

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

**Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biotechnologie**

---

---

**Mémoire**

**Pour obtenir le Diplôme de Master en Valorisation des Substances  
Naturelles Végétales.**

**Présenté par :**

**M<sup>me</sup> BENNAMA Wafa**

**Thème**

**Étude de La rémanence d'un savon additionné à l'huile  
essentielle de citron (*Citrus limon*).**

**Devant le jury :**

**M<sup>me</sup> S. BERGUEL**

**M.A. Université de Mostaganem**

**Présidente.**

**M<sup>me</sup> M. TERBECHE**

**M.A. Université de Mostaganem**

**Examinatrice.**

**M<sup>me</sup> I. DRISSI**

**M.A. Université de Mostaganem**

**Promotrice.**

---

---

**Année Universitaire 2015/2016**

## *Préambule*

*Les huiles essentielles représentent un groupe très intéressant de métabolites qui sont dotés de propriétés antimicrobiennes les rendant intéressants comme produits de remplacement des antiseptiques pour le secteur des détergeant. Ce sont des composés volatils naturels qui confèrent aux plantes et, notamment, aux herbes et aux épices, leurs essences.*

*L'objectif de notre travail est double. Tout d'abord il consiste à extraire l'huile essentielle de citron (*Citrus limon*) et l'incorporer dans un savon synthétisé au Laboratoire de Biochimie de l'Université de Mostaganem. D'autre part, d'étudier la rémanence du savon obtenu.*

*Cette étude préliminaire s'inscrit parmi les travaux de recherche menés sous la direction de M<sup>me</sup> I. DRISSI, Maître assistante à l'Université de Mostaganem. Qu'il soit persuadé de mes sincères gratitudees et reconnaissances.*

*Le présent mémoire comprend trois parties: données bibliographiques, matériels et méthodes, résultats et discussions. Les premières pages ont été consacrées à l'exposition des abréviations, de la table des matières, du résumé et de l'abstract. Enfin conclusion et perspectives, références bibliographiques, annexes figurent aux dernières pages. Les illustrations graphiques et les calculs des moyennes ont été faits par Excel 2007.*

*Nous apprécions considérablement que M<sup>me</sup> S. BEURGVUEL, Maître-assistante à l'Université de Mostaganem et M<sup>me</sup> M. TERBECHÉ, Maître-assistante à l'Université de Mostaganem aient bien voulu examiner ce travail et composer le Jury de la soutenance.*

# **Sommaire**

**Préambule**

**Abréviations**

**Résumé**

**Abstract**

**Table des matières**

- 1. Chapitre 1. Généralités sur le savon**
- 2. Chapitre 2. Huiles essentielles du citron (*Citrus limon*)**
- 3. Chapitre 3. Matériels et méthodes.**
- 4. Chapitre 4. Résultats et discussions.**
- 5. Conclusion et perspectives.**
- 6. Références.**
- 7. Annexes.**

## *Table des matières*

	<i>Pages</i>
<b>Préambule</b>	1
<b>Sommaire</b>	2
<b>Abréviations</b>	8
<b>Résumé</b>	9
<b>Abstract</b>	10
<b>Liste des figures</b>	11
<b>Liste des tableaux</b>	12
<b>Liste des annexes</b>	13
<b>Introduction</b>	14
<b>Chapitre 1 : Généralités sur le savon</b>	15
1. Histoire du savon	15
2. Définition	15
3. La production du savon (La saponification)	16
4. Différents types de savon	17
4.1. Le Savon de Marseille	17
4.2. Le Savon au Lait	17
4.3. Le Savon Blanc	18
4.4. Savon de toilette	18
4.5. Savon de ménage	19
4.6. Savon Ponce	19
4.7. Savon dentifrice	19
4.8. Savon Surgras	20
4.9. Savon Médical	20
4.10. Savon Médicinal	20
4.11. Le Savon liquide (de Marseille)	21
4.12. Le Savon Noir	21
4.13. Le Savon Animal	22
4.14. Le Savon Transparent	22

4.15. Le Savon Antiseptique	23
4.16. Le Savon des Verriers	23
4.17. Gel douche, bain moussants	24
5. Les matières premières de fabrication	24
5.1. Les huiles et corps gras	24
5.2. Les alcalis	25
5.3. La saumure	26
5.4. Les additifs	26
6. Les méthodes de fabrication	26
6.1. Fabrication artisanale	26
6.1.1. La fonte ou "rebatch"	27
6.1.2. Le procédé à froid	27
6.1.3. Le procédé à chaud	27
6.2. Fabrication industrielles	28
6.2.1. L'empatage	28
6.2.2. Le relargage	28
6.2.3. L'épinage	28
6.2.4. Le lavage	28
6.2.5. Le séchage	28
7. Propriétés physico-chimiques du savon	28
7.1. Le point de fusion	29
7.2. Le pouvoir mouillant	29
7.3. Le pouvoir émulsifiant	29
7.4. Le pouvoir dispersant	30
7.5. Le pouvoir moussant	30
8. Action moléculaire du savon	30
8.1. Formation des micelles	30
8.2. Propriétés détergentes	31
9. Indices techniques	32
9.1. Le surgraissage	32

9.2. Le pH du savon	33
9.3. Indice d'iode	33
9.4. Indice de saponification	34
10. Notion de rémanence	34
<b>Chapitre 2. Huiles essentielles du citron (<i>Citrus limon</i>)</b>	<b>35</b>
1. Généralités sur le citron	35
1.1. L'histoire du citron	35
1.2. Description	36
1.3. Classification botanique	36
1.4. Caractéristiques générales	37
1.5. Particularités de culture	37
1.6. Valeur nutritive du citron	38
1.7. Les bienfaits du citron	38
2. Généralités sur les huiles essentielles	40
2.1. Histoire des huiles essentielles	40
2.2. Définition	40
2.3. Caractéristiques d'HE du citron	41
2.4. Partie de la plante utilisée	42
2.5. Localisation de biosynthèse de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	42
2.6. Composition chimique	43
2.7. Méthodes d'extraction	44
2.7.1. Entraînement par la vapeur	44
2.7.2. Extraction par « l'expression à froid »	45
2.9. Application d'huile essentielle du citron	46
2.10. Activités biologiques des huiles essentielles	46
2.10.1. Activités antioxydantes	47
2.10.2. Activités antibactérienne	47
2.10.3. Activités antifongique	47
2.10.4. Activité pesticide	48
2.10.5. Activité antiseptique	48

2.10.6. Activités anti-inflammatoires	48
2..11. Toxicité des huiles essentielles	49
<b>Chapitre 3. Matériels et méthodes</b>	<b>50</b>
Objectifs du travail	50
1 <sup>ère</sup> partie : Extraction de l'huile essentielle du citron	50
1. Matériel végétal	50
2. Extraction de l'huile essentielle du citron ( <i>Citrus limon</i> )	50
2.1. Principe d'extraction	50
2.2. Technique d'extraction	51
2.3. Calcul du rendement	52
2 <sup>ème</sup> partie : Synthèse du savon	52
1. Principe de la saponification	52
2. Technique de la saponification	53
1 <sup>ère</sup> étape : chauffage à reflux	53
2 <sup>ème</sup> étape : le relargage	53
3 <sup>ème</sup> étape : filtration sur Büchner	53
3. Incorporation de l'HE du citron	54
4. Moulage et séchage	54
3 <sup>ème</sup> Partie : Étude des propriétés du savon obtenu	55
1. Détermination du point de fusion	55
2. Détermination du pH	56
3. Détermination de l'alcali libre caustique	56
4. Détermination du pouvoir moussant de savon dans différents milieux.	56
4.1. En milieu acide	56
4.2. En milieu salin	56
4 <sup>ème</sup> partie : Étude microbiologique	57
1. Méthode d'évaluation de l'efficacité et la rémanence du savon	57
2. Description globale du protocole expérimental	57
Étape 1. Prélèvements bactériologiques avant lavage	57
Étape 2. Prélèvement bactériologique après lavage.	58

Étape 3. Dénombrement des bactéries	58
3. Étude statistique	58
<b>Chapitre 4. Résultats et discussions</b>	60
1 <sup>ère</sup> partie : Extraction de l'HE de citron	60
1. Le rendement	60
2 <sup>ème</sup> partie : Synthèse du savon	62
3 <sup>ème</sup> Partie : Étude des propriétés du savon obtenu	63
1. Détermination du point de fusion	63
2. Détermination du pH	63
3. Détermination de l'alcali libre caustique	64
4. Détermination du pouvoir moussant de savon dans différents milieux.	65
4.1. En milieu acide	65
4.2. En milieu salin	66
4 <sup>ème</sup> partie : Étude microbiologique	68
<b>Conclusion et perspectives</b>	74
<b>Références</b>	75
<b>Annexes</b>	82

## *Abréviations*

% : Pour cent.

°C : Degré Celsius.

µl : Microlitre.

cm : Centimètre.

g : Gramme.

H : Heure.

HE : Huile Essentielle.

Kcal : Kilocalorie.

m : Mètre.

M : Molaire (mol/l).

MF : Matière fraîche.

Max : Maximum.

Min : Minimum.

mg : Milligramme.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

sec : Seconde.

SM : Solution mère.

t : Temps.

TM : Taux de Mousse.

TR : Taux de Réduction bactérienne.

## **Résumé**

Cette étude a eu pour objectif de tester *in vivo* l'efficacité et la rémanence d'un savon additionné à l'huile essentielle de citron (*Citrus limon*), lors de la désinfection des mains. Aucune étude de ce type n'a été pratiquée auparavant. Plusieurs prélèvements bactériologiques ont été réalisés sur les mains de trois opérateurs avant et après lavage au savon obtenu à différent temps.

Après incubation, les colonies ont été dénombrées. Les résultats ont été satisfaisants car le taux de réduction bactérienne a été de 80,47% ; 2 heures après la désinfection.

Ce travail a montré que le savon obtenu semble avoir une excellente rémanence et la peau des mains semble protégée de la recontamination bactérienne.

Les résultats obtenus ouvrent de nombreuses perspectives d'études qui pourraient être réalisées pour comparer l'efficacité et la rémanence du savon obtenu avec d'autres savons, pouvant servir de témoins.

**Mots clés :** savon, huile essentielle, *Citrus limon*, taux de réduction, rémanence.

## **Abstract**

This thesis has aimed to test in vivo efficacy and persistence of a soap added to the essential oil of lemon (*Citrus limon*), at the hand disinfection. No such study has been carried out before. Several bacteriological samples were taken on the hands of three operators before and after washing with soap obtained at different times.

After incubation, the colonies were counted. The results were satisfactory since the bacterial reduction rate was 80.47%; 2 hours after the disinfection.

This work showed that the obtained soap appears to have an excellent remanence and hand skin seems to be protected from bacterial recontamination.

The results open up many prospects for studies that could be conducted to compare the efficacy and persistence of the resulting soap with other soaps, which can serve as witnesses.

**Keywords:** soap, essential oil, *Citrus limon*, reduction ratio, remanence.

## *Liste des figures*

*pages*

Figure 1. La réaction de saponification	16
Figure 2. La formule chimique générale des triglycérides	16
Figure 3. Savon de Marseille, pour le corps et le linge	17
Figure 4. Savon au Lait	18
Figure 5. Savon Blanc	18
Figure 6. Savon de toilette	18
Figure 7. Savon de ménage	19
Figure 8. Savon Ponce	19
Figure 9. Savon dentifrice	19
Figure 10. Savon Surgras	20
Figure 11. Savon Médical	20
Figure 12. Savon Médicinal	21
Figure 13. Savon liquide (de Marseille)	21
Figure 14. Savon noir	22
Figure 15. Savon animal	22
Figure 16. Savon Transparent	23
Figure 17. Savon Antiseptique	23
Figure 18. Structure schématique d'un tensioactif	30
Figure 19. Disposition des molécules de savon dans l'eau et formation des micelles	31
Figure 20. Phénomène de détergence	32
Figure 21. Champ des citronniers	35
Figure 22. La plante de <i>Citrus limon</i>	36
Figure 23. <i>Citrus Limon</i> (L.)	37
Figure 24. Huile essentielle de Citron	41
Figure 25. Poche sécrétrice schizolysigène des <i>Citrus</i>	43
Figure 26. Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (d'hydrodistillation)	45
Figure 27. Rendement en HE extraite à partir de citron	60
Figure 28. Solvatation des ions de savon dans l'eau	65
Figure 29 : Taux de réduction bactérienne (TR) après 1min	71
Figure 30 : Taux de réduction bactérienne (TR) après ½ heure	72
Figure 31 : Taux de réduction bactérienne (TR) après 2heures	73

## *Liste des tableaux*

*pages*

Tableau 1. Les principales huiles utilisées dans la fabrication du savon	25
Tableau 2. Classification de citrus limon (Padrini et Lucheroni, 1996)	37
Tableau 3. Composition biochimique moyenne de citron	38
Tableau 4 : Tableau récapitulatif du déroulement des prélèvements	58
Tableau 5. Point de fusion des savons usuels (JOHO, 2007)	63
Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques du savon synthétisé	64
Tableau 7 : Résultats des prélèvements microbiologiques	69
Tableau 8. Les taux de réduction bactérienne 1min après le lavage avec le savon synthétisé	70
Tableau 9. Les taux de réduction bactérienne ½ heure après le lavage avec le savon synthétisé	71
Tableau 10. Les taux de réduction bactérienne 2 heures après le lavage avec le savon synthétisé	72

<i>Listes des annexes</i>	<i>pages</i>
Annexes N° 1. La composition de la Gélose Nutritive	82
Annexe N°2. Les normes adoptées pour classer les savons et détergents (ISO 684-1974)	82
Annexe N° 3. Les taux de mousse dans un milieu acide	83
Annexe N° 4. Les taux de mousse dans un milieu salin	83
Annexe N° 5. Les prélèvements microbiologiques des mains de l'opérateur 1 avant et après lavage au savon	84
Annexe N° 6. Les prélèvements microbiologiques des mains de l'opérateur 2 avant et après lavage au savon	86
Annexe N° 7. Les prélèvements microbiologiques des mains de l'opérateur 3 avant et après lavage au savon	88

## Introduction

Les plantes, les fleurs et autres arbres à essence produisent des huiles essentielles pour se protéger des insectes, des maladies ou éliminer des substances de leurs métabolismes. Ces substances volatiles et odorantes, extraites par entraînement à la vapeur ou par expression, étaient déjà connues et utilisées par les Grecs et les Égyptiens.

Aujourd'hui, après un essor constaté à partir des années 1960, on observe que les huiles essentielles sont de plus en plus utilisées par les particuliers, soit en soin thérapeutique, soit en «bien-être». Il est de plus en plus fréquent que les industriels ajoutent des huiles essentielles pour parfumer leurs produits manufacturés : savons, détergents, lessives, mais aussi désodorisants ou parfums d'intérieur, ou encore denrées alimentaires.

Ces substances naturelles concentrent les composés actifs des végétaux. On leur attribue empiriquement, depuis de nombreuses années, toutes sortes de propriétés thérapeutiques, spécifiques à chaque type de végétal utilisé.

C'est dans cette optique, que se situe notre étude dont les objectifs principaux s'articulent autour des volets suivants :

- Valorisation de l'huile essentielle de citron (*Citrus limon*) par son extraction et son incorporation dans la synthèse d'un savon.
- Étude des caractéristiques physico-chimiques du savon obtenu.
- Et enfin, évaluer l'efficacité et la rémanence du savon *in vivo*.

## Chapitre 1. Généralités sur le savon

### 1. Histoire du savon

Le savon est né il y a environ 4500 ans. Les sumériens créent alors une pâte savonneuse à base de graisse et de  $K_2CO_3$ . Ces premiers savons sont utilisés comme détergent ou remède contre les maladies de la peau, ils n'ont cependant pas pour but de garantir l'hygiène quotidienne. Son utilisation se répandit peu à peu aux autres civilisations.

Les romains commencèrent à l'utiliser pour se laver au cours du 2<sup>ème</sup> siècle après J.-C.

Le savon, connu aussi par les arabes, était composé d'un mélange de matières grasses et de cendres contenant de la soude.

Au 7<sup>ème</sup> siècle, un savon plus dur utilisé pour la lessive, est fabriqué à partir de la chaux.

L'industrie du savon voit ses débuts sur les côtes de la Méditerranée : l'Italie, l'Espagne et surtout Marseille.

Au Moyen Age, le savon est délaissé à cause des mœurs de l'époque. De nombreuses maladies (peste et syphilis entre autre) poussent en effet les gens à ne plus faire usage des bains publics de peur de la contamination.

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, la révolution industrielle amène les populations des villages vers les villes. Le savon alors réservé à l'industrie du textile se retrouve petit à petit dans les foyers urbains grâce à l'apprentissage de l'hygiène dès le plus jeune âge. L'utilisation de la douche et du savon devient dès lors chose fréquente. La santé publique s'améliore (HENRY, N et LUPSA, D, 2011).

A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, le savon est progressivement supplanté par les tensioactifs de synthèse dérivés du pétrole, sans pour autant disparaître des rayons de produits cosmétiques (WATERVAL, G, 2011).

### 2. Définition du savon

Le savon est une matière moléculaire obtenue par la combinaison d'une base (soude ou potasse) avec un corps gras (graisses animales ou végétales) et servant à blanchir et à nettoyer.

Le savon est un produit liquide ou solide composé de molécules amphiphiles obtenues par réaction chimique entre une base forte, spécifiquement l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde de potassium, et un ou plusieurs acides gras.

Son caractère amphiphile lui donne des propriétés caractéristiques, notamment la capacité de ses composants moléculaires à se placer à l'interface entre la phase aqueuse (solvant hydrophile) et la phase lipidique (graisse hydrophobe), la formation de mousse et la stabilisation d'émulsions utiles pour le lavage (MOYEN, M et VAN PUYVELDE, L, 2009).

### 3. La production du savon (la saponification)

C'est un mélange d'une base alcaline liquide (soude dans eau, infusion, ou lait) et d'une sélection d'huiles et de graisses (végétales et/ou animales) que l'on va émulsionner ensemble. Ce processus s'appelle la saponification. C'est un peu comme par magie que les liquides deviennent solides, que la soude et les huiles disparaissent pour donner naissance à la molécule de savon. Par la composition de leurs ingrédients et grâce à des recettes équilibrées, nos savons moussent généreusement, embaument la salle de bain, et qui plus est tout en douceur!

La réaction d'estérification permet de fabriquer des odeurs fruitées et parfums synthétiques, mais celle-ci est réversible et équilibrée en milieu acide. La réaction inverse s'appelle une hydrolyse acide (MOOR, C et SNAUWAERT, P, 2011).

Il est aussi possible de réaliser une **hydrolyse basique d'un ester**, à l'aide d'une base forte. C'est la réaction de **saponification** qui se produit aboutit à la formation de deux composants : le savon (détergent) et la glycérine (hydratant), (Figure 1).

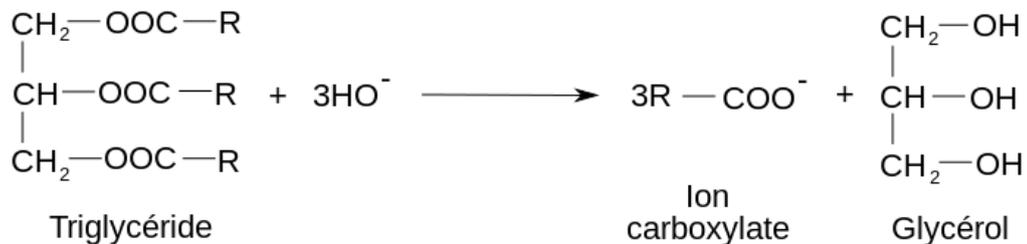


Figure 1. La réaction de saponification

Les triglycérides sont les composants essentiels dans la fabrication du savon. Les triglycérides sont les graisses et huiles que l'on connaît. Ils sont formés par l'union du glycérol et de trois acides carboxyliques encore appelés acides gras (Figure 2).

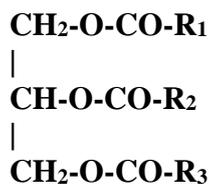


Figure 2. La formule chimique générale des triglycérides

En ce qui concerne les alcalis ou les lessives, nous considérons : l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium (KOH) et le carbonate de potassium ( $K_2CO_3$ ).

#### 4. Différents types de savon

Le savon commercial se présente sous différentes formes : de bloc (pain, cube, formes ovalisées...), de poudre, de paillètes fines (lessives), de mousses, de gels ou de solutions, comme le savon liquide.

##### 4.1. Le Savon de Marseille

Le savon que l'on appelle couramment Savon de Marseille est un savon composé majoritairement d'huile végétale (Figure 3). Il en existe deux catégories : celui au mélange d'huile végétal, souvent de karité de palme ou encore de coco ayant une couleur crème, et celui à l'huile d'olive ayant une couleur verte. Il en résulte d'un procédé de saponification par la soude. Le "vrai" savon de Marseille se reconnaît à sa composition ; il est composé d'au moins 72% d'huile. Ne contenant aucun agent allergène, il est souvent utilisé pour le linge des bébés ou des personnes allergiques ou encore pour leur toilette.



Figure 3. Savon de Marseille, pour le corps et le linge.

##### 4.2. Le Savon au Lait

Depuis l'antiquité, le lait est utilisé pour ses propriétés adoucissantes et apaisantes. En effet le pH de celui-ci étant proche de celui de la peau, cela réduit considérablement le risque d'allergie et d'irritation. Il est d'ailleurs utilisé pour les peaux sensibles, les peaux fragiles (bébés) mais encore sujettes à des allergies chroniques ou ponctuelles (eczéma, psoriasis).

Il existe différentes variétés de savon au lait ayant des spécificités différentes : le savon au lait d'ânesse connu pour son pouvoir tenseur réduisant les rides, le savon au lait de jument connu pour ses propriétés hydrolysantes, et le plus courant le savon au lait écrémé connu pour ses propriétés nourrissantes (Figure 4).



**Figure 4. Savon au Lait.**

#### **4.3. Le Savon Blanc**

C'est un savon de luxe d'origine suisse, à base de l'huile de tournesol (Figure 5). Il est de couleur jaune pâle mais dit "blanc" car il était utilisé comme savon de toilette, contrairement au Savon Noir qui était utilisé comme détergent.



**Figure 5. Savon Blanc.**

#### **4.4. Savon de toilette**

Le savon de toilette est un petit pain dur de savon d'aspect agréable, parfumé, coloré et neutralisé (Figure 6). À l'instar des savons ou mousses à raser, les savons de toilettes sont préparés à partir de suif et de noix de coco et contiennent les plus hautes teneurs en sel d'acides gras, supérieures à 76 ou 78%.



**Figure 6. Savon de toilette.**

#### 4.5. Savon de ménage

Le savon de ménage, autrefois pour le nettoyage domestique, est composé de savon de l'huile de palme, d'eau, de glycérine, du sel, de savon de graisse de coco, du thiosulfate de sodium( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) ((Figure 7).



Figure 7. Savon de ménage.

#### 4.6. Savon Ponce

C'est un savon à décrasser dans lequel il entre une charge minérale, sous forme de pierre ponce (roche volcanique très poreuse et de faible densité) pulvérisée (Figure 8).



Figure 8. Savon Ponce.

#### 4.7. Savon dentifrice

C'est un savon additionné de glycérol, et de substances aromatiques pour les soins de la bouche (Figure 9).



Figure 9. Savon dentifrice.

#### 4.8. Savon Surgras

Ce savon est enrichi en agents (sur) graissant, par exemple d'huiles végétales ; la présence d'huiles limite le dessèchement dû au savon qui enlève le film gras recouvrant naturellement la peau (Figure 10). Il contient aussi de l'huile d'amande douce, ou autrefois du beurre de karité, restaurant le film hydrolipidique de la peau. Cependant, ce savon aide à lutter contre la peau sèche du corps et du visage.



Figure 10. Savon Surgras.

#### 4.9. Savon Médical

Ce savon était autrefois un savon de Marseille surgras, avec apports antiseptiques tels que le soufre, le phénol, l'ichtyol, le formaldéhyde, le sublimé de naphthol ou de salol, des goudrons ou du bois de Panama (Figure 11). Il est adapté pour le lavage simple répétitif, mais aussi pour l'aseptie chirurgicale avant l'utilisation d'une solution antiseptique.



Figure 11. Savon Médical.

#### 4.10. Savon Médicinal

Un savon médicinal est un mélange de lessives de savonniers, avec des huiles d'amandes douces. Autrefois, il était utilisé comme excipient dans la fabrication de pilules, ou prescrit comme laxatif (Figure 12).



**Figure 12. Savon Médicinal.**

#### **4.11. Le Savon liquide (de Marseille)**

Ce savon, fabriqué à base d'huile végétale, d'huile d'olives et d'huile de coprah ; est cuit au chaudron, selon la méthode traditionnelle marseillaise (Figure 13). Il est doux pour la peau et pour l'environnement également. Il a la plus faible teneur équivalente en acide gras : 15 à 20% de masse.



**Figure 13. Savon liquide (de Marseille).**

#### **4.12. Le Savon Noir**

Le savon noir est un savon plus ou moins mou et est un produit 100% naturel, riche en vitamine E régénératrice. Il est utilisé particulièrement pour le soin du corps, mais aussi pour l'entretien de la maison (Figure 14).

Lorsqu'il est utilisé pour le soin de la peau, le savon noir se présente sous la forme d'une pâte de gommage sans grain, végétale et huileuse. Cette pâte est obtenue à partir d'un mélange d'huiles et d'olives noires broyées.



**Figure 14. Savon noir.**

#### **4.13. Le Savon Animal**

Ce savon est obtenu avec la lessive des savonniers et des graisses animales, souvent de la graisse du porc ou du suif de bœuf (Figure 15).

Le savon animal est essentiellement obtenu à partir de mélange d'huile d'olives (250 grammes), de suif de bœuf (750 grammes), de lessive de soude (390 grammes), de l'infusion miel citron (120 grammes). A ceci s'ajoute du lait de coco (40ml), de l'HV d'amande douce (20 ml), et de l'arome naturel de vanille (10 ml) à la trace.



**Figure 15. Savon animal.**

#### **4.14. Le Savon Transparent**

Ce savon est obtenu par dissolution d'un savon de suif dans de l'alcool à chaud, puis refroidissement lent et coulage (Figure 16). Il s'appelle savon de glycérine lorsque l'alcool est le glycérol (glycérine). D'une douceur extrême, le Savon Transparent adoucissant DHC enrichi à l'huile d'olive vierge et au miel nettoie et assainit la peau en profondeur tout en assurant son hydratation, la laissant parfaitement nette et purifiée, sans jamais tirailler. Sa mousse ferme et onctueuse ne dessèche pas la peau et convient aux épidermes les plus délicats.



**Figure 16. Savon Transparent.**

#### **4.15. Le Savon Antiseptique**

Ce savon est un produit destiné à détruire les micro-organismes présents sur les tissus vivants (peau saine, muqueuses, plaies). Il est à base d'iode ou d'antifongiques (médicaments capables de traiter les mycoses). Il est utilisé pour des soins particuliers de dermatologie. Il ne contient pas de molécule de savon et la plupart de ces Savons Antiseptiques sont des détergents cationiques, c'est à dire des sels d'amines (Figure 17).

Il est en de même que le Savon sans Savon, aussi appelé pain dermatologique ou syndet. Ce dernier ne contient pas non plus de molécules de savon et il est à base de tensioactifs synthétiques. Son pH est proche du pH de la peau.



**Figure 17. Savon Antiseptique.**

#### **4.16. Le Savon des Verriers**

Le Savon des Verriers désigne le dioxyde de manganèse  $MnO_2$  employé pour décolorer le verre dans les creusets de fusion. Il est employé dans les verreries à la décoloration ou purification du verre.

#### **4.17. Gel douche, bain moussants**

Fabriqué à partir de tensioactifs d'origine pétrochimique, on leur ajoute des additifs et des agents moussants. Ils sont sensés être plus doux que les savons. Mais on leur adjoint souvent des additifs (parfums, colorants, conservateurs) qui les rendent finalement irritants pour la peau. Défaut plus gênant avec les bains moussants, puisque l'agent moussant constitue une agression supplémentaire pour la peau, d'autant plus que l'on trempe longtemps dedans. Ils sont même suspectés d'être à l'origine d'inflammation uro-génitale.

### **5. Les matières premières de fabrication**

Les matières premières essentielles pour la fabrication de savon sont :

- Les corps gras : graisses ou huiles
- Les alcalis ou les lessives : soude caustique ou potasse caustique
- Les saumures
- Les additifs

#### **5.1. Les huiles et corps gras**

Les caractéristiques essentielles d'un savon sont son pouvoir moussant, son pouvoir détergent, sa consistance, son taux de dissolution dans l'eau et la stabilité de sa mousse. Ces caractéristiques dépendent principalement de la nature et de la qualité des corps gras utilisés.

Le tableau suivant liste les matières grasses qui sont le plus souvent utilisées lors de la fabrication des savons.

Tableau 1. Les principales huiles utilisées dans la fabrication du savon

Matière grasse (huile ou graisse)	Nom INCI de la matière grasse	Nom INCI du savon obtenu	Acide gras dominant
Suif (graisse de bœuf)	<i>Adeps Bovis</i>	<i>Sodium Tallowate</i>	Acide <i>cis</i> -9- octadécénoïque
Saindoux (graisse de porc)	<i>Adeps Suillus</i>	<i>Sodium Lardate</i>	Acide <i>cis</i> -9- octadécénoïque
Huile d'arachide	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Sodium Peanutate</i>	Acide <i>cis</i> -9- octadécénoïque
Huile d'olive	<i>Olea europaea</i>	<i>Sodium Oliviate</i>	Acide <i>cis</i> -9- octadécénoïque
Huile de coprah (noix de coco)	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Sodium Cocoate</i>	Acide dodécénoïque
Huile de palme	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>Sodium Palmate</i>	Acide hexadécénoïque
Huile de palmiste	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>Sodium Palm Kernelate</i>	-

\*Si le savon est un savon liquide fabriqué à base de potasse, il faut remplacer « sodium » par « potassium » dans les noms INCI.

## 5.2. Les alcalis

L'alcali est une lessive de soude, qui produit un savon dur, ou de potasse, qui produit un savon mou. La soude ne se trouve que très rarement à l'état naturel, celle que l'on trouve dans le commerce est le résultat de processus industriels. On préférera donc utiliser une lessive de potasse obtenue par infusion de cendres dans l'eau. La qualité de la cendre influe sur le résultat. Il faut des cendres très blanches (obtenues par une combustion à haute température).

Les cendres de coque de noix, de chêne ou, pour un savon très blanc, de pommier sont les plus appropriées. De la cendre tout venant finement tamisée fait, par ailleurs, très bien l'affaire. La lessive de potasse est très corrosive et doit être manipulée avec grande précaution pour éviter les brûlures.

### 5.3. La saumure

La saumure (du latin *sal*, sel, et *muria*, saumure) est une solution aqueuse d'un sel, généralement de chlorure de sodium (sel de cuisine) NaCl, saturée ou de forte concentration. Naturelle ou artificielle, elle est utilisée notamment comme conservateur pour les aliments (par saumurage) ou encore comme fluide caloporteur.

Une saumure est une solution de chlorure de sodium dans l'eau, à une concentration supérieure à celle de l'eau de mer. Celle-ci contient environ 3,5 % de chlorure de sodium NaCl, en masse, bien que cette proportion dépende du lieu.

### 5.4. Les additifs

Des additifs divers et variés sont utilisés pour modifier les qualités du savon ou pour faciliter la réaction. Ainsi l'ajout de sel en fin de réaction permet d'obtenir un savon dur avec la lessive de cendres, l'alcool permet d'accélérer la réaction et rend le savon transparent (notamment la vodka), l'ajout d'acide lactique produit des « savon acides » moins agressifs pour l'épiderme. À la recette de base, on ajoute différents additifs selon l'effet recherché :

- Des agents anticalcaires, pour réduire la sensibilité des savons à précipiter en eau dure, c'est-à-dire chargée en sels d'alcalino-terreux ;
- Des conservateurs ;
- Des colorants ;
- Des parfums ;
- Des agents surgraissants (huiles) pour fabriquer un savon surgras ;
- Des agents hydratants comme le miel ;
- Des abrasifs pour fabriquer un savon exfoliant ;
- Des huiles essentielles extraites de plantes ;
- Des substances aux propriétés antiseptiques, notamment antibactériennes, ou antifongiques.

Sous sa forme la plus simple, le savon est un produit détergent totalement biodégradable. Les additifs peuvent être polluants pour l'environnement.

## 6. Les méthodes de fabrication

### 6.1. Fabrication artisanale

Il existe trois grandes méthodes artisanales pour produire du savon : le "melt and pour" ou rebatch, le procédé à froid et procédé à chaud (DONNEZ, M, 1993).

### **6.1.1. La refonte ou "rebatch"**

La méthode consiste à fondre une base de savon (souvent commerciale), puis à y ajouter des colorants et des parfums avant de la verser dans des moules. L'intérêt de cette technique est de permettre l'introduction d'additifs qui ne supportent pas les milieux très basiques, puisqu'ils sont ajoutés dans un savon déjà terminé et non pendant le processus de saponification. Ce procédé ne nécessite donc que des précautions lors de la refonte, celle-ci devant se faire au bain-marie et ne jamais directement dans un récipient placé sur une plaque chauffante, pour éviter que la température ne puisse monter au delà de 100°C. Les savons finaux obtenus par cette méthode nécessitent un long temps de séchage à cause de l'eau supplémentaire ajoutée lors de la refonte pour obtenir une pâte qui puisse être versée facilement dans des moules.

### **6.1.2. Le procédé à froid**

Cette méthode est complète : on part d'un mélange d'huiles, on ajoute la soude nécessaire et on saponifie à une température proche de la température ambiante. Les additifs et parfums sont ajoutés au cours même de la saponification, juste avant de verser dans les moules.

Le savon obtenu par cette méthode doit murir au moins un mois avant d'être utilisé. Ce temps de maturation est souvent considéré comme indispensable pour terminer la saponification, mais il s'agit surtout d'une période de séchage au cours de laquelle le savon perdra entre 10 et 20% de son poids, qui s'accompagne d'une perte de poids de 10 à 20%. La saponification se termine durant la première semaine de cette période. Le processus de séchage peut être bien sur prolongé : le célèbre savon d'Alep est séché pendant 8 mois avant d'être commercialisé.

### **6.1.3. Le procédé à chaud**

La méthode est similaire au procédé à froid, mais ici, la saponification est réalisée à 80°C environ pendant trois heures, avant l'ajout des additifs et le moulage. Les savons obtenus sont directement utilisables, car la saponification est complètement terminée à l'issue du processus, mais un temps de séchage est quand même nécessaire. Les additifs sensibles,

comme les huiles essentielles par exemple, perdent moins leurs propriétés avec cette méthode, s'ils peuvent être intégrés à la pâte à une température n'excédant pas 50°C.

La méthode à chaud possède donc certains avantages sur la méthode à froid, mais elle a également ses inconvénients : le savon produit est très difficile à mouler et présente souvent une texture plus grossière que son homologue réalisé à froid dont la texture est plus lisse.

## 6.2. Fabrication industrielles

La fabrication et les procédés industriels sont variés depuis les premières mises au point vers 1750. La fabrication en cuve est autrefois caractérisée par l'empatage, le relargage, l'épinage, le lavage et séchage. Voici les étapes-types de la Belle Époque (KONE, S, 2000).

**6.2.1. L'empatage :** consiste à mélanger les corps gras à la lessive de soude. Ici une solution de soude, facilement alcaline, est chauffée à ébullition. Le corps gras végétal, c'est-à-dire l'huile d'olive, d'arachide, de coton, de palme, de noix de coco, de sésame ou le corps gras animal, suif ou l'huile de poisson, est ajouté par petites doses et souvent sous forme de mélange complexe selon le savon à obtenir. Notons qu'il reste dans la lessive de soude une quantité définie de vieilles solutions savonneuses, ou solutions mères soutirées d'une précédente saponification. Pour obtenir du savon mou on utilisera des huiles de colza, d'œillette ou de chènevis et de la potasse caustique (KOH).

**6.2.2. Le relargage :** utilise des lessives concentrées puis des lessives salées qui permettent une meilleure séparation des sels alcalins d'acide gras, c'est-à-dire du savon formé qui est relargué et surnage en grumeaux.

**6.2.3. L'épinage :** qui prend son nom de l'épine, robinet du bas de la cuve, consiste à soutirer l'eau salée et le glycérol, appelé glycérine.

**6.2.4. Le lavage :** consiste à répéter l'ajout de solutions salines, pour emporter glycérol et lessives résiduelles.

**6.2.5. Le séchage :** permet d'obtenir des pains de savon secs et consistants.

Les deux étapes médianes ont parfois disparu au cours des années 1920 pour favoriser une épuration rapide et permettre une coulée à l'état liquide dans des bassins peu profonds, appelés mises ou le savon se solidifie avant d'être débité en bandes, puis après séchage, marqué et débité en cubes.

## 7. Propriétés physico-chimiques du savon

Les savons commerciaux sont des mélanges de sels de sodium ou de potassium et d'acides gras. La longueur de la chaîne carbonée et surtout la présence d'insaturation, c'est-à-dire d'une double liaison induisant une conformation spatiale, une rigidité ou une mobilité spécifique, affectent les propriétés.

### 7.1. Le point de fusion

Le point de fusion des savons, même lorsque le sel d'acide gras est unique et purifié, reste assez mal défini, variant entre 200 °C et 250 °C, par mesure sur un banc Moffler. Le liquide obtenu est transparent, non laiteux.

À basses températures dans l'eau liquide, la dispersion du savon est difficile par agitation, sauf pour le laurate de sodium avec sa « petite » chaîne en C<sub>11</sub>. Plus la température est élevée, plus la dispersion est facile, donnant des eaux savonneuses claires et opalescentes. En milieu basique, pour un optimum de pH entre 10 à 12, est constatée une hydrolyse partielle en acides gras et en ions basiques libres.

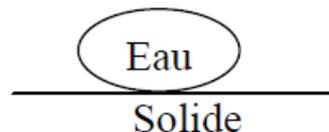
La dispersion est très faible dans le benzène, le toluène et la plupart des solvants organiques. La formation de micelles inverses est énergétiquement moins favorisée.

### 7.2. Le pouvoir mouillant

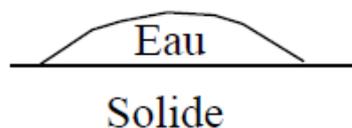
L'eau savonneuse peut pénétrer les petits interstices de la surface en contact (donc les fibres du linge, l'assiette, la table, la peau...) plus efficacement que l'eau.

#### Remarque

- Eau seule : La tension superficielle élevée, la cohésion du liquide l'emporte sur les interactions avec le solide donc le liquide s'étale peu.



- Eau + Tensioactif : La tension superficielle a baissé, moins de cohésion donc le liquide s'étale mouillage meilleure.



### 7.3. Le pouvoir émulsifiant

Les ions carboxylates s'agglutinent autour de la saleté et s'immiscent entre celle-ci et la surface en contact jusqu'à isoler la saleté de cette surface. Ils forment des micelles (Figure 19), englobant de petites particules de saleté. Les ions carboxylates ont une extrémité lipophile et sont donc particulièrement efficaces sur les corps gras.

#### 7.4. Le pouvoir dispersant

De par propriétés des ions carboxylates et la structure des micelles, celles-ci se repoussent l'une et l'autre et elles se retrouvent donc dispersées dans l'eau savonneuse.

#### 7.5. Le pouvoir moussant

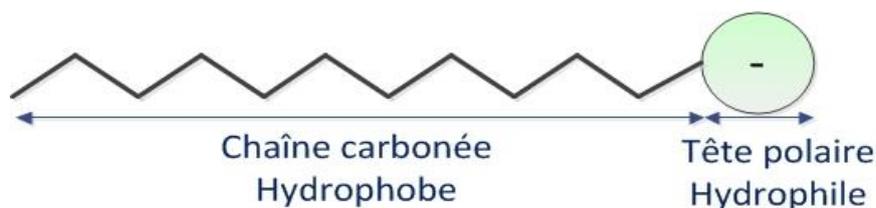
Il se forme un film d'ions carboxylate à la surface de l'eau de tension superficielle faible. Par agitation de l'eau savonneuse, des bulles d'air peuvent alors être emprisonnées. La mousse n'intervient pas en tant que telle dans le lavage mais, c'est un indicateur de la tension superficielle du liquide et donc de son pouvoir détergent.

### 8. Action moléculaire du savon

Au niveau moléculaire, le savon se compose de molécules dites « bipolaires » ou « tensioactifs » (Figure 18), contenant des ions carboxylates qu'on peut ranger en deux groupes :

- Celles formées par un groupe polaire hydrophile, c'est le groupe  $\text{COO}^-$  porteur d'une charge électrique négative.
- Celles formées par un groupe hydrophobe mais aussi lipophile c'est à dire non polaire et soluble aux substances organiques, avec une chaîne carbonée R provenant de l'acide gras et dont le nombre d'atomes de carbone est en général élevé.

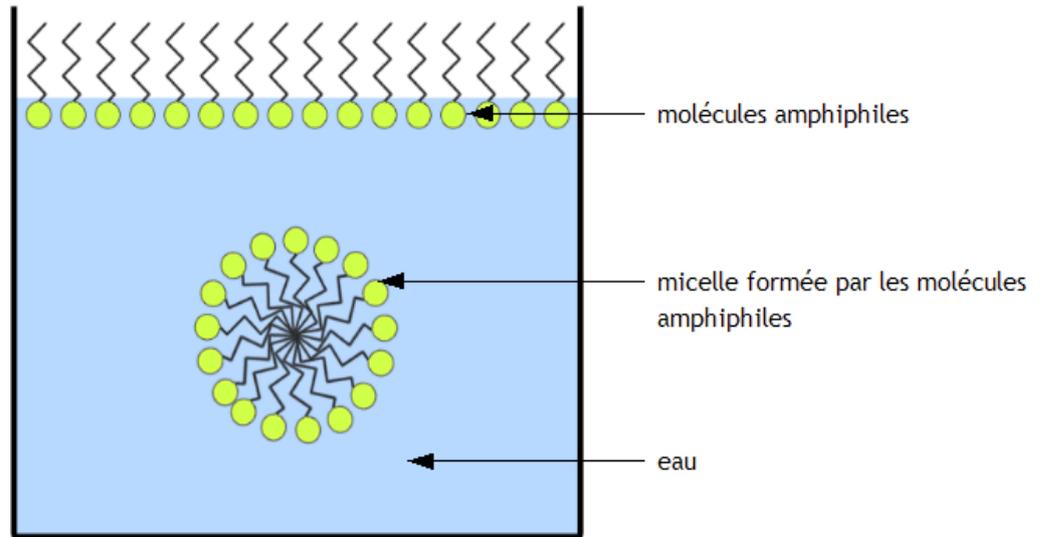
Dans la composition du savon, l'huile apporte la partie hydrophobe(ou non polaire) et la soude apporte la partie hydrophile (ou polaire) (BESSION, S, 2007).



**Figure 18. Structure schématique d'un tensioactif**

#### 8.1. Formation des micelles

Dans l'eau, très peu d'ions carboxylates du savon sont isolés. Ils forment plutôt des films à la surface de l'eau. La partie polaire, hydrophile, se trouve dans l'eau et la chaîne carbonée, hydrophobe, se trouve dans l'air. Ce film peut parfois contenir de l'air ce qui explique la formation des bulles de savon (Figure 19).



**Figure 19. Disposition des molécules de savon dans l'eau et formation des micelles.**

Si la concentration en ions carboxylate augmente, lorsque la surface du liquide est entièrement recouverte d'un film, les autres ions carboxylate pénètrent dans l'eau et s'unissent entre eux. Les parties hydrophobes se regroupent et se resserrent entre elles de manière à s'isoler de l'eau, les parties hydrophiles étant dirigées vers l'extérieur. On obtient alors des micelles (Figure 19, ci-dessus).

## 8.2. Propriétés détergentes

**Détergent :** Substance qui permet d'éliminer les graisses et autres salissures à la surface des matériaux. Supposons une salissure grasse à la surface d'un tissu. En présence d'un savon en solution aqueuse, elle s'entoure d'ions carboxylate dont la partie lipophile se trouve dans la salissure, et la partie hydrophile dans l'eau (Figure 20. a et b).

Ce phénomène contribue à arracher la salissure, conjointement à une action mécanique d'agitation ou de brossage (Figure 20. c).

La graisse est alors piégée dans des micelles pour être ensuite évacuée grâce aux eaux de rinçage.

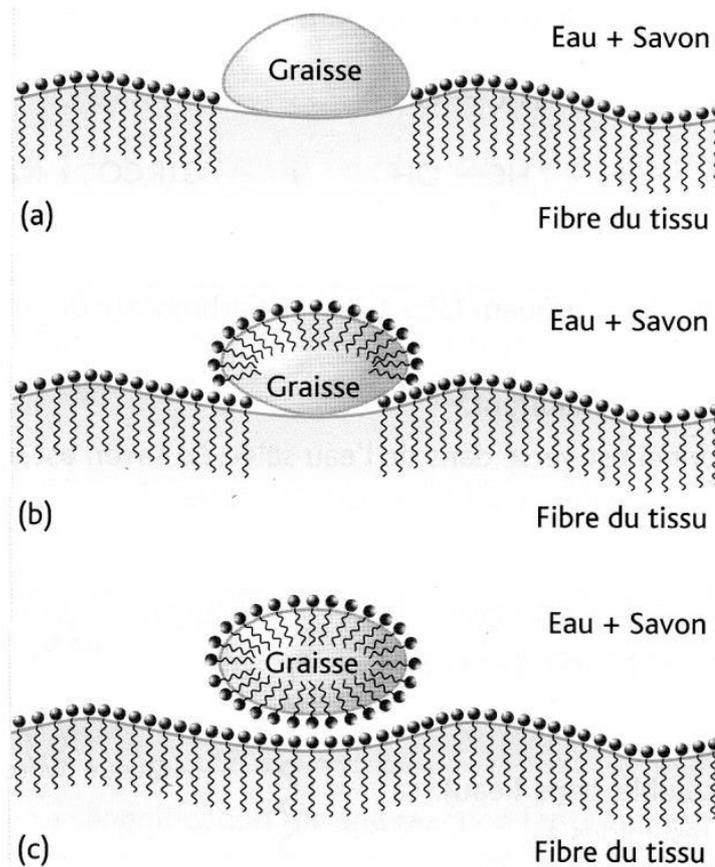


Figure 20. Phénomène de détergence.

## 9. Indices techniques

### 9.1. Le surgraissage

Surgraisser un savon est très important, c'est le surgraissage qui va faire en sorte que le savon sera moins agressif pour la peau. En effet à la surface de la peau il y a un film hydrolipidique (FHL) composé d'eau et de sébum. Il protège la peau des agressions extérieures en faisant barrière, il joue aussi un rôle d'anti-déshydratant, puisque l'eau est retenue dans les cellules grâce au film de gras.

Il est courant de surgraisser un savon entre 5 et 10% avec des huiles plus onéreuses, comme les huiles de jojoba et d'avocat par exemple, dont on souhaite conserver au mieux les propriétés en ne les ajoutant qu'une fois la saponification bien avancée. La présence de telles huiles en excès limite le dessèchement cutané du à l'usage du savon et constitue en même temps une marge de sécurité permettant de s'assurer d'une utilisation complète de la soude à l'issue de processus de saponification.

En même temps que les huiles de surgraissage, vous pouvez encore ajouter à la pâte un certain nombre d'additifs qui améliorent les performances du savon, sa couleur ou son odeur : colorants (argiles), huiles essentielles, conservateurs (acides lactique et critique), agents hydratants (miel), agents anticalcaires (acide critique), filmogène et durcisseur (cire d'abeille) etc. La quantité de chacun de ces additifs ne devrait pas dépasser le 2% du poids des huiles (WATERVAL, G, 2011).

## 9.2. Le pH du savon

Avec un pH voisin de 10, le savon est nettement basique et perturbe incontestablement l'acidité de la peau (dont le pH est environ 5,5). Dans la pratique toutefois, on constate, à de rares exceptions près, que le pH de la peau se rétablit assez vite et que les irritations cutanées causées par le caractère basique des savons sont peu fréquentes.

A l'inverse, les savons à base de dérivés du pétrole présentent un pH généralement plus proche de celui de la peau. Par contre, eux aussi ont leur inconvénient : leur pouvoir détergeant est souvent tellement puissant qu'ils assèchent la peau et ne sont finalement pas plus "doux" à l'usage que les savons classiques.

La littérature publie plusieurs valeurs du pH de la peau, toutes dans la gamme acide mais avec un éventail s'étalant de pH 4 à 7. Les valeurs obtenues varient :

- Selon le type de la peau : une peau sèche est plus acide qu'une peau grasse
- Selon l'endroit de la mesure : le pH de la peau sous les aisselles est moins acide que sur d'autres zones
- Selon que la peau a été soumise à des influences extérieures (nettoyée ou pas, par exemple) (WATERVAL, G, 2011).

Le savon étant basique, généralement voisin de 10, perturbe le pH de la peau, mais seulement de manière transitoire, le temps que les glandes sébacées reprennent une activité normale, ce qui se produit après deux heures environ.

## 9.3. Indice d'iode

L'indice d'iode permet de mesurer le degré d'insaturation d'une graisse.

- Plus l'indice d'iode d'une huile est élevé, plus cette huile aura tendance à rancir et plus le savon qu'elle produira sera mou.

- Plus l'indice d'iode d'une huile est bas, plus cette huile sera stable et plus le savon qu'elle produira sera dur.

Valeurs conseillées : 41 – 70.

#### 9.4. Indice de saponification

L'indice de saponification d'une huile/beurre. Représente la masse de potasse (exprimée en mg) nécessaire pour saponifier 1g de cette huile/beurre. Pour obtenir l'équivalent en soude, il faut diviser la valeur renseignée pour le KOH par **1,4025**.

La connaissance des indices de saponification des différentes huiles d'un mélange permet de calculer la quantité de soude/potasse nécessaire pour saponifier une quantité donnée du mélange.

Ainsi, pour saponifier **1 Kg** du mélange suivant :

- graisse de coco **25%** ;
- huile d'olive **55%** ;
- beurre de Karité **20%** ;

Il nous faudra :  $(184 \times 0,25) + (135 \times 0,55) + (128 \times 0,20) = 145,85$  g de soude.

#### 10. Notion de rémanence

Pour un antiseptique la rémanence se rapporte à un effet antibactérien persistant sur la peau ou la muqueuse après son application, ou la durée pendant laquelle il continue à exercer une action.

Pour être plus précis, la rémanence peut concerner la durée pendant laquelle l'antiseptique va continuer à être actif sans qu'il soit nécessaire de renouveler son application. Une rémanence élevée peut parfois être associée à une plus grande toxicité.

Pour qu'un produit ait une action rémanente il faut qu'il reste présent sur la peau ou dans les couches supérieures cutanées après son application et séchage.

De fait, certains antiseptiques, persistant à la surface de la peau après application, présentent une rémanence. Il s'agit :

- **de la chlorhexidine** : la rémanence de la chlorhexidine aqueuse ou alcoolique varie de 1 à 4 heures selon les études,
- **de la PVP-I. La polyvinylpyrrolidone** : est un polymère sans activité antiseptique qui a pour rôle de transporter l'iode (substance active) et de la libérer progressivement. Son affinité vis-à-vis des membranes cellulaires explique sa rémanence. La rémanence de la PVP-I alcoolique à 5% après une application cutanée est au moins de 3h (TRAORE, O et *al*, 2004). D'autres antiseptiques, au contraire, n'ont aucune rémanence comme l'éthanol dont l'action disparaît immédiatement dès son évaporation (GAUTIER, C et *al*., 2013).

## Chapitre 2. Huile essentielle du citron

### 1. Généralités sur le citron

#### 1.1. L'histoire du citron

L'origine du citron reste peu connue. Certains prétendent que ce fruit serait né d'un croisement entre le pamplemousse, le cédrat et la lime (citron vert).

Le citron était peut-être cultivé par les Grecs et les Romains, voire par les Égyptiens, mais on ne trouve guère de traces de cette culture, sinon sur des mosaïques de l'époque. Il pourrait d'ailleurs s'agir du cédrat (*Citrus medica*), son ancêtre probable, connu de longue date, tant à l'est qu'à l'ouest, pour ses propriétés médicinales. Au fil des invasions et des fluctuations climatiques, il se peut que le citron ait disparu du sud de l'Europe à quelques reprises pour y être réintroduit plus tard. Après les invasions barbares (350 à 400 de notre ère), ce sont les Arabes qui reprennent les rênes du commerce. Ils diffuseront le citron, l'introduisant en Afrique du Nord, en Afrique et en Espagne, de même que dans tout le bassin méditerranéen, à l'exception des côtes italiennes et françaises.

Enfin, lors des Croisades au Proche-Orient, les Européens de l'ouest, de l'est et du nord découvriront les agrumes et développeront un goût pour ces fruits acides et juteux qu'ils rapporteront dans leur pays respectif (Figure 21). (COTTIN, 2002).



Figure 21. Champ des citronniers.

## 1.2. Description

*Citrus limon* est un arbuste de taille moyenne qui atteindra, en pleine terre entre 3 et 6 m de haut. En culture, il est souvent taillé, d'une part pour limiter son encombrement, d'autre part optimiser son branchage. Ses feuilles sont persistantes, vert profond et luisantes, plus pâles sur leur revers. Elles ont une forme en fuseau, de 6 à 11 cm de long. Les feuilles sont alternes, dentelées et leur pétiole est parfois ailé. Les feuilles sont odorantes. Les fleurs sont plutôt de petites tailles et blanc violacé, à 5 pétales blancs. Légèrement cireuse d'aspect, elle dégage un parfum très agréable. Leurs fruits, les citrons jaunes sont plus ou moins acides en fonction de la variété.

Les racines sont relativement superficielles et supportent mal la concurrence de plantes voisines. Il peut vivre environ 80 ans (BLANCKE, 2001), (Figure 22).



Figure 22. La plante de *Citrus limon*

Les principales variétés méditerranéennes cultivées de citronnier sont « Verna », « Eureka », « Lisbonne », « Monachello », et « Lunaris » (BLANCKE, 2001).

## 1.3. Classification botanique

Le tableau 2, ci-dessous illustre la classification botanique du citron (*Citrus limon*).

Tableau 2. Classification de citrus limon (Padrini et Lucheroni, 1996).

<b>Classe</b>	<i>Eudicotylédones</i>
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Rutaceae
<b>Genre</b>	<i>Citrus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Citrus limon</i>

#### 1.4. Caractéristiques générales

**Aspect général :** arbre de port érigé et de croissance rapide.

**Feuilles :** grandes et très parfumées. Jeunes pousses souvent de couleur pourpre.

**Fleurs :** blanches, rosées en boutons, groupées en inflorescences. La floraison, parfois très remontante. Dans ce dernier cas, on le dira « citronnier des 4 Saisons ».

**Fruits :** ovale, moyens à gros, au zeste très parfumé. La peau est d'épaisseur variable, la pulpe acide, juteuse, avec quelques pépins. Ils restent longtemps sur l'arbre sans que le goût s'altère. C'est un arbre très fructifère (Figure 23).



Figure 23. *Citrus Limon* (L.)

#### 1.5. Particularités de culture

**Résistance au froid :** - 5 à - 6 °C.

**Culture en intérieur :** à proscrire. Il craint particulièrement la sécheresse des appartements chauffés. Très vigoureux en pleine terre, il faut le tailler fréquemment. En pot également la taille de formation est impérative les premières années (Bénédicte et Michel, B, 2011).

## 1.6. Valeur nutritive du citron

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90 % d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est essentiellement à l'acide citrique, accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le fruit du a une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (VALNET, 2001).

Le tableau 3 représente les principaux composés contenus dans le fruit de citron et son jus. L'arôme du citron provient en grande partie de ses essences et huiles essentielles, abondantes dans les vacuoles de l'écorce. Il s'agit de mélange de limonènes, de citral, de citronellal, de coumarines, substances très aromatiques et pour certaines fortement amères (LECLERC, 1984).

**Tableau 3. Composition biochimique moyenne de citron.**

	<b>Citron sans écorce (5,4 cm de diamètre)/60 g</b>	<b>Jus de citron frais, 63 ml (¼ tasse)/65 g</b>
<b>Calories</b>	17	16
<b>Protéines</b>	0,6 g	0,3 g
<b>Glucides</b>	5,4 g	5,6 g
<b>Lipides</b>	0,2 g	0,0 g
<b>Fibres alimentaires</b>	1,6 g	0,3 g

Sources : Santé Canada. *Fichier canadien sur les éléments nutritifs*, 2010.

## 1.7. Les bienfaits du citron

De nombreuses études indiquent que la consommation d'agrumes, dont le citron et la lime, exerce un effet favorable contre le cancer.

- **Cancer (prévention)**

Plusieurs études ont démontré que la consommation d'**agrumes** serait reliée à la prévention de certains types de cancers (CHAINANI-Wu, 2002; KIM et *al.*, 2002; TANAKA et *al.*, 2000; FOSCHI et *al.*, 2010), comme le cancer de l'oesophage, le cancer de l'estomac, le cancer du côlon, de la bouche et du pharynx. Selon l'une de ces études (FOSCHI et *al.*, 2010), une consommation modérée d'agrumes (soit de 1 à 4 portions par semaine) permettrait de réduire les risques de cancers touchant le tube digestif et la partie supérieure du système respiratoire. En ce

qui concerne le cancer du pancréas ou de la prostate, les études demeurent controversées (BAE et *al.*, 2009).

- **Cancer (ralentir la progression)**

Les flavonoïdes, des composés antioxydants contenus dans les agrumes, ont démontré qu'ils pouvaient ralentir la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses (KAWAII et *al.*, 1999; POULOSE, 2005; BENAVENTE-GARCIA et CASTILLO, 2008) et diminuer la croissance des métastases (KUNIMASA et *al.*, 2000).

- **Maladies cardiovasculaires**

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'un apport régulier en flavonoïdes provenant d'agrumes est associé à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (BENAVENTE-GARCIA et CASTILLO, 2008). Les flavonoïdes contribueraient à améliorer la vasodilatation coronarienne, à diminuer l'agrégation des plaquettes sanguines et à prévenir l'oxydation du « mauvais » cholestérol (LDL).

- **Inflammation**

Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes des agrumes avaient des propriétés anti-inflammatoires. Ils inhiberaient la synthèse et l'activité de médiateurs impliqués dans l'inflammation (dérivés de l'acide arachidonique, prostaglandines E2, F2 et thromboxanes A2), (BENAVENTE-GARCIA et CASTILLO, 2008).

- **Hypercholestérolémie**

Les flavonoïdes et les limonoïdes des agrumes et de leurs jus pourraient avoir un potentiel de réduction de l'hypercholestérolémie. Des études réalisées chez l'animal ont démontré que certains d'entre eux abaissaient le cholestérol sanguin (KAWAGUCHI et *al.*, 1997; BOK et *al.*, 1999; KUROWSKA et *al.*, 2000).

- **Autres**

Parmi d'autres effets observés, deux limonoïdes présents dans les agrumes (la limonine et la nomiline) inhiberaient la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), en plus d'inhiber l'activité de la protéase du virus (BATTINELLI et *al.*, 2003). De plus, certains limonoïdes du citron démontrent une activité contre certains champignons pathogènes (GOVINDACHARI et *al.*, 2000).

D'autres limonoïdes (RAPHAEL et KUTTAN, 2003) et certaines protéines (GHARAGOZLOO et GHADERI, 2001) amélioreraient le système immunitaire chez l'animal.

## 2. Généralités sur les huiles essentielles

### 2.1. Histoire des huiles essentielles

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (khella, pin, fenouil...), en Egypte, en Grèce, en Amérique (Aztèques, Mayas, Incas: bois de Hô, sassafras) et en Afrique (encens, myrrhe, ravintsara), les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age. A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

L'extraction des huiles essentielles par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. Au début du XXème siècle, des chercheurs (CHAMBERLAND, CADEAC, MARTINDALE) démontrent par leurs expérimentations le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Mais les véritables "pères" de l'aromathérapie sont GATTEFOSSE puis VALNET et ses disciples.

R.M.GATTEFOSSE, pionnier de la parfumerie moderne qui, se brûlant les mains lors d'une explosion dans son laboratoire, a le réflexe génial de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande. Soulagé instantanément, sa plaie guérit avec une rapidité déconcertante. Etonné par ce résultat, il décide d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés. L'aromathérapie moderne était née. Aujourd'hui, des médecins (VALNET, DURAFFOURD, LAPRAZ, D'HERVIN COURT, BELAICHE) et des chercheurs de haut niveau (P. FRANCHOMME), des pharmaciens (D. BAUDOUX) ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles.

### 2.2. Définition

On appelle huile essentielle, ou parfois essence végétale (du latin *essentia*, « nature d'une chose »), le liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Il est obtenu par extraction mécanique, entraînement à la vapeur d'eau ou distillation à sec.

Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage.

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (ANSM, 2008).

Selon la Norme ISO, une huile essentielle est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche.

Selon l'AFNOR, L'huile essentielle est une substance volatile et odoriférante sécrétée par les plantes aromatiques. Les poches sécrétrices peuvent être situées tant au niveau des parties aériennes (fleurs, feuilles, tiges et rameaux) que des organes souterrains (racines, rhizome). L'huile essentielle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première (dont elle porte le nom) par simple distillation ou par expression mécanique (AFNOR, 2000).

Le terme d'huile essentielle a été retenu par les spécialistes en pharmacognosie. La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible (BRUNETON, 1999).

### 2.3. Caractéristiques d'HE du citron

L'huile essentielle du citron est obtenue par expression mécanique à froid à partir d'un zeste frais de fruit (Figure 24), le terme technique ou appellation est essence. Ce mode d'obtention est le plus couramment utilisé pour le traitement des zestes.

Cependant les zestes secs d'agrumes peuvent être distillés à la vapeur d'eau. Le produit obtenu est alors une huile essentielle.

Essence et huile essentielle présentent les mêmes propriétés et précautions à l'exception de la photosensibilisation qui existe uniquement pour l'essence.



**Figure 24. Huile essentielle de Citron.**

**Nom botanique :** Citrus limon.

**Famille botanique :** Rutacées.

**Origine :** Italie.

**Procédé d'obtention :** Expression à froid de la partie externe de l'écorce.

**Partie utilisée:** zestes.

**Couleur:** jaune pâle.

**Odeur :** fraîche, agréable, douce et citronnée.

**Aspect :** liquide mobile limpide. Peut troubler légèrement.

**Parfum :** agrume, frais et délicat.

#### **2.4. Partie de la plante utilisée**

L'huile essentielle se trouve dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches (Myrtacées, Rutacées), dans des canaux sécréteurs (Apiacées, Composées) ou dans des poils sécréteurs (Lamiacées). Ces cellules sont le plus souvent à la périphérie des organes extérieurs de la plante.

Les huiles essentielles permettent, entre autre, à la plante de se défendre contre les agressions extérieures. Elles ont des propriétés répulsives ou attractives vis-à-vis des insectes. La pollinisation des fleurs est, économiquement, très importante pour les arbres fruitiers. Elles présentent aussi des propriétés antiseptiques dirigées contre les parasites du sol et des propriétés inhibitrices sur la germination des grains sur le sol (MONNATTE, 2014).

#### **2.5. Localisation de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus limon***

Les essences des plantes sont sécrétées par des cellules spéciales, localisées au niveau de l'épiderme, souvent à la base d'un poil.

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (GORIS, 1967).

Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Le fruit du *citron* se compose de l'épiderme, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schézolysigènes réparties de façon très irrégulière (Figure 25), (BRUNETON, 1999).

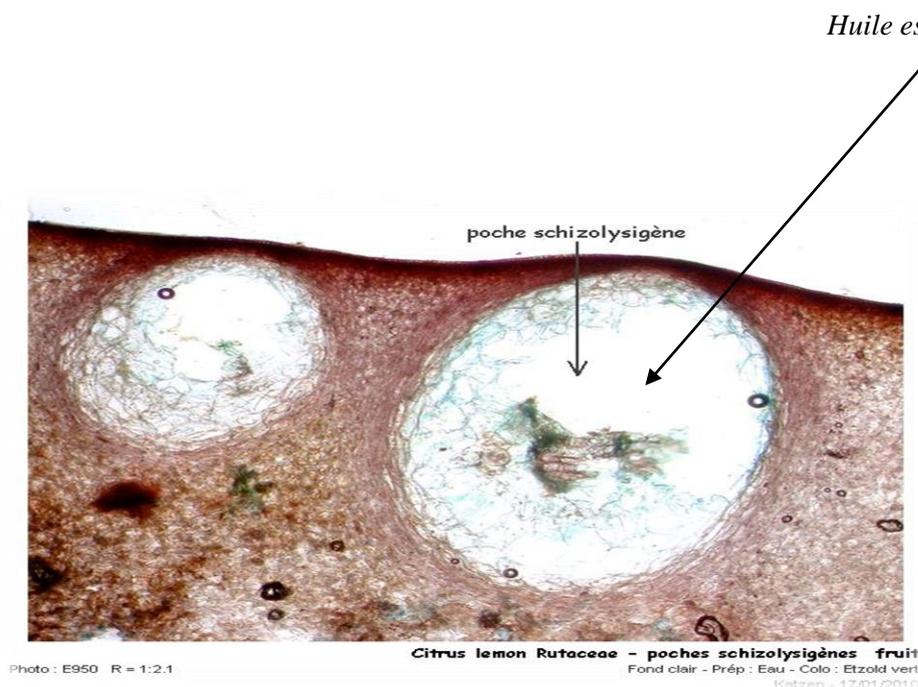


Figure 25. Poche sécrétrice schézolysigène des *Citrus*.

## 2.6. Composition chimique

Les huiles volatiles sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale  $(C_5H_8)_n$ , les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones et des phénols.

On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phénylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (SVOBODA et HAMPSON, 1999).

La norme ISO : NF T 75-335 (1995) a donné la composition de l'huile essentielle extraire par expression de l'écorce du *Citrus limon* avec un rendement de 1,2 à 1,5%. Les principaux constituants sont le limonène (65 à 70%), le citral (1 à 5%), le bêta-pinène (4 à 9%), le gamaterpène (9 à 12%), le linalol (1,5%), le cinéole, d'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l'alpha-terpinéol, le camphène et l'alpha-bisabolène.

## 2.7. Méthodes d'extraction

Les huiles essentielles sont obtenues selon trois techniques. Les deux premières utilisent la chaleur (entraînement par la vapeur ou hydrodistillation, et la distillation sèche). La troisième est l'expression mécanique réalisée à la température ambiante et ne concerne que les agrumes (fruits du genre *Citrus*) à l'état frais.

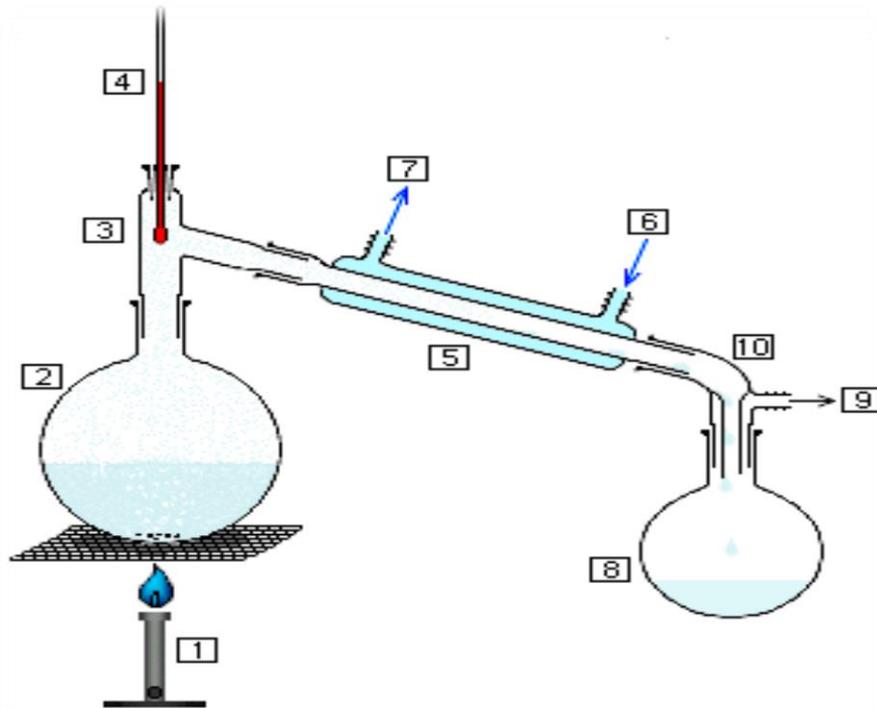
Dans le domaine alimentaire, une distillation peut être réalisée, par exemple à partir de fruits conservés dans l'alcool. Cette distillation « après macération » ne sera pas évoquée ici.

Enfin, de plus en plus d'industriels utilisent les méthodes d'extraction à partir de solvants organiques, suivies de l'évaporation de ces derniers. Le résidu d'extraction après volatilisation du solvant est appelé « extrait » et non « huile essentielle ».

### 2.7.1. Entraînement par la vapeur

C'est procédé le plus utilisé dans l'extraction moderne. Le procédé consiste à placer la masse végétale dans un alambic à vapeur sous pression et faire passer le flux de vapeur en son sein. La chaleur de la vapeur fait éclater les gouttes d'huiles végétales qui s'évaporent. La vapeur étant emprisonné dans un circuit fermé, elle monte naturellement dans l'alambic jusqu'à son passage dans un système de refroidissement. La vapeur est donc condensée et fait sont retour à l'état liquide en étant gorgé des précieuses huiles essentielles (BRUNETON, 1999), (Figure 24).

L'huile essentielle commence à se séparer de l'eau et, bien sûr, flotte au-dessus de l'eau. On pense que ce processus permet de conserver les propriétés curatives et aromatiques de la manière la plus avantageuse (PADRINI et LUCHERONI, 1996).



**Figure 26. Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (d'hydrodistillation).**

- |  |  |
|--|--|
| 1. source de chaleur (ici, un bec Bunsen). | 6. entrée d'eau de refroidissement.              |
| 2. ballon à distiller.                     | 7. sortie d'eau de refroidissement.              |
| 3. tête de distillation.                   | 8. ballon de réception des gouttes de distillat. |
| 4. thermomètre.                            | 9. vers une pompe à vide éventuelle.             |
| 5. réfrigérant à eau.                      | 10. adaptateur pour la pompe à vide.             |

### 2.7.2. Extraction par « l'expression à froid »

Technique réservée aux agrumes (citron, orange, bigarade...etc.). L'extraction se fait sans chauffage, l'écorce ou les fruits ses plantes sont pressées à froid (Notamment pour les hespéridés : citron, orange...). On utilise des presses hydrauliques.

La pulpe et l'H.E. sont séparées à la centrifugeuse. Il s'agit d'une méthode d'extraction utilisée pour certaines variétés de fruits ou plantes comme par exemple les agrumes. Les zestes d'agrumes, sont séparées des fruits, les croûtes sont broyés ou hachés puis pressées pour extraire l'huile qui séparée de la phase aqueuse par différence de densité et libérer le contenu des poches sécrétrices. Le résultat est un mélange aqueux où l'huile essentielle finira par remonter à la surface (BRUNETON, 1999 ; WERNER, 2002).

## 2.9. Application d'huile essentielle du citron

Depuis plusieurs années, les huiles essentielles ont envahies de nombreux produits de la vie courante. Il y a bien sûr les parfums mais elles sont de plus en plus remplacées par des produits de synthèse beaucoup moins chers.

Par contre, on les retrouve de plus en plus en tant qu'arômes alimentaires comme exhausteur de goûts (cafés, thés, tabacs, vins, yaourts, plats cuisinés,...) (ISERIN et *al.*, 1996, ROBERT et LOBSTEIN, 2005).

La cosmétique, et principalement la cosmétique bio, est également un secteur qui utilise de plus en plus d'huiles essentielles. On les retrouve dans de nombreux produits comme : savons, shampoings, gel-douches, crèmes.

Dans une époque où tout doit être beau et sentir bon, les huiles essentielles ont largement envahies, en tant que parfum, le secteur des produits ménagers. Elles permettent notamment de masquer les odeurs des produits purs souvent désagréables (ISERIN et *al.*, 1996).

En gastronomie l'emploi des plantes à essences sous forme d'épices. Celles-ci sont réparties aromatiques (aromes amers et acres) comme dans le cas du faux poivrier, ou simplement en épice pour les desserts et pâtisseries (BRUNETON, 1999). Les huiles essentielles peuvent également être ajoutées dans les produits alimentaires destinés à la conservation (produits de la quatrième gamme). Elles s'ajoutent sur les produits de consommation dans le but d'aromatisation (quelques gouttes déposées sur les morceaux du sucre), (PINGOT, 1998).

## 2.10. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalisées (BILLERBECK, 2008) ou au niveau de la microflore vaginale (DUARTE et *al.*, 2007 ; GIRON et *al.*, 1988); et d'origine fongique contre les dermatophytes (DUARTE et *al.*, 2005) Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (BAKKALI et *al.*, 2008) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans les domaines phytosanitaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (KURITA, MIYAJI, KURANE ET TAKAHARA, 1981) et en agroalimentaire, contre les microorganismes contaminant les denrées alimentaires (SMITH et *al.*, 2002).

### **2.10.1. Activités antioxydantes**

Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué et sont aujourd'hui commercialisés : c'est le cas de l'eugénol, du thymol, du carvacrol, ...etc.

Les résultats montrent que les huiles essentielles constituent une bonne source d'antioxydants naturels recherchés pour leur innocuité relative (Burits et Bucar, 2000 ;Candan, Unlu, Daferera, Polissiou, Sökmen et Akpulat, 2003; Tepe, Daferera, Sokmen et Polissiou, 2005).

Le pouvoir antioxydant, de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (RICHARD, 1992).

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation. En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou réduction d'oxygène...etc (MADHAVI *et al.*, 1996).

### **2.10.2. Activités antibactérienne**

Du fait de la variabilité des qualités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (CARSON *et al.*, 2002).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (DAVIDSON, 1997). Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (COX *et al.*, 2000; CARSON *et al.*, 2002).

### **2.10.3. Activités antifongique**

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (LIS-BALCHIN, 2002).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, lavande, menthe, romarin, sauge, ...etc.

Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (VOUKOU *et al.*, 1988).

#### **2.10.4. Activité pesticide**

Malgré les nombreuses molécules synthétiques susceptibles d'être utilisées, la protection des végétaux peut également se faire avec certaines essences naturelles. En effet, les pesticides sont très diversifiés et se classent selon leur activité en insecticides, mollucides, nématocides, germicides. Certaines huiles sont reconnues pour leur efficacité sur les champignons phytopathogènes : tel est le cas des essences de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis* (CHENG *et al.*, 2004).

#### **2.10.5. Activité antiseptique**

Certaines huiles essentielles sont dotées d'un pouvoir antiseptique marqué. Ce dernier s'exerce sur des souches bactériennes variées, y compris celles habituellement résistantes en antibiotique (Tétracycline, acide oxolinique) (BURT, 2004).

En effet, elles sont « eubiotiques », (NGASSAPA, RUNYORO, HARVALA & CHINO, 2003), c'est à dire qu'elles détruisent les parasites sans interférence avec l'organisme hôte, contrairement aux antibiotiques qui très souvent interagissent avec les parasites en les dénaturant avec des effets secondaires sur les sujets traités. Elles agissent généralement à faible dose. Les essences de sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus sont les plus antiseptiques. Certains de leurs composés tels que le citral, le géraniol, le linalol et le thymol sont en moyenne 7 à 10 fois plus antiseptiques que le phénol (BRUNETON, 1999; NGASSAPA *Et al.*, 2003).

Certaines huiles essentielles sont utilisées dans le traitement de certaines maladies du tractus respiratoires : toux, bronchites, angines (MILJAONA *et al.*, 2003).

#### **2.10.6. Activités anti-inflammatoires**

Les constituants des huiles essentielles tels que les monoterpènes hydrocarbonés, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les alcools sesquiterpéniques ont montré une activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase qui est une enzyme responsable de la production de leucotriènes suspectés de jouer un rôle importante dans la maladie d'Alzheimer (CHAO *et al.*, 2005).

### **2..11. Toxicité des huiles essentielles**

La toxicité des huiles essentielles est variable en fonction des composés et de la voie d'administration. Les HE à l'intérieur des plantes posent peu de problèmes. En revanche, des solutions concentrées d'HE peuvent être responsables de toxicité.

La toxicocinétique des HE est difficile à établir. En effet, si l'on peut étudier et décrire les effets biologiques et/ou pharmacologiques d'un monoterpène ou sesquiterpène pur, il est difficile (voire impossible) de parler de pharmacologie, pharmacocinétique ou de métabolisme d'une HE, c'est-à-dire d'un mélange d'une certaine de composés (BRUNETON, 1993).

De plus, il n'existe pas encore d'études complètes et rigoureuses, de type « partie toxicologiques » d'un dossier d'AMM. De nombreuses études sont réalisées par différents laboratoires, avec des objectifs différents, des conditions expérimentales très variables. Il est donc difficile de faire le point.

L'action de l'HE est assimilée à l'action de l'un des ses composants ou quelques-uns de ses composants, ainsi qu'à certains métabolites issus des biotransformations de ces composés.

## Chapitre 3. Matériels et méthodes

### ◆ Objectifs du travail

Nous avons essayé, au laboratoire de biochimie et au laboratoire de microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mostaganem (Algérie), d'extraire l'huile essentielle du citron (*Citrus limon*) d'une part.

D'autre part ; de synthétiser un savon additionné de cette huile et enfin étudier ces propriétés physico-chimiques et sa rémanence.

### 1<sup>ère</sup> Partie : Extraction de l'huile essentielle du citron

#### 1. Matériel végétal

Le produit ayant servi à l'extraction des huiles essentielles est la partie écorce (zeste) du citron (*Citrus limon*).

Les fruits ont été procurés d'une petite pépinière située à Oued Lkhir, wilaya de Mostaganem. Le fruit utilisé se caractérise par une forme ovale, de couleur jaune, l'écorce est molle, moyennement épaisse, son épaisseur est d'environ 2 mm. Le poids moyen d'un fruit du citron employé est de 200 g le poids moyen de son zeste est de 33 g (Photo 1).



Photo 1. Matériel végétal utilisé.

#### 2. Extraction de l'huile essentielle du citron (*Citrus limon*)

##### 2.1. Principe d'extraction

L'extraction des huiles essentielles à partir du zeste de citron frais est effectuée par la méthode d'hydrodistillation décrite par CHANTHAPHON et *al.*, (2008).

Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité.

### 2.3. Technique d'extraction

Le citron utilisé pour l'extraction des huiles essentielles a préalablement subi un lavage, une élimination des taches et un essuyage.

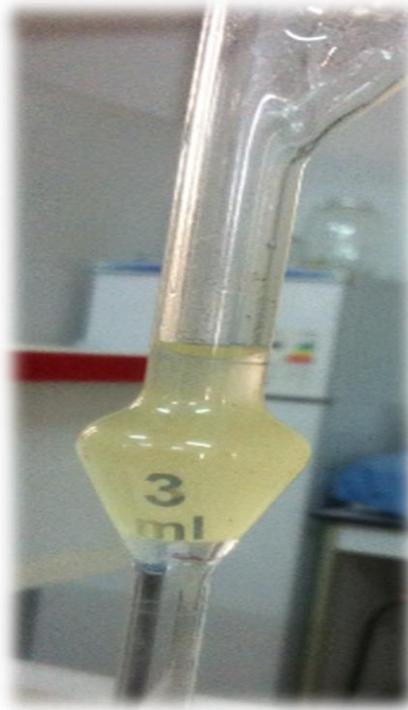
Pour extraire l'huile du citron nous avons choisi l'hydrodistillation, ça consiste à retirer l'huile de l'écorce du citron et à la récupérer grâce à un réfrigérant droit, il transforme la vapeur en liquide (condensation).

Pour cela, il faut réaliser le montage illustré sur la photo 2, avec un chauffe ballon, un réfrigérant droit, un erlenmeyer et un ballon monocol. L'entrée de l'eau se situe en bas, et la sortie en haut. Mettre le chauffe ballon en marche, puis observer la température : celle-ci atteint rapidement 90°C. Chauffer environ 3 heures pour obtenir l'huile essentielle et l'eau.



**Photo 2. Dispositif utilisé pour l'extraction de l'HE du citron**

Une fois l'hydrodistillation réalisée, prendre une ampoule à décanter et y mettre le distillat, puis ajouter un solvant extracteur pour séparer l'eau de l'huile essentielle (ex : eau salée) (Photo 3). L'huile obtenue est conservée dans un réfrigérant à une température de 6°C, dans des flacons en verre brun en vue de son incorporation dans le savon.



**Photo 3. Ampoule à décanter du Clevenger.**

### 2.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de la biomasse végétale traitée (AFNOR, 1986). Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R = (P_H / P_P) \times 100$$

**R** : rendement en huile essentielle en pourcentage (%).

**P<sub>H</sub>** : poids de l'huile essentielle en gramme.

**P<sub>P</sub>** : poids de la biomasse végétale en gramme.

## 2<sup>ème</sup> partie : Synthèse du savon

### 1. Principe de la saponification

Le savon est le produit de la réaction d'une saponification (Figure 17). Au cours de cette réaction, des corps gras (graisses ou huiles) sont hydrolysés en milieu alcalin par une base, généralement de la potasse (KOH) ou de la soude (NaOH), à une température comprise entre 80

et 100 °C. La température élevée sert à accélérer la réaction de saponification. La saponification des corps gras produit du glycérol et un mélange de carboxylates (de sodium ou de potassium) qui constitue le savon.

## 2. Technique de la saponification

### 1<sup>ère</sup> étape : chauffage à reflux

Dans un ballon de 250 ml, on place un barreau aimanté, puis on verse 20 ml d'huile d'olive, 2.5 ml de glycérine, 10 ml de NaOH à 7 mol/l et 20 ml d'une solution d'éthanol à 90°.

On met en place le réfrigérant à eau et on chauffe à reflux le mélange réactionnel durant 30 min (Photo 4).



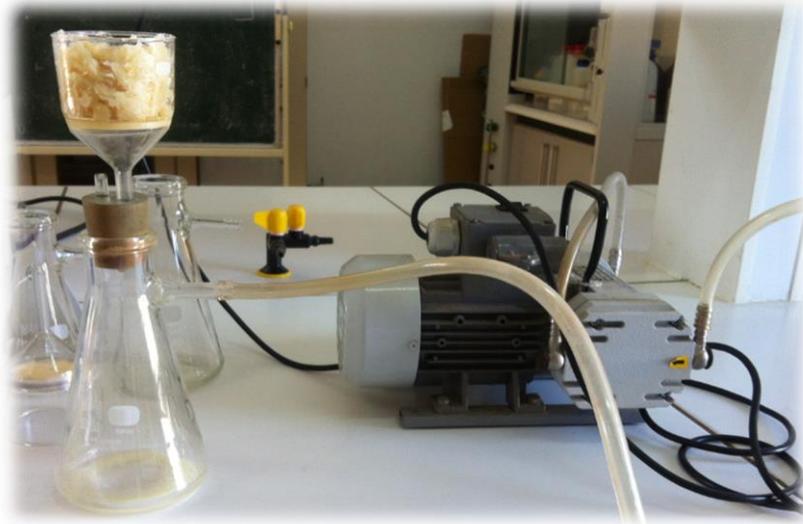
**Photo 4. Dispositif de chauffage à reflux.**

### 2<sup>ème</sup> étape : le relargage

Au bout de 30 min, on arrête le chauffage et on laisse refroidir. On verse alors le mélange dans un bécher contenant environ 100 ml de solution froide de chlorure de sodium à 20%.

### 3<sup>ème</sup> étape : filtration sur Büchner

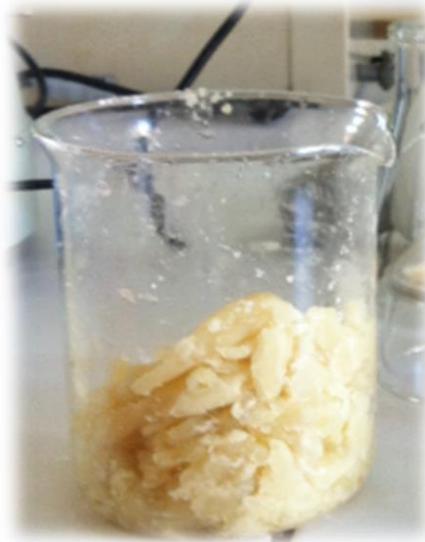
On filtre le mélange obtenu sur un filtre Büchner (Photo 5) et on rince le savon à l'eau distillée froide plusieurs fois afin d'éliminer l'excès de NaOH.



**Photo 5. Dispositif de filtration du savon.**

### **3. Incorporation de l'HE du citron**

L'essence de citron est incorporée dans le savon obtenu à raison de 2 % (v/p). L'HE est ajoutée au besoin à la pâte du savon obtenue (Photo 6).



**Cliché 6. La pâte du savon obtenue.**

### **4. Moulage et séchage**

La pâte du savon est versée dans des moules (Photo 7), puis mise à sécher pour la durcir pendant plusieurs jours.



**Photo 7. Moulage de la pâte du savon.**

### **3<sup>ème</sup> Partie : Étude des propriétés du savon obtenu**

#### **1. Détermination du point de fusion**

Le point de fusion est la température à laquelle la substance est complètement fondue ainsi qu'en témoigne la disparition de la phase solide et la transparence totale du liquide obtenu.

Le principe repose sur le chauffage d'un tube capillaire contenant une prise d'essai du savon synthétisé sur une plaque chauffante et la notation de la température de fusion.

Le point de fusion de savon synthétisé est déterminé à l'aide d'un banc de Koffler (Photo 8).



**Photo 8. L'appareil de banc de Koffler.**

On note la température à laquelle la pâte de savon devient complètement transparente ; cette température constitue le point de fusion.

## 2. Détermination du pH

Pour la mesure du pH, on prépare une solution aqueuse par l'ajout de 0,5 g de savon synthétisé et 150 ml d'eau distillée. L'ensemble est soumis à une agitation constante pendant 2 minutes ; à l'aide d'un agitateur (Stuart, modèle UC 152). Le pH est ensuite déterminé à l'aide d'un pH-mètre (AD, modèle 1030).

## 3. Détermination de l'alcali libre caustique

Elle représente l'hydroxyde alcalin NaOH ou KOH non combiné aux acides gras exprimés en grammes pour 100 g de savon (% , P/P). La méthode utilisée est celle de l'éthanol de la Norme Algérienne n° 284 publiée en 1990 (selon la Norme ISO n° 456 du 1973).

On dissout 5 gramme de savon au réfrigérant ascendant dans 100 ml d'alcool à 60 % et l'on précipite à l'aide d'un excès de solution neutre à 10 % de chlorure de baryum. Sans filtrer le précipité qui s'est formé, on titre alors goutte à goutte et en agitant constamment, par l'acide chlorhydrique en présence de phénolphtaléine.

## 4. Détermination du pouvoir moussant du savon dans différents milieux

Le pouvoir moussant du savon dans différents milieux est estimé par la mesure de taux de mousse formée dans chaque milieu (acide, salin) par rapport à un témoin (eau distillée) selon la formule suivante :

$$\text{Taux de mousse (TM \%)} = \frac{\text{hauteur de mousse de l'échantillon (cm)}}{\text{hauteur de mousse de témoin (cm)}} \times 100$$

### 4.1. En milieu acide

On prépare une solution savonneuse (S) par la dissolution de 3 g de savon dans 100 ml d'eau distillée dans un tube à vis, on ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (1 mmol/l) à 2 ml de la solution S. On bouche le tube, on agite vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes environ. Après 5 min au repos, on mesure la hauteur de mousse.

### 4.2. En milieu salin

Dans un tube à vis, on ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution saline de NaCl (30%) à 2 ml de la solution S. On bouche le tube, on agite vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes environ. Après 5 min de repos, on mesure la hauteur de mousse.

## 4<sup>ème</sup> Partie : Étude microbiologique

### 1. Méthode d'évaluation de l'efficacité et la rémanence du savon

Les objectifs de cette étude ont été de tester l'efficacité bactéricide et la rémanence du savon obtenu.

Un protocole expérimental est élaboré en s'inspirant d'autres études réalisées dans le but d'apprécier l'efficacité de différents désinfectants (MARCHETTI et *al.*, 2003; HERRUZO-CABRERA et *al.*, 2000; MULBERY et *al.*, 2001; GIROU et LOYEAU, 2002).

Les volontaires choisis pour participer aux études étaient des étudiants de l'Université de Mostaganem, âgés de 23 à 26 ans.

Les résultats des expérimentations permettront de calculer la capacité de réduction bactérienne du savon après lavage des mains.

### 2. Description globale du protocole expérimental

Le protocole expérimental s'est déroulé en plusieurs étapes : des prélèvements bactériologiques ont été effectués sur les mains de l'opérateur avant et à différents temps après lavage avec le savon synthétisé (1 min, 1/2 h et 2 h).

#### Étape 1. Prélèvements bactériologiques avant lavage

Un premier prélèvement bactériologique réalisé sur mains non lavées a été effectué afin de connaître la flore cutanée de départ de l'opérateur. Ce prélèvement a servi de valeur de base pour évaluer la capacité d'élimination des bactéries sur la peau par le savon.

Les extrémités distales des phalanges des doigts 2, 3 et 4 (index, majeur et annulaire) de chaque main ont été apposées 5 secondes sur la gélose de 3 boîtes de prélèvements, en appuyant légèrement (Photo 13) Ces manipulations se sont déroulées sur une seule journée. Les boîtes de prélèvement ont été identifiées : "D" pour la main droite et "G" pour la main gauche (Tableau 8).

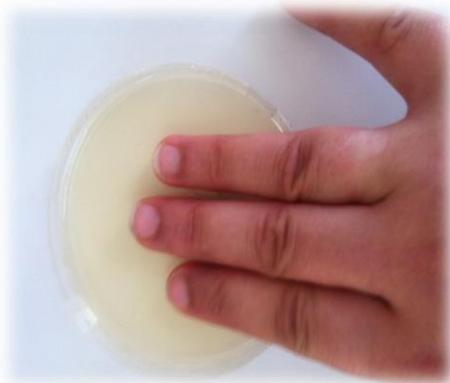


Photo 9. Prélèvement bactériologique avant lavage des mains

**Étape 2. Prélèvement bactériologique après lavage.**

Un prélèvement a été réalisé après le rinçage et le séchage des mains, Le protocole expérimental a été identique pour chaque prélèvement, seuls les temps auxquels les prélèvements étaient effectués différaient (1 minute, ½ heure et 2 heures).

L'opérateur a frotté, avec du savon, chaque zone des 2 mains qui ont été rincées à l'eau courante et laissées sécher.

**Étape 3. Dénombrement des bactéries**

A la fin des différentes manipulations, les boîtes de gélose contenant les prélèvements ont été incubées pendant 24 heures à 30°C. A l'issue de cette période, les colonies bactériennes présentes dans chaque boîte ont été dénombrées.

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif du déroulement des prélèvements.**

Opérateur	Temps	Bactériologie des mains	
		Droite	Gauche
N° 1	Avant lavage	D1	G1
	1 min après lavage	D1(1)	G1(1)
	1/2 heure après lavage	D1 (1/2)	G1 (1/2)
	2 heures après lavage	D1(2)	G1(2)
N° 2	Avant lavage	D2	G2
	1 min après lavage	D2(1)	G2(1)
	1/2 heure après lavage	D2 (1/2)	G2 (1/2)
	2 heures après lavage	D2(2)	G2(2)
N° 3	Avant lavage	D3	G3
	1 min après lavage	D3(1)	G3(1)
	1/2 heure après lavage	D3 (1/2)	G3 (1/2)
	2 heures après lavage	D3(2)	G3(2)

**3. Étude statistique**

Après obtention des résultats bactériologiques, le taux de réduction bactérienne (TR) a été calculé de la manière suivante :

$$TR = \frac{\text{nombre d'UFC dans le prélèvement avant désinfection} - \text{nombre d'UFC après désinfection}}{\text{nombre d'UFC dans le prélèvement avant désinfection}} \times 100$$

Des TR moyens ont été calculés en prenant en compte les résultats obtenus pour chaque opérateur, à différentes répétitions et à différents temps.

## Chapitre 4. Résultats et discussions

### 1<sup>ère</sup> Partie : Extraction de l'HE de citron

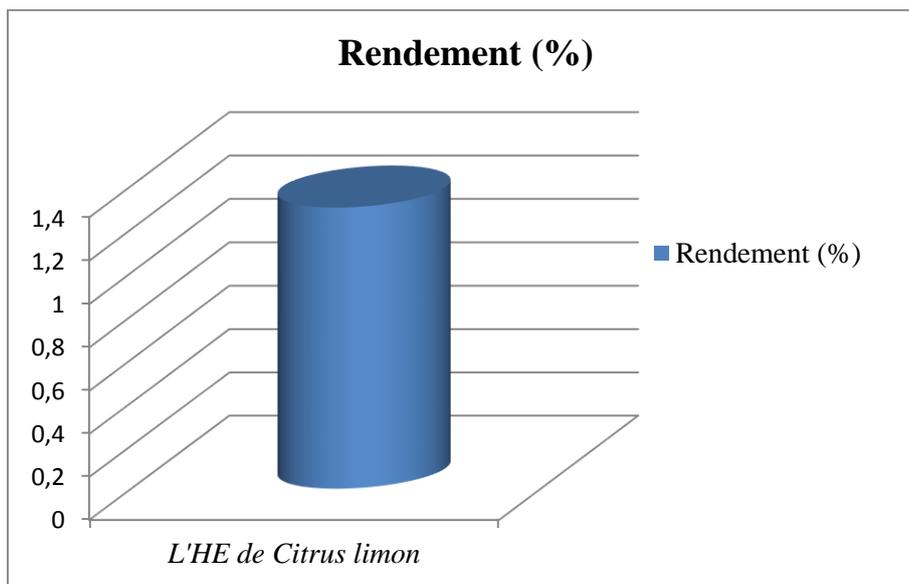
#### 1. Le rendement

L'hydrodistillation réalisée sur le zeste de citron (*Citrus limon*) a permis l'obtention d'une huile de couleur jaune pâle, limpide, possédant une odeur caractéristique fraîche de citron (Photo 8). La densité déterminée de l'HE extraite est de 0,852.



**Photo 10. HE de citron (*Citrus limon*) obtenue par hydrodistillation.**

Le rendement d'extraction calculé est de l'ordre de 1,3%, en fonction de la matière végétale fraîche (Figure 27).



**Figure 27. Rendement en HE extraite à partir de citron.**

Notre résultat en matière de rendement est supérieur aux rendements édités par KHEIRA (2013) qui est de l'ordre de 1,1%, par contre elle est égale le rendement édité par BOURGOU et *al.* (2012) qui est de l'ordre de 1,3%. Mais ce rendement est supérieur aux rendements obtenus par BLANCO TIRADO et *al.* (1995) et HELLAL (2011) qui valent respectivement 0,19% et 0,7%.

Le rendement de ces métabolites secondaires est différent d'une famille botanique à une autre, d'une espèce à une autre et même entre les plantes de la même espèce. De plus, cette différence de teneur en HES peut être liée à plusieurs facteurs tels que la zone géographique de collecte, le climat, le stade de développement et la saison.

Le degré de maturation du fruit influe remarquablement le rendement de l'huile essentielle. BOURGOU et *al.* (2012) ont constaté que le rendement en HE du citron augmente au début puis diminue vers la fin de la maturation.

D'après HIMAD (2011), le mode d'extraction a un impact sur le rendement d'extraction des huiles essentielles. Le même auteur a constaté que, en utilisant la même variété de citron, le rendement obtenu par hydrodistillation est nettement supérieur à celui obtenu par expression à froid.

La norme AFNOR NF ISO 855 (2004) a donné la composition de l'huile essentielle extraite par expression de l'écorce du *Citrus limon* avec un rendement de 1,2 à 1,5%. Les principaux constituants sont le limonène (65 à 70%), le citral (1 à 5%), le bêta-pinène (4 à 9%), le gamma-terpinène (9 à 12%), le linalol (1,5%), le cinéole, d'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l'alpha-terpinéol, le camphène et l'alpha-bisabolène.

Donc du point de vue quantitatif, il est intéressant de procéder à l'extraction des huiles essentielles de citron par hydrodistillation. L'intervention de la chaleur dans l'extraction par hydrodistillation facilite l'éclatement des poches sécrétrices ce qui explique cette différence en rendements (BACHELOT et *al.*, 2006).

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, et précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisantes.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

Dans notre protocole on a choisi une durée de 3 heures, qui nous a apparu convenable avec nos conditions expérimentales : matière fraîche utilisée et la température d'ébullition (Max 100°C).

On constate que le rendement est variable malgré que la technique d'extraction est la même ; cette variabilité est due probablement à la variation des facteurs suivants : le stade de croissance, la période du récolte, le temps du récolte...etc.

## 2<sup>ème</sup> partie : Synthèse du savon

Étant donné que la réaction de saponification est une réaction lente à température ambiante, on augmente la température du mélange réactionnel pour accélérer la réaction. Le chauffage à reflux a permis de condenser les vapeurs des réactifs grâce au réfrigérant à bulles et de les faire retourner à l'état liquide dans le ballon.

L'utilisation de l'éthanol a rendu le mélange réactionnel plus homogène. Il joue un rôle d'émulsifiant : il permet le mélange de l'huile d'olive et la glycérine hydrophobe et de la solution aqueuse de NaOH hydrophile.

Lors de l'étape du relargage, on a versé la solution obtenue dans solution aqueuse de chlorure de sodium froide, elle s'est solidifiée et le savon précipita. Ainsi, on a pu récupérer le savon.

On a laissé le savon se durcir pendant quelques jours. Le Photo 9, représente le savon obtenu.



**Photo 11. Le savon synthétisé après séchage.**

### 3<sup>ème</sup> partie : Étude des propriétés du savon obtenu

#### 1. Détermination du point de fusion

Le point de fusion déterminé pour notre savon synthétisé est de 190°C, cette température permet la transformation totale de savon en liquide non laiteux.

Le point de fusion des savons, même lorsque le sel d'acide gras est unique et purifié, reste assez mal défini, entre 200°C et 250°C, par mesure sur le banc Koffler. Le liquide obtenu est transparent, non laiteux.

La nature de base utilisée en saponification influe considérablement le point de fusion de savon synthétisé, environ 150°C avec une base minérale et 200°C avec une base de synthèse (JOHO, 2007). Le tableau 5, ci-après représente les points de fusion des savons usuels selon la nature de la base utilisée.

**Tableau 5. Point de fusion des savons usuels (JOHO, 2007).**

Savon	Calcium	Aluminium	Lithium	Sodium	Argile
Point de fusion (°C)	95	110	180	190	Infusible

#### 2. Détermination du pH

Pour notre savon obtenu, le pH déterminé est de 10,5 à 22°C, qui est un pH basique. La principale préoccupation à propos du savon à l'heure actuelle est celle du pH. Le pH de la peau est acide et se situe entre 5,2 et 7,0.

Le pH de la peau entre 5,2 et 7,0 caractérise le type de peau. Une peau normale a un pH d'environ 6,5. La peau humaine a un pH relativement acide. Le savon est basique. Son pH est autour de 9. Lors de la toilette, il perturbe donc l'acidité de l'épiderme (HOTANTAI, 1999).

La diminution du pH est liée à la l'addition de l'HE de citron qui à un pH acide de 6,6.

Le niveau du pH obtenue est en concordance avec celui obtenue par BRANDA et *al.*, (2002) pour le savon « Rosa venus », (Tableau 6).

Théoriquement, il apparait logique de croire qu'une telle substance soit irritante pour la peau. Et pourtant nous utilisons tous régulièrement le savon.

En effet après savonnage, les glandes sébacées reprennent une activité normale en quelques minutes et le pH initial de la peau est rétabli.

L'incorporation de la glycérine dans notre savon synthétisé, et sa teneur en huiles neutre permet un savonnage en douceur respectant le film hydrolipidique de la peau.

Certains savons à base de dérivés du pétrole, ont un pH allant de 7 à 5,5 ; on pourrait donc les croire plus « doux » mais ce n'est pas le cas ces savons ont un pouvoir détergent tellement puissant qu'ils assèchent la peau.

Le niveau de pH du savon déterminera son utilisation postérieure, ainsi un savon avec un pH supérieur à celui de la peau, c'est-à-dire, alcalin lui-même et irritant pour la peau, peut se considérer comme un savon détergent, et par conséquent ne pas être recommandé pour l'utilisation personnelle.

### 3. Détermination de l'alcali libre caustique

L'excès d'alcali doit être évité non seulement dans les savons de toilette et de ménage, mais aussi dans les savons servant au lavage de la laine et de la soie, car l'alcali libre rend rêches les fibres animales, et diminue leur solidité et leur éclat. Les teintureries sur soie ne tolèrent par exemple pas plus de 0,03% de soude libre, tandis que pour le lavage et le foulage des draps laine, on permet de 1 à 1/2 % (MARCUSSEON, 1929).

L'alcali libre caustique déterminé pour notre savon est de 0,27%. Cette valeur indique la quantité minimale de soude caustique présente dans le produit fini. L'élimination de la soude est atteinte, dans notre protocole, par plusieurs rinçages consécutifs à l'eau distillée (environ 12 rinçages).

De façon générale, lorsqu'on se réfère aux normes ISO 684-1974, notre savon peut être classé dans la 2<sup>ème</sup> gamme des savons de ménage (leur teneur en alcali libre caustique étant inférieure ou égale à 0,27%, celui de l'eau étant également inférieure à 30%).

De cette faible teneur en alcali libre caustiques décelée dans le savon parfumée à l'HE de citron, on peut prévoir son incapacité à produire des irritations sur une peau normale.

Le tableau 7, ci-dessous récapitule les caractéristiques physico-chimiques du savon synthétisé (point de fusion, pH, alcali libre caustique).

**Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques du savon synthétisé.**

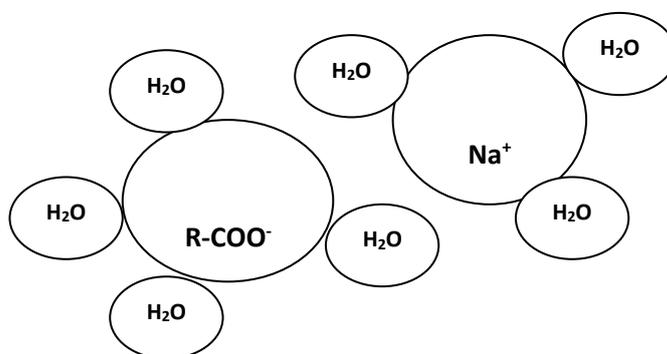
<b>Point de fusion</b>	190°C
<b>pH</b>	10,5
<b>Alcali libre caustique</b>	0,27%

## 4. Détermination du pouvoir moussant de savon dans différents milieux

### 4.1. En milieu acide

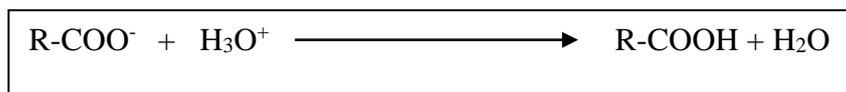
L'ajout de la solution savonneuse au milieu acide (HCl), a permis l'obtention d'un précipité blanc (Photo 11, B) et il n'y avait pas formation de mousse par rapport au témoin (Photo 11, A). Le taux de mousse calculé (TM) est de 0% par rapport au témoin.

Lors de la dissolution du savon dans l'eau, les groupes carboxylate et les ions sodium s'entourent de molécules d'eau et sont dispersés dans la solution : c'est le phénomène de solvation (Figure 28). On obtient des ions hydratés entourés de molécules d'eau.

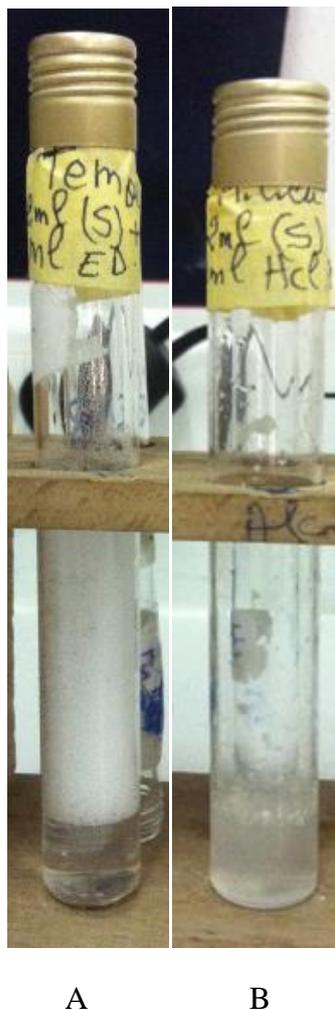


**Figure 28. Solvation des ions de savon dans l'eau.**

Une solution acide contient des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  qui sont l'acide du couple  $\text{H}_3\text{O}^+/\text{H}_2\text{O}$ . Comme les ions carboxylate sont la base du couple  $\text{RCOOH}/\text{RCOO}^-$ , il se déroulera une réaction acide – basique qui a pour équation :



L'action détergente d'un savon est liée à sa solubilité dans l'eau, c'est-à-dire son pouvoir moussant. Donc un milieu acide n'est pas favorable à l'action du savon obtenu.



**Photo 12. La solubilité du savon.**  
**A. dans l'eau distillée.**  
**B. dans l'acide chlorhydrique.**

#### 4.2. En milieu salin

Le pouvoir moussant du savon dans un milieu salin (NaCl) a largement diminué par rapport à l'eau distillée (Photo 13, B). Le taux de mousse calculé (TM) est de 15% par rapport au témoin.

En présence d'ions sodium  $\text{Na}^+$ , les ions carboxylates vont réagir en formant un précipité de carboxylate de sodium, c'est-à-dire du savon solide qui n'aura aucune action. Cette réaction de précipitation a pour équation :





A

B

**Photo 13. La solubilité du savon.**

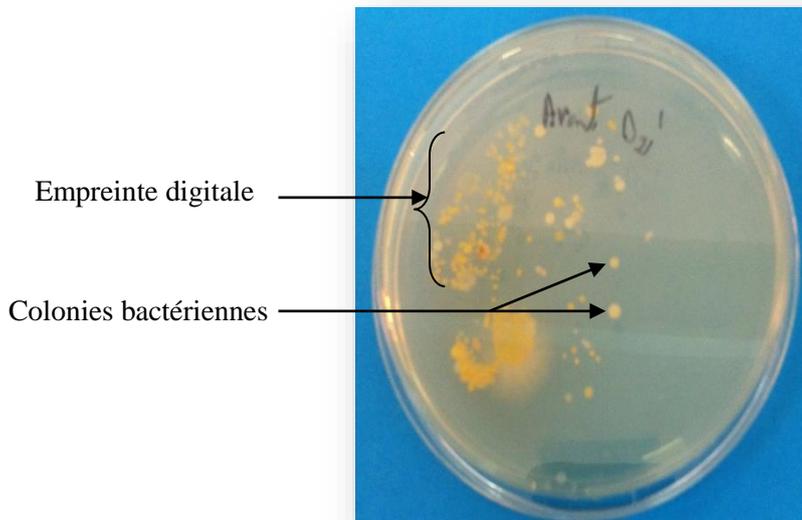
**A. dans l'eau distillée.**

**B. dans le chlorure de sodium.**

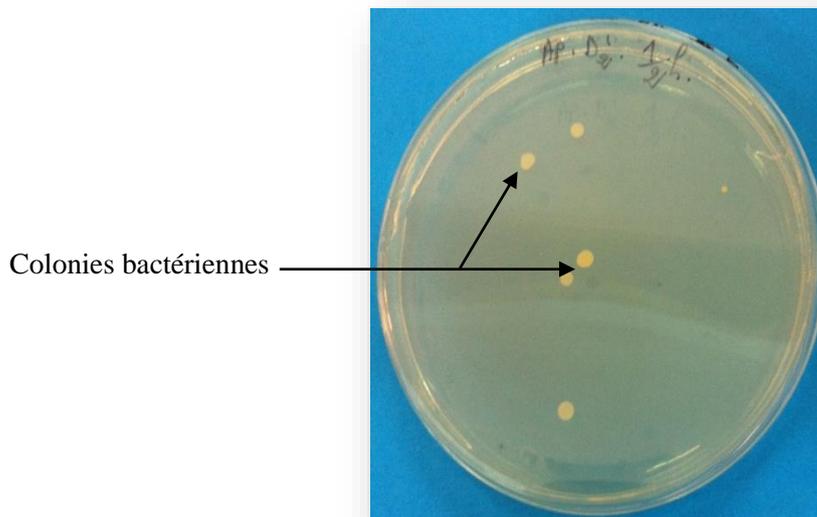
#### 4<sup>ème</sup> Partie : Étude microbiologique

Les résultats obtenus des différents prélèvements microbiologiques sont rapportés dans le tableau 9 : des colonies bactériennes et des moisissures ont été dénombrées dans chaque boîte de Pétri, de chaque répétition et pour chaque opérateur et à différents temps.

Les photos 14 et 15 représentent les boîtes de gélose des prélèvements de l'opérateur D2 avant et après lavage avec le savon synthétisé après l'incubation. Les colonies bactériennes sont visibles sur les deux boîtes de prélèvement avant lavage (Photo 14) et après lavage (Photo 15). Les empreintes de doigts laissées par l'opérateur lors du prélèvement sont discernables sur la Photo 14.



**Photo 14. Boîte de gélose D2 après incubation.**  
(D. main droite, 2. Opérateur 2 avant lavage avec le savon)



**Photo 15. Boîte de gélose D2(1/2 h) après incubation.**  
(D. main droite, 2. Opérateur 2, 1/2 heure après lavage avec le savon)

**Tableau 7 : Résultats des prélèvements microbiologiques.**

Opérateur	Temps	Dénombrement des colonies (mains droites)		Dénombrement des colonies (mains gauches)	
N° 1	Avant lavage	D1	430 colonies 23 moisissures	G1	63 colonies 6 moisissures
	1 min après lavage	D1(1min)	6 colonies	G1(1min)	7 colonies
	1/2 heure après lavage	D1 (1/2h)	40colonies	G1 (1/2h)	35 colonies
	2 heures après lavage	D1(2h)	84 colonies	G1(2h)	50 colonies
N° 2	Avant lavage	D2	111 colonies 16 moisissures	G2	168 colonies 4 moisissures
	1 min après lavage	D2(1min)	48 colonies	G2(1min)	32 colonies
	1/2 heure après lavage	D2(1/2h)	53colonies	G2(1/2h)	40 colonies
	2 heures après lavage	D2(2h)	72 colonies	G2(2h)	61 colonies
N° 3	Avant lavage	D3	142 colonies 1 moisissure	G3	118 colonies 8 moisissures
	1 min après lavage	D3(1min)	55 colonies	G3(1min)	62colonies
	1/2 heure après lavage	D3(1/2h)	80 colonies	G3(1/2h)	78 colonies
	2 heures après lavage	D3(2h)	93 colonies	G3(2h)	89 colonies

Ce tableau montre bien que le nombre de colonies bactériennes dénombrées avant lavage des mains (soit droite ou gauche) avec le savon synthétisé est largement réduit après lavage et celui-ci pour chaque opérateur et à différents temps.

Les doigts de la main droite, pour l'opérateur 1 et l'opérateur 3, semblaient plus contaminés que ceux de la main gauche : donc la boîte de gélose D1, par exemple, contenait 430 colonies alors que la boîte G1 en contenait 63 colonies (Tableau 9).

Les doigts de la main gauche, pour l'opérateur 2, semblaient plus contaminés que ceux de la main droite : la boîte de gélose D2, contenait 111 colonies alors que la boîte G2 en contenait 168 colonies (Tableau 9). Le nombre de moisissures dénombrées dans les différents prélèvements varie de 1 à 23.

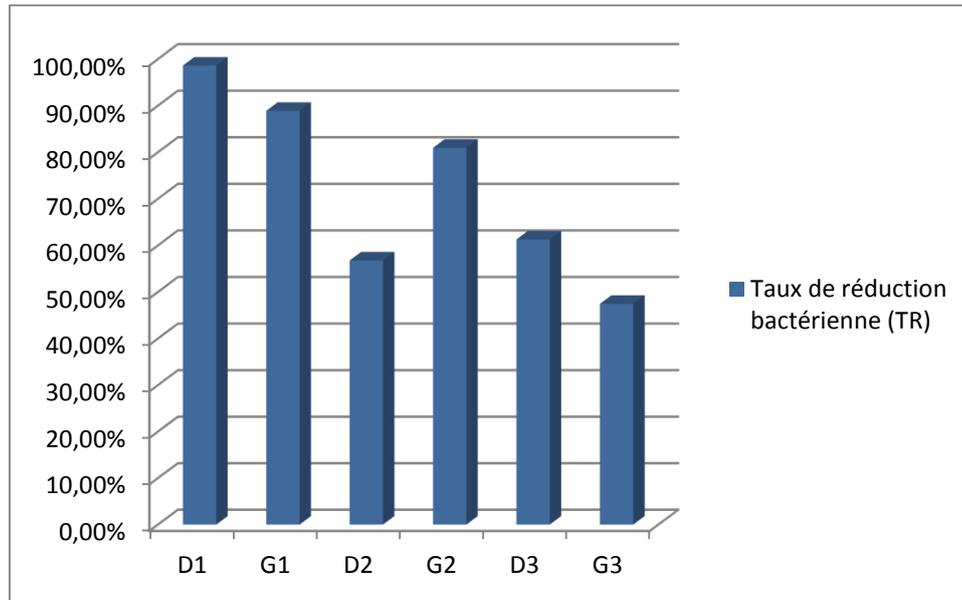
L'objectif de cette étude était de tester l'efficacité ainsi que la rémanence du savon obtenu après le lavage des mains. Le protocole expérimental a été élaboré en s'inspirant d'une étude testant l'efficacité d'un savon chirurgical (TANNEUR, 2006). Contrairement à cette étude, nos expérimentations ont été effectuées sur 3 opérateurs.

Les résultats obtenus des tests microbiologiques nous ont permis d'avoir une première idée sur l'efficacité du savon.

Les résultats des prélèvements bactériologiques réalisés pendant les manipulations ont été très satisfaisants. Ils ont montré qu'après un lavage avec le savon, le taux de réduction bactérienne sur la peau était entre 47,46 et 98,60% de la flore totale avant lavage; et ce une minute après le lavage avec le savon. (Tableau 10 et Figure 29, ci-après)

**Tableau 8. Les taux de réduction bactérienne 1min après le lavage avec le savon synthétisé.**

Opérateur	Prélèvement	Taux de réduction bactérienne (TR)
N° 1	D1(1min)	98,60%
	G1(1min)	88,89%
N° 2	D2(1min)	56,76%
	G2(1min)	80,95%
N° 3	D3(1min)	47,46%
	G3(1min)	61,27%

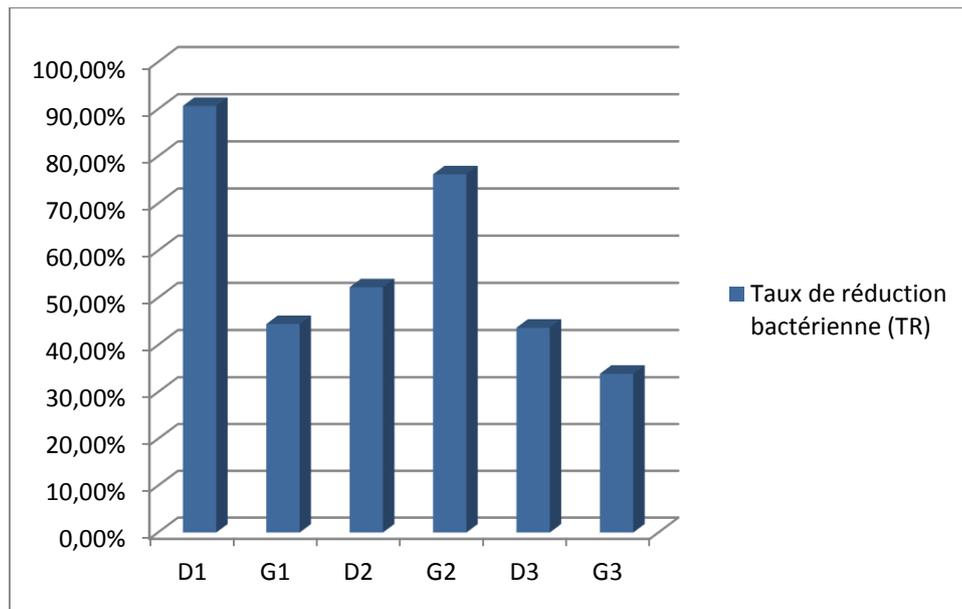


**Figure 29 : Taux de réduction bactérienne (TR) après 1min.**

Pour l'étude de la rémanence du savon synthétisé on a fait des prélèvements bactériologiques aussi après ½ heures. Le TR était entre 33,90 et 90,69 %. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 11 et figure 30, ci-après.

**Tableau 9. Les taux de réduction bactérienne ½ heure après le lavage avec le savon synthétisé.**

Opérateur	Prélèvement	Taux de réduction bactérienne (TR)
N° 1	D1(1/2 h)	90,69%
	G1(1/2 h)	44,44%
N° 2	D2(1/2 h)	52,25%
	G2(1/2 h)	76,19%
N° 3	D3(1/2 h)	43,66%
	G3(1/2 h)	33,90 %

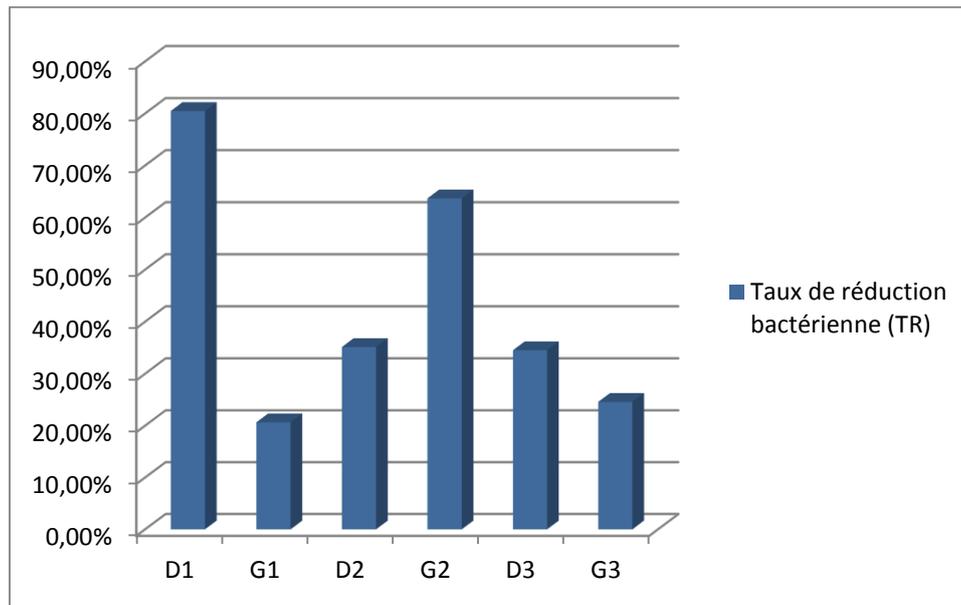


**Figure 30 : Taux de réduction bactérienne (TR) après ½ heure .**

Les résultats des prélèvements bactériologiques après 2 heures, le taux de réduction bactérienne sur la peau était entre 20,63 et 80,47% de la flore totale avant lavage (Tableau 12 et Figure 31, ci-dessous).

**Tableau 10. Les taux de réduction bactérienne 2heures après le lavage avec le savon synthétisé.**

Opérateur	Prélèvement	Taux de réduction bactérienne (TR)
N° 1	D1(2 h)	80,47%
	G1(2 h)	20,63%
N° 2	D2(2 h)	35,14%
	G2(2 h)	63,69%
N° 3	D3(2 h)	34,51%
	G3(2 h)	24,58%



**Figure 31 : Taux de réduction bactérienne (TR) après 2heures.**

Ces résultats étaient attendus et concordant avec les données bibliographiques concernant l'efficacité antibactériennes de l'huile d'olive et l'HE de citron utilisée comme adjuvant dans notre savon amélioré.

Les mécanismes par lesquels les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont incomplètement compris, mais il y a un certain nombre de mécanismes proposés (HLLEY et PATEL, 2005). L'action des huiles essentielles sur le développement des microorganismes peut être

Le savon obtenu semble avoir une activité bactéricide prolongée dans le temps sur la peau : jusqu'à 2 heures après le lavage des mains, le taux de réduction bactérienne a atteint 80,47%. La peau ne s'est pas recontaminée, malgré que la chaleur et l'humidité des mains génèrent un milieu confiné très favorable au développement des bactéries. Le savon semble donc avoir une excellente rémanence.

La peau des mains semble protégée de la recontamination bactérienne par l'action rémanente du savon. Cependant, il est possible que des bactéries restent en phase de latence (capables de survivre mais pas de se multiplier).

## Conclusion

La formation du savon est une réaction simple sur le plan chimique. Cependant la démarche technologique à adopter pour obtenir un produit de qualité acceptable est quelque peu complexe. Pour obtenir un savon de bonne qualité, il faut attacher une attention particulière à la qualité des matières premières. L'objectif premier de cette étude était de tester l'efficacité bactéricide d'un savon additionné à l'huile essentielle de citron (*Citrus limon*), ainsi que sa rémanence.

Les résultats des manipulations réalisées ont été très encourageants : après un lavage avec ce savon, le taux de réduction bactérienne sur la peau a été de 47,46 et 98,60%. L'efficacité et la rémanence de ce savon paraissent être excellentes.

Les perspectives d'études sur l'efficacité et la rémanence du savon synthétisé suite à cette étude sont nombreuses :

- les résultats de cette étude montrent que la réduction bactérienne est de 80,47%, 2 heures après désinfection. Il serait judicieux de bâtir un protocole expérimental comprenant des prélèvements bactériologiques à des temps supérieurs à 2 heures après le lavage des mains. Ceci permettrait de déterminer le temps au bout duquel la rémanence du savon s'atténue ;
- il est également envisageable de réaliser d'autres études comprenant des protocoles de désinfection des mains, permettant par exemple de déterminer le temps de lavage minimum pour un effet optimum du savon ;
- des études pourraient être réalisées pour comparer l'efficacité et la rémanence du savon obtenu avec d'autres savons, pouvant servir de témoins ;

## Références

- ABBARA, A, 2004. Ecologie microbienne de la peau, la flore cutanée et ses caractéristiques [Enligne]. (Page consultée le 20/05/2014). Adresse URL : [http://www.alyabbara.com/livre\\_gyn\\_obs/termes/hygiene/flore\\_transitoire\\_résidente\\_peau\\_mains.html](http://www.alyabbara.com/livre_gyn_obs/termes/hygiene/flore_transitoire_résidente_peau_mains.html).
- AFNOR NF ISO 855, 2004. *Huile essentielle de citron [Citrus limon (L.) Burm.f.]*;AFNOR, Paris.
- AFNOR, NF T.75-2002. *Association Française de Normalisation. Les huiles essentielles.* Paris, France.
- AFNOR, 1984. *Association Française de Normalisation Recueil des normes françaises des corps gras, raines oléagineuses, produits dérivés.* 3<sup>ème</sup> édition.
- AFNOR, 2000. *Association Française de Normalisation. Normes françaises : huiles essentielles.* AFNOR, Paris.
- AFNOR, 1986. *Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ».* AFNOR. Paris.57 p.
- AHMAD, M. M., REHMAN, S. U., ANJUM, F. M., BAJWA, E. E., 2006. *Comparative physical examination of various citrus peel essential oils.* International Journal of Agriculture and Biology, 8, p. 186-190.
- BACHELOT, C., BLAISE, A., CORBEL, T. et LE GUERNIC, A., 2006. *Les huiles essentielles : extraction et comparaison.* U.C.O Bretagne, p. 1-18.
- BAE, J.M, Lee, E.J et GUYATT, G, 2009. *Citrus fruit intake and pancreatic cancer risk : a quantitative systematic review.* Pancreas; 38:168-74.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M., 2008. *Biological effects of essential oils – A Review.* Food and Chemical Toxicology, 46(2), 446-475.
- BARANDA, L, GONZALEZ-AMARO, R, TORRES-ALVAREZ, B, ALVAREZ, C et RAMIREZ, V., 2002. *Correlation between P<sup>H</sup> and irritant effect of cleansers marketed for dry skin.* International Journal of Dermatology, 41, 494-499.
- BARRY, N, 2001. *Art d'extraire les huiles essentielles : De parfum à faire soi même.* Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 125-128.
- BATTINELLI, L et al., 2003. *Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells.* Planta Med. 69:910-913.
- BELAICHE, P., 1979. *Traité de phytothérapie et l'aromatérapie.* Tome I: L'aromatogramme. Ed : maloine S.A., Paris, 204 p.

- BENAVENTE-GARCIA, O et CASTILLO, J, 2008. *Update on uses and properties of citrus flavonoids : new findings in anticancer, cardiovascular and antinflammatory activity.* J.Agric.Food.Chem. 56:6185-205.
- BENEDICTE, B., BACHES, M., 2011. *Livre des agrumes.* Ed : Eugen Ulmer, 08 rue Blanche, 75009, Paris, 440-01. Adresse URL : [www.editins-ulmer.fr](http://www.editins-ulmer.fr).
- BESSON, S., 2007. *Propriétés adhésives Entre deux bulles de savon.* Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie. Paris, France. p. 1-144.
- BLANCKE, R., 2001. *Guide des fruits et légumes tropicaux.* Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
- BLANCO TIRADO, C., STASHENKO, E. E., COMBARIZA, M. Y., MARTINEZ, J. R. 1995. *Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.* J. Chromatogr.A 697, p. 513.
- BOURGOU, S., RAHALI, F, Z., OURGHEMMI, I., SAIDANI TOUNSI, M., 2012. *Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation.* The Scientific World Journal, 10 p.
- BRUNETON, J., 1987. *Mono et sesquiterpènes In elements de photochimie et de pharmacognosie.* Ed : Tec & Doc., Lavoisier, Paris, 223-234.
- BRUNETON, J., 1999. *Pharmacognosie- photochimie- Plantes médicinales.* Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1220 p.
- CARRELET, T et POSPISIL, F., 2001. *Objectif mains ; Guide technique pour l'hygiène et la protection des mains.* Publications C.CLIN SUD-Est, Tabloid Communication, Paris. p. 49-52.
- CARSON, C.F., RILLEY T. V et BOSQUE F., 2002. *Antimicrobial activity of the major components of essential oil of Malaleuca alternifolia.* Journal of Applied Bacteriology. 78, p: 264-269.
- CATALOGUES DES NORMES ALGERIENNES. 2008.
- CHAINANI-Wu, 2002. *Diet and oral, pharyngeal, and esophageal cancer.* Nutr Cancer. 44:104-126.
- CHATHAPHON, S., CHATHACHUM, S et HONGPATTARAKERE, T, 2008.

*Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. Against food-related microorganisms.* J. Sci. Technol. 30, 125-131.

- COATS, A.J, 1998. *The potential role of soluble fibre in the treatment of hypercholestérolaemia*. Postgrad Med J. 74:391-394.
- COTTIN, R, 2002. *Citrus of the World. A Citrus Directory*. SRA INRA-CIRAD (éd), France.
- COUDERC, V.L., 2001. *Toxicité des huiles essentielles*. Thèse de grade Docteur Vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse, 61 p.
- COX, S.D et al.1991. *In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Malaleuca alternifolia essential oils*. Journal of Applied Microbiology. 88, p: 170-175.
- COX, S.D et al.2000. *The mode of antimicrobial action and chemical composition of the essential oils of Malaleuca alternifolia (tee tree oil)* . Journal of Applied Microbiology. 88, p: 170-175.
- DAVIDSON, P.M., 1997. *Methods for testing the efficacy of food antimicrobial*. Food Technology. 43, p: 148-155.
- DONNEZ, M, 1993. *La production du savon*. Centre du développement industriel, Bruxelles, Belgique. p. 1-50.
- FOSCHI, R et al., 2010. *Citrus fruits and cancer risk in a network of case-control studies*. Cancer Causes Control 21:237-42.
- GARNERO J., 1991. *Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation*. Ed : Techniques-Encyclopédie des médecines naturelles, Paris p. 2-20.
- GHARAGOZLOO, M et GHADERI A, 2001. *Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells*. J Ethnopharmacol. 77:85-90.
- GHARAGOZLOO, M et DROUDCHI, M et GHADERI, A, 2002. *Effects of Citrus aurantifolia concentrated extract on the spontaneous proliferation of MDA-MB-453 and RPMI-8866 tumor cell lines*. Phytomedicine. 9:475-477.
- GIROU E., LOYEAU S., 2002. *Efficacy of handrubbing with alcohol based solution versus standard handwashing with antiseptic soap: randomized clinical trial*. British Medical Journal. 325-362.
- GORIS, A. 1967. *Manuel de botanique*. Ed. Clin. pp. 265-268.
- GOVINDACHARI, T.R et al., 2000. *Antifungal activity of some tetranortriterpenoids*. Fitoterapia. 71:317-320.

- GROSSET, J., 2004. Hygiène hospitalière [en ligne]. Tours, France. Faculté de médecine de Tours. (page consultée le 20/05/2014). Adresse URL : <http://www.med.univ-tours.fr:enseign/santepub/doc-ped/prevention/prevention-IN/lavage-mains.htm>.
- HELLAL, Z, 2001. *Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. : Application sur la sardine (Sardina pilchardus)*. Mémoire de magistère, Faculté des sciences biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- HERRUZO-CABRERA R., VIZCAINO-ALCAIDE M-J., FDEZ-ACINORO M-J., 2000. *Usefulness of an alcohol solution of N-Duopropenide for the surgical antisepsis of hands compared with handwashing with iodine-povidone and chlorhexidine : clinical essay*. Journal of Surgery Research. 94: 6-12.
- HIMED, L., 2011. *Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine*. Mémoire de magistère, institut de la nutrition, de l'alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire I.N.A.T.A.A. Univerité Mentouri – Constantine.
- HOTANTAI, L., 1999. *Détergents et produits de soins corporels*, Paris, Dunod, 479 p.
- ISERIN, P et al., 1996. *Encyclopédie des plantes médicinales ; Identifications, Préparations, Soins*. Ed : Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française, France. 335 p.
- JOHO, P., 2007. LES GRAISSES. Paul Emile Victor : maintenance et environnement.
- KAWAGUCHI, K et al., 1997. *Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and Pseudomonas*. BiosciBiotechnolBiochem; 61:102-104.
- KAWAII, S et al., 1999. *Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines*. BiosciBiotechnolBiochem; 63:896-899.
- KIM, H.J et al., 2002. *Dietary factors and gastric cancer in Korea: a case-control study*. Int J Cancer. 97:531-535.
- KONE, S, 2000. *Fabrication de savons améliorés. Technical Information, Eschborn, Allemand. P. 1-14*.
- KUNIMASA, K et al., 2010. *Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo*. Cancer Sci. 101:2462-9.

- KUROWSKA, E.M et al., 2000. *Régulation of apo B production in HepG2 cells by citrus limonoids*. In: Berhow MA, Hasegawa S, Manners GD, editors. *Citrus Limonoids Functional Chemicals*. Agriculture and Foods. Washington, 175-184.
- LARSON, E.L, MORTON, H.E., 199. *Alcohols*. Lea and Febiger ed. Philadelphia. P. 642-654.
- LECLERC, H, 1984. *Le citron : Les fruits de France*. 9ème Ed. Masson. France. 274 p.
- LIS-BALCHIN, M, 2002. *Lavender : the genus Lavandula*. Taylor and Francis, London.p : 37, 40, 50, 155-200.
- LIU, Y et al., 2001. *Citrus pectin: characterization and inhibitory effect on fibroblast growth factor-receptor interaction*. J Agric Food Chem. 49:3051-3057.
- MADHAVI, D.L., DESHPANDE, S.S et SALUNKHE, D.K., 1996. *Food Antioxydants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. Marcel Dekkar, Inc. New York. P: 65.
- MARCHETTI, M.G., KAMPF G., FINZI G., SALVATORELLI G., 2003. *Evaluation of the bactericidal effect of five products for surgical hand disinfection according to prEN 12054 and prEN 1279*. Journal of Hospital Infection. 55(33):238.
- MARCUSSON, J., 1929. *Manuel de Laboratoire pour l'industrie des Huiles et Graisses*. Librairie Polytechnique CH. BERANGER.Paris.
- MASLO, C., 2002. *La désinfection des mains par friction hydro-alcoolique*. Campagne.
- MEDINA, E., DE CASTRO, A., ROMERO, C., and BRENES, M. 2006. *Comparison of the concentration of phenolic compounds in olive oils and other plant: correlation with antimicrobial activity*. J.Agric. Food Chem. 54, 4954-4961.
- MINATO, K et al., 2003. *Lemon flavonoids, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver*. Life Sci. 72 :1609-1616.
- MIYAKE, Y et al., 1998. *Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats*. Lipids. 33:689-695.
- MOYEN, M et VAN PUYVELDE, L. 2009. *Le savon*. Elocution. p. 1-8.
- MOOR, C et SNAUWAERT, P., 2011.
- MONNATE., 2014. *Les huiles essentielles* Livre (voir).
- MULBERY, G., SNYDER, AT., HEILMAN, J., PYRECK, J., 2001. *Evaluation of a waterless scrubless chlorhexidine gluconate / ethanol surgical scrub for antimicrobial efficacy*. American Journal of Infection Control. 29. p. 377-382.

- NICOLAS, H., DANINA, L., OMAR, E., 2011. *Service de chimie et physicochimie organiques*. "Printemps des Sciences", Bruxelles.
- OGATA, S et al., 2000. *Apoptosis induced by the flavonoide from lemon fruit (Citrus limon BURM.f.) and its metabolites in HL-60 cells*. BiosciBiotechnolBiochem. 64:1075-1078.
- PADRINI, P et LUCHERONI, M.T., 1996. *Le grand livre des huiles essentielles- guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences*. Ed : De Vecchi, Paris.
- PERRY, N.B., ANDERSON, R.E. et BRENNAN, N., 1999. *Essential oils from Dalmatian sage (Salvia officinalis): variation among individuals, plant parts, seasons and sites*. J. Agric. Chem. 47(5): 48-54.
- PINGOT, A., 1998. *Les huiles essentielles*. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 230-236.
- POULOUSE, S.M, HARRIS, E.D et PATIL, B.S, 2005. *Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity*. J Nutr. 135:870-877.
- RAPHAEL, T.J et KUTTAN, G, 2003. *Effect of naturally occurring triterpenoidsglycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system*. Phytomedecine. 10:483-489.
- RICHARD F., 1992. *Manuel des corps gras*. Paris, Ed : Lavoisier, Tec.&Doc., p :1228-1241.
- ROBERT, A. et LOBSTEIN, A., 2005. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- SMALLFIELD, B., 2001. *Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes*. Crop & Food Research. Number 45, 4p.
- TANAKA, T et al., 2000. *Citrus limonoidsobacunone and limonin inhibit azoxymethane-induced coloncarcinogenesis in rats*. Biofactors. 13:213-218.
- TANNEUR, M.M.J., 2006. *Etude de l'efficacité in vivo d'un savon chirurgical à base de chlorhexidine*. Thèse de Doctorat. Université de Paule-Sabatier de Toulouse. P. 1-53.
- TERPSTRA, A.H et al., 2002. *The hypocholesterolemic effect of lemon peels, lemon pectin, and the waste stream material of lemon peels in hybrid F1B hamsters*. Eur.J.Nutr. 41:19-26.
- VALNET, J. 2001. *La santé par les fruits, légumes et les céréales*. Ed Vigot. France, 411 p.
- VALNET, M., 2005. *Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth International*. Journal of Food Microbiology. 85, p:73-81.

- VOKOU, D., KOKKINI, S. et BRESSIERS, J.M., 1998. *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece Distribution, volatile oil yield, and composition. *Economy botanic*. 42, p:407-412.
- WATERVAL, G, 2011. *Savon Artisanal*. GNU Free Documentation. p. 1-20.
- WENDA KOON, K. et SAGUCHI, N.A., 1995. *Methods of asses quality and stability of oils and fatcontaining foods*. AOCS. Press, champaign.
- WERNER, M., 2002. *Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit*. Editions Vigot, collection Santé Bien-être, 95 p.
- KUBO, A., LUNDE, C. S., and KUBO, I. 1995. *Antimicrobial activity of the olive oil flavour compounds*. *J. Agric. Food Chem*. 43, 1629-1633.
- ZAMPA, A., SILVI, S., SERVILI, M., MONTE DORO, G., ORPIANESI, C., and CRECI, A. 2006. *In vitro modulatory of colonic microflora by olive iridoids*. *Microb. Ecol. Health Dis*. 18, 147-153.
- GAUTIER, C et al., 2013. *Le bon usage des antiseptiques pour la prévention du risque infectieux chez l'adulte*. CCLIN Sud-ouest. France.
- TRAORE, O et al., 2004. *Comparaison de l'efficacité bactéricide in vivo de la polyvidone iodée alcoolique versus la chlorhexidine alcoolique pour la préparation du champ opératoire*. *Hygiènes*. 12: p 431-6
- BRUNETON, J., 1993. *Pharmacognosie et photochimie des plantes médicinales*. Lavoisier, Paris. Tec&Doc.

## Annexes

## Annexes N° 1. La composition de la Gélose Nutritive

- Extrait de viande 1,0g
- Extrait de levure 2,5g
- Peptone 5,0g
- Chlorure de sodium 5,0g
- Agar 16,5g
- pH = 7,0

## Annexe N°2. Les normes adoptées pour classer les savons et détergents (ISO 684-1974).

Type de produit	Savon de ménage			Savon de toilette		Pate de savon
	Parfumé 1 <sup>ère</sup> Gamme	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>	1 <sup>ème</sup>	2 <sup>ème</sup>	
<b>Pourcentage pondéral</b>						/
<b>Matières grasses animales ou végétales (Min)</b>	62	58	60	78	70	18
<b>Alcali libre (Max)</b>	0,08	0,3	0,3	0,002	0,02	0,02
<b>Humidité (Max)</b>	28	30	28	14	20	55

**Annexe N° 3. Les taux de mousse dans un milieu acide.**

**A**      **B**

**Photo 16. La solubilité du savon.**

**A. dans l'eau distillée.**

**B. dans l'acide chlorhydrique.**

Le taux de mousse calculé (TM) est de 0% par rapport au témoin.

**Annexe N° 4. Les taux de mousse dans un milieu salin.**

**A**      **B**

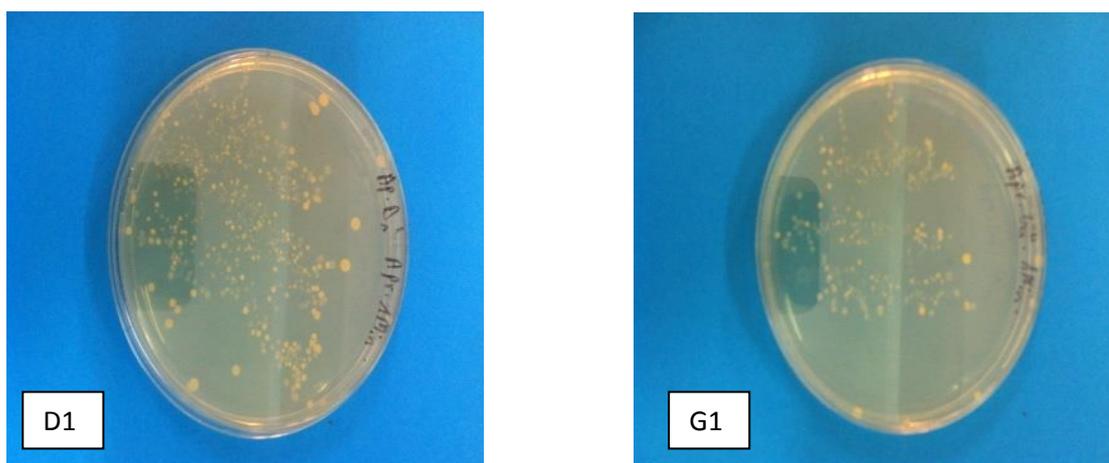
**Photo 17. La solubilité du savon.**

**A. dans l'eau distillée.**

**B. dans le chlorure de sodium.**

Le taux de mousse calculé (TM) est de 15% par rapport au témoin.

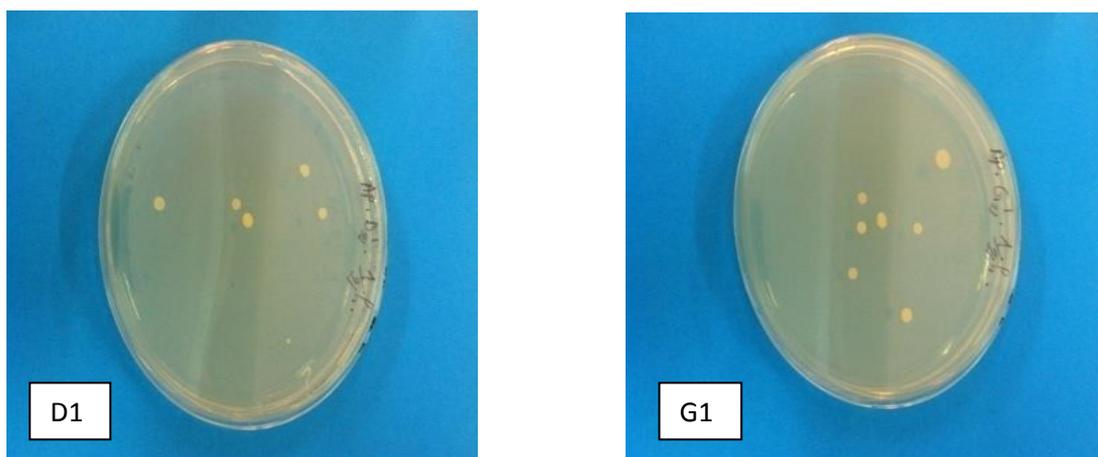
**Annexe N° 5. Les prélèvements microbiologiques des mains de l'opérateur 1 avant et après lavage au savon.**



**Photo 18. Prélèvements microbiologiques des mains avant lavage au savon.**

**D1 : main droite, opérateur 1.**

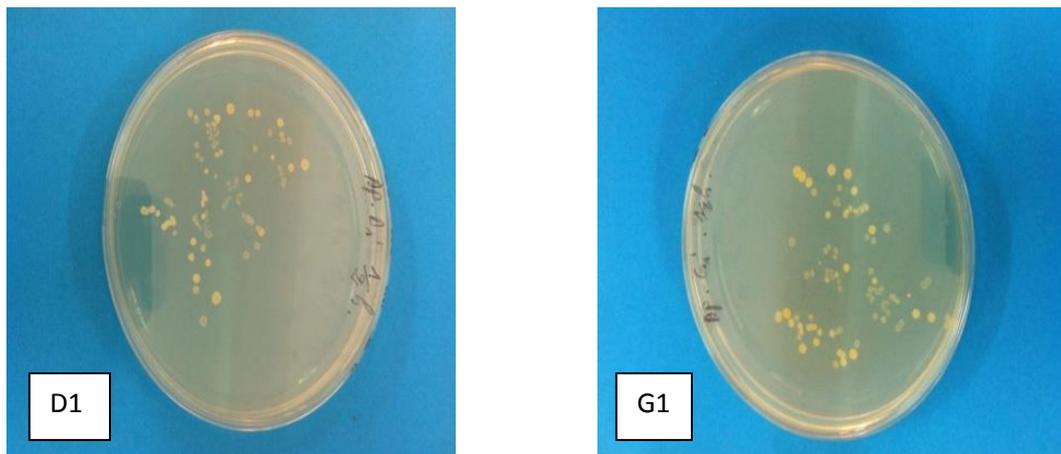
**G1 : main gauche, opérateur 1.**



**Photo 19. Prélèvements microbiologiques des mains après 1min de lavage au savon.**

**D1 : main droite, opérateur 1.**

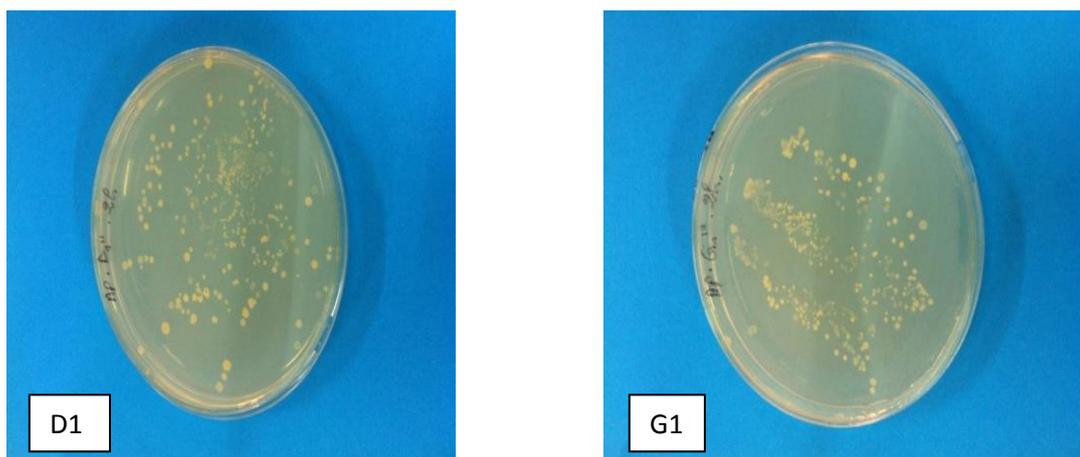
**G1 : main gauche, opérateur 1.**



**Photo 20. Prélèvements microbiologiques des mains après 1/2 h de lavage au savon.**

**D1 : main droite, opérateur 1.**

**G1 : main gauche, opérateur 1.**

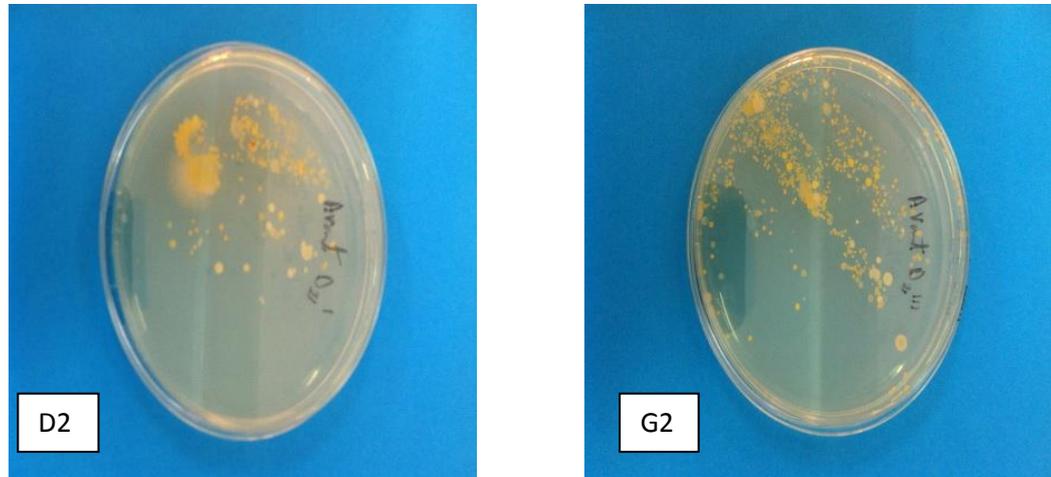


**Photo 21. Prélèvements microbiologiques des mains après 2h de lavage au savon.**

**D1 : main droite, opérateur 1.**

**G1 : main gauche, opérateur 1.**

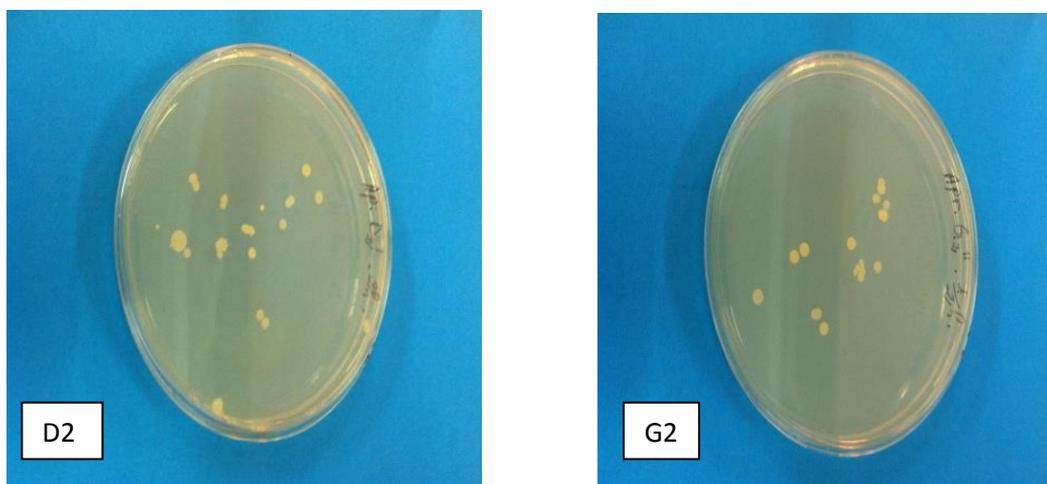
**Annexe N° 6. Les prélèvements microbiologiques des mains de l'opérateur 2 avant et après lavage au savon.**



**Photo 22. Prélèvements microbiologiques des mains avant lavage au savon.**

**D2 : main droite, opérateur 2.**

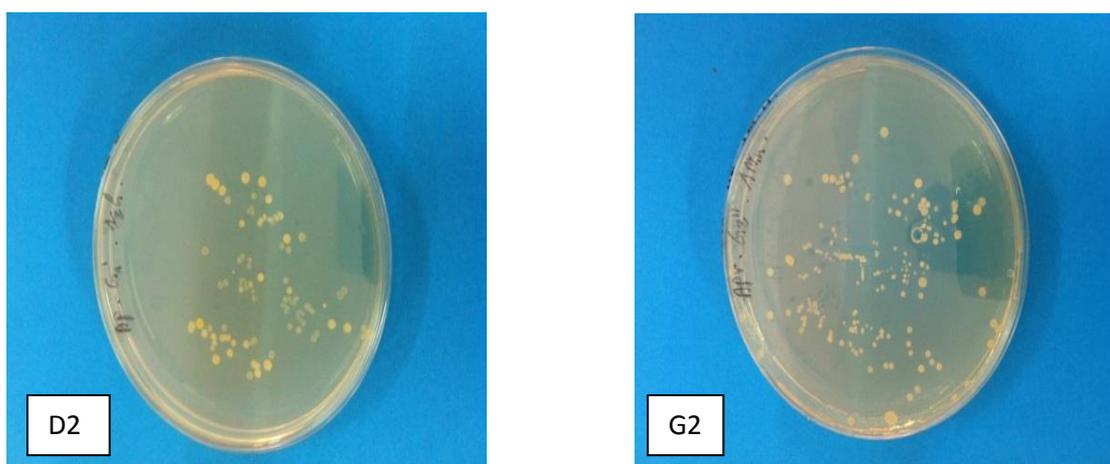
**G2 : main gauche, opérateur 2.**



**Photo 23. Prélèvements microbiologiques des mains après 1min de lavage au savon.**

**D2 : main droite, opérateur 2.**

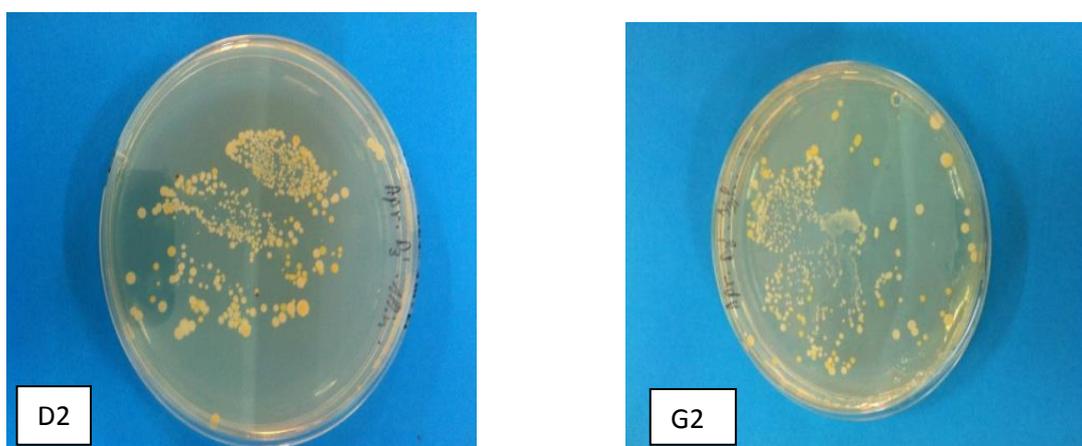
**G2 : main gauche, opérateur 2.**



**Photo 24. Prélèvements microbiologiques des mains après ½ h de lavage au savon.**

**D2 : main droite, opérateur 2.**

**G2 : main gauche, opérateur 2.**

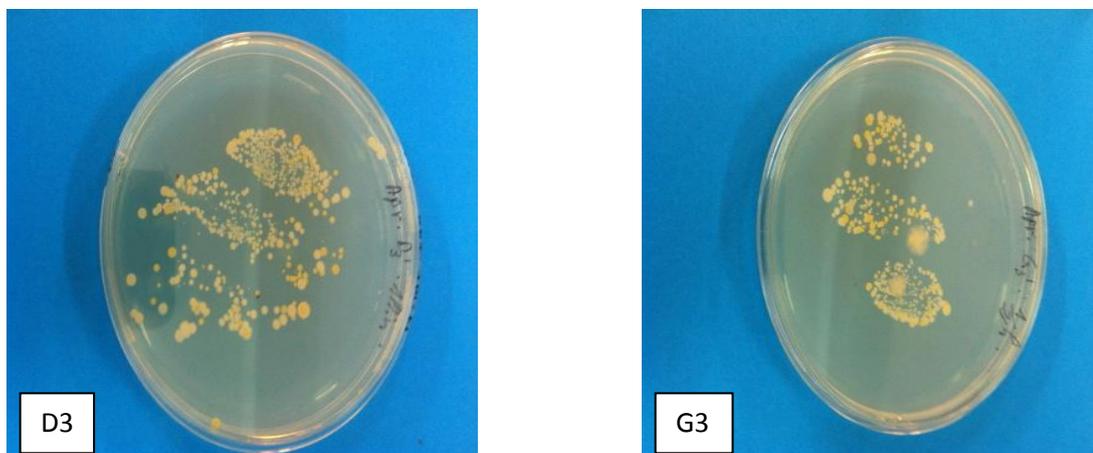


**Photo 25. Prélèvements microbiologiques des mains après 2h de lavage au savon.**

**D2 : main droite, opérateur 2.**

**G2 : main gauche, opérateur 2.**

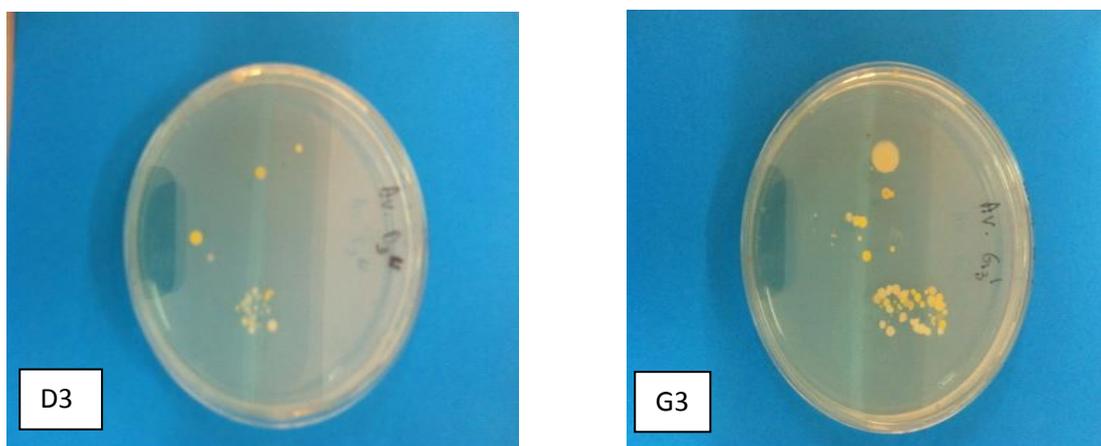
**Annexe N° 7. Les prélèvements microbiologiques des mains de l'opérateur 3 avant et après lavage au savon.**



**Photo 26. Prélèvements microbiologiques des mains avant lavage au savon.**

**D3 : main droite, opérateur 3.**

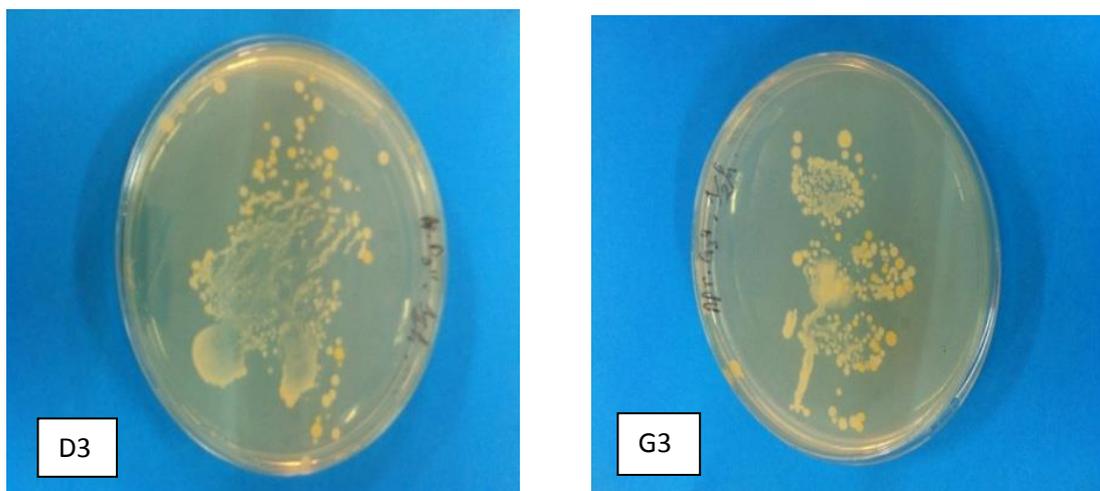
**G3 : main gauche, opérateur 3.**



**Photo 27. Prélèvements microbiologiques des mains après 1min de lavage au savon.**

**D3 : main droite, opérateur 3.**

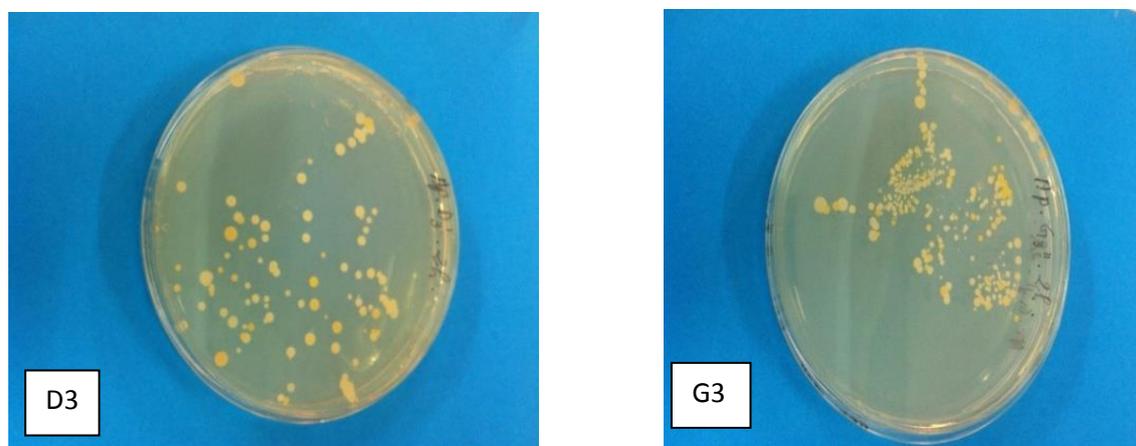
**G3 : main gauche, opérateur 3.**



**Photo 28. Prélèvements microbiologiques des mains après ½ h de lavage au savon.**

**D3 : main droite, opérateur 3.**

**G3 : main gauche, opérateur 3.**



**Photo 29. Prélèvements microbiologiques des mains après 2h de lavage au savon.**

**D3 : main droite, opérateur 3.**

**G3 : main gauche, opérateur 3.**