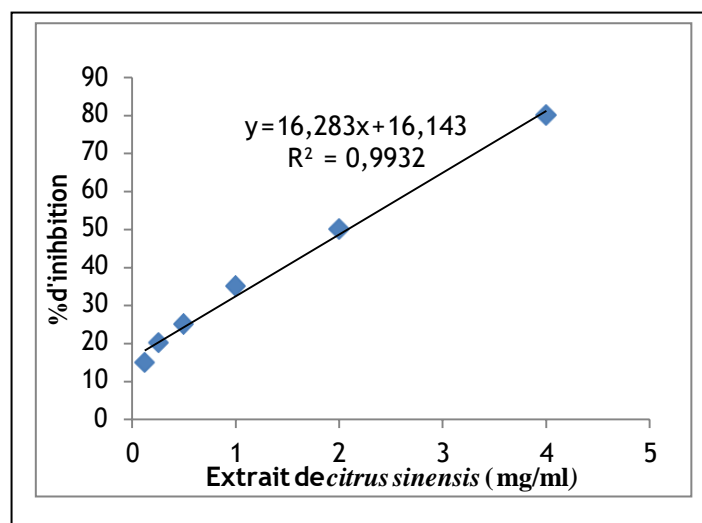


Figure42 : courbe de pourcentage d'inhibition d'extrait (*citrus sinensis*).

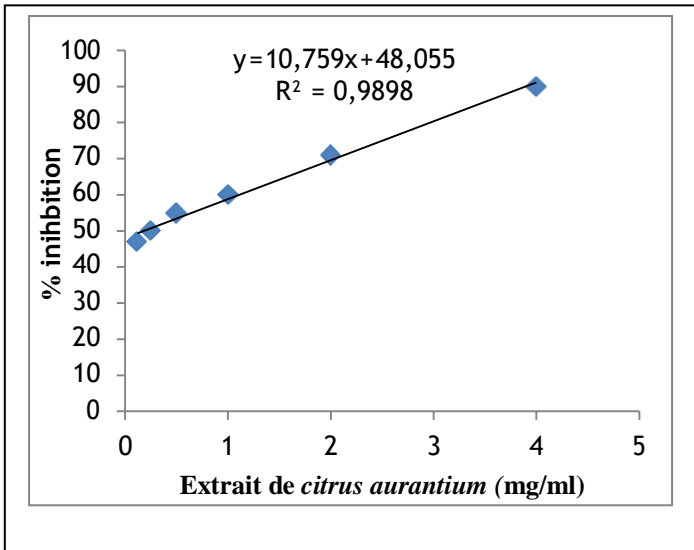


Figure43 : courbe de pourcentage d'inhibition d'extrait (*citrus aurantium*).

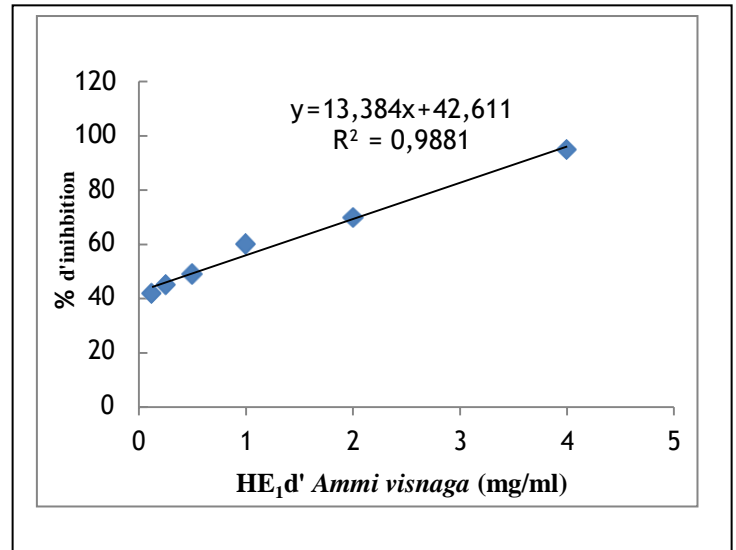


Figure44 : courbe de pourcentage d'inhibition d'huile essentielle (*Ammi visnaga*).

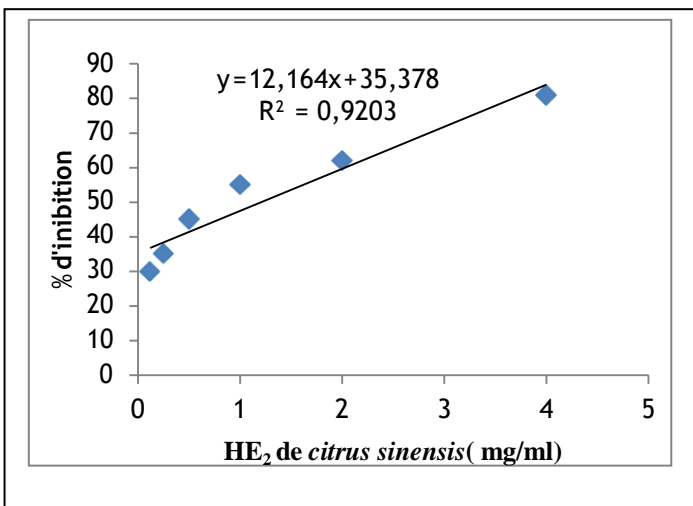


Figure45 : courbe de pourcentage d'inhibition d'huiles essentielle (*citrus sinensis*).

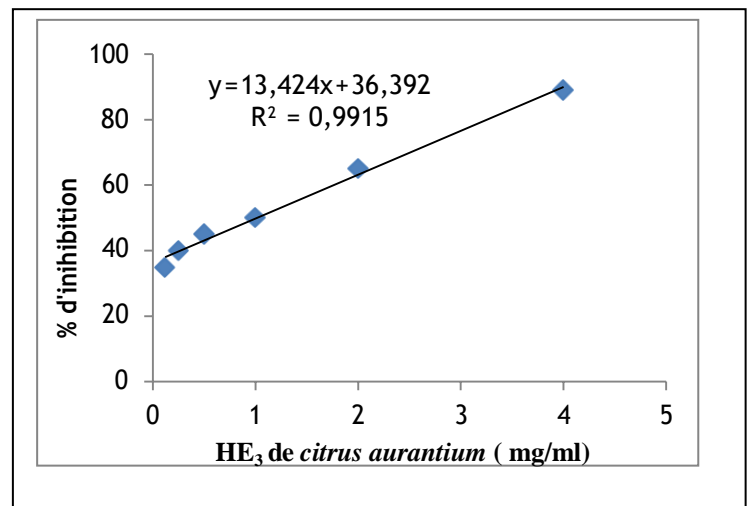


Figure46 : courbe de pourcentage d'inhibition des différents d'extrait (*citrus aurantium*).

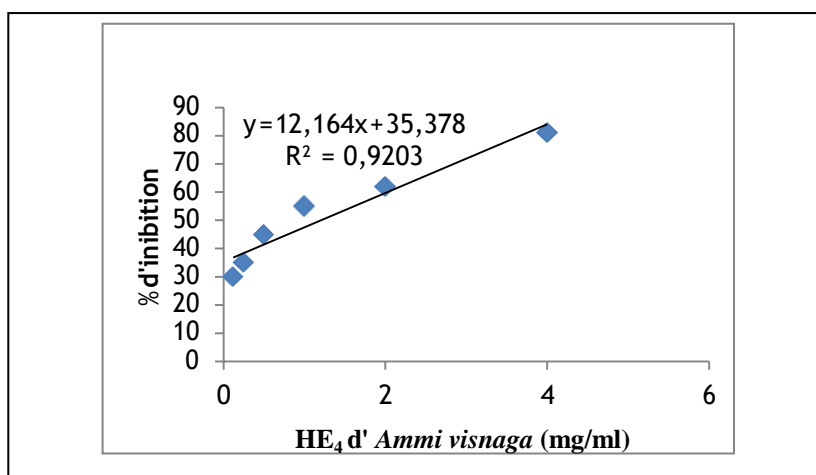


Figure47 : courbes de pourcentage d'inhibition d'huile essentielle (*Ammi visnaga*).

Les concentrations des extraits, des huiles essentielles et de l'acide ascorbique qui inhibent 50% du DPPH (IC50) déterminés graphiquement (figures 41 - 47). Les résultats calculés des IC50 sont représentés dans le tableau16.

Tableau16 : concentration d'inhibition à 50% (mg/ml) des extraits et des huiles essentielles des (*Ammi visnaga*, *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*) par les trois méthodes d'extraction utilisées.

plante	<i>Ammi visnaga</i>		<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Acide ascorbique
mode d'extraction	Clevenger	Enraiment à la vapeur d'eau	Enraiment à la vapeur d'eau		
IC50 mg/ml (huiles essentielle)	0.605	0.552	1.013	1.202	0.362
Mode d'extraction	<i>Soxhlet</i>		<i>soxhlet</i>	<i>soxhlet</i>	
IC50 mg/ml (extrait)	0.701		1.930	2.079	0.362

D'après les valeurs déterminés d'IC₅₀, on constate que la plus faible concentration pour les extraits et les huiles essentielles est de *l'ammi visnaga* (IC₅₀=0.701mg/ml d'extrait) par la méthode de soxhlet , et (IC₅₀= 0.552mg/ml d'huile) par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau .

D'après [98][99] [100] indiquent que plus la valeur IC₅₀ est faible, plus l'extrait ou huile essentielle sera efficace.

11. Activité antimicrobienne des extraits et des huiles essentielles

Cette partie de notre travail vise à évaluer l'effet antibactérien d'extrait et d'huile essentielle de (*Ammi visnaga*, *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*), c'est pour cette raison nous avons opté la méthode des disques, c'est une méthode qualitative de diffusion sur gélose, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne ceci est représenté sur les Figures (48-50).

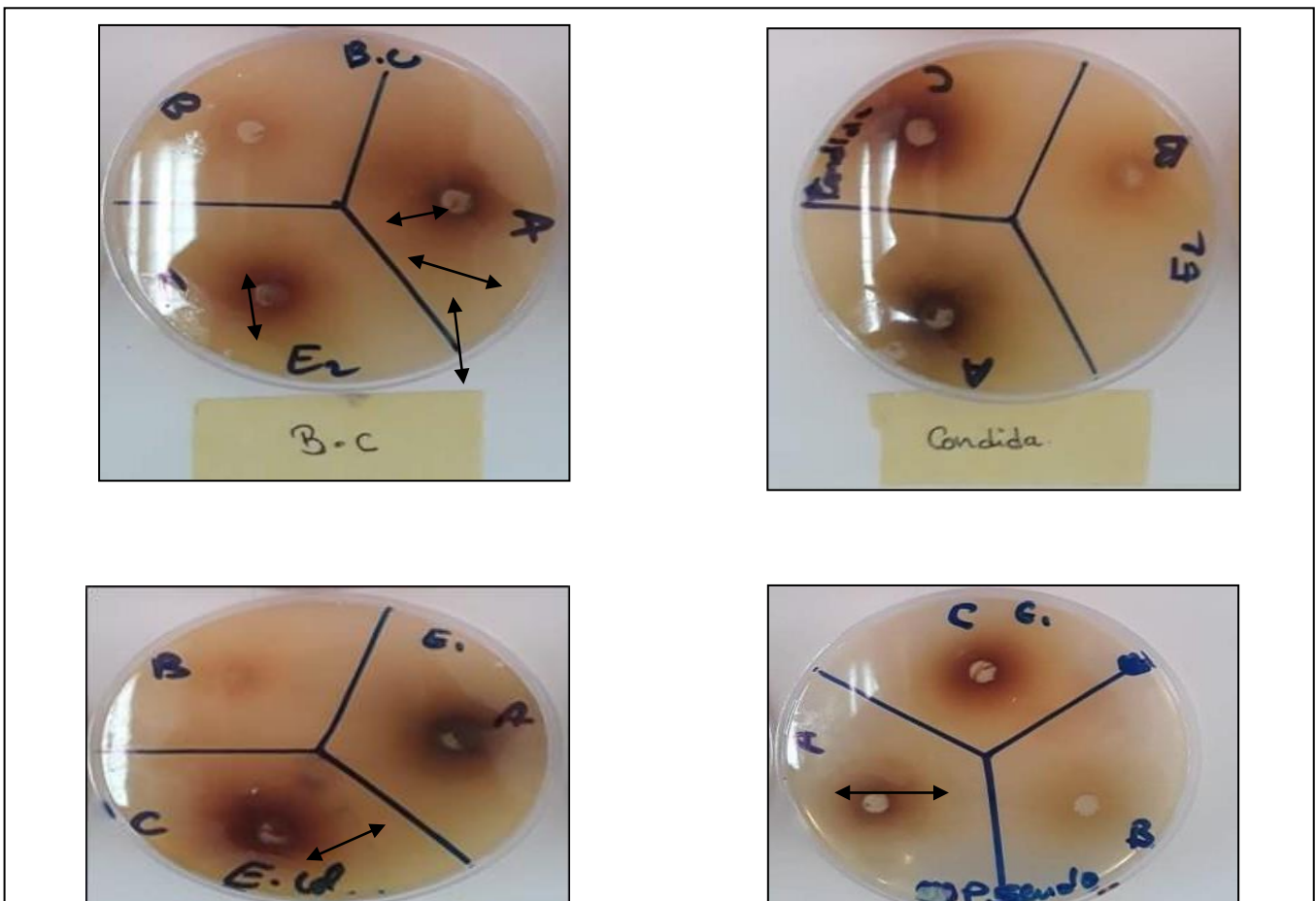


Figure 48 étude de l'activité antibactérienne de trois extraits brute en présence de quatre souches (*P.S*, *E.coli*, *B.C* et *condida*)

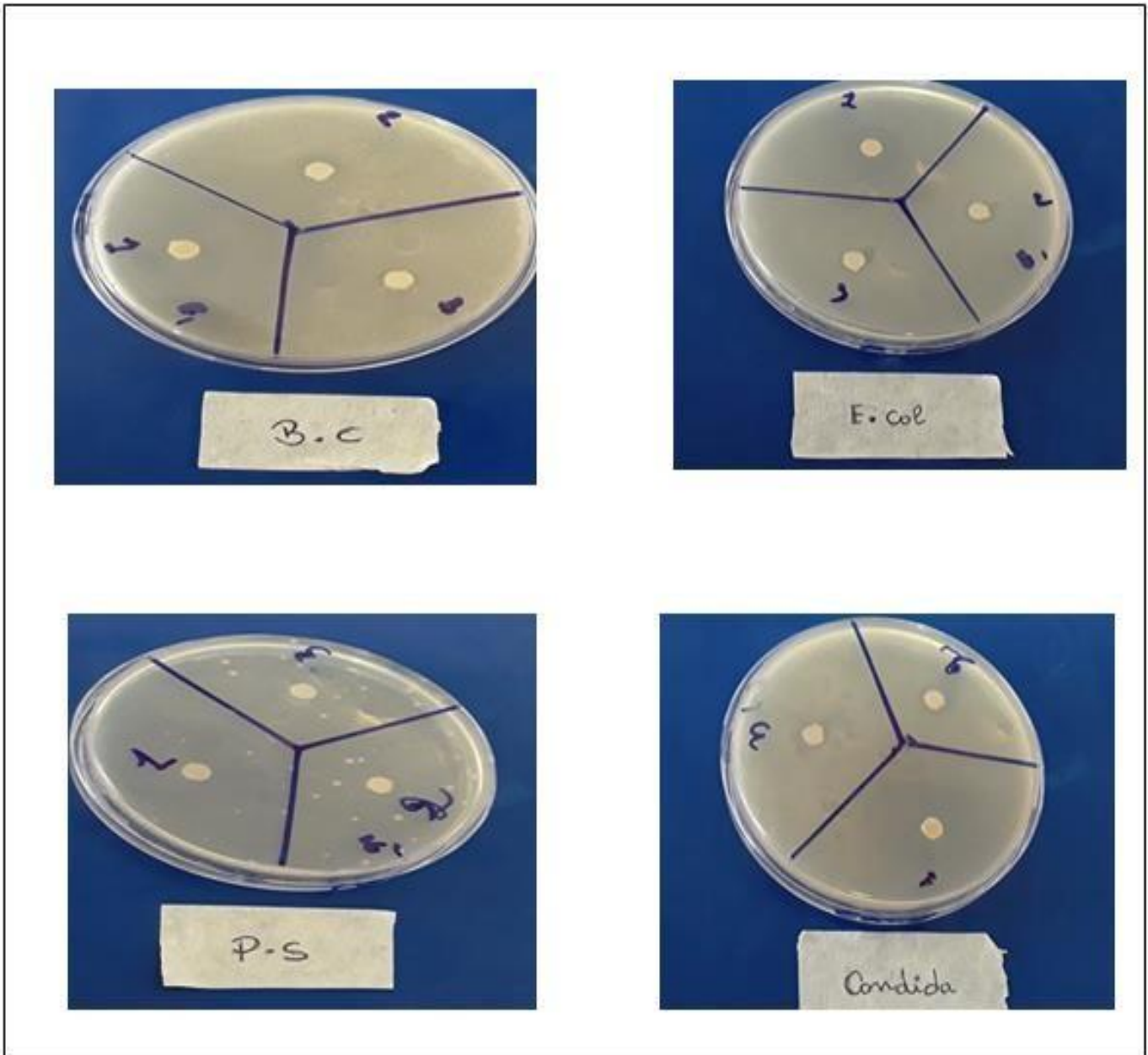


Figure49 : Etude de l'activité antibactérienne de trois l'huiles essentielles brute en présence de (P.S, E.coli B.C et condida).

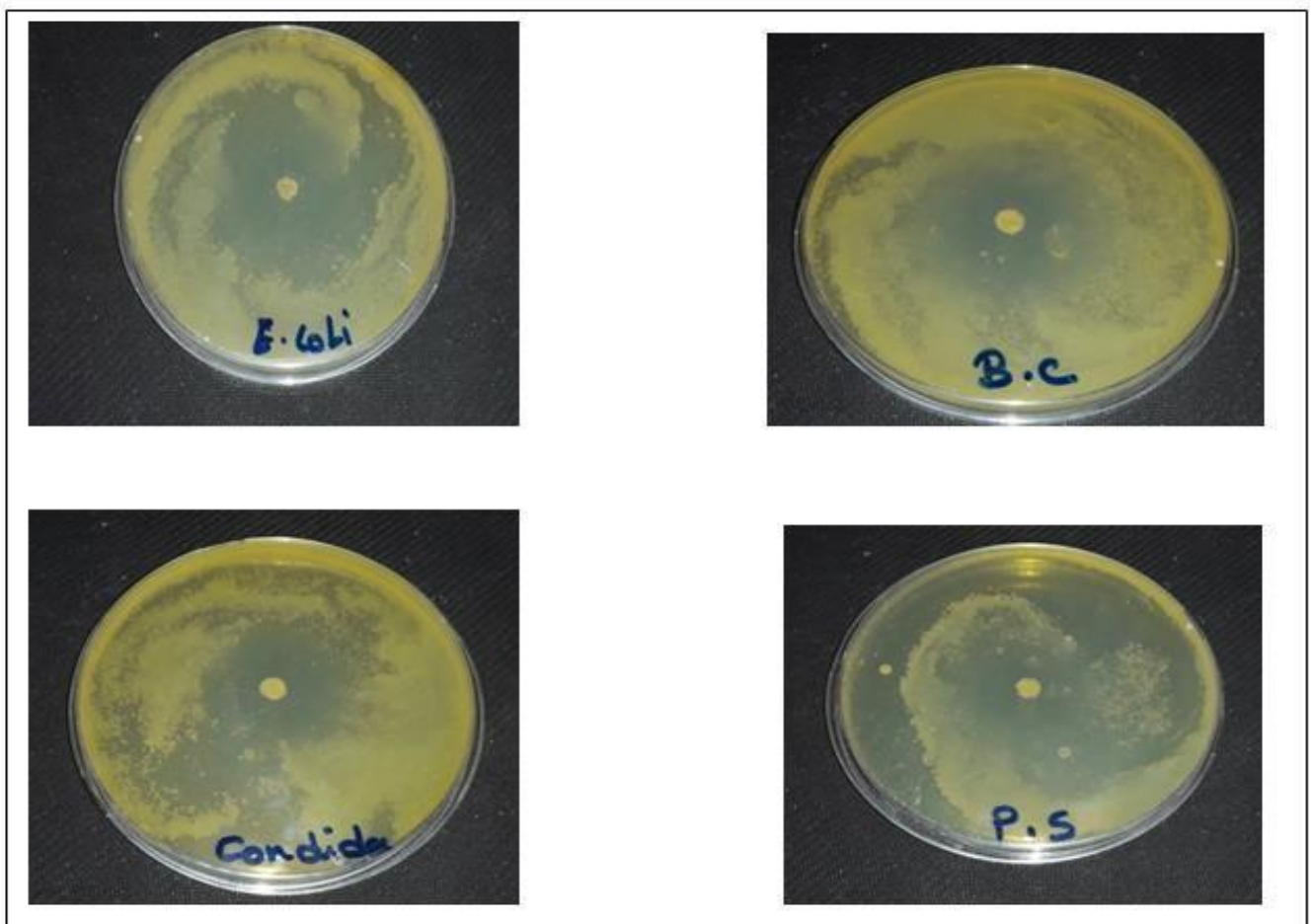


Figure50 : Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* par la méthode

d'entraînement à la vapeur d'eau en présence de (P.S, E.coli B.C et condida)

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres d'inhibition, qui sont représenté par une auréole claire formé autour de chaque disque : les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activités qui sont représenté dans le tableau17.

Tableau17: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D) (Pouce et al) 2003[101]

Inhibition	Transcription	Sensibilité
$D \leq 8\text{mm}$	-	Résistante
$9\text{mm} \leq D \leq 14$	+	Sensible
$15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$	++	Assez sensible
$D > 20\text{mm}$	+++	Très sensible

Pour l'évaluation de l'effet antimicrobien, les diamètres mesurés des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus sont représenté sur les tableaux (18,19).

Tableau18: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus (Extraits).

Souches	Extraits	Mode d'extraction	Diamètre (mm)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	<i>Ammi visnaga</i>	Soxhlet	30
	<i>Citrus sinensis.</i>	Soxhlet	11
	<i>Citrus aurantium</i>	Soxhlet	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>PS</i>)	<i>Ammi visnaga</i>	Soxhlet	22
	<i>Citrus sinensis.</i>	Soxhlet	12
	<i>Citrus aurantium</i>	Soxhlet	21
<i>Bacillus cereus</i> (<i>B.C</i>)	<i>Ammi visnaga</i>	Soxhlet	21
	<i>Citrus sinensis</i>	Soxhlet	11
	<i>Citrus aurantium</i>	Soxhlet	17

<i>Condidaalbicans</i> (<i>Condida</i>)	<i>Ammi visnaga</i>	Soxhlet	31
	<i>Citrus sinensis</i>	Soxhlet	12
	<i>Citrus aurantium</i>	Soxhlet	24

D'après les résultats obtenus dans le tableau 18 on remarque que les extraits d'*Ammi visnaga* et *Citrus aurantium* présentent une Activité biologique très important sur toutes les souches bactériennes étudiées et moyennement important pour l'extrait de *Citru sinensis*.

Tableau19 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus (Huiles essentielles).

Souches	Huile essentielle	Mode d'extraction	Diamètre (mm)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	<i>Ammi visnaga</i>	clevnger	18
		Entrainement a la vapeur d'eau	55
	<i>Citrus aurantium</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	8
	<i>Citrus sinensis</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PS)	<i>Ammi visnaga</i>	Clevenger	30
		Entrainement a la vapeur d'eau	50
	<i>Citrus aurantium</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	12
	<i>Citrus sinensis</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	8
<i>Bacillus cereus</i> (B.C)	<i>Ammi visnaga</i>	Clevenger	26
		Entrainement a la vapeur d'eau	35
	<i>Citrus aurantium</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	11
	<i>Citrus sinensis.</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	9

<i>Candidaalbicans</i> (<i>Condida</i>)	<i>Ammi visnaga</i>	clevenger	31
		Entrainement a la vapeur d'eau	60
	<i>Citrus aurantium</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	24
	<i>Citrus sinensis</i>	Entrainement a la vapeur d'eau	14

D'après les résultats obtenus dans le tableau 19 on observe que l'huiles essentielle d'*Ammi visnaga* avec les deux méthodes d'extraction (clevenger et entrainement à la vapeur d'eau) et *Citrus aurantium* présentent une Activité biologique très importante sur les souches bactériennes étudiées et moyennement important pour L'huile essentielles de *Citrus sinensis*. les résultats de [93] de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* sur les souches (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) a une activité très importante avec des diamètres de (E.coli =29mm, PS= 25mm).

12. Determination de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I) :

Généralement la concentration minimale inhibitrice (CMI) est considérée comme étant la Plus faible concentration de substance antimicrobienne capable d'inhiber la croissance visible d'un microorganisme donné après un temps d'incubation de 24h. Le tableau 20 represente les resultats recapitulatives obtenus pour les trois plantes et methodes d'extracion étudiées .

Tableau20: Resultat de concentration minimale inhibitrice de (*Ammi visnaga* , *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*) pour les trois methodes d'extraction étudiées .

Les souches		<i>Condida</i>	<i>B.C</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.S</i>
Mode d'extraction					
<i>Ammi visnaga</i>	<i>soxhlet</i>	12.5	50	12.5	50
<i>Citrus sinensis</i>	<i>soxhlet</i>	100	100	100	50
<i>Citrus aurantium</i>	<i>soxhlet</i>	100	100	100	100
<i>Ammi visnaga</i>	(Clevnger)	25	25	25	25
	Entrainement à la vapeur d'eau	12.5	3.125	3.125	6.25
<i>Citrus aurantium</i>	Entrainement à la vapeur d'eau	50	50	25	25
<i>Citrus sinensis</i>	Entrainement à la vapeur d'eau	25	25	50	25

D'après Les Résultats de CMI (concentration minimale inhibitrice) obtenus par la méthode de micro dilution des extraits et des huiles essentielles de (*Ammi visnaga*, *Citrus aurantium* , *Citrus sinensis*) sont représentés dans (voir Annexe1-14) .

Conclusion

L'objectif de cette étude est porté sur l'étude des activités chimiques et biologiques des huiles essentielles et des extraits pour trois plantes les feuilles d'oranges douce (*Citrus sinensis*), les feuilles d'oranges amère (*Citrus aurantium*) et la plante *noukha* (*Ammi visnaga*). Récoltées dans la wilaya de Mostaganem.

- ❖ Le dosage de la vitamine C dans 5 ml extrait (infusion) de chaque plante donne $0.266 \cdot 10^{-4}$ g d'acide ascorbique pour les feuilles *Citrus sinensis*, $0.017 \cdot 10^{-4}$ g pour les feuilles *Citrus aurantium* et $0.956 \cdot 10^{-4}$ g pour l'*Ammi visnaga*.
- ❖ le pourcentage d'humidité des plantes utilisées est 50.3% pour *Ammi visnaga*, 44% pour les feuilles *Citrus sinensis* et 40% pour les feuilles *Citrus aurantium*.

Nous avons utilisé trois méthodes d'extraction de type Clevenger, entraînement à la vapeur d'eau et Soxhlet (l'eau comme solvant) afin de voir quelle méthode est adaptée pour quelle plante.

- L'extraction de l'huile essentielle par la méthode de Clevenger, donne un rendement nul pour les feuilles (*Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*) (R=0%), et un rendement égale 3.33% pour l'*Ammi visnaga* et une densité de 0.876 et un indice de réfraction 1.436 et pH=5. Huile essentielle d'*Ammi visnaga* par Clevenger possède une teneur en polyphénols égale 5.577 mgEAG/mg et une activité antioxydante de $IC_{50}=0.605$ mg/ml par le teste de DPPH par spectrophotométrique.
- Par contre l'extraction l'huile essentielle par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau donne un rendement pas mal pour les trois plantes (les feuilles *Citrus sinensis* R=0.1%, les feuilles *Citrus aurantium* R=0.25% et *Ammi visnaga* R=1.22%) et des densité de (0.844, 0.850, 0.880) pour les trois plantes successivement avec un intervalle de pH de (4-6) et des indices de réfraction égales (1.474, 1.466, 1.499) pour trois plantes (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* et *Ammi visnaga*) respectivement, les résultats des polyphénols sont égales (4.411, 4.239, 6.311) mgEAG/mg pour trois plantes (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* et *Ammi visnaga*) respectivement. Le teste de DPPH par spectrophotométrique permet de déterminer les concentrations d'inhibitions 50% (IC_{50}) des trois plantes :
 - $IC_{50}=1.013$ mg/ml (*Citrus sinensis*)
 - $IC_{50}=1.202$ mg/ml (*Citrus aurantium*)
 - $IC_{50}=0.552$ mg/ml (*Ammi visnaga*)

- L'extraction des extraits par soxhlet (l'eau comme solvant) donne un rendement (R=28.41% pour l'*Ammi visnaga*, R=6.59% pour les feuilles *Citrus sinensis* et R=16.16 % pour les feuilles *Citrus aurantium*) et un indice de réfraction est (1.450,1.472, 1.470) pour les trois plantes respectivement. les extraits possèdent une teneur en polyphenols de 3.235, 2.282, 1.782(mgEAG/mg) pour (*Ammi visnaga*,*Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*) respectivement.
- Le résultat de DPPH des trois plantes :
 - IC50=0.701 mg/ml (*Ammi visnaga*)
 - IC50=1.930 mg/ml (*Citrus sinensis*)
 - IC50=2.079 mg/ml (*Citrus aurantium*)

L'activité biologique est réalisée par deux méthodes, la méthode de disque (pour huiles essentielles) et méthode des puits (pour les extraits)

- ❖ L'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles *Citrus sinensis* par la méthode d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau) est sensible pour toutes les souches bactériennes (*Escherichia coli* *pseudomonas aeruginosa*, *bacillus cereus* et *condidaalbicans*) avec un diamètre ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$) .mais l' huile essentielle des feuilles *Citrus aurantium* par la même méthode d'extraction donne une activité biologique sensible avec *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* et *bacillus cereus* sauf avec *condidaalbicans* était très sensible ($D > 20$).
- ❖ Huile essentielle d'*Ammi visnaga* par les deux méthodes d'extraction (clevenger et entraînement à la vapeur d'eau) est assez sensible avec un diamètre $D > 20\text{mm}$ pour toutes les souches bactériennes étudiées.
- ❖ L'activité biologique de l'extrait d'*Ammi visnaga* par la méthode d'extraction soxhlet est assez sensible avec un diamètre de ($D > 20\text{mm}$) pour toutes les souches étudiées .par contre l'extrait de *Citrus sinensis* par la même méthode d'extraction était très sensible avec un diamètre ($15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$).
- ❖ L'extrait de *Citrus aurantium* a une activité antibactérienne assez sensible avec *pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *condidaalbicans*) avec $D > 20$ et très sensible avec *bacillus cereus* ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$).

Donc si on compare les trois méthodes utilisées

on peut dire que la méthode d'extraction la plus adaptée pour les huiles essentielles des feuilles *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* est la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, et pour l'*Ammi visnaga*, les deux méthodes d'extraction (clevenger et entraînement à la vapeur d'eau) ont donné presque le même résultat.

- [1] Ventrella, M.C. et Marinho, C.R. (2008). Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. *Revista Brasil. Bot*, 31(3) : 457-467.
- [2] Zenasni, (2014). Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Agdal, Rabat. 155p.
- [3] Guo et al (2003) .The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell* 12(2):517-24.
- [4] Choi, H-S., Song, H.S., Ukeda, H. et Sawamura, M. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1, 1-Diphenyl-2- picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem*, 48: 4156-4161.
- [5] (Petitjean, 1974), Editorial. In: *Pratiques : linguistique, littérature, didactique*, n°1-2, 1974. pp. 1-4.
- [6] (Larousse, 1997), *Le petit Larousse illustré : Edition 1997 Relié* – 8 janvier 1997.
- [7] Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z.(1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*. 64(2) : 159-164.
- [8] ElQaj M., Ahami A., Belghyti D.,(2007) La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques", (Maroc): 22.
- [9] Nostro, A., Germano M.P., D'Angelo, A.,Marino, A., Cannatelli, M. A. (2000), Extraction methode and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 30(5): 379- 385.
- [10](Iserin P,2001), *Encyclopedie des plantes medicinales*. Ed : Larousse Bourdasse .Paris . p335 .
- [11] (Bruneton J. 2009). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 4^e Ed : Lavoisier ; Paris. P.1269.

- [12] (Decaux I. 2002), *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public Pp6.
- [13] Pinto, E., Palmeira, A., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Goncalves, M.J., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A., Oliveira, S.(2003). Antifungal activity of oregano oils (*Lippia graveolens* and *Origanum virens*) on dermatophyte species. *Clin Microbiol Infec.* 9 (1), 222- 230.
- [14] BOITEAU et POTIER, (1980). La prospection des plantes médicinales. Le Courrier du CNRS, n° 14, oct. 1974, pp. 19-23.
- [15] (Mohammadi,(2006), Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- [16] Bruneton, (1993), Pharmacognosie, phytochimie Plantes médicinales, technique et documentation, p.266- 275- 2 ème édition. Lavoisier. Paris.
- [17] Messkgue, (1975). Mon herbier de sante, Edition Robert Laffont S.A., Paris, pp 1-50.
- [18] Legrand, (1994). Manuel du Préparateur en pharmacie l'usage des élèves préparateurs et étudiants stagiaires en pharmacie, Edition : Masson, pp 1-20.
- [19] Billerbeck, (2002). Les contaminations biologiques des biens culturels : Essai d'utilisation d'huile essentielle en traitement de l'aire. Ed : Elsevier.357-365.
- [20] Teuscheret, (2005). plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc éditions, Paris.
- [21] www.ooreka.fr
- [22] Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A.,(1988). Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie.
- [23] Ollitrault, P., Dambier, D., Froelicher, Y., Luro, F., Cottin, R.,(2000). La diversité des agrumes : structuration et exploitation par hybridation somatique. Compte rendu d'Académie d'Agriculture de France.
- [24] www.tous-les-fruits.com/orange
- [25] www.lesfruitsetlegumesfrais.com/fruits-legumes/agrumes/orange/

- [26] [www .mieux-se-connaître.com/2011/04/loranger-amer/](http://www.mieux-se-connaître.com/2011/04/loranger-amer/)
- [27] Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F,(2010). Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.
- [28] Vogel, (2013). Encyclopédie des plantes. L'univers des plantes médicinales; Act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* 2000, 153 (1- 2): 1-5.
- [29] Francis, (1979). Identifier les fleurs du maroc atlantique par leurs couleurs.
- [30] Sonnenberg , (1995). Isolation and characterization of an angular type dihydropyranocoumaringlycoside from the fruits of *Ammi visnaga* (L.) LAM. (Apiaceae)". *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences* 50(9- 10): 729-731. Inst. Pharmazeutische Biol., Freie Univ. Berlin, Koenigin- Luise Str. 2 and 4, D-14195 berlin, Germany.
- [31] Sittig, (1988). Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse III sabatier. 194p.
- [32] Gynayd et Erim,(2002), Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 954, 291- 294.
- [33] Cazau-Beyret, (2013). Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse III sabatier. 194p.
- [34] Solene, (2012). La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. 142p.
- [35] www.herboratheque.fr
- [36] condoret jean-stéphane et angelov george, (2010) .Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.

- [37] Bruneton, (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2e édition, Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 915 p.
- [38] Benjilali, (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et hydrodiffusion ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- [39] Bousbia, (2011). Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 128p.
- [40] Dongmo, P.M.J., Kuate, J., Boyom, F.F., Ducelier, D., Damesse, F., Zollo, P.H.A., Menut, M. et Bessiere, J.M. (2002). Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de citrus sur la croissance mycelienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*, 57(2): 95-104.
- [41] Faucon,(2015).Traité d'aromathérapie scientifique et médicale Fondements aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.
- [42] Hellal, (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine. Mastère, faculté des sciences agronomiques, Algérie, 120p.
- [43] www.herboratheque.fr
- [44] Fleuriet, (1982). thèse doc. Etat, Montpellier .
- [45] Scalbert, (2005). Dietary Polyphenols and the Singleton ., Antifungal activity in vitro of Aloe vera pulp and liquid fraction against plan pathogenic fungi. *Ind Crops Prod* 21:81–87.
- [46] Manallah, (2012). Activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols. Thèse de Magister de Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas de Sétif, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 86 p.
- [47] Middleton, (2000). Salinity effects on polyphenol content and antioxidantactivities in leaves of the halophyte *Cakil emaritima*. *Plant.Physiol Bioch*, 45: 244-249.

- [48] Leong et Shui, (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.
- [49] Bouakaz, (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*.
- [50] Havasteen,(2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutiquis*, 96: 67-72.
- [51] Ghedira, (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother*. 2005; 3: 162-169.
- [52] HOPKINS, (2003) .Jean Bruneton, *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales*, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales, 1999, 1120 p. (ISBN 2-7430- 0315-4) phyto chimie.
- [10] iserin, (2001) .Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2^{ème} Ed., Paris : 14,275.
- [53] wichtl et anton, (2009). Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris : 38, 41.
- [54] Kansole, (2009) .Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologique de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de leucas martinicansis (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta vahl* et *Orthosiphon pallidus royle* ex Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- [34] Lakhdar, (2015) .La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine. 142p
- [55] Willox J-K., Catignani G-L. et Lazurus S. (2003). Oranges and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43: 13-18.
- [56] Diallo, (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense WILLD*(MYRTACEAE). Thèse de doctorat en pharmacie. Univercité de Bamako : 13-14.
- [57] Moreno-Roohiguez JF., Sotomendivil E.A. (2006).Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *.T.Vulgaris* against *Alternaria citri*.Z.Gnosis.

- [58] Ouriniet (2007). Activité antifongique de l'acide oleique et des huiles essentielles de thymus saturjoides L. et de mentha pulegium L. comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*.
- [59] Edris , (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review-*Phytother. Res*; 2007, Vol. 21; pp 308-323.
- [60] Jukic M. et Milos (2000). Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.)- *Croatia Chemica Acta*; 2005, Vol. 78; N°1; pp 105-110.
- [61] Celiktas O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C , (2007). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621–632.
- [62] Gianni Sacchetti, Silvia Maietti, Mariavittoria Muzzoli, Martina Scaglianti, Stefano Manfredini, Matteo Radice, Renato Bruni , (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621–632.
- [63] Suhr K.I. et Nielson P.V. (2003). Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 665-674.
- [64] Lahlou M, (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils-*Phytotherapy research*. 18: 435-448.
- [65] Fauchère, J.-L. et J.-L. Avril (2002). "Bactériologie générale et médicale" Ellipses Editions Paris. P 365.
- [66] Bellaiche, (1979). Aromatogramme. *In Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Edition Maloine-S-A, tome I. pp. 9-20.
- [67] Sharopov, (2015) .Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 128p.
- [68] Ferhat M. (2009) .Recherche de substances bio actives de *Centaurea microcarpa* coss et dur. Diplôme étude supérieur de biochimie Université de M'sila .

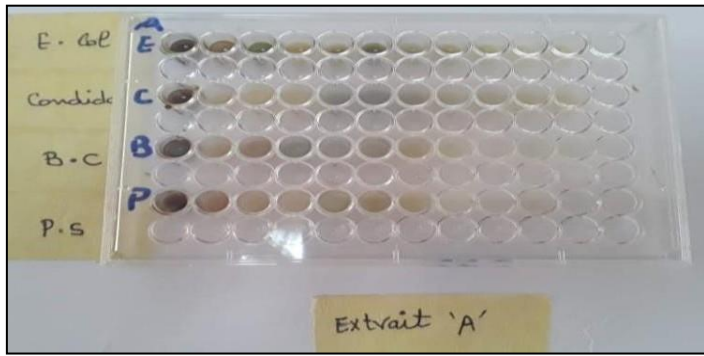
- [69] www.microbes-edu.org.
- [70] agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/documents/pdf/fche_orange.
- [71] Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W.J., & Sener, A., (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. Asian Pacific journal of tropical biomedicine,
- [72] Paris, (1969) .Les plantes et les médicaments, l'origine végétal de nos médicaments. Edition Delachaux et Niestlé SA, Paris.
- [73] Harborne, (1973). Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées. Thèse en Océanologie, Métérologie, Environnement.
- [74] Bruneton, (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3e édition. Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, p1120
- [75] Trease et Evans, (1987). Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. Paris : ACCT.
- [76] Mohammadi, (2006) .Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Telemcen .Th. Mag. Biologie. Univ. Telemcen. 103P.
- [77] Mohamdi Z, (2005). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la région du Tlemcen, Thèse de magistère, Université Abou Bakr Belkaid-Telemcen.
- [78] EI-Harrah khalfi-Habes ouassi la ,boutekedjiret chahrazed et samira(2005) . Departement de zoologie agricole et for estière, In stitut National Agronomique .
- [79] Ferhat M A, Boukhatem M N, Hazzit M, Chemat F., (2016). Rapid Extraction of Volatile Compounds from Citrus Fruits using a Microwave dry Distillation. J. Fundam. Appl. Sci., 8(3),753-781.
- [80] Negi p, jayaprakasha G , jeuna B,(2003) . Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate Peel extracts. Food chemistry,80(3) :393-397 .

- [81] clémente B, Mathieu S, Elena v, Ilonka S, Baghiani A ,(2012).Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) *Revue génie industriel*, 7 : 35-45
- [82] Robinson et Stotz, J. *Bioi. Chem.*, 160, 217Baldesten, A., Hjalmarsson, S.G., Neuman, G,(1978). Isotachophoretic analysis of some organic acids in food. *Fresenius'Z. Anal. Chem.*, 290, 148-149.
- [83] Molyneux, (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211–219.
- [84] Chen c.n., weng m. s., wu c. l., and lin j. k., (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources, *Evid. Based Complement Alternat. Med. J.*, 1, 175-185.
- [85] leitao g.g., leitao s.g., and vilagag w., (2002). Quick preparative separation of natural Naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. *Z. Naturforsch. J.*, 57, 1051-1055.
- [86] wang s.y., wu j.h., shyur l.f., kuo l.h., and chang s.t., (2002). Antioxidant activity of Abietane-Type Diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata,.
- [87] www.biokar_diagnostics.fr
- [88] Kishor, (2005) *Gestion thérapeutique des plaies étendues chez le chien et le chat. Nouveau Praticien Vétérinaire, Hors série : Hospitalisation*, p 125-130.
- [89] Broadasky, 1976 *Contribution à l'étude chimique de l'huile d'arganiaspinosa (L.) (Sapotaceae)*. Thèse Sciences Université de Perpignan. France.
- [90] Doumandj, (2010) *Laboratoire de pharmacognosie, Faculté de pharmacie*,
- [91] Hwanhlem,(2011). *Recettes de la Médecine traditionnelle. Bull. Méd. Trad. Pharm* 2,p 217.
- [92] CLSI, (2008) *Comparaison de l'effet anti-prolifératif de trois stéroïdes végétaux (diosgénine, hécogénine, tigogénine) sur la lignée 1547 d'ostéosarcome humain. Implication de la mitochondrie et de la cyclooxygénase-2 dans l'apoptose induite par la diosgénine sur les lignées 1547, HEP-2 (laryngocarcinome) et M4Beu (mélanome)*. Thèse de doctorat, Université de Limoges, France.

- [93] A.khalfallah ,A.labed ,z.semra B.aikaki ,A.kabouche ,(2011). antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of ammi cispagol (apiaceae) from constantine,algeria .
- [94] k.periyamayagam1, s. dhanalakshmi2, v. karthikeyan3, m. jagadeesan4, (2003) Phytochemical studies and GC/MS analysis on the isolated essential oil from the leaves of Citrus Aurantium .
- [95] N. Ekwenye and Oghenerobo V. Edeha Department of Microbiology Michael Okpara , (2010) . the antibacterial activity of crude leaf extract of citrus sinensis (sweet orange) Uchechi University of Agriculture Umudike P.M.B 7267 Umuahia, Abia State, Nigeria.
- [96] Nidal Amin1, Abualhasan Murad1, Al-Masri Motasem2 , Speih Reem Ibrahim1 , Johari Mona Ass'ad1 , Awad May Ayed1 , Available Online: 1st February,(2011)
- 15). Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (Ammi visnaga.L.) A member of Palestinian Flora Jaradat.
- [97] Samira Lagha-Benamrouchea , Khodir Madani, (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves.
- [98] BRAND WILLIAMS .W, BERSET.C,CUVELIER.M.E," Use of free radical method to evaluate antioxidant activity Lebens " Wissen .U.Tech , 1995 , p: 28 -30
- [99] BLOIS," Détermination antioxydants de M .S . par l'utilisation d'un radical libre stable nature1958, p : 181, 2000, pp : 1199
- [100] MARNEY BUTZ . " Use of the ferrie Reducing Antioxidant Power Test (FRAO) Assay as a Measurement of Antioxidant of Plant Phenylpropanoids Undergraduate Research conference Centennial Studebt Union Minnesota State University , Mankato mars 2002 , p : 25 - 26 .
- [101] (Ponce et al, 2003), Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., Roura S.I. (2003): Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, 36: 679–684.



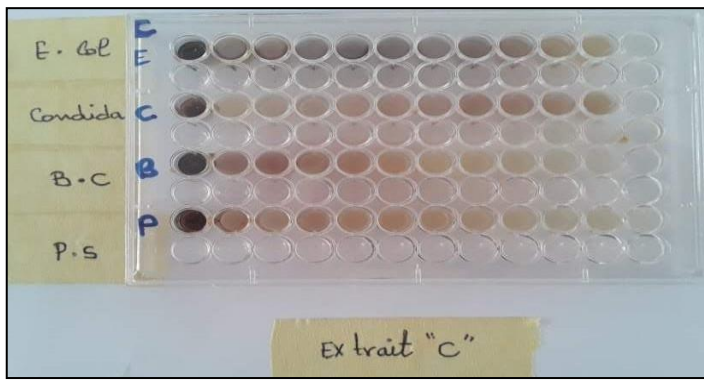
Annexe



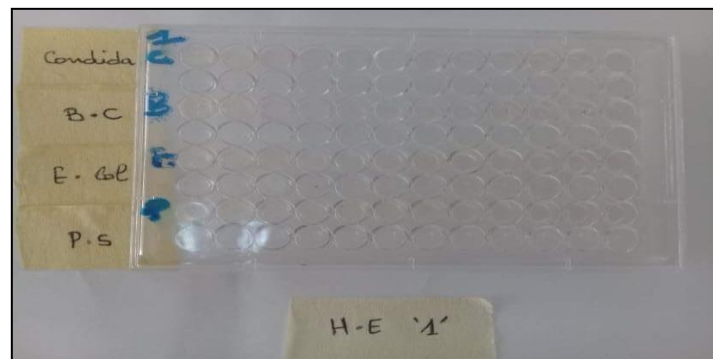
Annexe 1: résultat de CMI d'extrait *Ammi visnaga* (soxhlet).



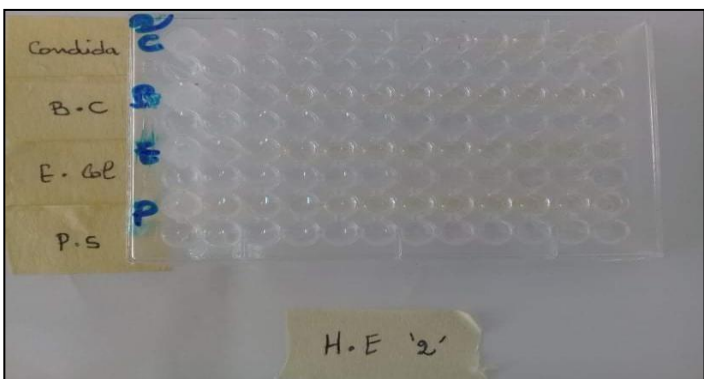
Annexe2: résultat de CMI d'extrait *Citrus sinensis* (soxhlet).



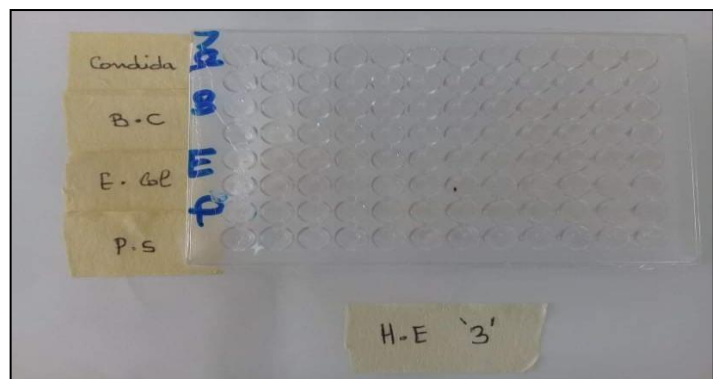
Annexe3 : résultat de CMI l'extrait *Citrus aurantium* (soxhlet).



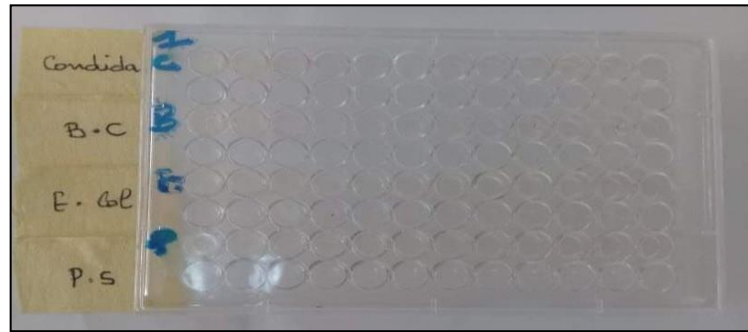
Annexe4: résultat de CMI d'huile essentielle *Ammi visnaga* (clevenger) .



Annexe5 : résultat de CMI d'huile essentielle *Citrus aurantium* (entrainement à la vapeur d'eau) .



Annexe6 : résultat de CMI d'huile essentielle *Citrus sinensis* (entrainement à la vapeur d'eau) .



Annexe 7 : résultat de CMI d'huile essentielle *Ammi visnaga* (entraînement à la vapeur d'eau).

Annexe 8: résultat de concentration minimale inhibitrice (C.M.I) de l'extrait brute d'*Ammi visnaga* (soxhlet).

C.M.I / souches	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.568	0.781	0.39	0.19	0.09	0.048
E. coli	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Condida	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B.C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P.S	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- (+) résultat positif absence de la bactérie.
- (-) résultat négatif présence de la bactérie.

Annexe13 : résultat de concentration minimale inhibitrice (C.M.I) d'huile essentielle *Citrus sinensis* (entrainement à la vapeur d'eau).

C.M.I souches	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.568	0.781	0.39	0.19	0.09	0.048
Condida	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B.C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.coli	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P.S	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Annexe14 : résultat de concentration minimale inhibitrice (C.M.I) d'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (entrainement à la vapeur d'eau).

C.M.I souches	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.586	0.781	0.39	0.19	0.09	0.048
Condida	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B.C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E.coli	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
p.s	+	+	+	+	+	-	-	-	-		-	-