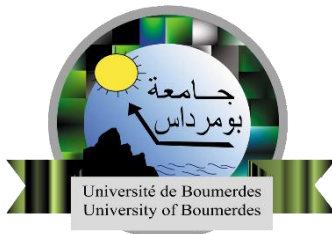


République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Organique

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Présenté et soutenu par

CHAFAI Yasmine

07 septembre 2021

Thème

“ Contribution à la caractérisation des huiles essentielles et de l’hydrolat de quelques *agrumes de la Mitidja :application* ”

Mme BOUSSAK Hassina	Maitre de conférence A FS – UMBB	Présidente
Mlle BENOUDJIT Fouzia	Maitre de conférence A FS - UMBB	Encadrant
Mme DEMIM Soraya	Maitre de conférence B FS – UMBB	Examinatrice

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements :

En premier, à Dieu tout puissant pour la volonté, la santé, la patience et le courage qu'il m'a donné durant toutes ces longues années et pour réaliser ce travail.

A ma promotrice et enseignante Mme Benoudjit Fouzia, pour m'avoir accordé sa confiance, pour sa compréhension, disponibilité malgré ses obligations professionnelles, de son savoir-faire, ainsi que ses encouragements et sa gentillesse, ses conseils judicieux et son suivi continuél tout le long de ce mémoire. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

A Mme Boussak, qui a bien voulu assumer la présidence du jury, qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

A Mme Demim Soraya, d'avoir accepté de partager ses impressions avisées lors de l'examen de ce travail.

Aux membres du laboratoire microbiologique de l'Etablissement Public Hospitalier de Dellys (Wilaya de Boumerdès) et plus particulièrement à **Yousra, Aziza et Hadjer**.

Au laboratoire d'analyse médicale Dr.Zahed (microbiologie et bactériologie) et au **laboratoire microbiologie** du Centre Hospitalier Universitaire de Bainem (Wilaya d'Alger).

Aux membres du laboratoire SPIC et plus particulièrement à **Hamoudi Imene** pour m'avoir gentiment accueilli, aidé et permis de réaliser mes formulations.

A Mr le Professeur Benmounah Abdelbaki, Directeur du Laboratoire de l'Unité de Recherche Matériaux, Procédés et Environnement (U.R.M.P.E) de l'UMBB, d'avoir eu la gentillesse de me permettre de réaliser diverses analyses au sein de son laboratoire.

Enfin mes remerciements d'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici ma sincère reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes chers parents. Ce travail n'aura jamais pu voir le jour sans leur soutien indéfectible et sans limite qu'ils ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et le fruit de vos innombrables sacrifices. Qu'ALLAH vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

À ma très chère sœur Badea et son mari Adlane

À mes chers frères Fateh, Nasreddine et son épouse

Qui sont toujours là pour moi et m'ont aidé financièrement pendant mon parcours à l'université et pour mon instruction et mon bien être.

À mes deux adorable nièce Racha et Anfel

À la Mémoire de ma tante Chahira

Ce travail est dédié à ma chère tante, décédée trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'ai tant souhaité ta présence en ce moment pour partager ma joie avec toi, tu seras toujours dans mon cœur. Que ton âme repose en paix. Je t'aime très fort, tu me manques...

À mes amis de toujours Asma, Lynda, Soumia, Meriem, Hanane qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, de réussite et de succès.

À tous ceux qui me sont chers

Je vous remercie pour tout le soutien, l'encouragement et l'amour que vous me portez.

Yasmine

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Classification botanique des <i>Citrus</i>	15
Tableau I.2 : Principaux composants de l'HE de mandarine.....	16
Tableau I.3 : Caractéristique organoleptique et physique de l'HE de mandarine.....	17
Tableau I.4 : Principaux constituants de l'HE de clémentine.....	19
Tableau I.5 : Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques de l'HE de clémentine...	19
Tableau I.6 : Propriétés organoleptiques et physicochimiques des HEs de bigaradier.....	21
Tableau I.7 : Principaux composés chimiques contenus dans les HEs de bigaradier.....	22
Tableau II.1 : Informations sur les HEs et l'HD étudiés.....	27
Tableau II.2 : Liste des souches microbiennes testées.....	35
Tableau II.3 : Sensibilités des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.....	37
Tableau II.4 : Valeurs des utilisées pour déterminer les CMI.....	39
Tableau II.5 : Composition des gels.....	40
Tableau II.6 : Composition des crèmes.....	41
Tableau III.1: Caractéristiques organoleptiques des HEs et de l'HD.....	53
Tableau III.2 : Propriétés physique des HEs et de l'HD.....	54
Tableau III.3 : Propriétés chimiques des HEs et de l'HD.....	55
Tableau III.4 : Résultats de l'analyse IR de l'HEC.....	57
Tableau III.5 : Résultats de l'analyse IR de l'HEM.....	58
Tableau III.6 : Résultats de l'analyse IR de l'HEBF.....	59
Tableau III.7 : Résultats de l'analyse IR de l'HEBPG.....	59
Tableau III.8 : Résultats de l'analyse IR de HDBPG.....	60
Tableau III.9: Caractéristiques organoleptiques et observations macroscopiques des formulations au cours du temps.....	71
Tableau III.10 : Teneurs en humidité et indices chimiques.....	73
Tableau III.11 : Teneurs en humidité et indices chimiques des formulations après vieillissement.....	89

Listes des figures

Figure I.1 : Exemples d’HEs issues de différentes parties de la plante.....	5
Figure I.2 : Formule chimique de l'isoprène.....	6
Figure I.3 : Exemple des composés monoterpéniques.....	6
Figure I.4 : Exemple de composés sesquiterpéniques.....	7
Figure I.5 : Exemple d’un composé diterpénique (acide abiétique)	7
Figure I.6 : Exemple d'un composé sesterpène (phorone A)	7
Figure I.7 : Exemple d’un composé triterpénique (squalène)	8
Figure I.8 : Exemple d'un composé polyternène (caoutchouc)	8
Figure I.9 : Entrainement à la vapeur d'eau à l'échelle industrielle et au laboratoire.....	12
Figure I.10 : Pelatrice et centrifugeuse séparatrice de l’essence de <i>citrus</i> des eaux résiduelles.....	12
Figure I.11 : Montage d’extraction par hydrodistillation et Clevenger.....	13
Figure I.12 : Extraction par micro- ondes.....	14
Figure I.13 : Schéma de principe d'extraction par CO ₂ supercritique.....	14
Figure I.14 : <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....	15
Figure I.15 : <i>Citrus clementina</i>	18
Figure I.16 : Répartition de la clémentine en Algérie.....	19
Figure I.17 : Fleurs, feuilles et fruit du <i>Citrus aurantium</i>	20
Figure I.18 : Représentation d’une émulsion avec sa phase externe et sa phase interne.....	23
Figure II.1 : Etapes de mesure de la densité relative.....	28
Figure II.2 : Réfractomètre Hanna HI 96801.....	29
Figure II.3 : Polarimètre Eleptron.....	30
Figure II.4 : Conductivimètre JENWAY 4510.....	31
Figure II.5 : Couleurs de la solution titrante avant et après équivalence.....	32
Figure II.6 : Couleurs de la solution titrante avant et après équivalence.....	33

Figure II.7 : Papier pH.....	34
Figure II.8 : Spectrophotomètre infrarouge FT/IR-4100 type A.....	35
Figure II.9 : Illustration de la méthode d'aromatogramme.....	37
Figure II.10: Illustration de la méthode en micro-atmosphère.....	38
Figure II.11 : Gels G ₁ , G ₂ et G _T respectivement.....	41
Figure II.12 : Crèmes C ₁ , C ₂ et C _T respectivement.....	42
Figure II.13 : Gel hydroalcoolique Vague de fraîcheur, Cytacnyl 10% et ACQUA di GIOIA respectivement.....	43
Figure II.14 : Etuve, dessiccateur et four à moufle respectivement.....	44
Figure II.15 : Spectrophotomètre UV-9200/VIS-7220G.....	45
Figure II.16 : Centrifugeuse nuve NF 400.....	46
Figure II.17 : Microscope optique OPTIKA.....	48
Figure II. 18 : Viscosimètre HAAKE VT550.....	49
Figure II.19 : Zêtamètre Zetasizer 2000.....	50
Figure III.1 : Observation microscopique des HEs et de l'HD.....	52
Figure III.2: Aspects et couleurs des HEs et HD.....	53
Figure III.3 : Spectre infra-rouge de l'HEC.....	57
Figure III.4 : Spectre infra-rouge de l'HEM.....	57
Figure III.5 : Spectre infra-rouge de l'HEBF.....	58
Figure III.6 : Spectre infra-rouge de l'HEBPG.....	59
Figure III.7 : Spectre infra-rouge de l'HDBPG.....	60
Figure III.8 : Stérilité des HEs et de l'HD.....	61
Figure III.9 : Photos représentant l'effet des HEs en micro-atmosphère.....	62
Figure III.10 : Effets des HEs sur les cinq souches étudiées.....	62
Figure III.11 : Aromatogramme des HEs et de l'HD (10µl)	63
Figure III.12 : Aromatogramme des HEs et HD (20µl)	63
Figure III.13 : Aromatogramme des HEs et HD (30µl)	63

Figure III.14 : Aromatogrammes des combinaisons des HEs et de l'HD (10µl)	65
Figure III.15 : Aromatogrammes des combinaisons des HEs et de l'HD (20µl)	65
Figure III.16 : Aromatogrammes des combinaisons des HEs et de l'HD (30µl)	65
Figure III.17 : Résultats des CMI sur les différentes souches.....	66
Figure III. 18 : Valeurs des CMI des HEs.....	67
Figure III.19 : Photos du micro-atmosphère de l'association HEs/ATBs.....	68
Figure III.20 : Effet de l'association HEs/ATBs sur les souches à 2 jours d'incubation.....	69
Figure III.21 : Effet de l'association HEs/ATBs sur les souches à 3 jours d'incubation.....	69
Figure III.22 : Effet de l'association HEs/ATBs sur les souches à 6 jours d'incubation.....	69
Figure III.23 : Test au bleu de méthylène des gels et des crèmes respectivement.....	74
Figure III.24 : Résultats des essais de centrifugation des gels et des crèmes formulés au cours du temps.....	75
Figure III.25 : Evolution du pH des crèmes et des gels formulés au cours du temps.....	76
Figure III.26 : Evolution de la CE (µS) des gels et des crèmes formulés au cours du temps.....	77
Figure III.27 : Evolution de l'indice de réfraction des crèmes et des gels formulés au cours du temps.....	78
Figure III. 28 : Turbidité des des crèmes et des gels formulés.....	78
Figure III. 29 : Résultats du potentiel zêta (mV) des crèmes et des gels formulés.....	79
Figure III. 30 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des crèmes.....	80
Figure III.31 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des gels.....	80
Figure III. 32 : Observations microscopiques des crèmes et des gels formulés (1 jour)	81
Figure III. 33 : Observations microscopiques des crèmes et des gels formulés (7 et 14 jours)	82
Figure III. 34 : Observations microscopiques des crèmes et des gels formulés (21 et 28 jours).....	83
Figure III. 35 : Observations microscopiques de la crème et des gels commerviaux.....	84
Figure III.36 : Résultats de stérilité des crèmes et des gels formulés.....	84

Figure III.37 : Diamètres d'inhibition en mm des crèmes.....	85
Figure III.38 : Diamètres d'inhibition en mm des gels.....	85
Figure III.39 : Activités antimicrobiennes des gels et des crèmes formulés respectivement.....	86
Figure III.40 : Valeurs des CMI des gels et des crèmes formulés.....	86
Figure III.41 : Aspect des émulsions après vieillissement.....	88
Figure III.42 : Indice de crémage des formulations C ₁ et C ₂ , G ₁ et G ₂	88
Figure III.43 : Test au bleu de méthylène des crèmes et des gels vieillis.....	89
Figure III.44 : Evolution du pH des gels et des crèmes après vieillissement.....	90
Figure III.45 : Conductivité électrique (en μS) des gels et des crèmes après vieillissement.....	90
Figure III.46 : Indice de réfraction des gels et des crèmes après vieillissement.....	91
Figure III.47 : Turbidité du vieillissement.....	91
Figure III.48 : Résultats du potentiel zêta après vieillissement.....	92
Figure III.49 : Rhéogramme des crèmes après vieillissement.....	92
Figure III.50 : Rhéogramme des gels après vieillissement.....	93
Figure III. 51 : Observations microscopiques des crèmes et des gels après vieillissement.....	94
Figure III.52 : Stérilité des gels et des crèmes après vieillissement.....	94
Figure III.53 : Diamètres d'inhibition en mm des crèmes après vieillissement.....	95
Figure III.54 : Diamètres d'inhibitions en mm des gels après vieillissement.....	95
Figure III.55 : Valeurs de la CMI des gels et des crèmes après vieillissement.....	96

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : American Type Culture Collection.

PAM : Plantes Aromatiques et Médicinales.

ATB : Antibiotique.

AM : Ampicilline.

B.C.P : Bromocrésol pourpre.

C.albicans : *Candida albicans*.

Cip : Ciprofloxacine.

CN : Gentamicine.

CZ : Céfazoline.

CMI : Concentration minimum d'inhibition.

DZI : Diamètre des zones d'inhibition.

E. coli : *Escherichia coli*.

E/H : Eau dans l'huile.

GN : Gélose nutritive.

HE : Huile essentielle.

HD : Hydrolat.

H/E : Huile dans l'eau.

ISO : Organisation Internationale de Normalisation.

Ia : Indice d'acide.

Is : Indice de saponification.

Ie : Indice d'ester.

IR : infra-rouge.

IRTF : Infrarouge à transformée de Fourier.

Ir : Indice de réfraction.

IC : Indice de crémage.

MH : Mueller Hinton.

OMS : Organisation Mondiale De Santé.

pH : Potentiel d'hydrogène.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

P : Pénicilline.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S.typhimurium : *Salmonella typhimurium*.

SAB : Sabouraud.

Sommaire

Introduction générale.....	13
Chapitre I : synthèse bibliographique	
I.1. Introduction.....	3
I.2. Plantes aromatiques et médicinales	3
I.2.1. Historique.....	3
I.2.2. Définition	3
I.3. Huiles essentielles.....	4
I.3.1. Histoire et origine	4
I.3.2. Définition	4
I.3.3. Répartition et localisation dans la plante	4
I.3.4. Propriétés physico-chimiques	5
I.3.5. Composition chimique	6
I.3.6. Facteurs influençant la composition chimique.....	8
I.3.7. Activités biologiques	8
I.3.8. Utilisation.....	9
I.3.9. Toxicité	10
I.3.10. Conservation	10
I.4. Hydrolat	10
I.4.1. Définition	10
I.4.2. Composition.....	10
I.4.4. Utilisation.....	11
I.4.6. Conservation	11
I.5. Techniques d'extraction des huiles essentielles et d'obtention des hydrolats	11
I.5.1. Entrainement à la vapeur d'eau.....	11
I.5.2. Expression à froid	12
I.5.3. Hydrodistillation	13
I.5.4. Extraction assisté par micro-onde	13
I.5.5. Extraction par CO ₂ supercritique	14
I.6. Matériel végétal étudié.....	15
I.6.1. Mandarine : <i>Citrus reticulata</i> Blanco	15
I.6.2. Clémentine : <i>Citrus clementina</i>	17
I.6.3. Bigaradier : <i>Citrus aurantium</i>	20
I.7. Notions sur les formulations	23

I.7.1. Crème cosmétique.....	23
I.7.2. Gel.....	24
I.8. Conclusion	25

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Introduction	26
II.2. Informations sur les huiles essentielles et l'hydrolat étudiés	26
II.3. Caractérisation des huiles essentielles et de l'hydrolat.....	28
II.3.1. Caractéristiques organoleptique.....	28
II.3.2. Propriétés physicochimiques	28
II.3.3. Analyse spectrale : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	34
II.3.4. Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et de l'hydrolat	35
II.4. Formulations et étude de stabilité	40
II.4.1. Formulation de gels et de crèmes	40
II.4.2. Caractérisation et étude de stabilité	42
II.4.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des formulations	50

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Introduction	52
III.2. Caractérisation des huiles essentielles et de l'hydrolat	52
III.2.1. Observations microscopiques et caractéristiques organoleptiques.....	52
III.2.2. Propriétés physiques.....	54
III.2.3. Propriétés chimiques	55
III.2.4. Analyse spectrale : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	56
III.3. Activité antimicrobienne des HEs et de l'HD	61
III.3.1. Stérilité des HEs et de l'HD	61
III.3.2. Méthode de diffusion par disque	61
III.3.3. Combinaisons des HEs et de l'HD	64
III.3.4. Concentrations minimales inhibitrices	66
III.3.5. Association des huiles essentielles et des antibiotiques	67
III.4. Caractérisation et étude de stabilité des formulations	70
III.4.1. Caractéristiques organoleptiques et observations macroscopiques.....	70
III.4.2. Teneurs en humidité et indices chimiques.....	73
III.4.3. Sens de l'émulsion.....	74
III.4.4. Test de centrifugation	74

III.4.5. pH	75
III.4.6. Conductivité électrique	76
III.4.7. Indice de réfraction.....	77
III.4.8. Turbidité	78
III.4.9. Potentiel zêta	79
III.4.10. Viscosité	79
III.4.11. Observations microscopiques	80
III.4.12. Activité antimicrobienne	84
III.4.13. Caractérisation des émulsions formulés après vieillissement (cycle froid/chaud) .	87
Conclusion générale	97
Références bibliographiques	99
Résumé	

Introduction générale

Depuis la nuit des temps, l'homme appréciait les vertus thérapeutiques des plantes aromatiques et les utilisait avec succès sous diverses formes pour guérir de très nombreuses maladies. Ces plantes ont un pouvoir de synthétiser une gamme extraordinaire de métabolites secondaires dont les huiles essentielles. En 2007, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. En effet, de 10 à 20% environ des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques [1], ce qui conduit les industries à s'intéresser d'avantage aux huiles essentielles.

Selon la norme AFNOR NFT 75-006 les huiles essentielles, définies suivant le procédé d'extraction comme étant « le produit obtenu à partir d'une matière première végétale », suscite actuellement beaucoup d'intérêt et ce en raison de leurs activités biologiques. L'effet antimicrobien marqué de certaines huiles essentielles sur le développement des micro-organismes a été démontré [2]. En phytothérapie et en aromathérapie, les huiles essentielles sont ainsi utilisées dans le traitement de nombreuses maladies infectieuses et sont aussi utilisées dans les préparations pharmaceutiques.

En revanche, il n'en va pas de même des hydrolats qui sont des produits de la distillation des plantes aromatiques et médicinales et qui restent bien souvent peu exploités. Ces "eaux magiques" ont pourtant, elles aussi, des vertus thérapeutiques hors pair. Malgré sa faible concentration en principes actifs, l'hydrolat présente certaines activités pharmacologiques intéressantes. Certains sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires [3]. Leur intérêt principal est qu'ils sont toujours beaucoup mieux tolérés que les huiles essentielles.

Ce travail s'est intéressé, dans un premier temps, à l'étude de quatre huiles essentielles d'agrumes (mandarine, clémentine et, fruit et petit grain de bigaradier) et d'un hydrolat du bigaradier et, dans un second temps, à l'incorporation de ces extraits dans des formulations (hydrogels et crèmes) aux caractères antimicrobiens.

Ce mémoire se divise en trois chapitres :

- Le premier chapitre est réservé à une étude bibliographique qui introduit les connaissances nécessaires à la compréhension de ce travail notamment les plantes aromatiques et médicinales, les huiles essentielles, les hydrolats, les matériel végétal étudié et quelques notions sur les émulsions et les hydrogels.
- Le deuxième chapitre est consacré aux différentes techniques et méthodes d'analyses utilisées pour caractériser les huiles essentielles et l'hydrolat. Ce chapitre détaille également les différents protocoles employés pour formuler les crèmes et les hydrogels antibactériens et pour étudier leurs stabilités respectives.
- Le troisième chapitre expose les résultats obtenus accompagnés de leurs interprétations.

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

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Introduction

Les plantes font partie de l'histoire de tous les continents. L'homme a découvert que les animaux sauvages utilisent instinctivement certaines plantes pour se soigner. Depuis ce jour, la médecine par les plantes existe.

Dans ce chapitre seront abordées, d'abord les plantes aromatiques et médicinales (PAM). Par la suite, seront traitées les huiles essentielles (HEs), qui suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, des biologistes et des médecins, les hydrolats (HDs), qui possèdent des propriétés thérapeutiques intéressantes et bien souvent différentes de celles des HEs correspondantes, ainsi que les principales méthodes d'extraction des HEs et d'obtention des HDs. Il sera aussi question de présenter le matériel végétal qui a fait l'objet de ce mémoire. Enfin ce chapitre se terminera par des notions sur les hydrogels et les émulsions qui constitueront les applications dans lesquels les HEs et l'HD étudiés vont être incorporés.

I.2. Plantes aromatiques et médicinales

I.2.1. Historique

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales (PAM) est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. Les PAM représentent une source immense de molécules chimiques naturelles et actives : alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, huiles essentielles...

Les années 90 ont été marquées par une prise de conscience générale en faveur de la santé de l'homme et de la qualité de l'environnement. L'agriculture biologique, la phytothérapie et l'aromathérapie, ont suscité un regain d'intérêt pour la culture des plantes médicinales pour l'utilisation en frais, en séchée ou sous forme d'extrait [4].

I.2.2. Définition

D'après la X^{ème} édition de la Pharmacopée française [5], les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

I.3. Huiles essentielles

I.3.1. Histoire et origine

Les HEs sont utilisées depuis des millénaires pour leur action bénéfique sur l'homme. 4000 ans avant J.C., les égyptiens utilisaient déjà les huiles comme parfum et dans les momifications des corps. Il faudra attendre le XVI^{ème} siècle pour voir apparaître la généralisation de la production et de l'utilisation des HEs. Selon Ntezurubanza [6], l'histoire de l'aromathérapie, qui est celle des HEs, peut se résumer en quatre époques comme suit :

1. L'époque au cours de laquelle étaient utilisées des plantes aromatiques telles quelles ou sous forme d'infusion ou de décoctions.
2. L'époque celle dans laquelle les plantes aromatiques étaient brûlées ou mises à infuser ou à macérer dans une huile végétale.
3. La troisième époque correspond à la recherche de l'extraction de cette substance odorante. Apparaît alors le concept d'HE qui aboutit à la création et au développement de la distillation.
4. La quatrième époque est la période moderne dans laquelle la connaissance des composants des HEs intervient et explique les effets physiques, chimiques, biochimiques, physiologiques voire électroniques des arômes végétaux.

I.3.2. Définition

L'HE est une essence extraite et modifiée selon les procédés d'obtention mis en œuvre. Elle est définie par la norme AFNOR NF 75-006 [7] comme étant un « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerie des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

I.3.3. Répartition et localisation dans la plante

La partie de la plante utilisée pour obtenir l'huile essentielle (Figure I.1) doit être précisée, soit pour des questions de rendement soit parce que la composition chimique de la partie considérée conduira à une application spécifique très intéressante.

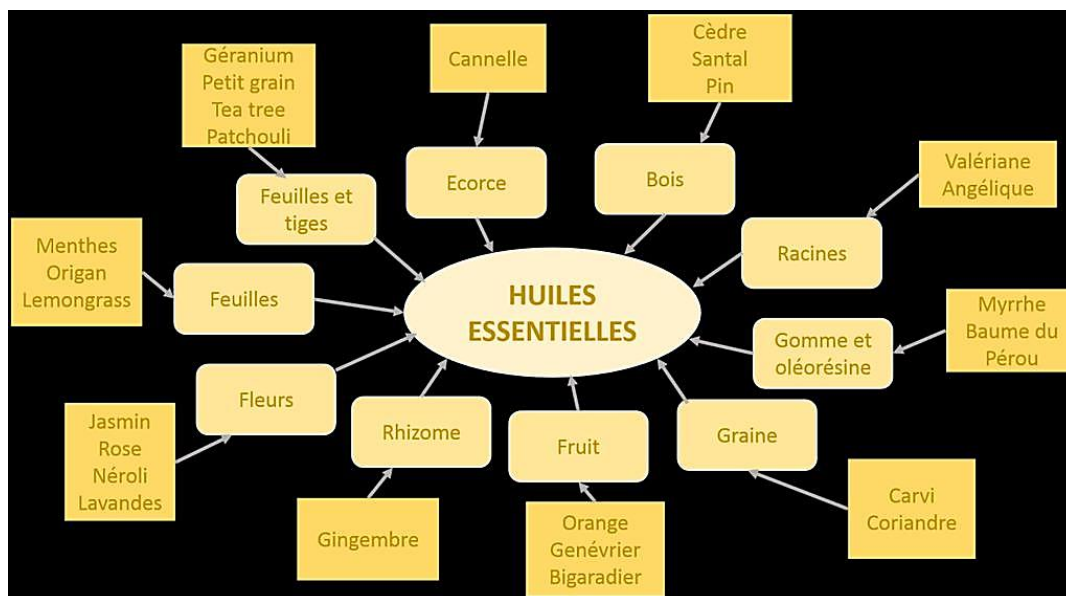


Figure I.1 : Exemples d’HEs issues de différentes parties de la plante [8].

I.3.4. Propriétés physico-chimiques

Les HEs possèdent en commun un certains nombres de propriétés physico-chimiques comme suit :

- Ce sont des liquides à température ambiante, volatiles, de consistance huileuse mais non grasse et d’odeur aromatique très prononcée.
- Les HEs peuvent être incolores ou de couleur jaune pâle à l’exception de quelques HEs, telles que celle de l’achillée et de la matricaire, qui se caractérisent par une coloration bleue à bleue verdâtre due à la présence de l’azulène et du chamazulène.
- La densité des HEs est le plus souvent inférieure à celle de l’eau. Seules les HEs de sassafras, de girofle et de cannelle ont des densités supérieures à celle de l’eau.
- Les HEs ont un indice de réfraction souvent élevé. Elles sont douées de pouvoir rotatoire. Cela est dû à leurs constitutions de molécules asymétriques.
- Les HEs sont liposolubles. Elles sont également solubles dans les alcools mais peu solubles dans l’eau.
- Le point d’ébullition des HEs est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaires.
- Les HEs sont peu polaires, très altérables et sensibles à l’oxydation, ce qui entraîne des modifications en leurs odeurs, leurs points d’ébullition et leurs solubilités.

I.3.5. Composition chimique

Les HEs sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvés en tant que composés majoritaires dans quelques-unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle. Suivant le nombre entier d'unités penta carbonées (C₅)_n ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène) (Figure I.2), nous pouvons réaliser la classification suivante :

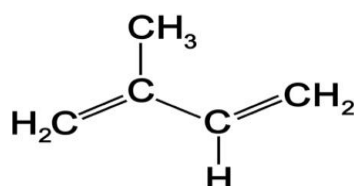


Figure I.2 : Formule chimique de l'isoprène.

- Pour n=2 : **les monoterpènes** : ce sont des hydrocarbures en C₁₀. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout l'alcool, l'cétone et l'aldéhyde (Figure I.3).

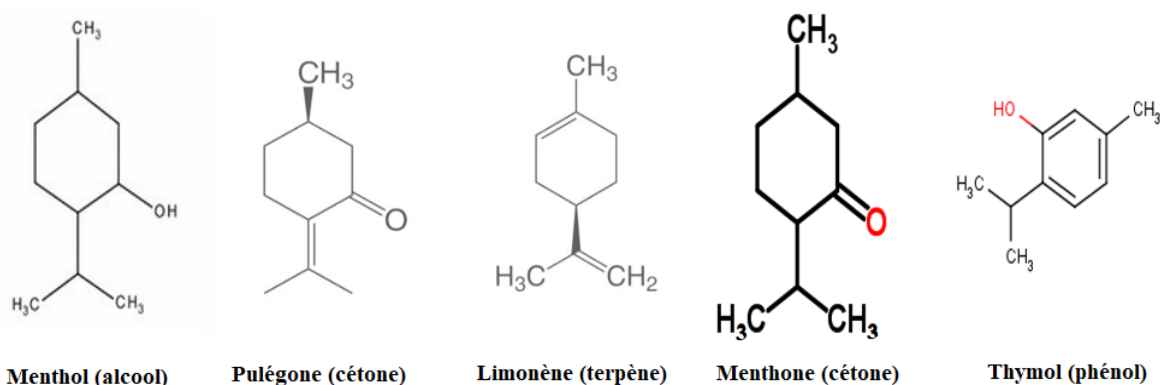


Figure I.3 : Exemple des composés monoterpéniques.

- Pour n=3 : **les sesquiterpènes** : ce sont des hydrocarbures de formule C₁₅ (Figure I.4). Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires [9]. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés.

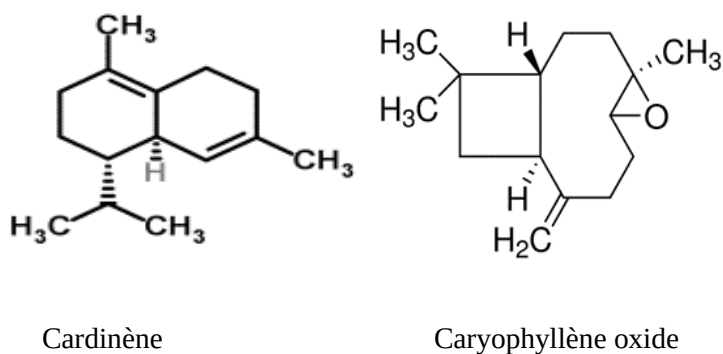


Figure I.4 : Exemple de composés sesquiterpéniques.

- Pour $n=4$: **les diterpènes** : ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C_{20} (Figure I.5). Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines.

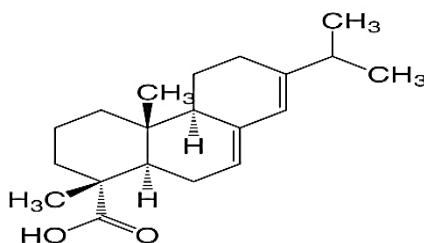


Figure I.5 : Exemple d'un composé diterpénique (acide abiétique).

- Pour $n=5$: **les sesterpènes** : ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C_{25} (Figure I.6).

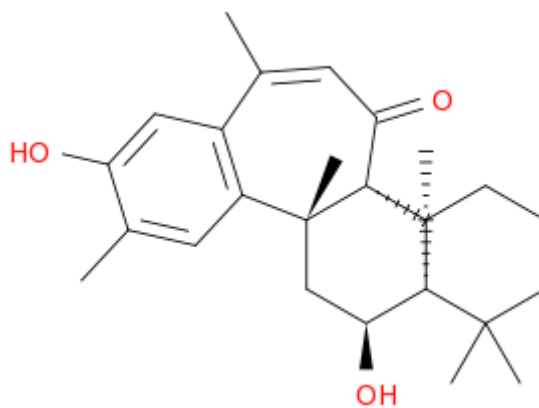


Figure I.6 : Exemple d'un composé sesterpène (phorone A).

- Pour $n=6$: **les triterpènes** : ces composés en C_{30} sont très répandus (Figure I.7), notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.

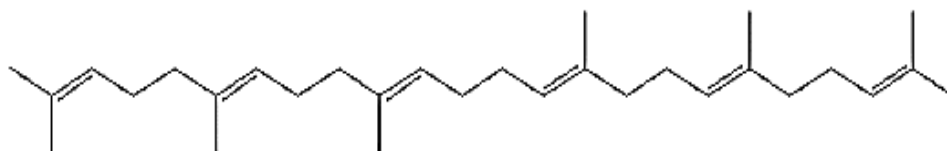


Figure I.7: Exemple d'un composé triterpénique (squalène).

- Pour $n=8$: **les polyterpènes** : ce sont des polymères de l'isoprène. Le caoutchouc en est un exemple (Figure I.8).

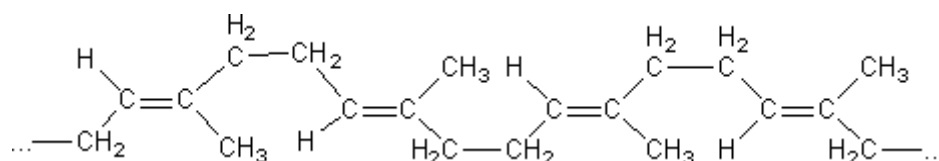


Figure I.8 : Exemple d'un composé polyterpénique (caoutchouc).

I.3.6. Facteurs influençant la composition chimique

La composition chimique des HEs dépend de multiples facteurs :

- Origine botanique.
- Mode d'obtention.
- Conservation des plantes.
- Organe producteur.
- Cycle végétatif.
- Existence de chimiotypes.
- Origine géographique.
- Conditions climatiques.
- Facteurs génétiques.

I.3.7. Activités biologiques

I.3.7.1. Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. 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, la fuite d'électrons et la coagulation du contenu protéique des cellules [10]. Le mode d'action des HEs 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. Les HEs agissent aussi bien sur les bactéries à gram positif que sur les bactéries à gram négatifs. Toutefois, les bactéries à gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est lié directement à la structure de leurs parois cellulaires [11].

Les HEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent à la famille des Labiées qui sont riches en composés phénoliques comme le thymol et le carvacrol. Ces derniers ont un effet antibactérien contre un large spectre de bactéries comme *Escherichia coli* (*E. coli*), et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [12].

I.3.7.2. Activité antifongique

Selon Voukou et al. [13], les HEs les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Labiées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge.... Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypée des HEs, les activités antifongiques des composés purs ont été classés, selon le type de fonctions chimiques, vis-à-vis de sept champignons [14] (*Candida tropicalis* – *Candida pseudotropicalis* – *Candida albicans* – *Candida auris* – *Aspergillus fumigatus* – *Aspergillus niger* - *Aspergillus flavus*) comme suit : Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > hydrocarbures.

I.3.8. Utilisation

Les HEs possèdent un champ d'application très vaste comme suit :

- **Dans l'industrie cosmétique** : comme des produits de base dans la fabrication des parfums, savons, shampoings, crèmes, masques de beauté....
- **Dans l'industrie du nettoyage** : dans les produits d'hygiène (détergents, lessives...).
- **Dans le secteur agroalimentaire** : comme antiseptiques, aromatisants, conservateurs...
- **Dans l'industrie chimique et médicinale** : comme agents thérapeutiques et comme matières premières pour synthétiser des principes actifs.

I.3.9. Toxicité

Bien que naturelles, les HEs ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. La toxicité des HEs est directement liée à leur composition chimique. En effet, les composés polyinsaturés sont plus toxiques que les autres (cétones, lactones, phénols) [15]. Les HEs peuvent être hépatotoxique, dermatotoxique (irritations, brûlures, hypersensibilité, phototoxicité), neurotoxique (dépression ou excitation du système nerveux central, effet stupéfiant, convulsions), néphrotoxique ...

I.3.10. Conservation

Sensibles à la lumière, la chaleur et l'oxygène, les HEs doivent être conservées de façon étanche dans des flacons en verres brun, en aluminium ou en acier inoxydable dans l'obscurité. La durée de conservation d'une HE varie entre 12-18 mois avec une température maximale de 25°C [16].

I.4. Hydrolat

I.4.1. Définition

L'hydrolat (HD) est l'eau distillée que l'on sépare de l'HE après distillation. Il se charge de molécules aromatiques au cours de la distillation. C'est pourquoi, l'HD contient naturellement certains composés aromatiques des HEs (moins de 5%) [17]. Les acides sont généralement présents dans les HDs car ils sont hydrosolubles. Ce sont des composés très actifs et efficaces, dotés d'un pouvoir anti-inflammatoire, même à l'état de traces [18]. Étant peu concentrés en principes actifs, les HDs présentent très peu de risques de surdosage.

I.4.2. Composition

Les HDs contiennent, en petite quantité, des composés volatils semblables à ceux présents dans l'HE ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'huile. La composition des HDs s'éloigne donc de celle des HEs : les molécules oxygénées hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles, comme les hydrocarbures terpéniques, sont la plupart du temps quasi absents.

I.4.4. Utilisation

Du fait de leur forte concentration en eau et de la présence de molécules actives, les HDs sont très doux pour la peau et les muqueuses. Ils peuvent être ingérés beaucoup plus facilement que les HEs. De ce fait, les HDs peuvent être utilisés dans différents domaines : en aromathérapie, en cosmétique et même intégrés dans la cuisine.

I.4.6. Conservation

Etant sans conservateurs, les HDs sont sensibles aux altérations. C'est pourquoi, il est vivement conseillé de les stocker au réfrigérateur et de les utiliser au maximum dans les 6 mois après ouverture (2 mois si usage interne).

I.5. Techniques d'extraction des huiles essentielles et d'obtention des hydrolats

I.5.1. Entrainement à la vapeur d'eau

C'est la méthode la plus utilisée. Dans ce système d'extraction le contact direct de l'eau et de la matière végétale à traiter est absent. Ainsi, les phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation qui peuvent altérer la qualité de l'HE sont évités (Figure I.9). Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur fourni par une chaudière. Les cellules de l'espèce végétale éclatent et libèrent des substances aromatiques qui sont par la suite vaporisées afin de former un mélange « eau + HE ». Le mélange est ensuite condensé, afin d'être décanté, dans l'essencier et séparé en deux phases : aqueuse et organique.

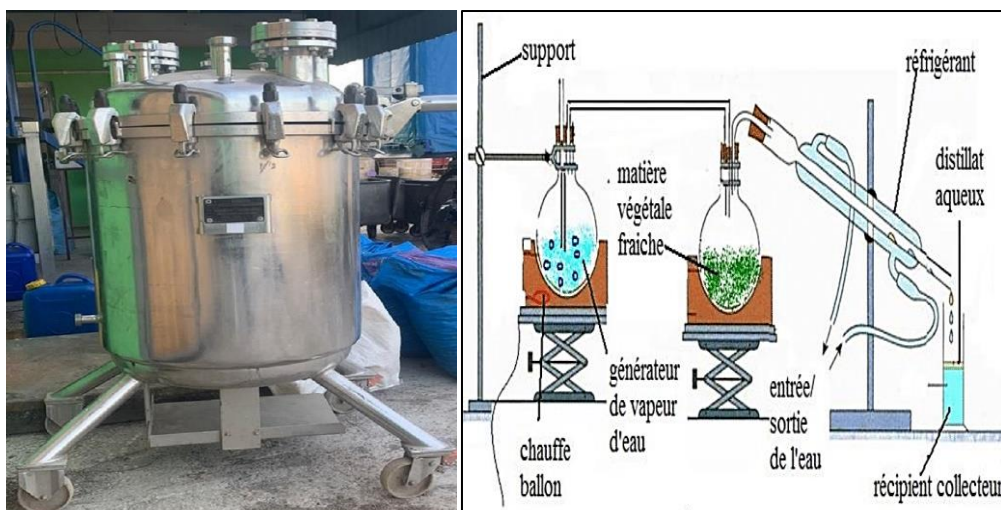


Figure I.9 : Entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle industrielle (à gauche) et au laboratoire (à droite).

I.5.2. Expression à froid

Décrite par la Pharmacopée européenne comme un « procédé mécanique sans chauffage », l'extraction par expression à froid (Figure I.10) est principalement utilisée pour les fruits d'agrumes (citron, orange, mandarine...). Son principe consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes en exerçant un courant d'eau sur toute la surface du fruit pour libérer leur contenu aromatique. Après élimination des déchets solides, l'HE est séparée de la phase aqueuse (pulpe, jus, pépin) par centrifugation.



Figure I.10 : Pelatrice (à gauche) et centrifugeuse séparatrice de l'essence de *citrus* des eaux résiduelles (à droite).

I.5.3. Hydrodistillation

L'hydrodistillation (Figure I.11) est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée. Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'HD par simple différence de densité. L'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'hydrodistillation peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Ce recyclage est dit cohobage et le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger (Figure I.11).

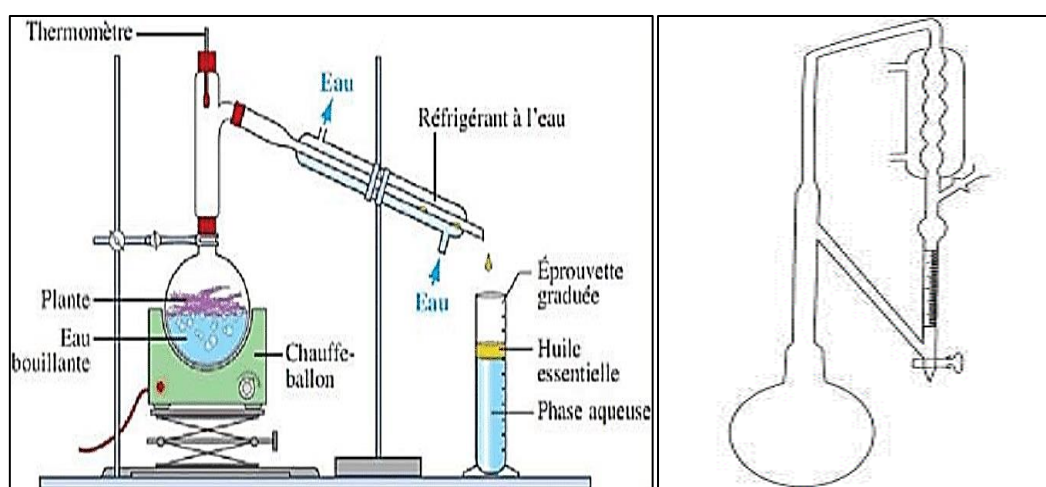


Figure I.11 : Montage d'extraction par hydrodistillation (à gauche) et Clevenger (à droite).

I.5.4. Extraction assisté par micro-onde

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante (Figure I.12). Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation (i.e. Refroidissement et décantation). Ce procédé permet un gain de temps, jusqu'à 10 fois, et d'énergie considérable par rapport à l'hydrodistillation.

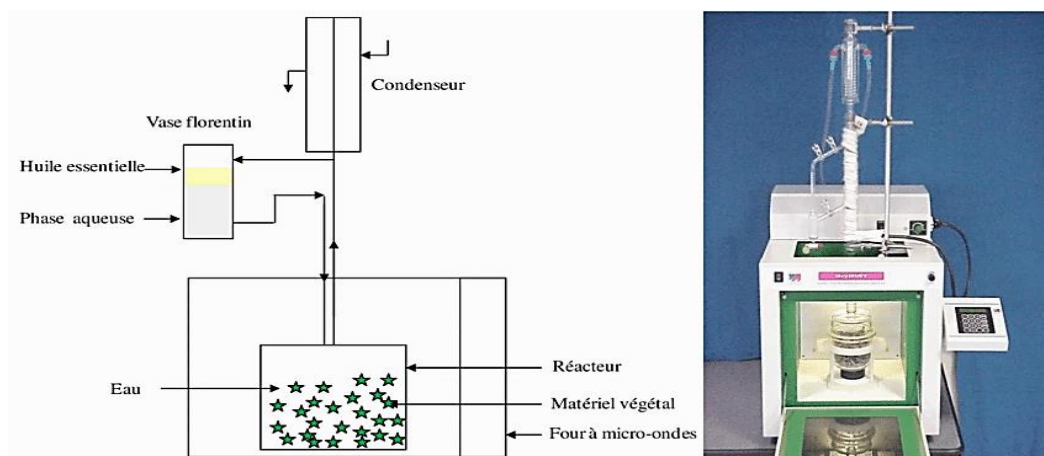


Figure I.12 : Extraction par micro- ondes.

I.5.5. Extraction par CO₂ supercritique

Ce procédé utilise généralement le dioxyde de carbone (CO₂), qui, au-delà du point critique (P= 73,8 bars et T= 31,1°C), possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. Ceci lui confère un bon pouvoir d'extraction qui est plus facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression (Figure I.13). Le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible, peu coûteux et s'élimine facilement de l'extract.

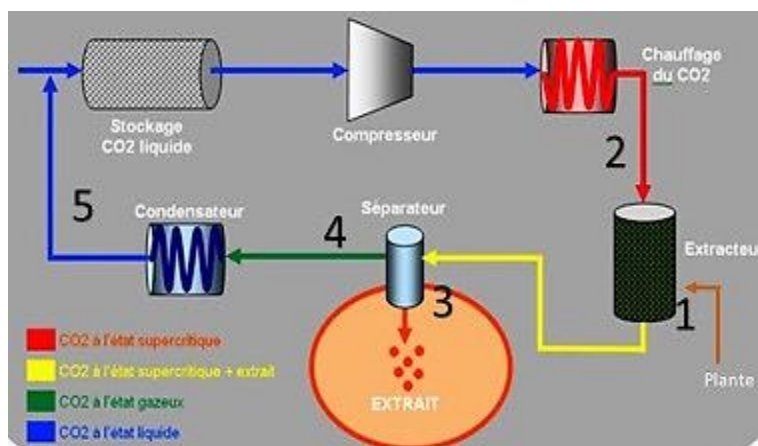


Figure I.13 : Schéma de principe d'extraction par CO₂ supercritique.

I.6. Matériel végétal étudié

I.6.1. Mandarine : *Citrus reticulata* Blanco

I.6.1.1. Description botanique et noms

Le mandarinier (*Citrus reticulata*) est un petit arbre de 3 à 5 m de hauteur. Les feuilles sont persistantes, ovales lancéolées à elliptiques lancéolées, d'un vert foncé brillant et pétiole étroitement ailé. Les fleurs du mandarinier sont blanches. Le fruit (i.e. Mandarine ou *Citrus reticulata* Blanco) est aplati ou piriforme dont l'écorce est jaune, orange ou rouge orangé riche en glandes huileuses, lisses, rugueuses dont la croûte est mince ou épaisse (Figure I.14). Les graines sont habituellement ovoïdes, lisses avec base arrondie.



Figure I.14 : *Citrus reticulata* Blanco.

- **Nom scientifique (latin) :** *Citrus reticulata* Blanco.
- **Noms communs :** mandarine.
- **Nom arabe :** alyusufi.
- **Nom anglais :** mandarin.

I.6.1.2. Classification botanique

Le Tableau I.1 ci-dessous regroupe la classification botanique des *Citrus*.

Tableau 2.1: Classification botanique des *Citrus*.

Famille	Rutaceae	Sous-famille	Aurantioideae
Règne	Plantae	Ordre	Sapindales
Genre	Citrus	Tribu	Citreae
Classe	Magnoliopsida	Sous classe	Rosidae

I.6.1.3. Origine et répartition géographique

Citrus reticulata Blanco (ou mandarines) sont des fruits tropicaux ou subtropicaux très répandus dans le monde. Les mandarines ont été cultivées en Chine et au Japon sur une grande échelle depuis le 16^{ème} siècle. C'est le dernier agrume important arrivé en Europe au 19^{ème} siècle. En 1805, deux variétés ont été acheminées en Angleterre en provenance de la région chinoise de Canton. De l'Angleterre, ils ont été introduits dans la région méditerranéenne. En 1850, le fruit fut solidement établi en Italie.

I.6.1.4. Récolte

Les mandarines se récoltent en hiver d'octobre à fin mars selon les variétés. La peau des mandarines à maturité encore sur l'arbre doit être uniformément orange et le fruit bien lourd. La variété peut être récoltée lorsque les fruits sont encore un peu verts. Cela ne signifie pas qu'ils ne sont pas mûrs car c'est le froid qui induit la couleur des agrumes.

I.6.1.5. Huile essentielle

- a) **Extraction** : l'HE est obtenu par pression à froid du zeste de mandarine (voir partie I.5.2). Ce procédé d'extraction permet de conserver les composés volatiles.
- b) **Composition chimique** : les principaux composés chimiques de l'HE de mandarine, selon la norme ISO 3528 [19], sont récapitulés dans le Tableau I.2.

Tableau I.2 : Principaux composants de l'HE de mandarine.

Composés	Teneurs (%)	Composés	Teneurs (%)
Alpha pinène	1,6 – 2,7	Limonène	65 – 74
Beta pinène	1 – 2	Linalol	0,05 – 0,2
Myrcene	1,4 – 2	n-Décanal	0,04 – 0,14
n-Octanal	0,08 – 0,14	Alpha sinensal	0,2 – 0,5
γ-Terpinene	17 – 22	Methyl N-methylanthranilate	0,4 – 0,7

- c) **Caractéristiques organoleptique et physicochimiques** : le Tableau I.3 ci-dessous regroupe les caractéristiques organoleptiques et physicochimiques de l'HE de mandarine selon la norme ISO 3528 [19].

Tableau I.3 : Caractéristique organoleptique et physique de l'HE de mandarine.

Paramètres	Résultats
Aspect	Liquide mobile
Couleur	Jaune à jaune orange
Odeur	Fraiche, fruitée
Densité à 20°C	0,846 – 0,854
Indice de réfraction à 20°C	1,4726 – 1,4753
Pouvoir rotatoire	+69° à +76°
Miscibilité dans l'éthanol 90% à 20°C	Miscible 1V/10V max.
Indice d'acide (mg de KOH/g d'huile)	< 2

- d) Activités biologiques :** des études antérieures ont rapporté diverses propriétés du *Citrus reticulata* Blanco telles l'activité antimicrobienne, anti-oxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antiprolifératif, hypoglycémique et insecticide [20].
- e) Emplois :** les HEs de Citrus peuvent être utilisées de façons très différentes pour un large spectre de maladies et symptômes :
- **Application cutanée :** pour les troubles digestifs, les infections virales et bactériennes, les douleurs et troubles de la circulation sanguine, les boutons, les cheveux ainsi que pour les peaux fatiguées, abîmée, ridée et grasse.
 - **Voie orale :** pour les brûlures et les douleurs d'estomac, les colites, la constipation chronique et la digestion difficile.
 - **Inhalation et diffusion :** pour lutter contre les infections et favoriser le bien-être (angoisse, anxiété, déprime, fatigue, nervosité...).

I.6.2. Clémentine : *Citrus clementina*

I.6.2.1. Description botanique et noms

Le clémentinier est un arbre hybride de la famille des Rutacées. Il est issu du croisement entre un mandarinier (*Citrus reticulata*) et un oranger (*Citrus sinensis*). De 4 à 6 mètres de hauteur, l'arbre porte des feuilles et des fleurs très parfumées (Figure I.15). La clémentine (*Citrus clementina*) est le fruit du clémentinier. Ce dernier est pratiquement sans pépin, contrairement à la mandarine, savoureuses dotées d'une peau fine d'une couleur verte qui devient orange sous l'effet de la baisse de température en hiver.



Figure I.15: *Citrus clementina*.

- **Nom scientifique (latin) :** *Citrus clementina*.
- **Noms communs :** clémentine.
- **Nom arabe :** clémentine.
- **Nom anglais :** clementine.

I.6.2.2. Classification botanique

La clémentine a la même classification botanique que la mandarine (voir partie I.6.1.2).

I.6.2.3. Origine, répartition géographique et récolte

La clémentine a vu le jour près d'Oran (Algérie). En 1902, le père Clément, chef des pépinières de l'orphelinat de Misserghin (Figure I.16), découvre un arbre qui ne ressemble pas à ses mandariniers en goûtant son fruit, il s'aperçoit que le produit est sucré, sans pépin et facile à éplucher. Elle fera rapidement son entrée en Europe et en Amérique du nord.

Les clémentines se récoltent en hiver d'octobre à fin février.



Figure I.16 : Répartition de la clémentine en Algérie.

I.6.2.4. Huile essentielle

- Extraction de la clémentine** : l'HE de la clémentine est obtenu par expression à froid du zeste des fruits frais (voir partie I.5.2).
- Composition chimique** : les principaux composés chimiques de l'HE de clémentine, selon la norme ISO 21631 [21], sont récapitulés dans le Tableau I.4.

Tableau I.4 : Principaux constituants de l'HE de clémentine.

Composés	Teneurs (%)
Limonène	90 – 97
Myrcène	1 – 2,5
Sabinène	0,3 – 1,5
γ -Terpinène	1

- Caractéristique organoleptique et physicochimiques** : le Tableau I.5 ci-dessous regroupe les caractéristiques organoleptiques et physicochimiques de l'HE de clémentine selon la norme ISO 21631 [21].

Tableau I.5 : Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques de l'HE de clémentine.

Paramètres	Résultats
Aspect	Liquide limpide, mobile
Couleur	Orange pâle à orange foncé
Odeur	Type citrus, mandarine
Densité relative à 20 °C d_{20}^{20}	0,840 à 0,860
Indice de réfraction à 20 °C	1,470 à 1,478
Pouvoir rotatoire à 20 °C	Entre +90° et +98°
Indice d'acide (mg de KOH/g d'huile)	< 0,2

- d) Activité biologique :** la riche composition de l'HE de clémentine en monoterpènes lui confère de puissantes propriétés anti-infectieuses contre les bactéries, les virus, les champignons mais aussi les vers et les parasites. La présence de limonène dans l'huile agit directement sur la motilité gastrique. Cette molécule a également une activité cholérétique et cholagogue. Le limonène et la myrcène sont des molécules aux propriétés antalgiques, relaxantes et sédatives.
- e) Emplois :** l'usage de l'HE de clémentine est identique à celui de l'HE de mandarine (voir partie I.6.1.9).

I.6.3. Bigaradier : *Citrus aurantium*

I.6.3.1. Description botanique et noms

Le bigaradier ou oranger amer est un arbrisseau fruitier (nom du fruit : orange amer ou bigarade) de 5 à 10 mètres de hauteur aux branches épineuses portant des feuilles brillantes vertes foncées, d'une légère odeur et une saveur amère, ovales, luisantes et persistantes. Les feuilles mesurent environ 8 cm de longueur et 4 cm de largeur. Le bigaradier a des fleurs de couleur blanche ou rose, pouvant atteindre 25 mm, plus grandes que celles de l'oranger doux et très odorante, duquel est tiré l'essence du néroli et l'eau de fleur d'oranger (Figure I.17).



Figure I.17 : Fleurs, feuilles et fruit du *Citrus aurantium*.

- **Noms scientifiques :** *Citrus aurantium* L.
- **Noms communs :** orange amère, bigaradier, petit grain bigarade, bigaradier, oranger amer.
- **Noms anglais :** bitter orange, Séville orange, sour orange.
- **Noms arabe :** naranj.

I.6.3.2. Classification botanique

L'orange amère est à la même classification botanique que la mandarine (voir partie I.6.1.2).

I.6.3.3. Origine, répartition géographique et récolte

Le bigaradier est passé de la Chine vers l'Inde, l'Arabie est enfin l'Égypte. Il est arrivé en Europe grâce aux arabes qui l'introduisirent en Sicile au XI^{ème} siècle. Il est cultivé en Amérique centrale et en Amérique du sud ainsi que dans le bassin méditerranéen.

Le bigaradier fleurit à la fin du printemps et les fruits sont matures de novembre à janvier.

I.6.3.4. Huiles essentielles

- a) **Extraction** : les HEs de bigaradier sont obtenues, soit par entraînement à la vapeur des feuilles et tiges (i.e. petit grain) (voir partie I.5.1), soit par expression à froid (voir partie I.5.2) des zestes des fruits frais (i.e. bigarades).
- b) **Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques** : le Tableau I.6 ci-dessous regroupe la caractéristiques organoleptique et physicochimiques des HEs obtenues à partir du fruit et du petit grain de bigaradier selon les normes ISO 9844 [22] et ISO 8901 [23] respectivement.

Tableau I.6 : Propriétés organoleptiques et physicochimiques des HEs de bigaradier.

	HE du fruit	HE du petit grain
Aspect	Liquide	Liquide limpide
Couleur	Jaune-vert à brun-vert	jaune pâle à jaune ambré
Odeur	Caractéristique de la partie extérieure de la peau d'orange amère	Orangée, amère agréable
Densité relative à 20°C	0,845 – 0,860	0,885 – 0,898
Indice de réfraction à 20°C	1,472 – 1,476	1,4550 – 1,4720
Pouvoir rotatoire 20°C	+88° à +98°	- 6° à +2°
Indice d'acide (mg de KOH/g d'huile)	/	2
Indice d'ester	/	140 – 217

- c) **Compositions chimiques** : Les principaux composés chimiques des HEs, obtenues à partir du fruit et du petit grain de bigaradier selon les normes ISO 9844 [22] et ISO 8901 [23] respectivement, sont récapitulés dans le Tableau I.7.

Tableau I.7 : Principaux composés chimiques contenus dans les HEs de bigaradier.

HEs	Fruit	Petit grain
Principaux constituants	Teneurs (%)	Teneurs (%)
Pinène alpha	0,3 – 0,7	/
β -Pinène	0,3 – 1,2	/
Myrcène	1,6 – 2	/
Limonène	92 – 95	1 – 6
Linalol	0,1 – 0,4	10 – 32
Acétate de linalyle	0,6 – 1	40 – 72
Acétate de géranyle	0,27	1,5 – 5,5
β -Caryophyllène	0,2	/
Germacrene D	0,21	/
Trans- β -Nerolidol	0,20	/
Octanal	0,2	/
Décanal	0,1 – 0,2	/
Trans- β -Ocimène	/	1 – 4
α -terpinèol	/	1 – 7
Géraniol	/	1 – 4

- d) **Activité biologique** : l'HE de bigaradier a montré une bonne activité de piégeage des radicaux libres, due en grande partie à la teneur élevée en limonène, efficace pour réduire le stress oxydatif. L'HE est également connue pour ses propriétés anti-infectieuses, analgésiques, anesthésiantes, cicatrisantes, bactéricides et antiseptiques. L'huile essentielle de petit grain est reconnue pour ces propriétés antispasmodique grâce à l'acétate de linalyle, elle favorise la détente des muscles, régule les systèmes respiratoire et cardiaque à l'aide de ses composés actifs.
- e) **Emplois** : l'emploi des HEs du bigaradier est le même que celui de la mandarine (voir partie I.6.1.9).

I.7. Notions sur les formulations

I.7.1. Crème cosmétique

I.7.1.1. Phénomène d'émulsion

Les émulsions (Figure I.18) sont des systèmes complexes qui appartiennent à la famille des systèmes dispersés. Elles sont le résultat d'une dispersion d'un liquide, sous forme de fines gouttelettes, dans un autre liquide. Ces liquides sont non-miscibles. L'un est hydrophobe ou lipophile et est couramment appelé « phase huileuse » ou « phase grasse » et l'autre, hydrophile, et est désigné en tant que « phase aqueuse ».

Il existe deux types d'émulsions dites simples (i.e. ne contenant que deux phases) comme suit :

- Les émulsions huile dans l'eau (H/E) pour lesquelles la phase grasse est dispersée dans la phase aqueuse.
- Les émulsions eau dans huile (E/H) qui sont une dispersion de la phase aqueuse dans la phase huileuse.

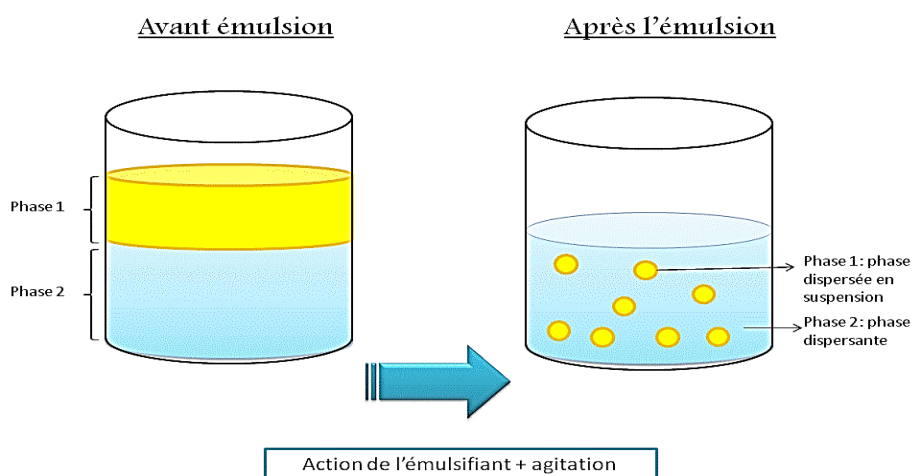


Figure I.18 : Représentation d'une émulsion avec sa phase externe et sa phase interne.

I.7.1.2. Définition

Les crèmes sont des préparations multiphasiques composées d'une phase lipophile et d'une phase aqueuse. Ce sont des émulsions H/E, plus ou moins fluides (crème légère ou crème épaisse) ou E/H, beaucoup plus épaisses et grasses. Les crèmes sont fabriquées en agitant plus

ou moins violemment les phases aqueuse et huileuse et les molécules amphiphiles, puis en laissant le système revenir au repos. Dans l'industrie, ce mélange est réalisé sous contrainte de cisaillement.

I.7.1.3. Composition

Les crèmes sont des préparations composées comme suit :

- **Phase lipophile** : elle comporte des huiles, des cires et des graisses d'origines végétale, animale ou minérale. Des substances synthétiques dérivées ou non de substances naturelles sont aussi utilisées.
- **Phase aqueuse** : elle contient l'eau ou les HDs, qui sont les solvants les plus utilisées dans les formulations des crèmes pour leurs propriétés hydratantes, adoucissantes et de solvation, et divers composants hydrosolubles. Les solutés de la phase aqueuse sont de natures diverses : ions minéraux, acides, bases, vitamines, glucides, protéines....
- **Principes actifs** : ils assurent l'efficacité du produit cosmétique tel que les HEs, protéines, vitamines.
- **Additifs** : leurs rôles et de conserver, parfumé et/ou colorer le produit cosmétique.
- **Excipients** : ils représentent un support dans le produit cosmétique et leur rôle et d'accélérer la diffusion des principes actifs.

I.7.2. Gel

I.7.2.1. Définition

Les gels sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés. Des agents hydratants, tels que le propylène glycol ou la glycérine, y sont souvent ajoutés. Les gels se liquéfient par étalement à la surface de la peau. L'évaporation de la phase aqueuse procure une agréable sensation de fraîcheur et laisse un léger film imperceptible à la surface de la peau. Les gels apportent une certaine douceur et ne sont pas gras. Ils sont facilement utilisables.

I.7.2.2. Classification

Il existe deux (02) catégories de gels :

- **Oléogels** : ce sont des gels hydrophobes.

- **Hydrogels** : ce sont des gels hydrophiles. Ils constituent des préparations dont l'excipient est habituellement de l'eau, du glycérol ou du propylène glycol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés.

I.7.2.3. Composition des hydrogels

- **Solvants hydrophiles** : eau, glycérol, propylène glycol....
- **Agents épaississants et/ou gélifiants** : carbopol®, sorbito....

I.8. Conclusion

Ce chapitre a permis d'obtenir une idée globale sur les HEs et les HDs ainsi que sur leurs modes d'obtention, en général, et ceux issues des agrumes en particulier. Ceci a conduit au travail expérimental établi dans ce mémoire est qui s'articulera comme suit :

- Caractérisation des HEs de mandarine et de clémentine ainsi que des HEs et de l'HD de bigaradier.
- Utilisation des extraits étudiés dans la formulation d'hydrogels et de crèmes antimicrobiennes à usages topiques et le suivi de leurs stabilités.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Introduction

Au cours de ce chapitre, seront présentés les méthodes et les dispositifs utilisés pour la détermination des propriétés physico-chimiques et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HEs et des HDs étudiés. Les formulations dans lesquelles ces derniers seront incorporés ainsi que les différents essais de leurs caractérisations et de leurs suivis au cours du temps (i.e. étude de stabilité) seront également détaillés.

II.2. Informations sur les huiles essentielles et l'hydrolat étudiés

L'étude s'est portée sur quatre (04) HEs et un HD :

- HE de clémentine noté par HEC
- HE de mandarine noté par HEM
- HE du fruit de bigaradier noté par HEBF
- HE du petit grain de bigaradier noté par HEBPG
- HD du petit grain de bigaradier noté par HDBPG

Ces échantillons proviennent de la distillerie qui se trouve dans la ferme pédagogique « Bio-Source » de Zéralda (wilaya d'Alger) et de la distillerie de la wilaya de Blida. Le matériel végétal a été récolté à Mitidja (wilaya de Blida) durant le mois de novembre 2020 et l'extraction a été faite au cours de la même période.

Les informations relatives au HEs et à l'HD étudiés, en l'occurrence la partie distillée du matériel végétal pour l'obtention de l'HE et de l'HD, le mode d'extraction et le rendement d'extraction en HE, sont récapitulées dans le Tableau II.1 ci-dessous.

Tableau II.1 : Informations sur les HEs et l'HD étudiés.

HEs et HD	Nom	Partie distillé	Mode d'extraction	Rendement (%)
	Mandarine	Zeste	Expression à froid	/
	Clémentine	Zeste	Expression à froid	/
	Bigaradier fruit	Zeste	Expression à froid	/
	Bigaradier petit grain	Feuilles et tiges	Entrainement à la vapeur	0,11

II.3. Caractérisation des huiles essentielles et de l'hydrolat

II.3.1. Caractéristiques organoleptique

Les propriétés organoleptiques ont été effectués sur les HEs et l'HD étudiés par analyse sensorielle. Il faut savoir que les caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur) étaient autrefois les seuls indicateurs permettant d'évaluer la qualité d'une HE. Cependant ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences. De ce fait, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises, tel que les indices physicochimiques, qui permettent d'estimer la qualité d'une HE.

II.3.2. Propriétés physicochimiques

II.3.2.1. Densité relative

La densité relative est le rapport entre la masse d'un certain volume d'échantillon et la masse du même volume d'eau pris comme référence. Les densités relatives des HEs et de l'HD ont été mesurées à l'aide d'une éprouvette graduée et d'une balance analytique selon le protocole ci-dessous (Figure II.1).

- **Mode opératoire**

Peser successivement une éprouvette graduée vide, rempli d'un volume d'HE ou d'HD puis d'un même volume d'eau. Noter à chaque fois la masse exacte.



Figure II.1 : Etapes de mesure de la densité relative (de gauche à droite : éprouvette vide, éprouvette remplie avec l'échantillon, éprouvette remplie d'eau).

Le calcul de la densité se fait à l'aide de la formule suivante :

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

m_0 : masse en gramme de l'éprouvette graduée vide.

m_1 : masse en gramme de l'éprouvette graduée d'eau distillée.

m_2 : masse en gramme de l'éprouvette graduée remplie d'HE ou d'HD.

II.3.2.2. Indice de réfraction

Le réfractomètre utilisé pour la mesure des indices de réfraction (n_D) des HEs et de l'HD est de la marque Hanna HI 96801 (Figure II.2). Ce dernier se trouve au sein des laboratoires pédagogiques du département de chimie de la faculté des sciences de l'université de Boumerdès. L'indice de réfraction s'affiche sur l'écran du réfractomètre en % Brix et varie en fonction de la température.

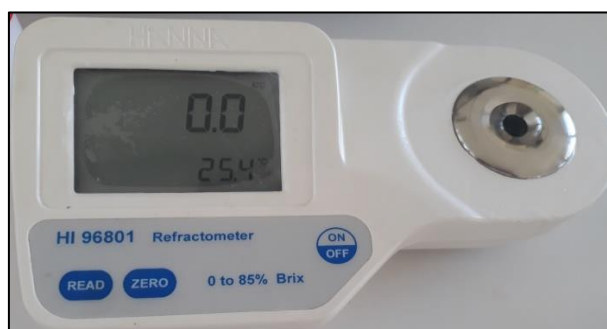


Figure II.2 : Réfractomètre Hanna HI 96801.

- **Mode opératoire :**

- Appuyer sur le bouton d'allumage et attendre que l'appareil, préalablement étalonné, se stabilise.
- Verser l'échantillon sur la cellule de mesure (i.e. puits de mesure).
- Appuyer sur la touche READ. La valeur de l'indice de réfraction s'affiche ainsi sur l'écran.
- Une fois la valeur notée, ôter l'échantillon du puits de mesure à l'aide d'un tissu doux et rincer soigneusement la cellule à l'eau distillée.

II.3.2.3. Pouvoir rotatoire

Pour la mesure du pouvoir rotatoire des HEs, 0,2 g de chaque HE a été diluée dans 100 ml d'éthanol [24]. Alors que la mesure a été effectuée directement sur l'HD. Le polarimètre utilisé pour la mesure des pouvoirs rotatoires aussi bien des HEs et que de l'HD est de type Eleptron et doté d'une lampe de sodium (Figure II.3) se trouve au niveau d'un laboratoire de la faculté de technologie de l'université de Boumerdès.

- **Mode opératoire :**

- Remplir la cellule du polarimètre par l'HE diluée ou l'HD. La température de référence est de 20 °C.
- Lire l'angle de rotation à l'aide de l'appareil.



Figure II.3 : Polarimètre Eleptron.

Le calcul du pouvoir rotatoire se fait par la formule suivante :

$$[\alpha]_d^{20} = \alpha / (L * C)$$

$[\alpha]_d^{20}$: pouvoir rotatoire spécifique de l'HE à 20°C.

α : angle de déviation de la lumière polarisée, lu sur le polarimètre, en degré.

C : concentration de l'échantillon exprimée en g/100ml.

L : trajet optique ou épaisseur de la cellule de mesure en dm.

II.3.2.4. Miscibilité dans l'éthanol

La miscibilité dans l'éthanol est déterminée par le volume (V) d'alcool (i.e. éthanol) nécessaire pour former avec un volume d'HE un mélange limpide [25].

- **Mode opératoire :**

- Ajouter un volume (V) d'éthanol à 96% par fractions de 1 ml, à l'aide d'une pipette graduée, à 1 ml d'HE.
- Agiter le mélange après chaque ajout.
- Noter le volume d'éthanol additionné lorsque la solution devient limpide.

II.3.2.5. Conductivité électrique

La conductivité électrique est la capacité de conduire le courant électrique dans une solution. La mesure de la conductivité est un moyen rapide, simple et économique de déterminer la force ionique d'une solution.

Conductivimètre utilisé pour la mesure de la conductivité électrique de l'HD est de type JENWAY modèle 4510. Ce dernier se trouve au niveau d'un des laboratoires pédagogiques du département de chimie de la faculté des sciences de l'université de Boumerdès (Figure II.4).

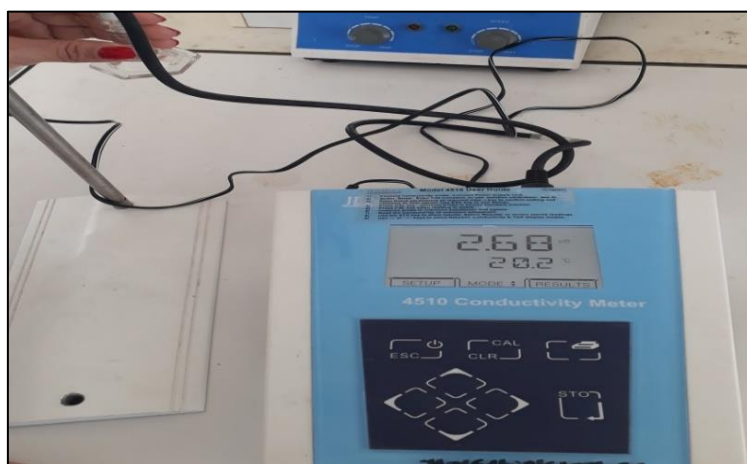


Figure II.4 : Conductivimètre JENWAY 4510.

- **Mode opératoire**

- Mettre un volume de l'échantillon dans une éprouvette.
- Plonger l'électrode dans l'échantillon et attendre jusqu'à ce que la valeur sur l'écran de l'appareil se stabilise.
- Noter la valeur affichée qui s'exprime en $\mu\text{S}/\text{cm}$.

II.3.2.6. Indice d'acide

L'indice d'acide permet de vérifier la qualité d'une HE, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant le stockage [24]. C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'HE. Cette analyse a été effectuée au sein d'un laboratoire pédagogique appartenant au département de chimie de la faculté des sciences (université de Boumerdès).

- **Mode opératoire :**

- Peser 1g d'HE dans un bécher.
- 5 ml d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes de phénolphtaléine sont introduites dans un erlenmeyer.
- Le mélange ainsi formé est titré par une solution alcoolique de potasse KOH (0,1N) jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante (Figure II.5).

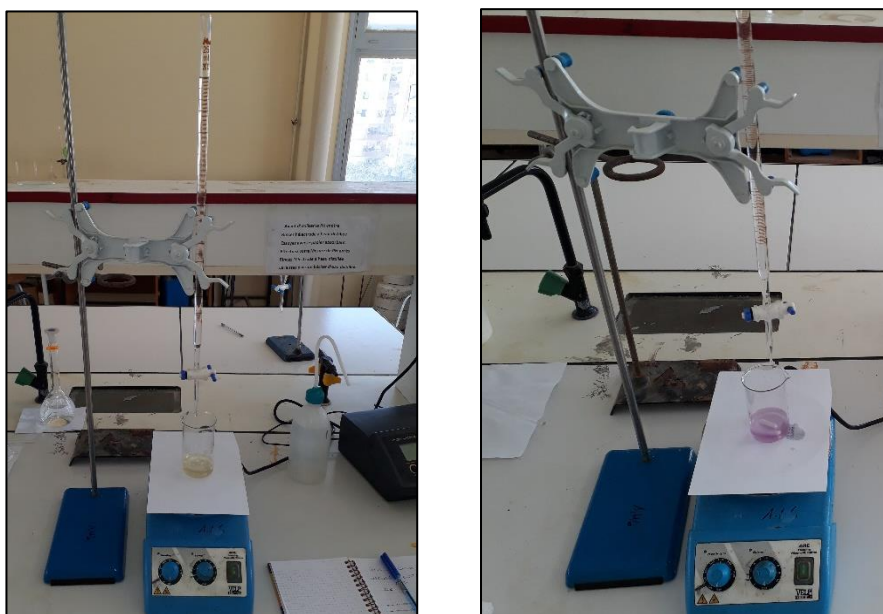


Figure II.5 : Couleurs de la solution titrante avant (à gauche) et après équivalence (à droite).

L'indice d'acide (I_a) est calculé par la formule suivante :

$$I_a = C \cdot V \cdot 56,11/m$$

V : volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

m : masse en grammes de la prise d'essai.

C : concentration exacte, en mole par litre de la solution de KOH.

II.3.2.7. Indice de saponification

L'indice de saponification (I_s), est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans un gramme d'HE [26].

- **Mode opératoire :**

- Mettre 2g d'HE dans un ballon muni d'un réfrigérant puis ajouter 25ml d'une solution éthanoïque de KOH (0,5 N).
- Porter le mélange à ébullition en de quelques pierres ponce.
- Ajouter 3 gouttes de phénolphtaléine. La solution savonneuse est titrée avec une solution de HCl (0,5N) jusqu'à disparition de la couleur rose (Figure II.6).
- Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

L'indice de saponification I_s est donné par la formule suivante :

$$I_s = [28.05 * (V_0 - V_1) / m]$$

V_0 : volume, en millilitres, de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc.

V_1 : volume, en millilitres, de la solution de HCl utilisé pour atteindre l'équivalence.

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



Figure II.6 : Couleurs de la solution titrante avant (à gauche) et après équivalence (à droite).

II.3.2.8. Indice d'ester

L'indice d'ester (I_e) est déduit à partir des valeurs obtenues des indices de saponification (I_s) et d'indice d'acide (I_a) par la relation suivante :

$$I_e = I_s - I_a$$

I_s : indice de saponification.

I_a : indice d'acide.

II.3.2.9. Potentiel d'hydrogène

Le potentiel d'hydrogène (pH) indique si une solution est acide ou basique. Il représente la concentration en ions hydrogène d'un échantillon. La détermination des pH des HEs et de l'HD a été effectuée avec du papier pH (Figure II.7).



Figure II.7 : Papier pH.

II.3.3. Analyse spectrale : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse qualitative permettant d'identifier les fonctions chimiques, principalement organiques. L'analyse spectrale des HEs et de l'HD a été effectuée au niveau de l'université de Bab Ezzouar (USTHB – Alger). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier FT/IR-4100 type A (Figure II.8).



Figure II.8 : Spectrophotomètre infrarouge FT/IR-4100 type A.

- **Mode opératoire :**

- Mettre dans le moule de la presse une petite quantité de bromure de potassium (KBr).
- Lui soumettre une compression pour former une pastille d'un centimètre de diamètre.
- Verser quelques gouttes d'HE ou d'HD à analyser sur la pastille préparée.
- Introduite la pastille dans l'appareil pour analyse.

II.3.4. Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et de l'hydrolat

- **Souches microbiennes utilisées**

Nous avons testé la sensibilité de cinq souches microbiennes de référence provenant de l'hôpital de Bainem (wilaya d'Alger) et du laboratoire d'analyse du docteur Zahed de Dellys (wilaya de Boumerdes). Il s'agit de quatre souches bactériennes (trois Gram négatives et une Gram positive) et une souche fongique (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Liste des souches microbiennes testées.

	Microorganismes	Références	Gram
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Négatif
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Négatif
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	Positif
	<i>Salmonella typhimurium</i>	/	Négatif
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	/

- **Milieux de cultures**

Les milieux de culture utilisés pour les bactéries sont : Hektoen ou BCP pour la souche *E.coli*, Chapman pour la souche *S.aureus*, Hektoen pour les deux souches *P.aeruginosa* et *S.thyphimurium* . Le sabouraud (SAB) solide utilisé pour la souche *Candida albicans*.

II.3.4.1. Stérilité des huiles essentielles et de l'hydrolat

Afin de contrôler la stérilité des HEs et de l'HD étudiés, une goutte de chaque l'huile ou HD est déposée sur des boîtes de pétri contenant respectivement de la gélose MH stérile, sang frais et cuit, du SAB et la GN. Après 24 heures d'incubation à 37° C, l'absence de contaminants dans la boîte indique la stérilité de l'échantillon considéré [27].

II.3.4.2. Préparation de l'inoculum

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure afin d'obtenir une culture jeune. 3 à 5 colonies bien isolées et identiques sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile avec agitation pendant quelques secondes.

II.3.4.3. Diffusion par disque

a) Aromatogramme

En premier lieu les deux milieux ont été fondus à l'étuve puis refroidis à l'air libre. Ensuite les géloses MH et SAB sont versées dans des boîtes pétri de diamètre 90 mm à raison de 15 ml par boîte. Après avoir fermé les boîtes de pétri on laisse les géloses séchées avant l'emploi [28].

Quelques colonies d'une culture de bactéries jeunes ont été raclées à l'aide d'une pipette Pasteur, puis déchargées dans un tube d'eau physiologique. Après homogénéisation, un inoculum est utilisé pour l'ensemencement des boîtes par écouvillonnage, qui consiste à imbiber un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, retirer l'excédent de liquide en l'essorant contre la paroi du tube puis le faire passer trois fois sur toute la surface de la gélose en tournant la boîte de 60° à chaque fois pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum.

A l'aide d'une pince stérile, on prélève des disques en papier buvard stérile de 6 mm de diamètre qu'on imbibe de 10, 20 et 30 µl d'HE ou d'HD que l'on dépose sur les boîtes pétries déjà

ensemencées. Après 20 mn, on incube les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et pendant 48h pour les levures (Figure II.9). Trois essais pour chaque test sont réalisés, le résultat étant la moyenne des trois.

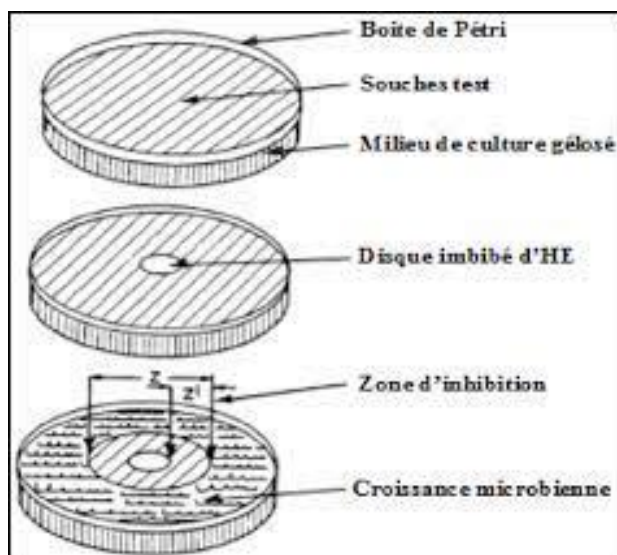


Figure II.9 : Illustration de la méthode d'aromatogramme.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse y compris le diamètre de disque de 6 mm. Les sensibilités des souches microbiennes selon les diamètres des zones d'inhibition sont classées selon le Tableau II.3 ci-dessous.

Tableau II.3 : Sensibilités des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition [29].

Sensibilités	Zones d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	Diamètre < 8mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20 mm

b) Aromatogramme en micro-atmosphère

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier buvard stériles de 6 mm de diamètre au centre du couvercle d'une boîte de pétri, puis la charger avec 10 µl de l'HE, sans que cette dernière entre en contact avec la gélose ensemencée auparavant par la souche test. La boîte est incubée à 37°C pendant 6 jours. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans

l'enceinte de la boîte et la croissance des cellules microbiennes sensibles de l'inoculum est inhibée (Figure II.10). L'observation et la mesure des diamètres d'inhibition en mm se font les 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation [30,31]. Trois essais pour chaque test sont réalisés. Le résultat étant la moyenne des trois.

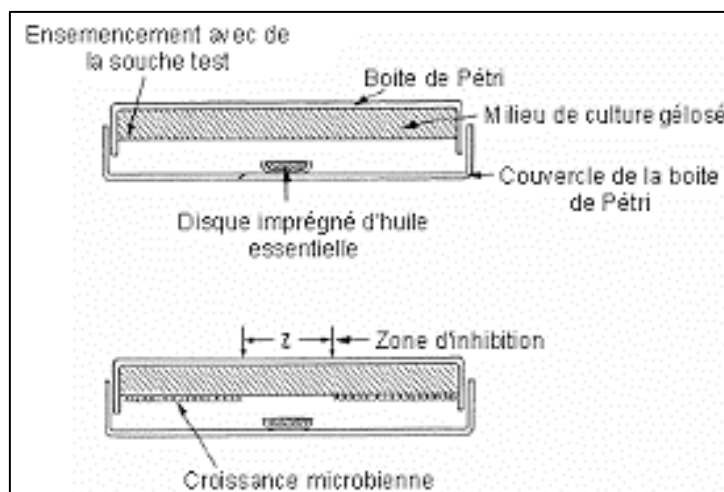


Figure II.10: Illustration de la méthode en micro-atmosphère [32].

II.3.4.4. Combinaison des huiles essentielles et de l'hydrolat

On a réalisé des combinaisons entre les HEs et l'HD étudiés en utilisant les volumes de 10, 20 et 30 μ l. Les combinaisons effectuées sont comme suit :

- HEM/HEC.
- HEM/HEBF.
- HEM/HEBPG.
- HEC/HEBF.
- HEC/HEBPG.
- HEBF/HEBPG.
- HEBF/HDBPG.
- HEBPG/HDBPG.

Quatre types d'effets peuvent résulter de cette combinaison [33] :

- **Effet d'indifférence** : l'activité d'une HE (ou HD) n'est pas affectée par l'autre.
- **Effet d'addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque HE (ou HD) étudiée isolée à la même concentration.

- **Effet de synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme des effets des HEs (ou HD) étudiées isolément à la même concentration.
- **Effet d'antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des HEs (ou HD). Elle est inférieure à la somme des effets de chaque HE (ou HD) pris séparément à la même concentration.

II.3.4.5. Evaluation de la concentration minimale d'inhibition

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HE où on n'observe aucune croissance bactérienne [34].

a) Préparation des dilutions

La CMI des HEs étudiées a été déterminée pour les souches microbienne par la méthode de dilution en milieu gélosé, en utilisant la gélose MH, selon le protocole Hellal [34] en lui apportant quelques modifications. L'HE est diluée dans du méthanol pur afin d'obtenir une gamme de concentration de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 mg/ml soit 500µl/ml à 13,25µl/ml de l'HE à tester (Tableau II.4).

Tableau II.4 : Valeurs des utilisées pour déterminer les CMI.

Rapport de dilution (HE/CH ₃ OH)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Pourcentage (%)	50	25	12,5	6,25	3,12
Concentration (µl HE/ml)	500	250	125	62,5	31,25

b) Ensemencement en milieu solide

Faire fondre le milieu MH. Le verser aseptiquement à raison de 15 ml de gélose par boîte de pétri et le laisser se solidifier sur la paillasse. Mélanger 1ml de chaque dilution d'HE à tester avec 3 ml de gélose MH en surfusion, puis agiter manuellement les tubes. Transvaser chaque contenu des tubes dans les boîtes contenant la première couche de gélose. Après solidification du milieu, réaliser un ensemencement en surface de 1 ml de suspension bactérienne (cellules jeunes de 18 à 20 heures). L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures.

II.3.4.6. Etude de l'association huile essentielle / antibiotique

Dans des boîtes de MH, préalablement ensemencées avec les suspensions bactériennes des souches testées, un disque d'antibiotique (ATB) est déposé au centre de chaque boîte. Un autre disque de papier buvard est déposé au centre du couvercle des boîtes de pétri, puis chargé de 10 µl de l'HE sans que cette dernière n'entre en contact avec la gélose. Les boîtes sont incubées à 37° C pendant 6 jours. Trois essais sont réalisés pour chaque test. Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés les 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation [35].

II.4. Formulations et étude de stabilité

II.4.1. Formulation de gels et de crèmes

Les formulations étudiées ont été formulées au niveau du laboratoire parapharmaceutique "SPIC" qui se trouve à El Mohammadia (wilaya d'Alger). Trois formulations respectives de gels et de crèmes ont été élaborées :

- Un gel (G_T) et une crème (C_T) témoin sans HE ni HD.
- Un gel (G₁) et une crème (C₁) contenant l'HEM, l'HRBF et l'HDBPG.
- Un gel (G₂) et une crème (C₂) contenant l'HEC, l'HEBPG et l'HDBPG.

II.4.1.1. Compositions

La composition des gels et des crèmes (émulsion H/E) dans lesquels les HEs et l'HD ont été incorporés sont respectivement résumés dans les Tableaux II.5 et II.6.

Tableau II.5 : Composition des gels.

	Constituants	G ₁	G ₂	G _T	Pourcentages (%)
Phase aqueuse	HDBPG	+	+	-	71
	Eau déminéralisée	-	-	+	
	Propylène glycol	+	+	+	
	Carbopol	+	+	+	
Phase huileuse	Sorbitol	+	+	+	24
	Acide salicylique	+	+	+	
	Alcool (éthanol)	+	+	+	
Principes actifs	HEM et HEBF	+	-	-	5
	HEC et HEBPG	-	+	-	

(+) : présence, (-) : absence, G_T : gel témoin, G₁ : gel à base d'HEM, HEBF et HDBPG, G₂ : gel à base d'HEC, HEBPG et HDBPG.

Tableau II.6 : Composition des crèmes.

	Constituants	C ₁	C ₂	C _T	Pourcentages (%)
Phase aqueuse	HDBPG	+	+	-	71
	Eau déminéralisée	-	-	+	
	Propylène glycol	+	+	+	
	Sorbitol	+	+	+	
Phase huileuse	Acide stéarique	+	+	+	24
	Alcool	+	+	+	
	Emulgin B1	+	+	+	
	Cutina AGC	+	+	+	
Principes actifs	HEM et HEBF	+	-	-	5
	HEC et HEBPG	-	+	-	

(+) : présence, (-) : absence, C_T : crème témoin, C₁ : crème à base d'HEM, HEBF et HDBPG, C₂ : crème à base d'HEC, HEBPG et HDBPG.

II.4.1.2. Protocoles de préparation

a) Gels

- Peser tous les constituants séparément.
- Mettre dans un bécher HD, alcool, sorbitol, propylène glycol, acide salicylique et carbopol et mélanger jusqu'à obtention d'une phase homogène.
- Ajouter ensuite les HEs et homogénéiser parfaitement l'ensemble par agitation.
- Mélanger graduellement les deux phases (i.e. huileuse et aqueuse) à l'aide d'une spatule jusqu'à épaississement
- Transférer les préparations obtenues dans des boîtes appropriées (Figure II.11).

Figure II.11 : Gels G₁, G₂ et G_T respectivement.

b) Crèmes

- Peser les ingrédients de la phase huileuse : acide stéarique, alcool, emulgin B1 et Cutina AGC.
- Mesurer les ingrédients de la phase aqueuse : HD et eau déminéralisée.
- Mettre dans un bécher et faire chauffer doucement la phase aqueuse à 70°C.
- Mettre dans un récipient et chauffer la phase huileuse jusqu'à obtention d'un liquide.
- Verser les deux phases en mélangeant dans un bain de glace.
- Ajouter les HEs et mélanger jusqu'à homogénéisation.
- Transférer les crèmes dans des boîtes stériles (Figure II.12).



Figure II.12 : Crèmes C₁, C₂ et C_T respectivement.

II.4.2. Caractérisation et étude de stabilité

L'étude de stabilité de toutes formulations a été suivie chaque semaine, pendant 1 mois, par des observations macroscopiques, des observations microscopiques, des analyses physicochimiques et des analyses antimicrobiennes. Deux gels commerciaux (gel hydroalcoolique Vague de Fraicheur et Cutacnyl 10%) et une émulsion commerciale (ACQUA di GIOIA) ont été également caractérisés afin de servir de références (Figure II.13). Les formulations ont également subi des cycles de froid et de chaud et ont été caractérisés de la même manière.



Figure II.13 : Gel hydroalcoolique Vague de fraîcheur, Cutacnyl 10% et ACQUA di GIOIA respectivement.

II.4.2.1. Teneur en humidité et en matière volatile

La teneur en humidité est la quantité d'eau (en %) présente dans un échantillon. Elle se détermine par séchage de ce dernier jusqu'à une masse constante. Alors que la matière volatile est la fraction organique (en %) pouvant être éliminée par passage au four à 550 °C de l'échantillon séché.

L'essai a été établi au niveau d'un laboratoire pédagogique du département de chimie (Faculté des sciences, université de Boumerdès). Les teneurs en humidité et en cendre ont été déterminées pour toutes les formulations.

- **Mode opératoire :**

- A l'aide d'une balance analytique peser la masse d'un creuset vide (m_v).
- Verser une quantité de la formulation dans ce creuset puis le peser rempli (m_R).
- Placer le creuset dans l'étuve à 105°C pendant 24 heures (Figure II.14).
- Retirer le creuset et le laisser refroidir dans un dessiccateur (Figure II.14).
- Peser les creusets après refroidissement (m_s).
- Mettre ce creuset dans un four à moufle à 550°C pendant 2 heures (Figure II.14).
- Retirer le creuset et le laisser refroidir dans le dessiccateur.
- Peser les creusets après refroidissement (m_C).



Figure II.14 : Etuve, dessiccateur et four à moufle respectivement.

Les teneurs en humidité (H) et en cendres sont respectivement est calculées par les formules suivantes :

$$\% H = [(m_R - m_S) / (m_R - m_V)] \times 100$$

$$\% MV = [(m_C - m_V) / (m_S - m_V)] \times 100$$

Tel que :

m_V : masse du creuset vide en g.

m_R : masse du creuset rempli avec l'échantillon considéré en g.

m_S : masse du creuset rempli après séchage en g.

m_C : masse du creuset rempli après calcination en g.

II.4.2.2. Caractérisation macroscopique

Les propriétés organoleptiques, de chacune des formulations, relevées sont : l'aspect, l'odeur, la couleur et le toucher. L'observation macroscopiques concerne également la consistance, l'homogénéité et la texture.

II.4.2.3. Propriétés physicochimiques

a) Mesure du pH

La mesure du pH de chacune des formulations a été effectuée avec du papier pH (Figure II.7).

b) Conductivité électrique

La conductivité électrique a été mesurée dans des solutions préparées à base de chacune des formulations. Le protocole expérimental est le même que celui utilisé dans la partie II.3.2.5.

- **Mode opératoire**

- Peser 1 g d'échantillon avec une balance analytique.
- Ajouter 100 ml d'eau distillée.
- Agiter le mélange jusqu'à avoir une solution homogène.
- Mesurer le pH de la solution.

c) Turbidité

La turbidité est une méthode de dosage des substances insolubles ou émulsionnées qui consiste à mesurer, par un moyen optique, le trouble qu'elles produisent dans un milieu liquide. La turbidité de toutes les émulsions formulées a été analysée en mesurant la transmittance des émulsions non diluées à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible UV-9200/VIS-7220G qui se trouve au sein d'un des laboratoires pédagogiques du département de chimie de la faculté des sciences (université de Boumerdès) (Figure II.15).



Figure II.15 : Spectrophotomètre UV-9200/VIS-7220G.

- **Mode opératoire :**

- Ajuster la longueur d'onde à 600 nm.
- Verser dans la première cuve de l'eau distillée et appuyer sur 100%.
- Remplir les trois autres cuves par les échantillons à analyser.
- Lire les valeurs des transmittances de chaque échantillon l'un après l'autre.

d) Sens de l'émulsion

Le sens de l'émulsion a été déterminé par la méthode au colorant. Le principe de cette méthode repose sur le fait qu'une goutte de colorant hydrophile ou lipophile mélangée à une goutte d'émulsion se dissout ou non dans sa phase externe en colorant de façon homogène ou non cette dernière. L'indicateur coloré utilisé dans ce travail est le bleu de méthylène.

e) Essais de centrifugation

Les essais de centrifugation des formules, au cours du temps, se sont effectués au sein du laboratoire microbiologique de l'Etablissement Public Hospitalier de Dellys à l'aide d'une centrifugeuse de marque nuve NF 400 (Figure II.16). C'est un moyen d'observer la résistance des émulsions à la centrifugation et d'évaluer leurs stabilités.



Figure II.16 : Centrifugeuse nuve NF 400.

- **Mode opératoire :**

- Prendre six tubes secs et propres adaptés à la centrifugation.
- Remplir la moitié de chacun d'eux par une des six formulations.
- Allumer la centrifugeuse et la régler à 4000 tour/min pendant 15 min.
- Introduire les tubes remplis dans la centrifugeuse.
- Appuyer sur le bouton « Start ».
- Enlever les tubes lorsque la centrifugeuse s'arrête.
- Noter après chaque centrifugation la présence ou non de déphasage.

f) Indice d'acide

- **Mode opératoire :**

- Prélever 10 g de substance dans un bécher.
- Ajouter un mélange de 50 ml d'un volume égal d'alcool et d'éther.
- Introduire le tout dans un ballon, raccordé au condenseur à reflux et chauffé lentement, jusqu'à dissolution complète de l'échantillon.
- Ajouter 1 ml de phénolphthaléine au mélange et le doser avec 0,1 N de NaOH, jusqu'à ce que la couleur légèrement rose apparaisse et persiste pendant 30 secondes.

L'indice d'acide (I_a) est calculé par la formule suivante :

$$I_a = n \cdot 5,61/m$$

n : nombre de mol de NaOH requis.

m : masse, en gramme, de l'échantillon.

g) Indices de saponification et d'ester

Le même protocole expérimental utilisé pour la détermination de l'indice de saponification des HEs est employés pour chacune des formulations. Aussi la même formule est employée pour la déduction de l'indice d'ester (voir parties II.3.2.7 et II.3.2.8 respectivement).

h) Indice de réfraction

Le même protocole expérimental utilisé pour la détermination de l'indice de réfraction des HEs et de l'HD est employés pour chacune des formulations (voir partie II.3.2.2).

II.4.2.4. Observations microscopiques

Les observations microscopiques sont exécutées, au sein d'une salle d'observation appartenant au département de biologie de la faculté des sciences de l'université de Boumerdès, à l'aide d'un microscope optique de marque OPTIKA, équipé d'une caméra de marque OPTIKAM (Figure II.17). Le microscope est muni d'un objectif permettant de grossir 4 x 10 fois l'image d'un objet de petites dimensions afin qu'il soit observable par l'œil humain. Ces observations microscopiques ont été effectuées en vue de contrôler l'homogénéité ou l'hétérogénéité des formulations ainsi que de suivre et de visualiser les tailles des gouttelettes au cours du temps.



Figure II.17 : Microscope optique OPTIKA.

- **Mode opératoire :**
 - Brancher le microscope et allumer la lampe.
 - Disposer l'échantillon sur la lame et le couvrir d'une lamelle.
 - Placer la préparation microscopique (avec la lamelle orientée vers le haut) à observer sur la platine au-dessus du trou et fixer la lame sur la platine avec les valets.
 - Sélectionner l'objectif de grossissement 4x10 au-dessus de la préparation en faisant pivoter la tourelle.
 - Regarder dans l'oculaire et ajuster l'objectif jusqu'à obtention d'une image nette.
 - Procéder à la capture de l'image.

II.4.2.5. Analyses physiques

a) Viscosité

Analyser la viscosité à différents taux de cisaillement pour simuler l'aptitude au traitement de l'échantillon pendant la production ainsi que son comportement. L'analyse a été faite à l'Unité de Recherche, Matériaux, Procédés et Environnement (URMPE) de l'université de Boumerdès à l'aide d'un viscosimètre de type Thermo HAAKE VT550 (Figure II.18).

- **Mode opératoire :**

- Déposer l'échantillon sur le plan du viscosimètre.
- Abaisser la géométrie sur l'échantillon.
- Procéder aux mesures.
- La vitesse de cisaillement est $\dot{\gamma} = 0 - 500 \text{ s}^{-1}$.

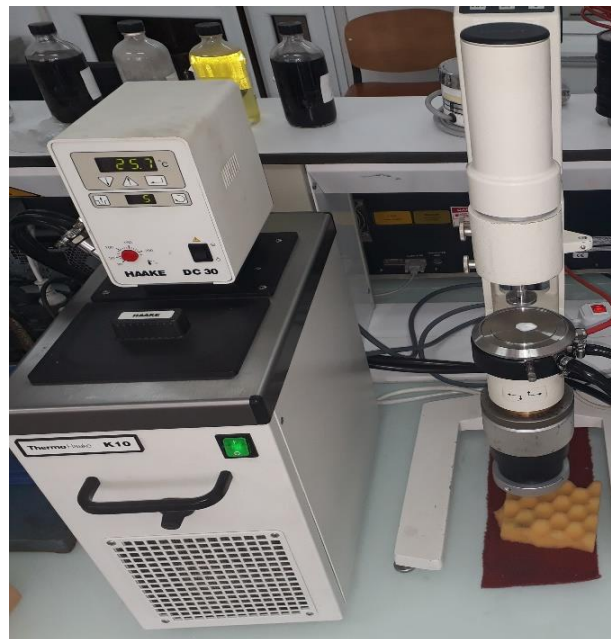


Figure II. 18 : Viscosimètre HAAKE VT550.

b) Potentiel zêta

Le potentiel zêta, défini comme la charge sur la surface de particules dans une émulsion ou une suspension, une mesure de la stabilité d'émulsion ou suspension. Les variations du potentiel zêta peuvent résulter de la sédimentation, du crémage ou de l'agglomération des particules. L'analyse a été faite à l'Unité de Recherche, Matériaux, Procédés et Environnement (URMPE) de l'université de Boumerdès à l'aide d'un zêta mètre de marque Zetasizer 2000 (Figure II.19).

- **Mode opératoire :**

- Procéder à la dilution de l'échantillon à 1/100.
- Prélever un volume de la solution préparée à l'aide d'une seringue, l'introduire dans l'orifice de l'appareil et lancer la mesure.



Figure II.19 : Zétamètre Zetasizer 2000.

II.4.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des formulations

II.4.3.1. Stérilité des formulations

Pour contrôler la stérilité des formulations préparées, une quantité de chacune d'elle est déposée dans des boîtes de pétri contenant différents milieux :

- Gélose MH stérile, gélose sang frais (GSF) et gélose sang cuit (GSC).
- Gélose Sabouraud (SAB).
- Gélose nutritive (GN).
- Gélose Hektoen.
- Gélose Chapman.
- Milieu BCP (Bromocrésol Pourpre).

Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'absence de contaminants dans la boîte indique la stérilité de l'échantillon considéré.

II.4.3.2. Aromatogramme

Même mode opératoire que pour les HEs et l'HD (Voir partie II.3.4.3- a). Cependant, pour les formulations les disques de papier buvard stérile ont été imbibés avec l'échantillon à analyser sur les mêmes souches microbiennes.

II.4.3.3. Concentration minimale inhibitrice

Même protocole que pour les HEs (Voir partie II.3.4.5).

II.5. Conclusion

Ce chapitre s'est subdivisé en deux parties. Dans la première partie, sont décrits les différents moyens de caractérisation des huiles essentielles et de l'hydrolat afin d'évaluer leurs qualités et leurs compositions, et de déterminer leurs éventuelles activités antimicrobiennes. Dans la seconde partie sont regroupés les protocoles des différentes formulations, dans lesquelles les huiles essentielles et l'hydrolat ont été incorporées, et les diverses méthodes et techniques expérimentales permettant leurs caractérisations et l'étude de leurs stabilités au cours du temps ou après avoir subi un vieillissement accéléré.

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Introduction

Le présent chapitre se divise en deux parties. Dans la première partie seront exposés les résultats des différentes analyses des HEs et de l'HD, en l'occurrence, les caractéristiques organoleptiques, physicochimiques et spectroscopiques accompagnées de leurs interprétations. Cette partie sera suivie par les résultats et les interprétations des études de stabilité et de vieillissement pendant un mois des gels et des crèmes formulées.

III.2. Caractérisation des huiles essentielles et de l'hydrolat

III.2.1. Observations microscopiques et caractéristiques organoleptiques

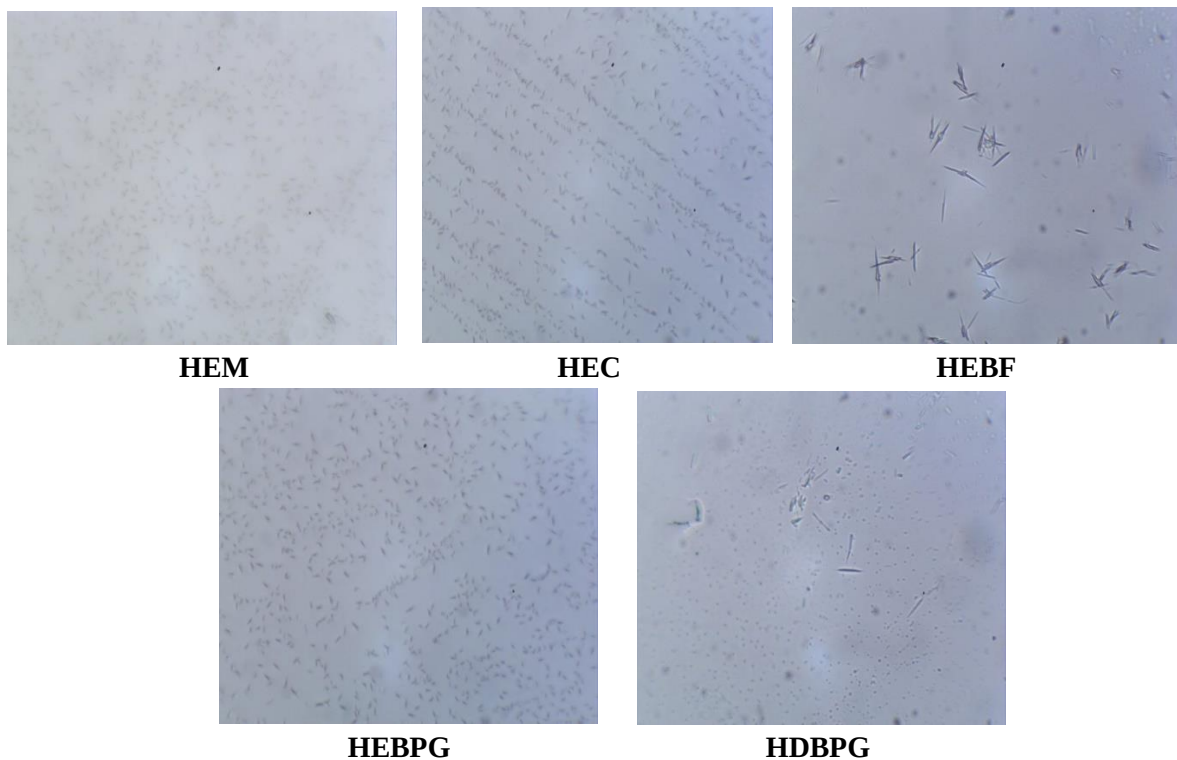


Figure III.1 : Observation microscopique des HEs et de l'HD.

Les observations microscopiques et les caractéristiques organoleptiques des HEs et de l'HD sont respectivement illustrée dans les Figures III.1 et III.2.

Les observations microscopiques des HEs et de l'HD montre la présence de microparticules qui représentent probablement des microfragments du matériel végétal qui subsistent dans les extraits.

Les HEs des espèces de *Citrus* étudiées présentent un aspect liquide visqueux (Figure III.1). Elles sont caractérisées par une odeur fraîche et aromatique (Tableau III.1).

Les caractéristiques organoleptiques des HEC, HEBF, HEBPG et HEM sont globalement en accord avec ceux répertoriées dans les normes ISO 21631, ISO 9844, ISO 8901 et ISO 3528 respectivement sauf pour la couleur de certaines huiles. Les HEs étudiées sont des liquides jaunes à jaunes pâles alors que l'HDBPG est transparent ce qui est probablement dû à sa richesse en eau.

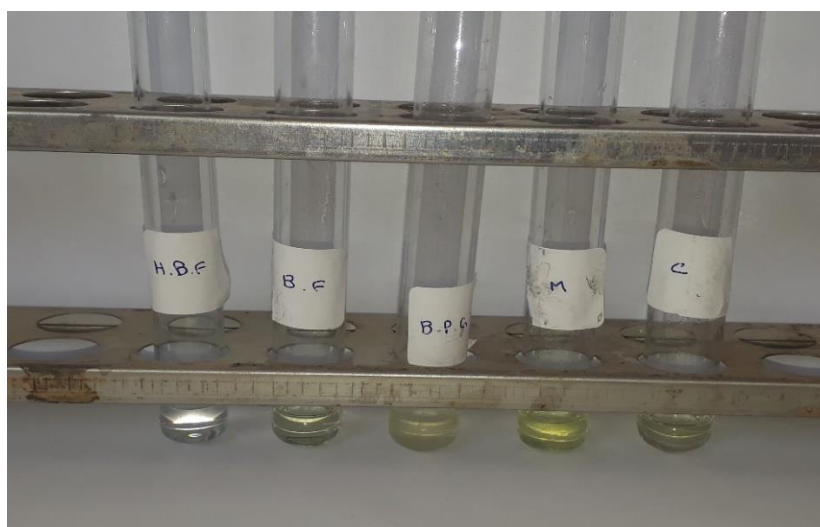


Figure III.2: Aspects et couleurs des HEs et HD.

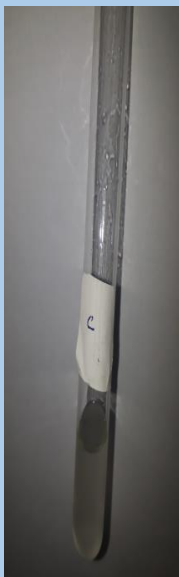
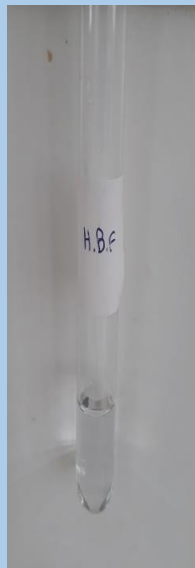
Tableau III.1: Caractéristiques organoleptiques des HEs et de l'HD.

HEs et HD	Aspect	Couleur	Odeur
HEC	Liquide mobile limpide	Orange pâle	Odeur de la mandarine
HEBF	Liquide limpide	Jaune pâle	Caractéristique de la partie extérieure de la peau d'orange amère
HEBPG	Liquide limpide	Jaune pâle	Caractéristique de la partie extérieure de la peau d'orange amère
HEM	Liquide mobile	Vert jaunâtre	Caractéristique du péricarpe frais du fruit
HDBPG	Liquide	Transparent	Douce agréable et fraîche

III.2.2. Propriétés physiques

Les propriétés physiques des HEs et de l'HD étudiés sont regroupées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2 : Propriétés physique des HEs et de l'HD.

HEs et HD	HEC	HEM	HEBF	HEBPG	HDBPG
Densité relative	0,855	0,846	0,840	0,885	0,947
Indice de réfraction	1,470	1,504	1,473	1,458	1,333
Miscibilité à l'éthanol	Non-miscible	Non-miscible	Non-miscible	Miscible (1V/1V _{éthanol})	Miscible (1V/1V _{éthanol})
					
Pouvoir rotatoire	+88,20°	+ 75°	+83,66 °	-2,79°	-11,79°
CE (μS/cm)	/	/	/	/	2,68

Les densités relatives de l'HEC, l'HEM, l'HEBF et l'HEBPG sont en accord avec les normes ISO 21631, ISO 3528, ISO 9844 et ISO 8901 respectivement. La densité relative de l'HDBPG est proche de celle de l'eau qui égale à 1. Ce résultat s'explique par la richesse des HDs en eau. Aucune norme ni résultats dans la littérature, concernant la densité relative de l'HDBPG, n'ont été trouvés. De plus, une grande valeur de la densité correspond à une faible teneur en monoterpènes dans la substance étudiée [36]. Ces résultats supposent que l'HEBPG est la plus riche en monoterpènes suivie par HEC, HEM, HEBF et HDBPG respectivement.

- ✚ L'indice de réfraction est une grandeur qui permet d'identifier l'huile essentielle et de contrôler sa pureté. Le Tableau III.2 montre que les indices de réfraction de l'HEC, l'HEM, l'HEBF et l'HEBPG sont respectivement conformes aux normes ISO 21631, ISO 3528, ISO 9844 et ISO 8901 ce qui indique leur bonne qualité. L'indice de réfraction de l'HDBPG est similaire celui de l'eau (1,333) ce qui indique la richesse de l'HD en eau.
- ✚ Les résultats et les constats obtenus pour l'étude de la miscibilité à l'éthanol des HEs montrent que l'HEBPG et l'HDBPG sont respectivement miscible pour un volume d'éthanol. Tandis qu'il n'y a pas de miscibilité pour l'HEM, HEBF et HEC. Les miscibilités de toutes les HEs restent conformes à leurs normes respectives.
- ✚ Les pouvoirs rotatoires obtenus montrent que l'HEC, l'HEM, l'HEBF sont dextrogyres alors que l'HEBPG et l'HDBPG sont lévogyres. Les valeurs des pouvoirs rotatoires de l'HEM, l'HEBF et l'HEBPG sont respectivement en accord avec les normes ISO 3528, ISO 9844 et ISO 8901. Sauf le pouvoir rotatoire de l'HEC est légèrement inférieur à la norme ISO 21631 (+90° - +98°). Le pouvoir rotatoire de l'HDBPG est de -11,79°. Aucune norme ni résultats dans la littérature, concernant le pouvoir rotatoire des hydrolats, n'ont été trouvés.
- ✚ La conductivité électrique de l'HDBPG vaut 2,68 $\mu\text{S}/\text{cm}$, malgré sa richesse en eau. En effet la valeur obtenue pour l'eau distillée vaut 0,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Ceci permet de déduire que l'HDBPG contient davantage de particules chargées électriquement et d'ions par rapport à l'eau. Ce qui suppose la présence de composés conduisant l'électricité dans l'HD provenant de l'extraction.

III.2.3. Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques des HEs et de l'HD étudiés sont regroupées dans le Tableau III.3 ci-dessous.

Tableau III.3 : Propriétés chimiques des HEs et de l'HD.

	HEC	HEM	HEBF	HEBPG	HDBPG
Ia (mg KOH/g d'HE)	0,2	1,68	2,09	1,98	
Is (mg KOH/g d'HE)	229,16	248,03	221,83	215,87	
Ie (mg KOH/g d'HE)	228,96	246,35	219,74	213,89	
pH	4-5	5	5	5	5

- ✚ L'indice d'acide indique la susceptibilité de l'huile à subir des alternations, notamment l'oxydation. Il caractérise aussi sa pureté et sa stabilité [24]. Le Tableau III.3 montre que l'HEC, l'HEM, l'HEBF et l'HEBPG présentent des indices d'acide de 0,2, 1,68, 2,09 et 1,98 mg KOH/g respectivement. Les indices d'acides de l'HEC, l'HEM et l'HEBPG sont conformes aux normes ISO 21631, ISO 3528 et ISO 8901 respectivement.
- ✚ L'indice de réfraction est un indicateur du poids moléculaire moyen et donc de la longueur des chaînes [37]. Les indices de saponification de l'HEC, l'HEM, l'HEBF et l'HEBPG sont respectivement 215,87, 221,83, 248,03 et 229,16 mg KOH/g. Ces valeurs rendent ces HEs intéressantes pour une utilisation industrielle dans la fabrication du savon [38]. Aucune norme ni résultats dans la littérature, concernant l'indice de saponification des HEs étudiées n'ont été trouvés.
- ✚ Les indices d'ester des HEs étudiés se rapprochent de leurs indices de saponification [39]. Ceci indique une bonne qualité ainsi qu'une bonne conservation de ces huiles. L'indice d'ester de l'HEBPG (213,89 mg KOH/g) est compris dans l'intervalle de la norme ISO8901. Aucune norme ni résultats dans la littérature, concernant les indices d'ester pour les HEC, HEM et HEBF n'ont été trouvés.
- ✚ Le pH des HEs et de l'HD étudiés est compris entre 4 et 5 (Tableau III.3). Ce qui signifie que les échantillons étudiés sont acides ($\text{pH} < 7$).

III.2.4. Analyse spectrale : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'identification des fonctions chimiques en spectroscopie IR facilite la comparaison entre les HEs et les HDs. Les spectres IR des HEC, HEM, HEBF et HEBPG ainsi que l'HDBPG sont illustrés dans les Figures III.3, III.4, III.5, III.6 et III.7 respectivement. Les nombres d'ondes ainsi que leurs interprétations pour HEC, HEM, HEBF, HEBPG et HDBPG sont représentés et regroupés dans les Tableaux III.4, III.5, III.6, III.7 et III.8 respectivement.

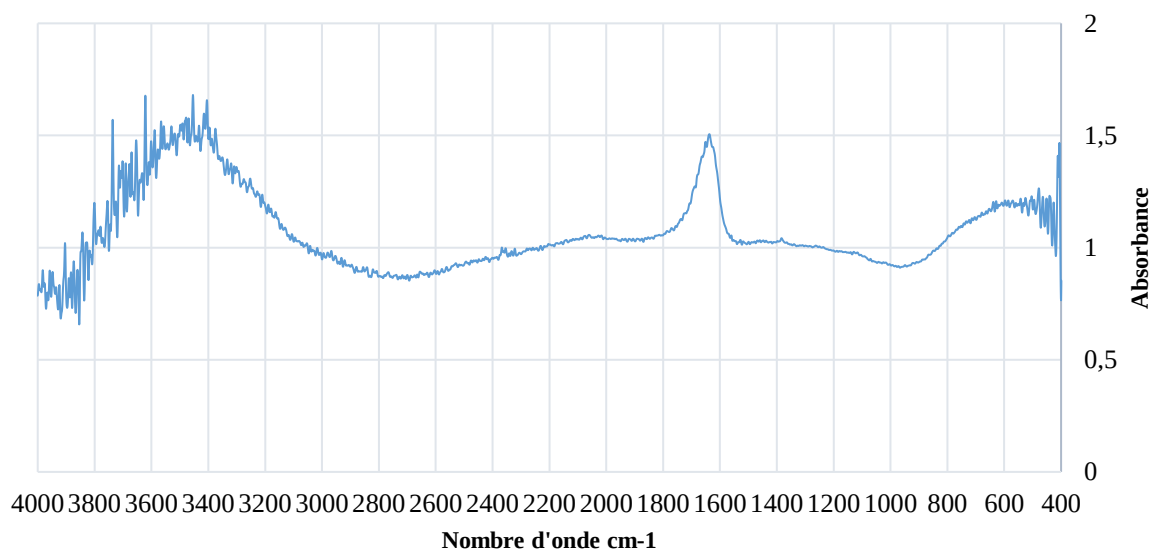


Figure III.3 : Spectre infra-rouge de l'HEC.

Tableau III.4 : Résultats de l'analyse IR de l'HEC.

Nombre d'onde (cm-1)	Fonction chimique	Nature	Composé chimique
3450	O-H	Elongation	Alcool
1653	C=C	Elongation	Alcène
1642	C=C	Elongation	Alcène
646	=C-H	Déformation	Alcène

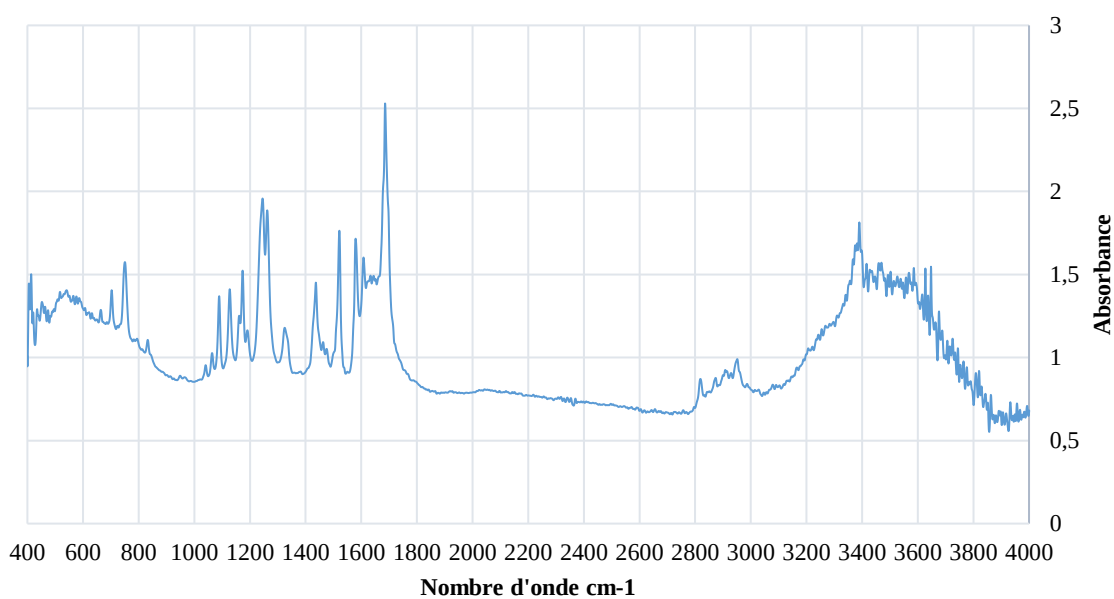


Figure III.4 : Spectre infra-rouge de l'HEM.

Tableau III.5 : Résultats de l'analyse IR de l'HEM.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Fonction chimique	Nature	Composé chimique
3490	O-H	Elongation	Alcool
2956	-CH ₃	Elongation	Alcane
2824	C-H	Elongation	Alcane
1687	C=O	Elongation	aldéhyde
1612	C=C	Elongation	Alcène
1583	C=C	Elongation	Alcène
1438	C-H	Déformation	Alcane
1264	C-O	Elongation	Ester
1258	C-O	Elongation	Ester
1175	C-O	Elongation	Ester
1091	C-O	Elongation	Ester
754	=C-H	Déformation	Alcène

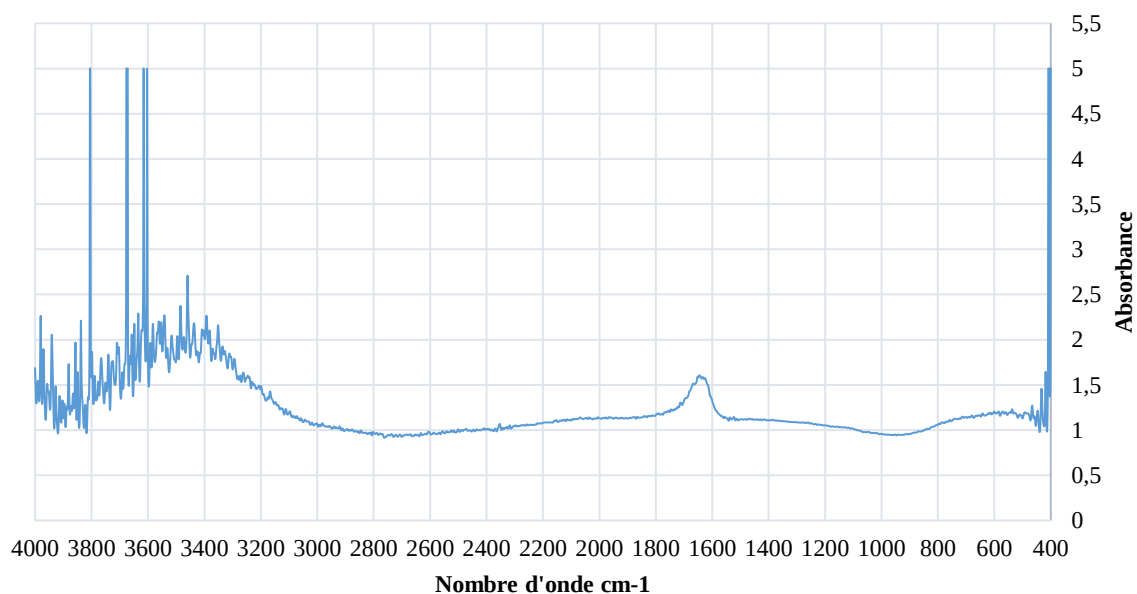


Figure III.5 : Spectre infra-rouge de l'HEBF.

Tableau III.6 : Résultats de l'analyse IR de l'HEBF.

Nombre d'onde (cm-1)	Fonction chimique	Nature	Composé chimique
3460	O-H	Elongation	Alcool
1718	C=O	Elongation	Aldéhyde, ester
1661	C=C	Elongation	Alcène
1637	C=C	Elongation	Alcène

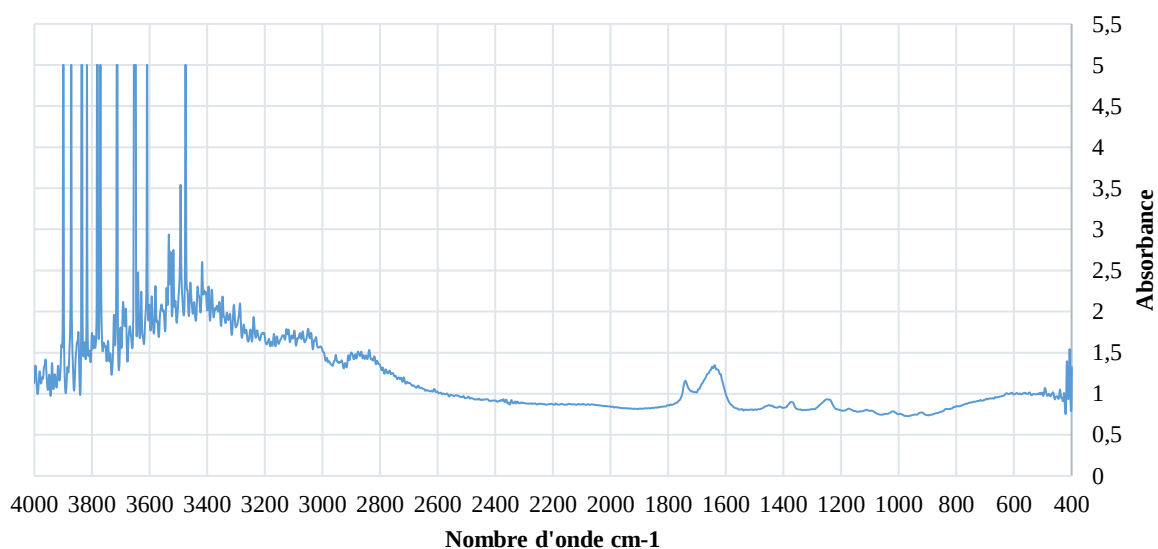


Figure III.6 : Spectre infra-rouge de l'HEBPG.

Tableau III.7 : Résultats de l'analyse IR de l'HEBPG.

Nombre d'onde (cm-1)	Fonction chimique	Nature	Composé chimique
3492	O-H	Elongation	Alcool
1748	C=O	Elongation	Ester
1643	C=C	Elongation	Alcène
1257	C-O	Elongation	Ester

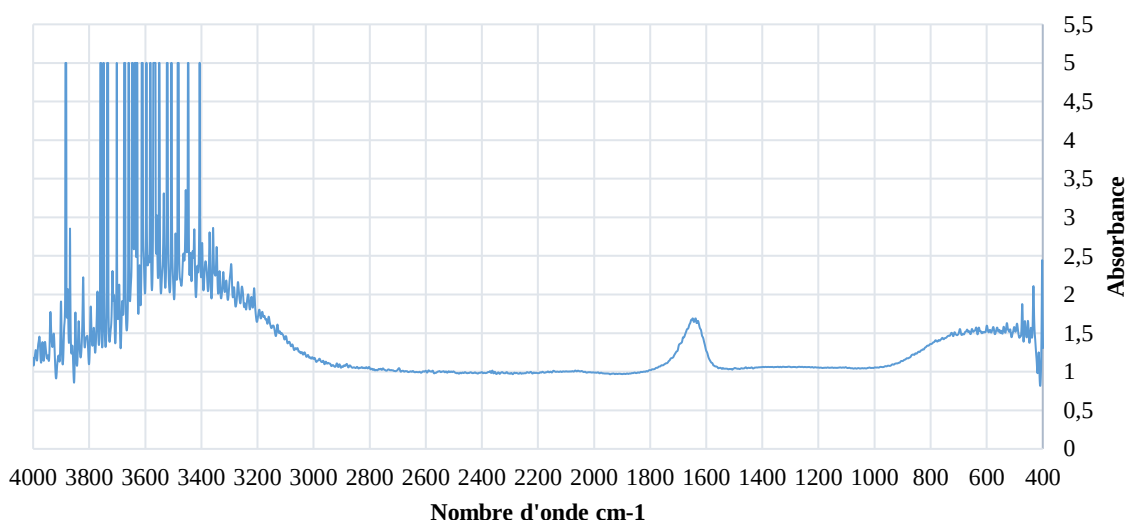


Figure III.7 : Spectre infra-rouge de l'HDBPG.

Tableau III.8 : Résultats de l'analyse IR de HDBPG.

Nombre d'onde (cm-1)	Fonction chimique	Nature	Composé chimique
3549	O-H	Elongation	Alcool
1643	C=C	Elongation	Alcène

Les analyses IR ont révélé que l'HEC contient diverses fonctions chimiques qui sont principalement des alcools et des alcènes. Le spectre IR de l'HEM a révélé la présence de plusieurs fonctions chimiques en l'occurrence des alcools, des alcanes, des alcènes, des esters et des aldéhydes. L'analyse IR de l'HEBF à présenter de nombreuses fonctions chimiques qui sont des alcools, des alcènes, des esters et des aldéhydes. L'analyse IR de l'HEBPG a démontré la présence de certaines fonctions chimiques qui sont les alcools, les alcènes et les esters.

Concernant l'HDBPG il contient majoritairement les mêmes fonctions que l'HE avec une différence d'intensité des pics et une absence de quelques fonctions. Le Tableau III.8 montre la présence, dans l'HD, des fonctions alcools et alcènes. Ces fonctions sont similaires à celle de trouvées dans l'HEBPG.

III.3. Activité antimicrobienne des HEs et de l'HD

III.3.1. Stérilité des HEs et de l'HD

Les résultats de la stérilité des HEs et de l'HD dans les différents milieux sont illustrés dans la Figure III.8. Les HEs et l'HD étudiés sont stériles car les boîtes contenant chacun des échantillons n'ont présenté aucun contaminant après incubation de 24h à 37°C.

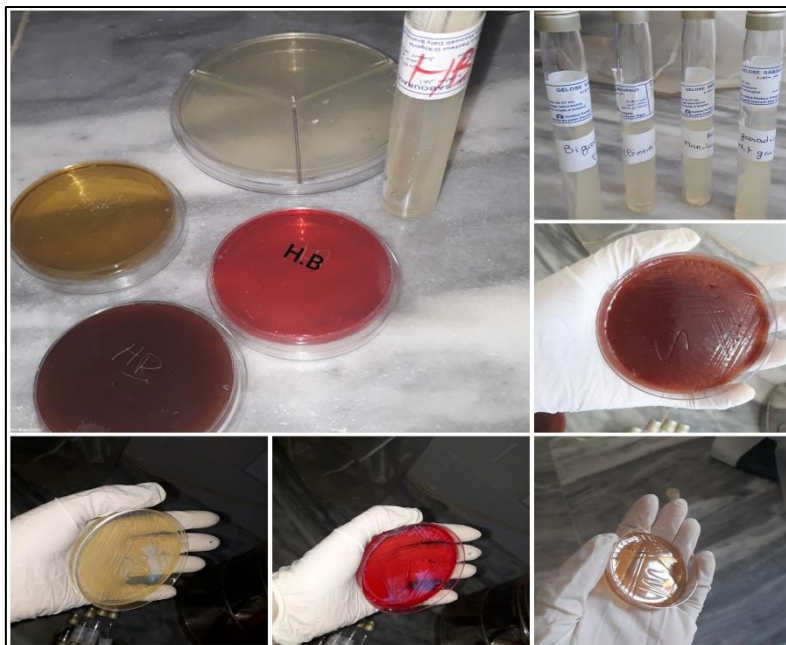


Figure III.8 : Stérilité des HEs et de l'HD.

III.3.2. Méthode de diffusion par disque

III.3.2.1. Aromatogramme en micro-atmosphère

L'activité antibactérienne des composants volatiles contenus dans les HEs contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium* et *C. albicans* n'a donné aucun diamètre d'inhibition et ce jusqu'à 6 jour d'incubation (Figures III.9). Cela signifie que les HEs n'ont aucun effet même au cours du temps.

Certaines HEs apparaissent plus actives par contact direct qu'en atmosphère. Un composé donné peut être inhibiteur lorsqu'il est en contact avec le microorganisme, mais peut présenter une faible activité voire nulle lorsqu'il est testé en phase vapeur à cause de sa faible volatilité. Ce qui est le cas des HEs étudiées.



Figure III.9 : Photos représentant l'effet des HEs en micro-atmosphère.

III.3.2.2. Aromatogramme des HEs et de l'HD

Les résultats de l'antibiogramme permettant d'étudier l'activité antimicrobienne des différentes concentrations (i.e. 10, 20 et 30 μ l) des HEs et de l'HD sur les souches *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* et *S. typhimurium* sont illustrés dans la Figure III.10. Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) pour chaque souche sont récapitulés dans les Figures III.11, III.12 et III.13.

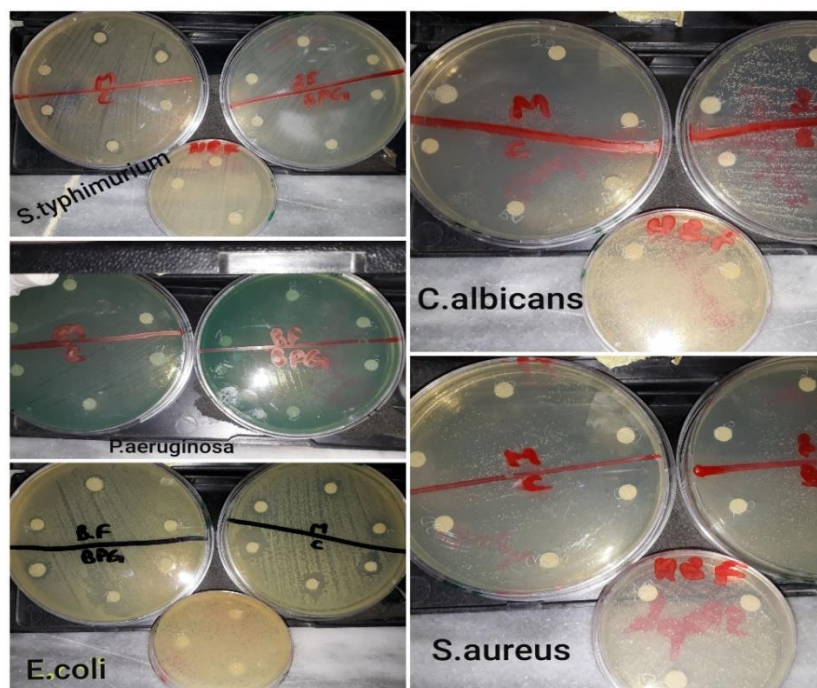


Figure III.10 : Effets des HEs sur les cinq souches étudiées (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. typhimurium*).

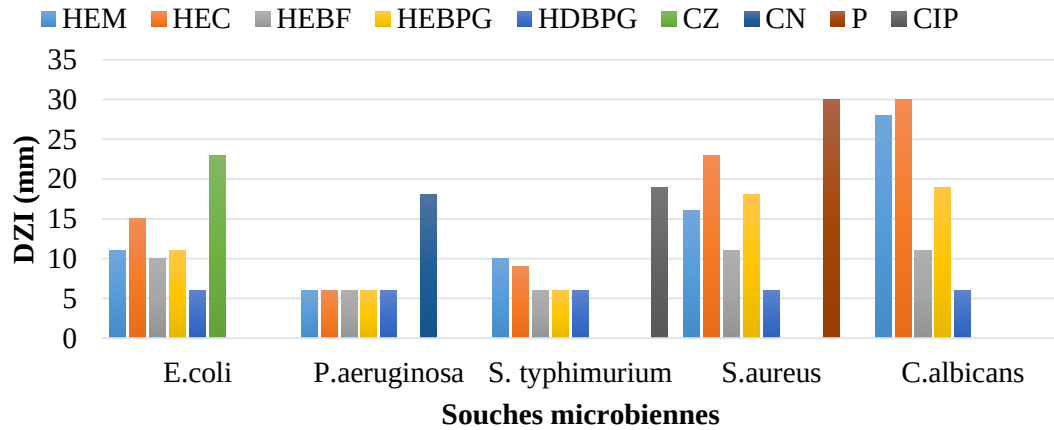


Figure III.11 : Aromatogramme des HEs et de l'HD (10µl).

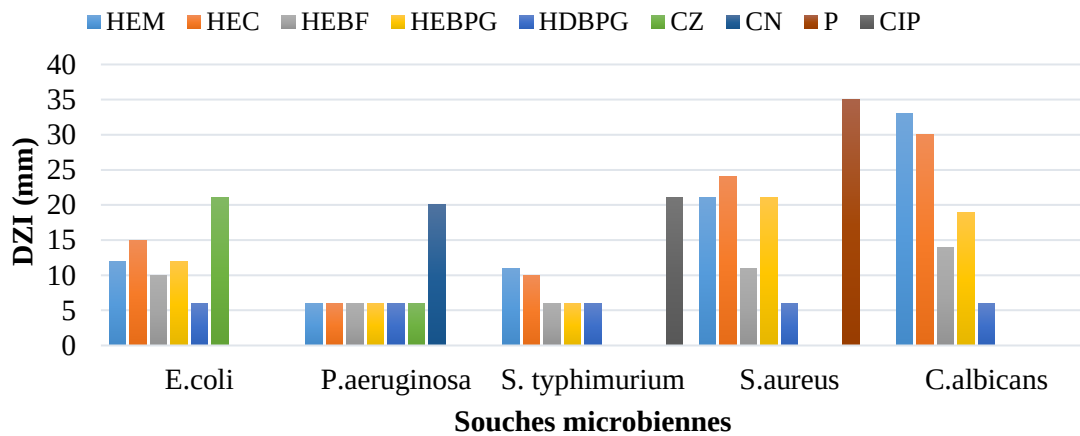


Figure III.12 : Aromatogramme des HEs et HD (20µl).

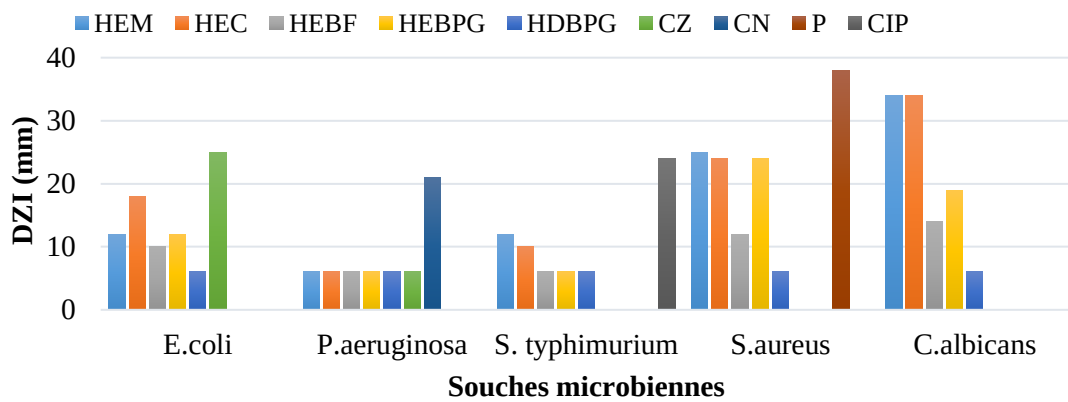


Figure III.13 : Aromatogramme des HEs et HD (30µl).

La souche à Gram (-) *P. aeruginosa* se caractérise par une résistance car les DZI pour les HEs sont inférieurs à 8mm pour tous les volumes étudiés (10, 20 et 30µl). La souche à Gram (-) *E. coli* est plus sensible pour les huiles HEM, HEBF et HEBPG (10mm-12mm), et est très sensible pour HEC (15 mm-18 mm) selon les DZI obtenues. Le DZI de l'HEBF est resté constant pour 10, 20 et 30µl d'HE utilisés. Alors que le même comportement antibactérien a été observé pour HEM et HEBPG. La souche *S. typhimurium* est sensible à HEM et HEC (9mm-12mm), et résistante à HEBF et HEBPG (6mm). En effet, les mêmes DZI ont été relevés pour HEBF et HEBPG. Alors que, le DZI de HEM augmente de 10 à 30µl respectivement. En ce qui concerne HEC, le DZI augmente en passant de 10 à 20µl puis reste constant pour 30µl. La souche à Gram (+) *S. aureus* est extrêmement sensible pour les HEM, HEC et HEBPG (16 mm-25 mm), et est sensible pour HEBF (11mm-12mm). Le DZI augmente en passant de 10 à 30µl pour HEM et HEBPG. La souche *C. albicans* est sensible à HEBF (DZI : 11mm-14mm), extrêmement sensible aux HEM et HEC (28mm-34mm), et très sensible pour HEBPG. Le DZI augmente en passant de 10 à 20µl puis reste constant pour 30µl pour HEBF. Les DZI des HEM et HEC augmentent avec l'augmentation du volume d'huile utilisée. Les DZI de l'HDBPG de 6mm, pour *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* et *C. albicans*, signifient que les cinq souches étudiées sont caractérisées par une résistance vis-à-vis de l'HD.

III.3.3. Combinaisons des HEs et de l'HD

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huit combinaisons sur les cinq souches a été opérée par la méthode de diffusion sur gélose pour différentes concentrations (10, 20 et 30µl). Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) sont respectivement illustrés dans les Figures III.14, III.15 et III.16.

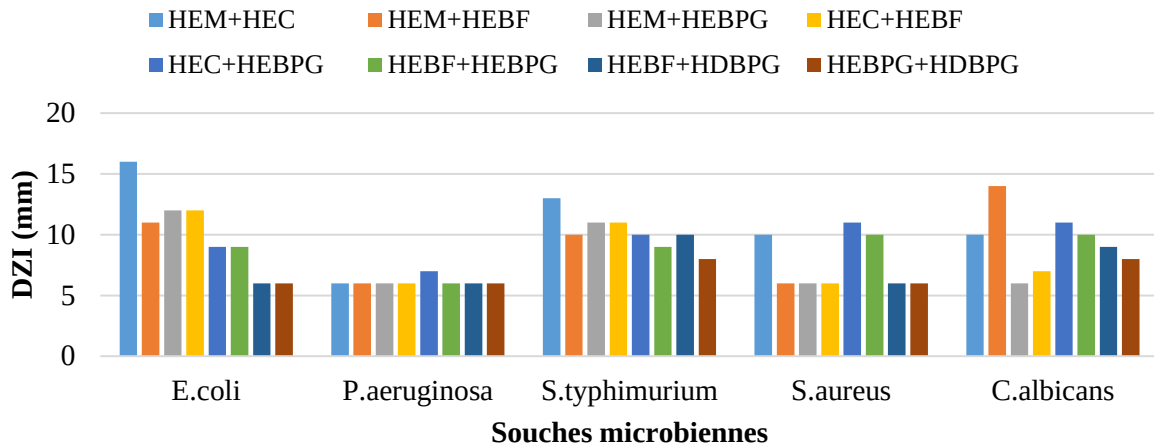


Figure III.14 : Aromatogrammes des combinaisons des HEs et de l'HD (10µl).

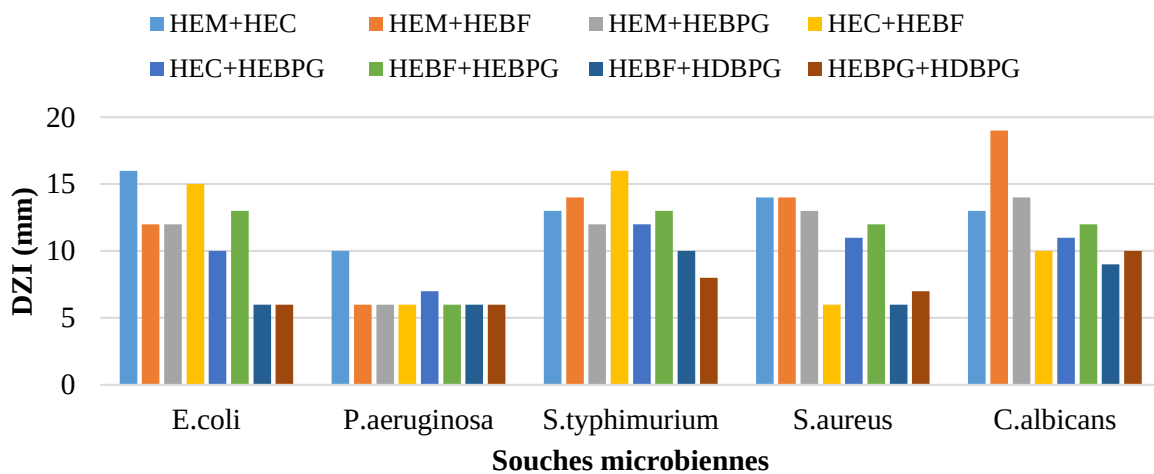


Figure III.15 : Aromatogrammes des combinaisons des HEs et de l'HD (20µl).

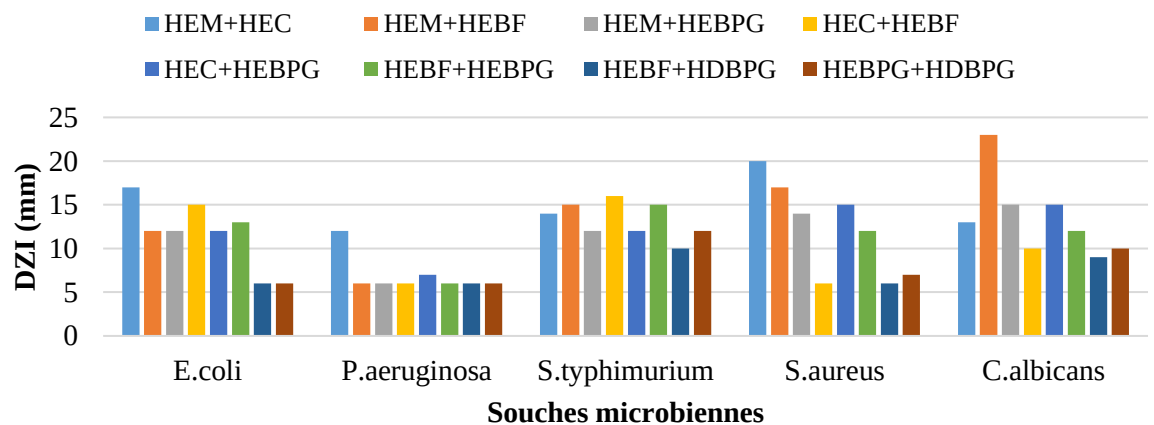


Figure III.16 : Aromatogrammes des combinaisons des HEs et de l'HD (30µl).

Ces résultats permettent de constater que les combinaisons des HEs et de l'HD sont différentes par rapport HEs et l'HD isolés. On trouve que les combinaisons des HEs et HD pour la souche *S. aureus* ont un effet d'antagonisme. Pour la souche *C. albicans*, les associations HEM+HEC, HEBF+HEBPG, HEM+HEBF, HEM+HEBPG ainsi que HEC+HEBF et HEC+HEBPG ont un effet d'antagonisme, alors que HDBPG+ HEBF et HDBPG+HEBPG ont un effet de synergie. L'HEM+HEC présente un effet de synergie pour *P. aeruginosa* et HEM+HEBF, HEM+HEBPG, HEC+HEBF, HEC+HEBPG, HEBF+HEBPG, HEBF+HDBPG et HEBPG+HDBPG ont un effet d'indifférence.

Quant à la souche *E. coli*, la combinaison HEM+HEC montre un effet de synergie alors que l'HEM+HEBF, HEM+HEBPG et HEBF+HEBPG ont un effet d'indifférence. Aussi, un effet d'antagonisme pour HEC+HEBPG, HEBF+HDBPG et HEBPG+HDBPG a été noté. Tandis que la combinaison HEC+HEBF a un effet d'addition.

Les combinaisons HEM+HEC, HEM+HEBF, HEC+HEBPG, HEBF+HDBPG et HEBPG+HDBPG présente un effet de synergie contre la souche *S. typhimurium*. Les combinaisons HEC+ HEBF et HEBF+HEBPG ont un effet d'addition, alors que l'association HEM+HEBPG a un effet d'indifférence.

III.3.4. Concentrations minimales inhibitrices

Les résultats des CMI des HEs pour les quatre souches testées sont respectivement illustrés et représentés dans les Figures III.17 et III.18.

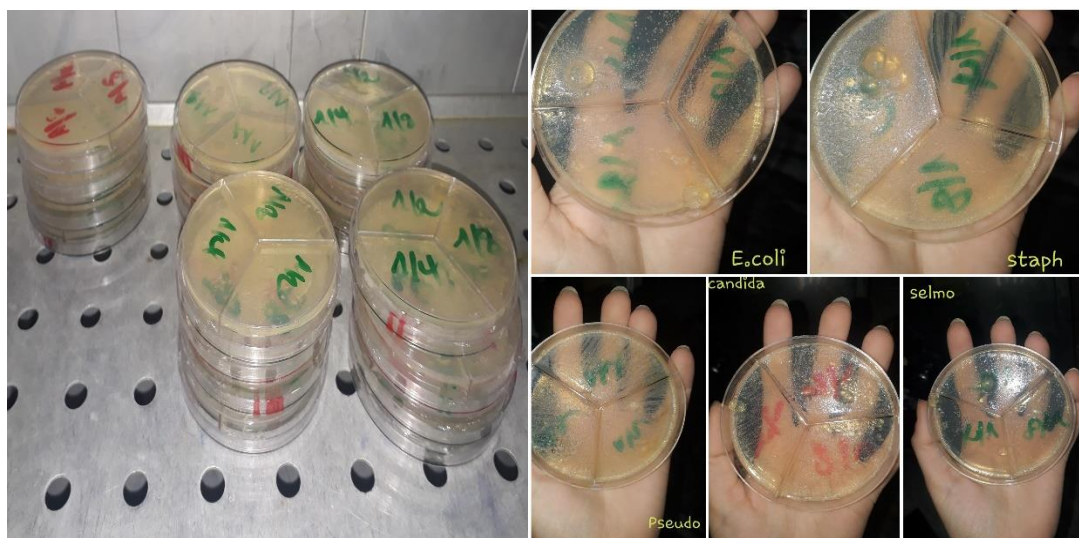


Figure III.17 : Résultats des CMI sur les différentes souches.

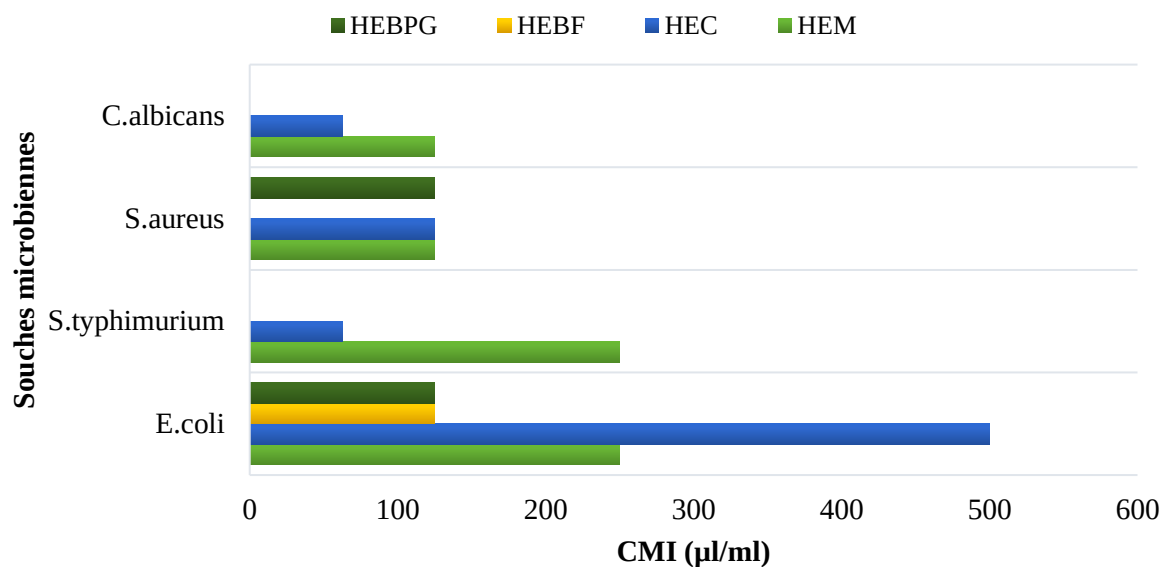


Figure III. 18 : Valeurs des CMI des HEs.

Les résultats de la diffusion sur gélose ont montré que parmi les quatre HEs testées, l'HEBF et l'HEBPG ont montré une faible activité antimicrobienne par rapport aux HEM et HEC sur les souches *C. albicans* et *S. typhimurium*. Pour la souche *S. aureus*, l'HEBF n'a aucune activité antimicrobienne par contre l'HEBPG a montré un effet inhibiteur à la CMI de 125µl/ml. L'HEBF et l'HEBPG ont présenté un effet antimicrobien contre la souche *Escherichia coli* à la CMI de 125µl/ml. L'HEC et l'HEM ont montré des effets inhibiteurs aux CMI's respectives de 500µl/ml et de 250µl/ml. En revanche l'HEC et l'HEM ont présenté une meilleure performance antimicrobienne à l'égard de la souche *S. aureus* avec des CMI's de 125µl/ml. Ces HEs sont également actives sur les souches *S. typhimurium* et *Candida albicans* avec des CMI's de 250µl/ml et de 62,5µl/ml pour l'HEM et l'HEC respectivement.

III.3.5. Association des huiles essentielles et des antibiotiques

Les diamètres des zones d'inhibition, en micro-atmosphère, des HEs (10µl) (HEM, HEC, HEBF et HEBPG) en combinaison avec les ATBs contre les quatre souches étudiées en fonction du temps d'incubation sont illustrées dans la Figures III.19 et représentées dans les Figures III.20, III.21 et III.22.



Figure III.19 : Photos du micro-atmosphère de l'association HEs/ATBs.

Les résultats obtenus montrent que l'association des quatre HEs avec l'antibiotique ciprofloxacine (CIP) n'ont aucun effet sur l'activité de l'huile pendant les 6 jours d'incubation. C'est donc un effet d'indifférence. Par contre leur association respective avec la gentamicine (CN) donne un effet synergique avec une augmentation des DZI de 18mm (HEBPG), 19mm (HEBF), 21mm (HEC) et 19mm (HEM) à 20mm (HEBPG, HEBF et HEM) et 23mm (HEC) le 2^{ème}, 3^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation respectivement.

L'association des HEs avec la pénicilline (P) donne un effet synergique ou d'indifférence. Il en résulte une augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de 29mm (HEBPG et HEM), 31mm (HEBF et HEC) à 30mm (HEBPG), 33mm (HEBF), 32mm(HEC) et 31mm (HEM) le 2^{ème}, 3^{ème} et 6^{ème} jour d'incubation respectivement.

La combinaison des HEs avec la céfazoline (CZ) donne un effet synergique avec une augmentation des DZI de 25mm (HEBPG), 24mm (HEBF et HEC), 19mm (HEM) à 26mm (HEBPG), 24mm HEBF et HEC et 20mm (HEM) le 2^{ème}, 3^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation respectivement.

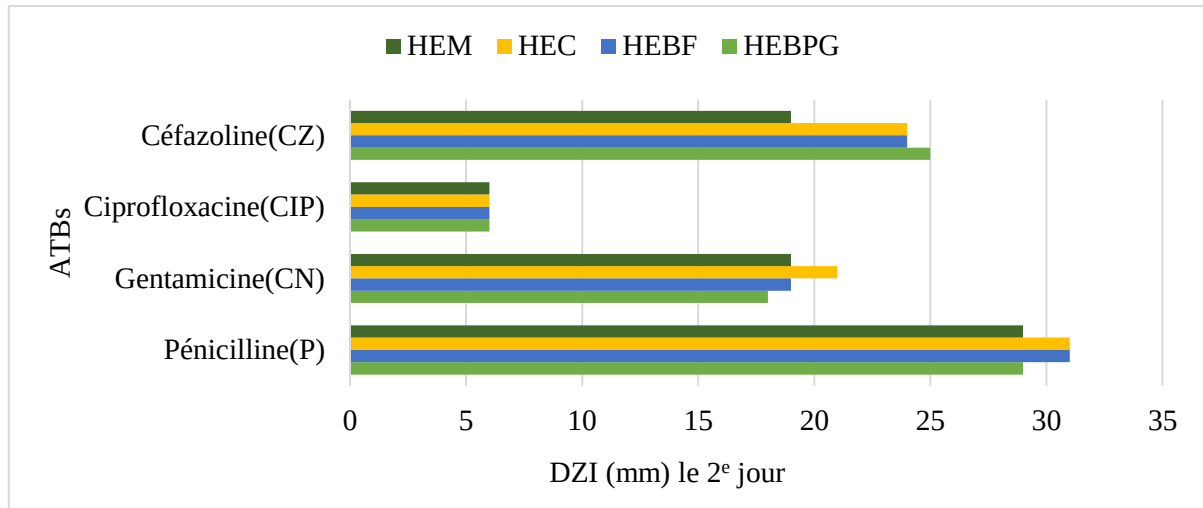


Figure III.20 : Effet de l'association HEs/ATBs sur les souches à 2 jours d'incubation.

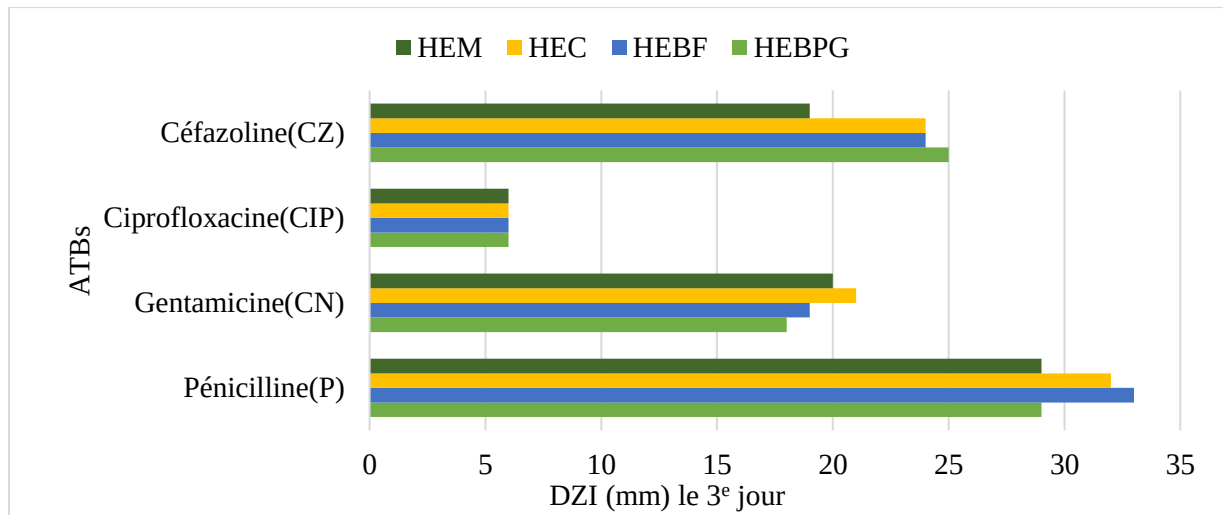


Figure III.21 : Effet de l'association HEs/ATBs sur les souches à 3 jours d'incubation.

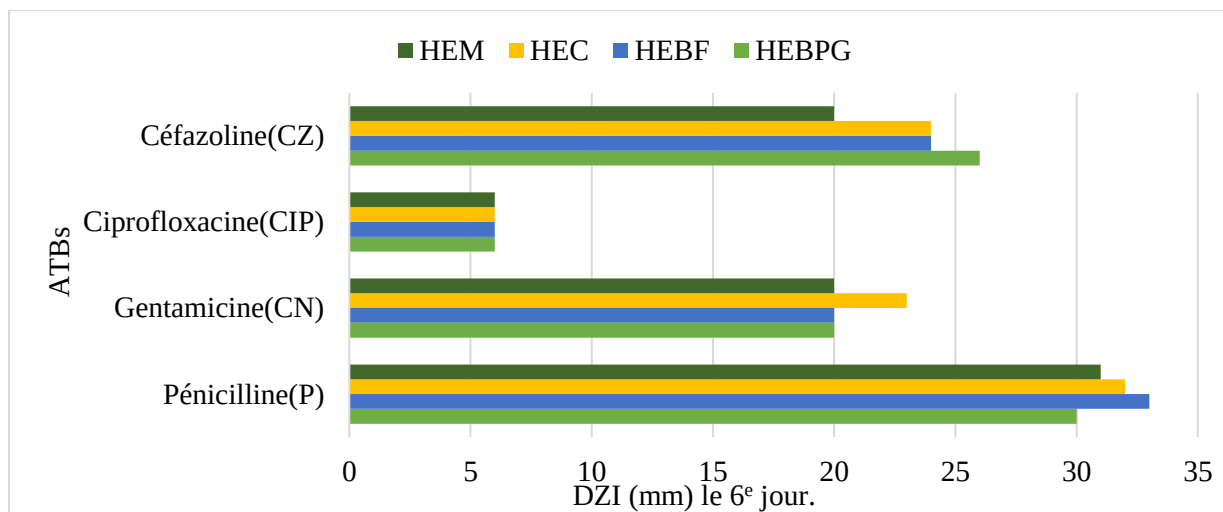


Figure III.22 : Effet de l'association HEs/ATBs sur les souches à 6 jours d'incubation.

III.4. Caractérisation et étude de stabilité des formulations

III.4.1. Caractéristiques organoleptiques et observations macroscopiques

Les propriétés organoleptiques et les observations macroscopiques, au cours de temps, des formulations conservées à la température ambiante sont regroupées dans le Tableau III.9. Les résultats ont montré que toutes les formulations étaient homogènes avec des apparences semi-solides, des textures onctueuses, des touchés doux et non collants lors de leurs applications sur la peau, ainsi qu'une facilité à être éliminer par lavage à l'eau. Ces paramètres précédemment cités n'ont subi aucun changement au cours du temps (60 jours).

Toutes les formulations élaborées sont caractérisées par une couleur blanche sauf le gel témoin G_T est de couleur transparente. Les crèmes C_1 , C_2 et les gels G_1 , G_2 sont caractérisées par des odeurs herbacées alors que les formulations témoins C_T et G_T ont une odeur caractéristique. Ces formulations maintiennent ces caractéristiques organoleptiques durant toute la période d'étude.

Tableau III.9: Caractéristiques organoleptiques et observations macroscopiques des formulations au cours du temps.

Jours	Formulations	Apparence	Couleur	Odeur	Homogénéité	Texture	Touché	Sensation	Lavabilité
0	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b
1	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b
7	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b
14	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b
21	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b

jours	Formulations	Apparence	Couleur	Odeur	Homogénéité	Texture	Touché	Sensation	Lavabilité
28	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b
60	C ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	C _T	SS	B	C	HM	O	D	F	b
	G ₁	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G ₂	SS	B	H	HM	O	D	F	b
	G _T	SS	T	C	HM	O	D	F	b
	C _C	SS	B	f	HM	O	D	F	b
	G _{CH}	SS	T	A	HM	O	D	F	b
	G _{CC}	SS	B	C	HM	O	D	F	b

C₁ : crème à base d'HEM, HEBF et HDBPG ; C₂ : crème à base d'HEC, HEBPG et HDBPG ; C_T : crème témoin sans HE et HD ; G₁ : gel à base d'HEM, HEBF et HDBPG ; G₂ : gel à base d'HEC ; HEBPG et HDBPG ; G_T : gel témoin sans HE et HD ; C_C : crème de référence ; G_{CH} : gel de référence ; G_{CC} : gel de référence ; SS : semi-solide ; B : blanche ; T : transparente ; C : caractéristique ; H : herbacée ; A : alcoolique ; f : fleurie ; HM : homogène ; O : onctueuse ; D : doux ; F : fraîcheur ; b : bonne.

III.4.2. Teneurs en humidité et indices chimiques

Le Tableau III.10 ci-dessous englobe les teneurs en humidité et les indices chimiques de toutes les formulations étudiées. Les résultats montrent des taux d'humidité élevés dépassant 75% pour les crèmes et 72% pour les gels. Ces résultats prouvent que la phase aqueuse est majoritaire dans toutes les formulations. Et teneurs en humidité dans les formulations élaborées sont en accord avec celles de références.

Les indices d'acide des crèmes formulées varient entre 5,97 mg/g et 6,31 mg/g et sont supérieurs à celui de la crème commerciale. Néanmoins, ils sont similaires aux indices d'acide obtenus par Bharat et al. et 2018 Priyadarsini et al. [40,41]. Les indices d'acides des gels élaborés sont compris entre 2,55 mg/g et 2,96 mg/g. Ces résultats se rapprochent de celui du gel hydro-alcoolique commercial.

Les valeurs des indices de saponification sont comprises entre 19,50 mg/g et 22,76 mg/g pour les crèmes formulés et sont largement inférieurs à celle de la crème commerciale. Ceci signifie que les longueurs des chaînes hydrocarbonées dans les émulsions élaborées sont moins longues. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Duraivel et al. [42]. L'indice de saponification est de 29,45 mg/g pour G_T alors qu'il vaut 47,54 mg/g et 41,94 mg/g pour G_1 et G_2 . Les indices de saponifications de ces derniers sont proches de celui de G_{CH} mais largement inférieur à G_{CC} .

Les indices d'ester des crèmes formulées sont beaucoup plus faible que celui de la crème commerciale. Alors que, les indices d'ester de G_1 et G_2 sont proches de G_{CH} . Ce qui n'est pas le cas de G_T .

Tableau III.10 : Teneurs en humidité et indices chimiques.

Formulations	H (%)	Ia (mg/g)	Is (mg/g)	Ie (mg/g)
C_1	76,27	6,31	19,50	13,19
C_2	75,73	6,00	22,76	16,76
C_T	81,33	5,97	18,19	12,22
G_1	97,28	2,96	47,54	44,58
G_2	98,07	2,55	41,94	39,39
G_T	98,41	2,55	29,45	26,9
C_C	78,40	2,32	48,94	46,62
G_{CH}	98,84	1,68	50,29	48,61
G_{CC}	92,58	6,56	97,49	90,93

La différence entre les valeurs des différents indices chimiques aussi bien pour les gels que pour les crèmes pourrait être due aux compositions chimiques des HEs et de l'HD incorporés dans chacune des formulations ainsi qu'aux autres ingrédients composant les phases aqueuses et huileuses.

III.4.3. Sens de l'émulsion

Le test au bleu de méthylène de chacune des formulations étudiées a révélé une coloration homogène sur toute la quantité de gel ou de crème testée, à l'échelle macroscopique (Figure III.23). Ces observations indiquent que les émulsions étudiées sont de types H/E et que la phase aqueuse est la phase majoritaire dans les gels.

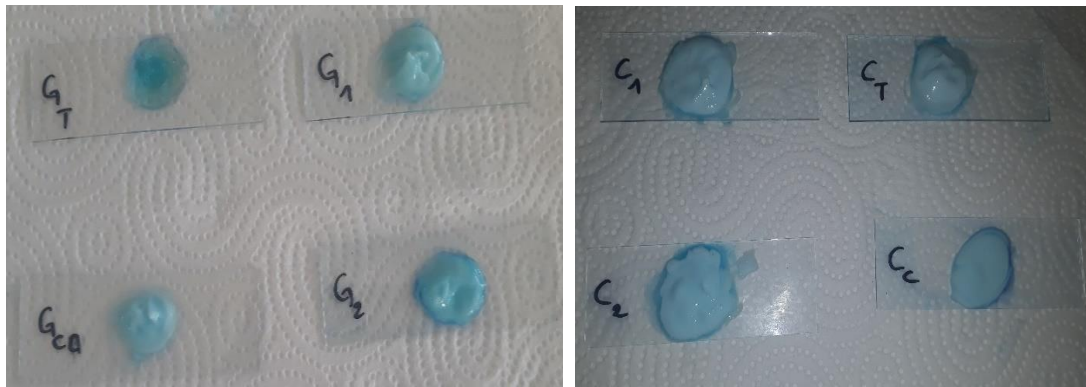


Figure III.23 : Test au bleu de méthylène des gels et des crèmes respectivement.

III.4.4. Test de centrifugation

Les résultats du test de centrifugation des gels et des crèmes formulées au cours du temps (28 jours) sont illustrés dans la Figure III.24. Les observations macroscopiques après centrifugation indiquent qu'aucune formulation n'a subi de déphasage durant la période d'étude. Ceci qui indique leurs stabilités.

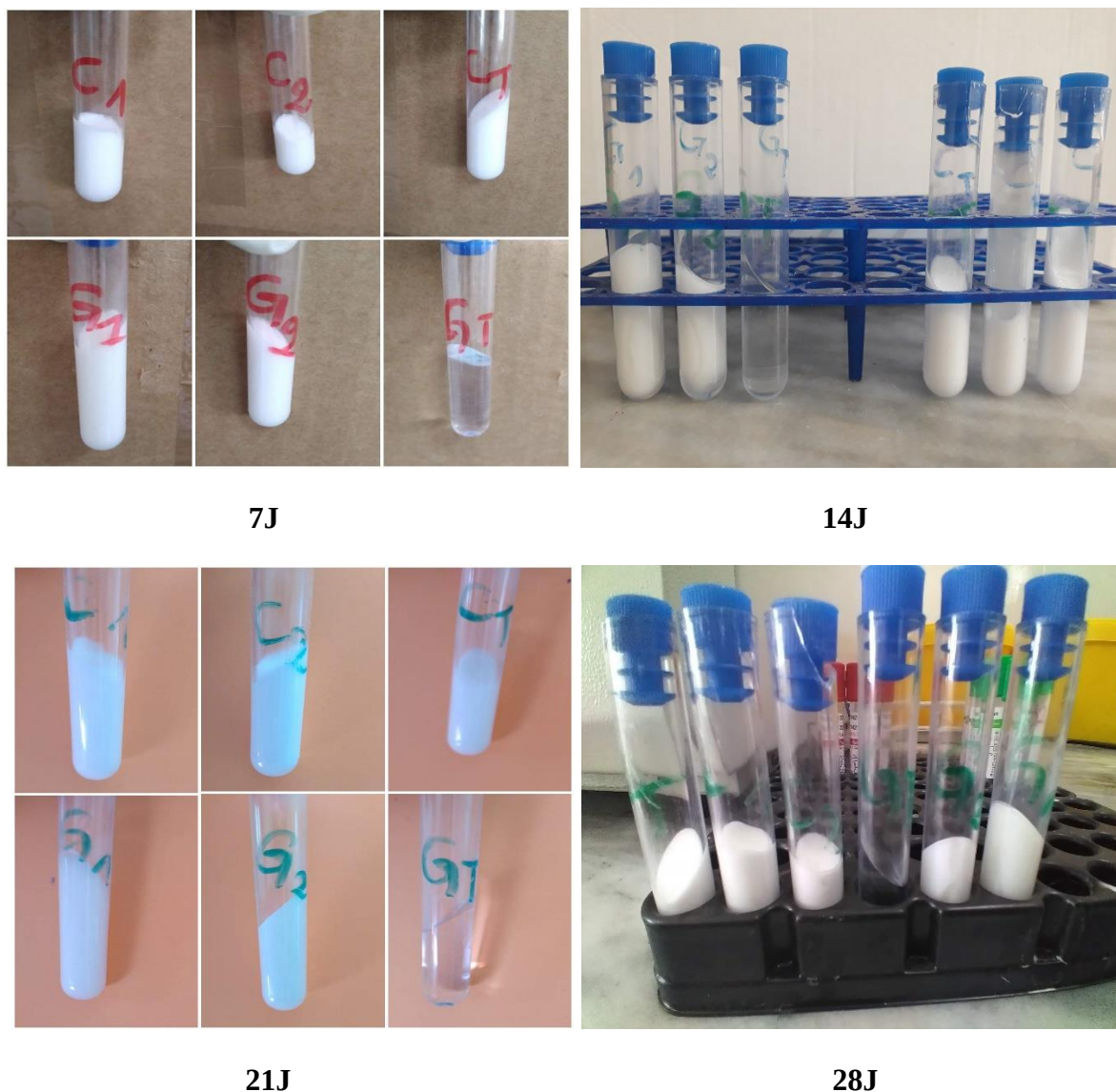


Figure III.24 : Résultats des essais de centrifugation des gels et des crèmes formulés au cours du temps.

III.4.5. pH

Les résultats du pH des formulations étudiées sont représentés dans la Figure III.25 ci-après.

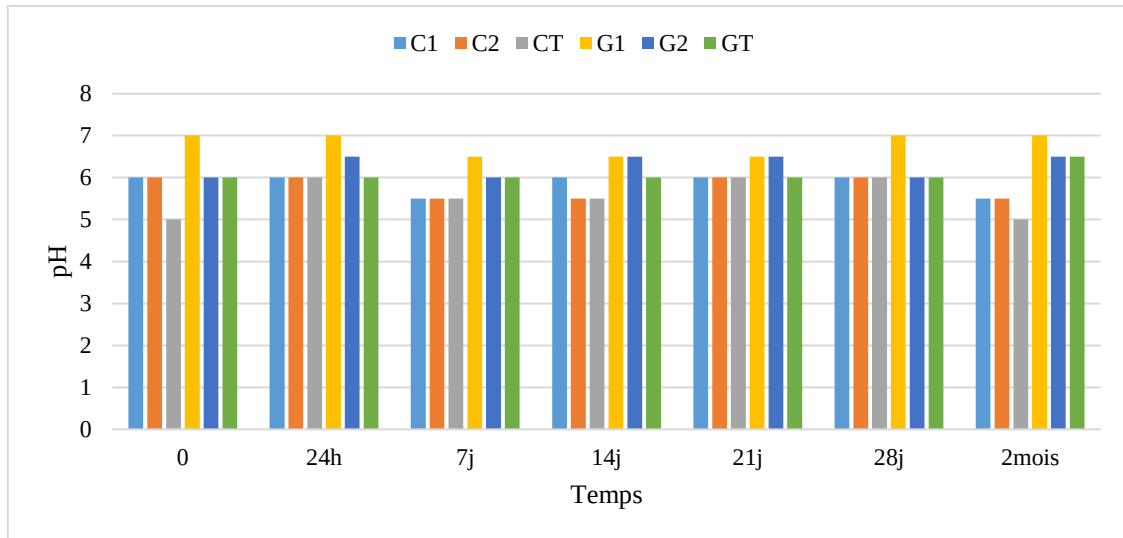


Figure III.25 : Evolution du pH des crèmes et des gels formulés au cours du temps.

Le pH peut être utilisé comme indicateur de stabilité d'une formulation. Les pH des crèmes varient entre 5 et 6. Ces valeurs sont légèrement inférieures du pH de la C_c (pH=6-7). Le pH des gels est compris entre 6 et 7. Ce qui est le cas du G_{CH} . Les valeurs obtenues pour toutes les formulations sont comprises dans l'intervalle du pH cutané [43] et sont globalement stables au cours du temps (60 jours).

III.4.6. Conductivité électrique

Les résultats de la conductivité électrique (CE) des gels et des crèmes formulés sont représentés dans la Figure III.26. La conductivité électrique (CE) est un indicateur du sens de l'émulsion H/E ou E/H [44]. Les valeurs de la conductivité électrique des gels formulés varient entre $0,14\mu S$ et $0,20\mu S$ au cours des 21 premiers jours. Les valeurs de la conductivité électrique des crèmes formulées sont comprises entre $0,11\mu S$ et $0,20\mu S$ au cours des 21 premiers jours. Au 28^{ème} jour, une augmentation des valeurs de la conductivité électrique comprises entre $3,3\mu S$ et $3,9\mu S$, pour les crèmes et G_T , et dépassant $15\mu S$ pour G_1 et G_2 est observée. Les conductivités de toutes les formulations élaborées sont supérieures aux formulations commerciales. Néanmoins, ces conductivités restent faibles. Ceci est bon pour la peau et indique une limitation de la migration des ions entre les composants de chaque formulation et la faible interaction chimique entre les composants de chaque formulation avec la peau [45].

Les CE élevées des crèmes formulées par rapport à la conductivité de l'eau ($0,6\mu S$) indiquent et confirment que ce sont des émulsions de type H/E.

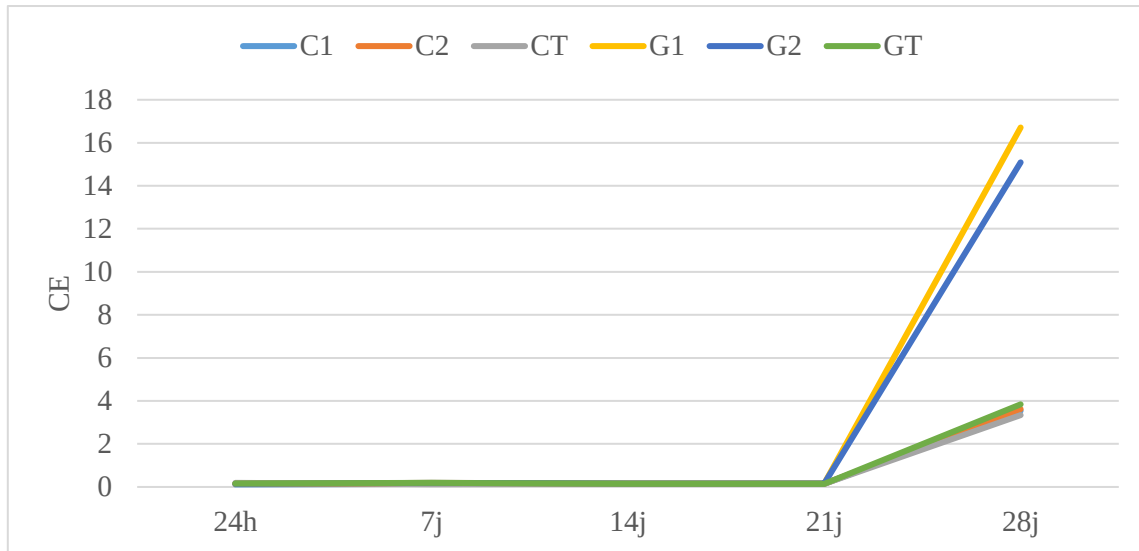


Figure III.26 : Evolution de la CE (μS) des gels et des crèmes formulés au cours du temps.

III.4.7. Indice de réfraction

Les résultats de l'indice de réfraction des formulations élaborées sont représentés sur la Figure III.27. Les indices de réfraction des crèmes formulées sont compris entre 1,36 et 1,38. Ils sont inférieurs à celui de la C_c (1,65). Les indices de réfraction des gels formulés varient entre 1,35 et 1,36. Ces valeurs sont également inférieures à ceux des gels commerciaux ($\sim 1,67$). Cette différence entre les indices de réfractions des formulations élaborées et celles commerciales pourrait être dû à la différence dans la composition entre la crème commerciale et celles formulées. La stabilité globale des indices de réfractions des formulations élaborées au cours du temps indique une stabilité chimique de ces dernières [46].

Les indices de réfraction des crèmes formulés sont proche de l'indice de réfraction de l'eau (1,33). Ceci montre et confirme encore que la phase aqueuse est la phase continue (émulsion H/E).

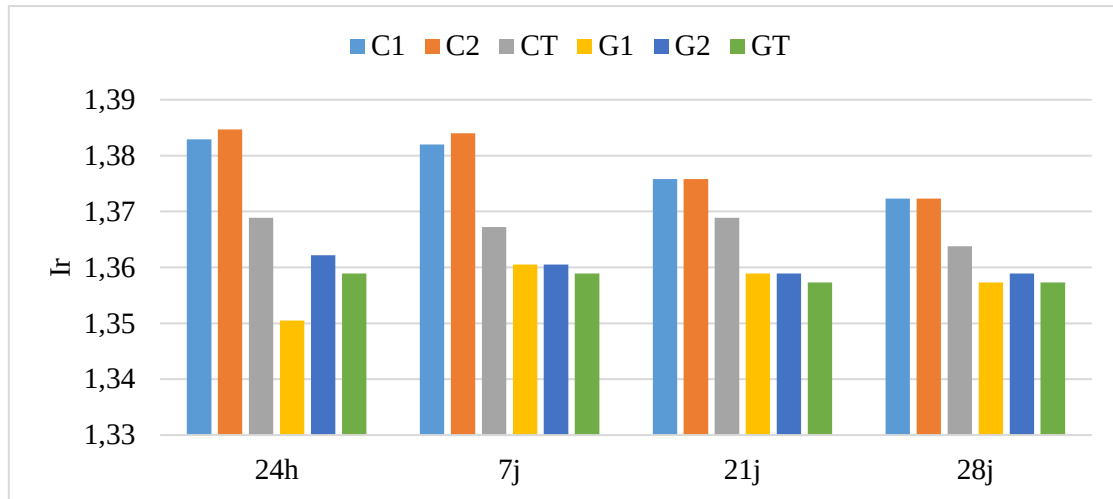


Figure III.27 : Evolution de l'indice de réfraction des crèmes et des gels formulés au cours du temps.

III.4.8. Turbidité

Les résultats de la turbidité des gels et des crèmes formulés sont illustrés sur la Figure III.28. Les turbidités des crèmes et de G1 et G2 sont d'environ 2,5 signifiant leur grande opacité. Ce qui n'est pas le cas du G_T dont la turbidité est d'environ 0,1 car il est transparent. Les turbidités des crèmes formulées et de G₁ et G₂ se rapprochent de celles de C_c et de G_{cc} (~2,5). La turbidité de G_T est similaire à celle du gel hydroalcoolique commercial G_{ch} (~0,1) qui lui aussi est transparent.

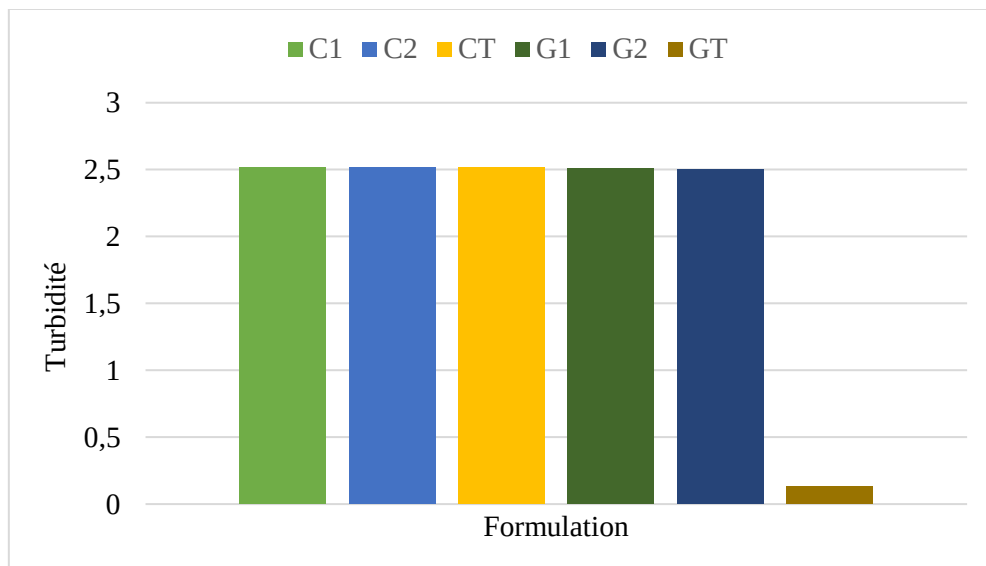


Figure III. 28 : Turbidité des des crèmes et des gels formulés.

III.4.9. Potentiel zêta

Le potentiel zêta permet de prédire la stabilité des formulations. Les résultats du potentiel zêta des formulations sont représentés dans la Figure III.29. Les potentiels zêta des crèmes formulées sont compris entre -50 et -59 mV. Ces valeurs sont similaires au potentiel zêta de la C_c (-53 mV). Les potentiels zêta des gels formulés varient entre -39 et -55 mV et sont supérieurs aux potentiels zêta de GCH (-24 mV) et au Gcc (-35 mV). Les résultats obtenus pour toutes les formulations élaborées largement inférieurs à -30 mV indiquent leur bonne stabilité [47].

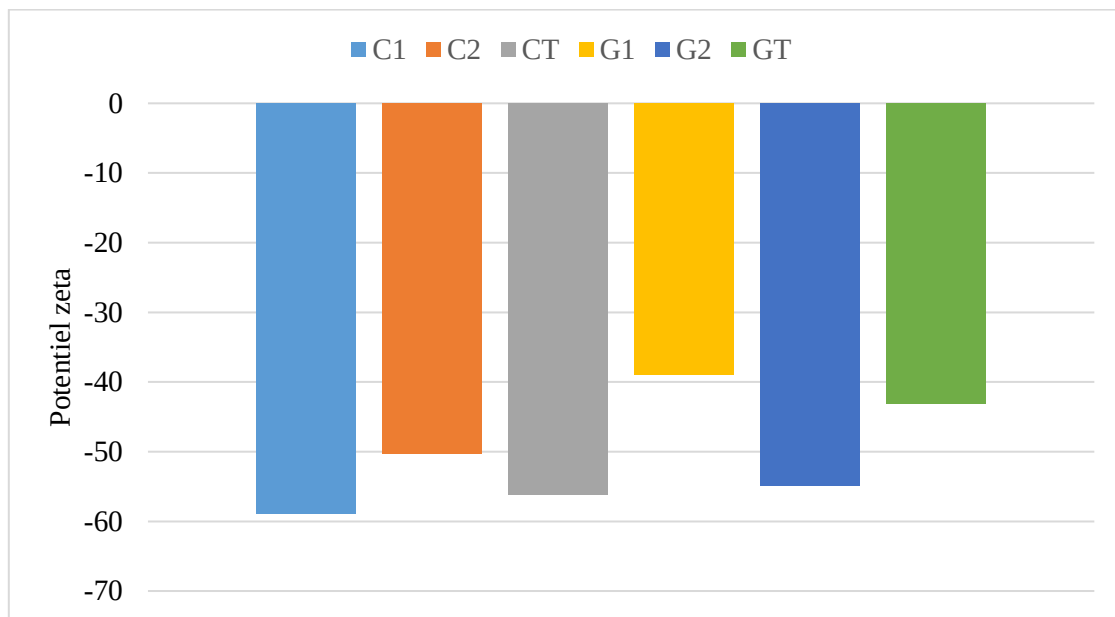


Figure III. 29 : Résultats du potentiel zêta (mV) des crèmes et des gels formulés.

III.4.10. Viscosité

Les rhéogrammes illustrés sur les Figure III.30 et III.31 représente les évolutions de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement des crèmes et des gels respectivement. Nous constatons une similitude dans comportement rhéologique des crèmes et des gels formulés avec les crèmes et les gels commerciaux respectivement. Une diminution de la viscosité avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement est observée dans toutes les indiquant un comportement rhéofluidifiant pour tous les échantillons. Ce comportement non-Newtonien est favorable à l'application cutanée car la force nécessaire pour permettre l'étalement de chacune des formulations est relativement faible et diminue lorsqu'elle est appliquée sur la peau [48].

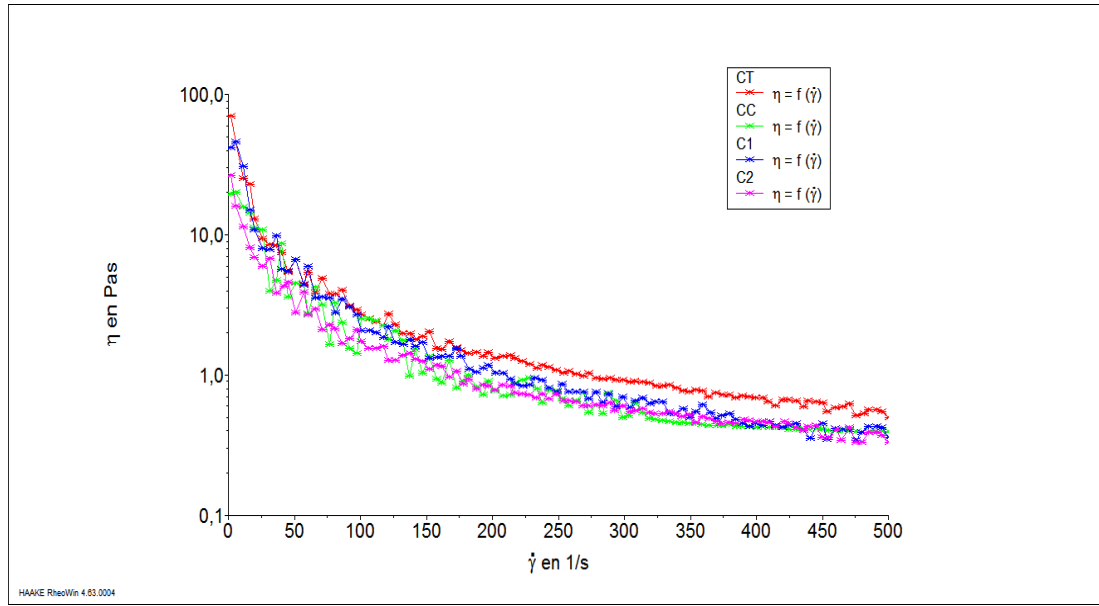


Figure III. 30 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des crèmes.

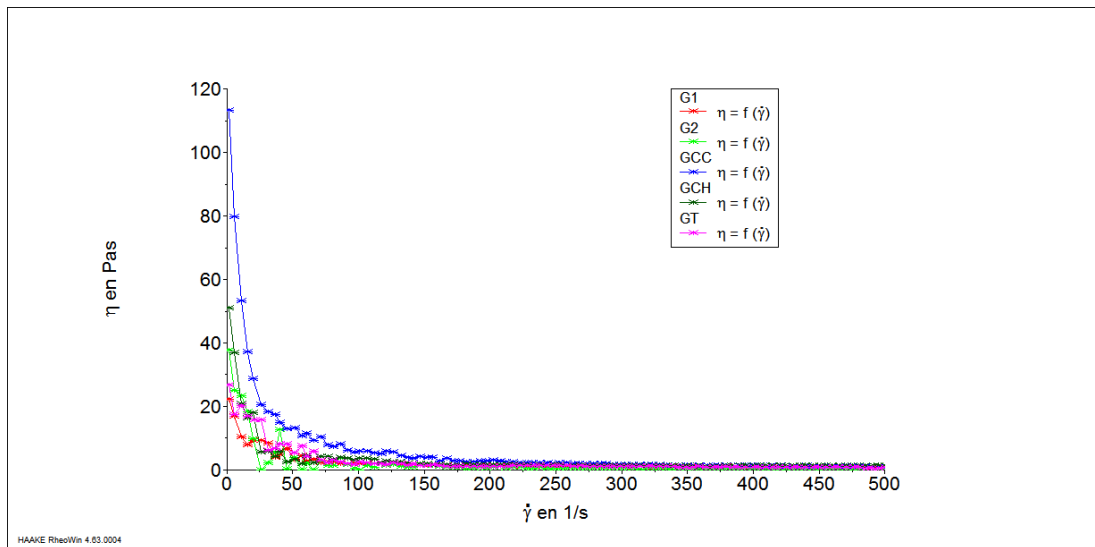


Figure III.31 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des gels.

III.4.11. Observations microscopiques

Les observations microscopiques des gels et des crèmes formulées au cours du temps, pendant 28 jours, sont illustrées dans les Figures III.32, III.33 et III.34. Le G_T qui ne contient ni HE ni HD ne présente pas de gouttelettes suspendue. Ce qui indique la présence d'une seule phase. Les mêmes observations microscopiques ont été notés pour le gel de référence G_{CH} . Ceci n'est pas le cas des crèmes et de G_1 et G_2 dans lesquels nous observons des gouttelettes de la phase huileuse qui sont éparpillées dans la phase aqueuse qui est la phase continue (i.e. majoritaire).

24h après formulation, les gouttelettes dans toutes les crèmes et dans les gels G_1 et G_2 étaient dispersées et avaient différentes tailles. Les formulations étaient ainsi hétérogènes. Au cours du temps ces formulations gagnaient en homogénéité par la réduction et l'uniformité de la taille des gouttelettes. G_1 et G_2 présente une meilleure homogénéité que G_{CC} et les crèmes formulées sont plus homogène que C_c (Figure III.35).

1 jour

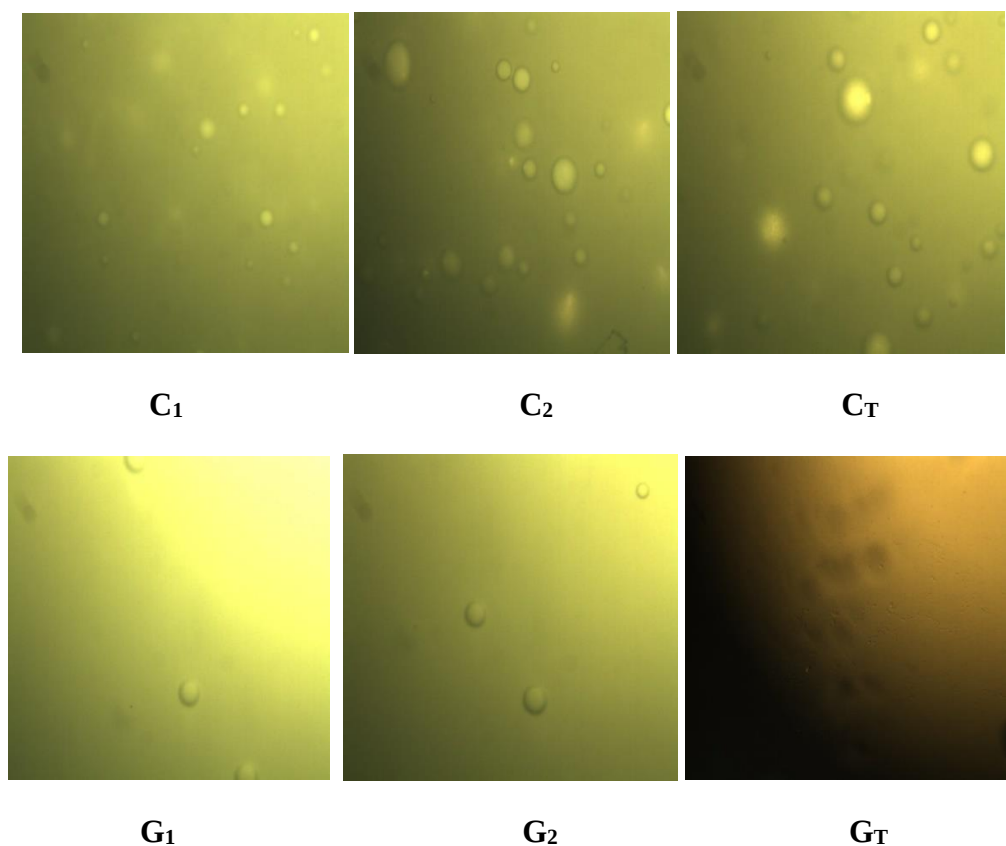
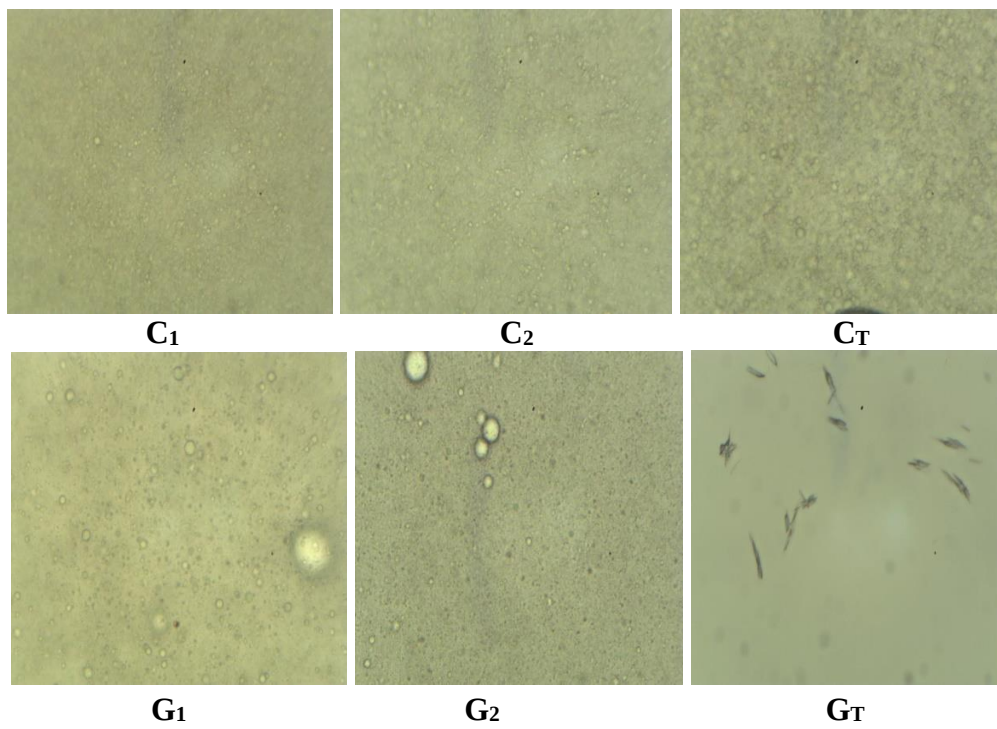


Figure III. 32 : Observations microscopiques des crèmes et des gels formulés (1 jour).

7jours



14jours

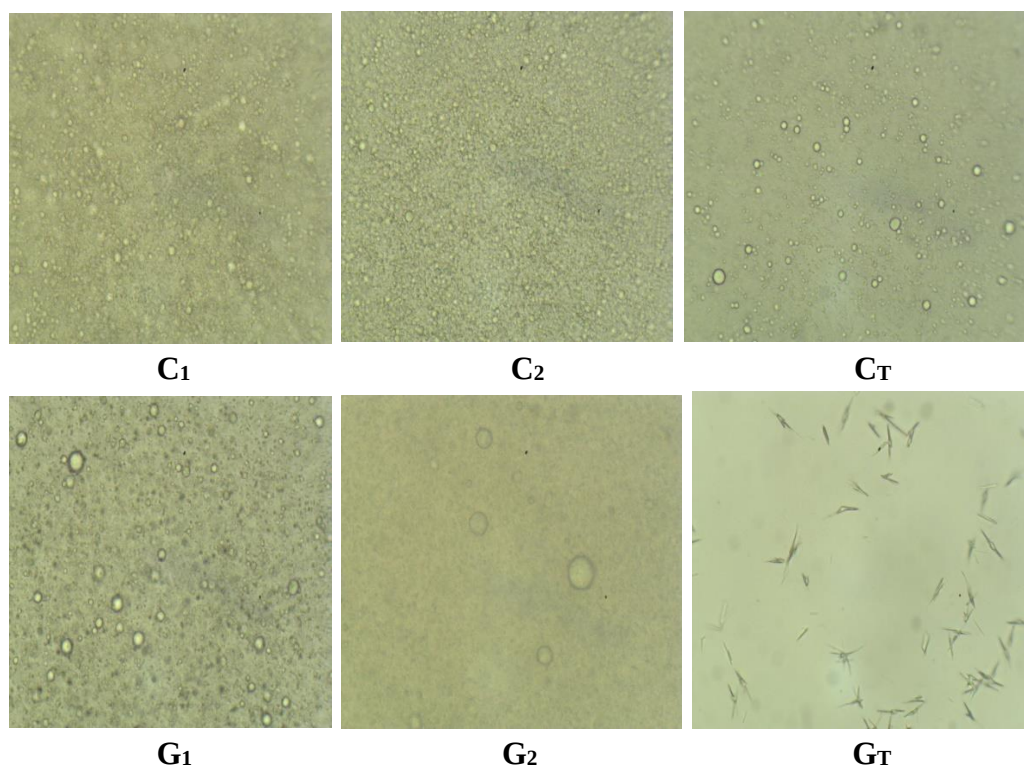
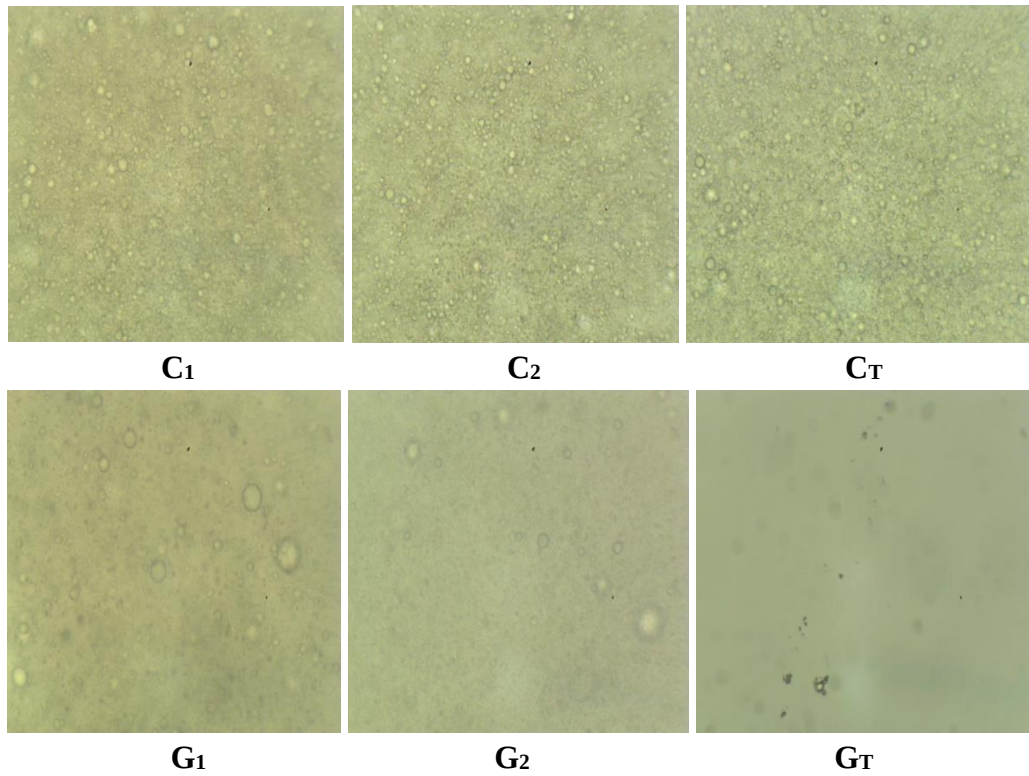


Figure III. 33 : Observations microscopiques des crèmes et des gels formulés (7 et 14 jours).

21jours



28jours

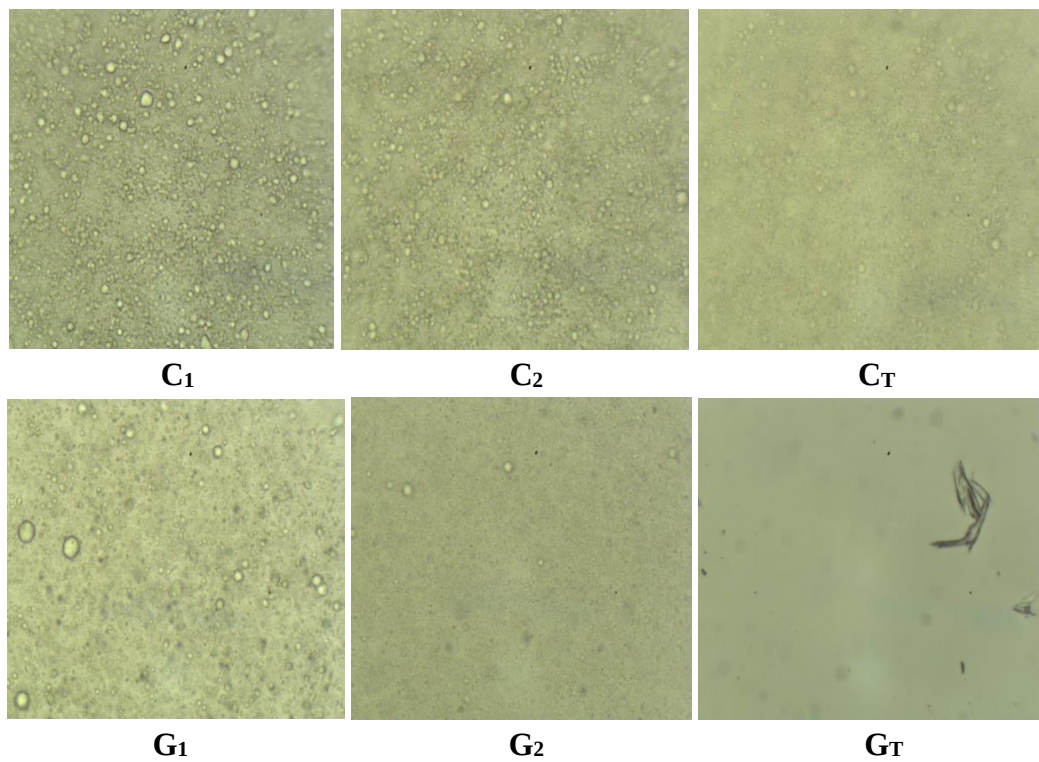


Figure III. 34 : Observations microscopiques des crèmes et des gels formulés (21 et 28 jours).

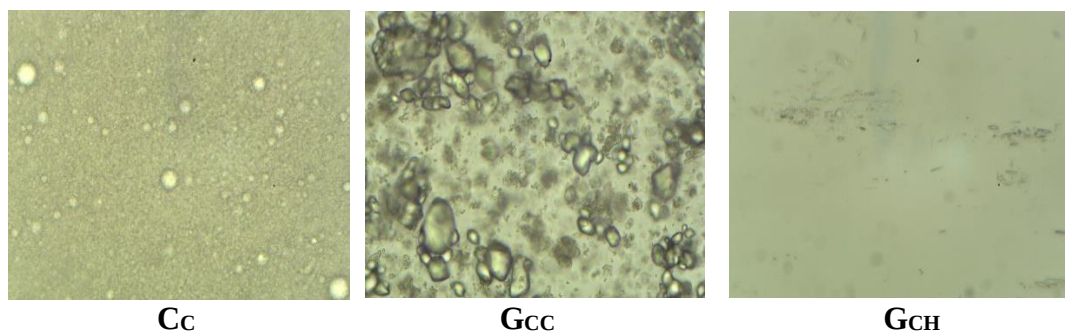


Figure III. 35 : Observations microscopiques de la crème et des gels commerciaux.

III.4.12. Activité antimicrobienne

III.4.12.1. Stérilité des formulations

Les résultats de la stérilité des formulations élaborées dans les différents milieux sont illustrés dans la Figure III.36. Les crèmes et les gels formulés sont stériles car les boîtes contenant chacun des échantillons n'ont présenté aucun contaminant après incubation de 24h à 37°C.

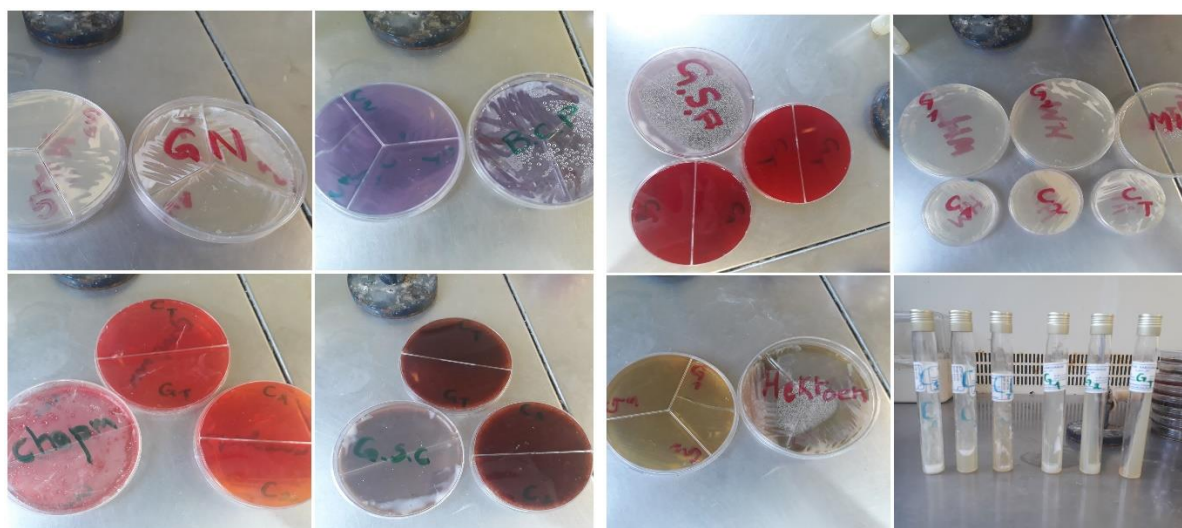


Figure III.36 : Résultats de stérilité des crèmes et des gels formulés.

III.4.12.2. Aromatogramme

Les résultats de l'antibiogramme permettant d'étudier l'activité antimicrobienne des formulations sur les souches *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* et *S. typhimurium* sont illustrés dans la Figure III.39. Les DZI pour chaque souche des crèmes et des gels sont récapitulés dans les Figures III.37 et III.38 respectivement.

La souche *S.typhimurium* est très sensible aux crèmes et aux gels étudiés (16mm - 17mm), Cependant, la souche à Gram (-) *E.coli* est sensible pour C₁ et C_T (14mm et 13mm), et très

sensible pour C₂, G₁, G₂ et G_T (15mm - 18mm). La souche à Gram (-) *P.aeruginosa* se caractérise par une résistance aux crèmes, car les DZI sont inférieurs à 8mm, et une sensibilité aux gels (10mm et 11mm). La souche à Gram (+) *S.aureus* est sensible aux C₁ et C₂, G₁ et G_T (10mm – 13 mm), et est très sensible aux C_T et G₂ (16mm et 18mm). La souche *C.albicans* est sensible aux C₁ et C_T (14mm et 12mm), très sensible aux C₂, G₁ et G₂ (16mm - 19mm) et extrêmement sensible au G_T (20mm).

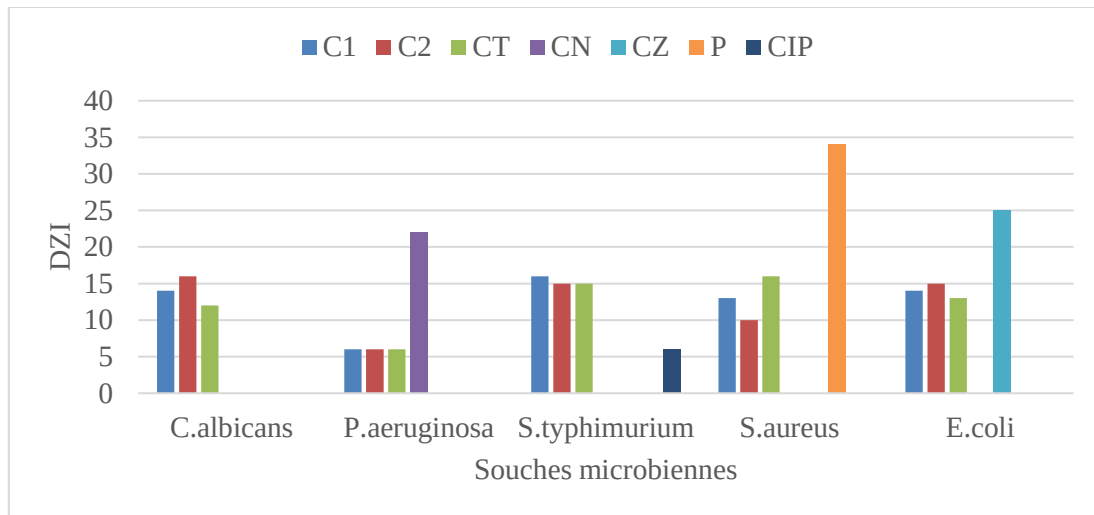


Figure III.37 : Diamètres d'inhibition en mm des crèmes.

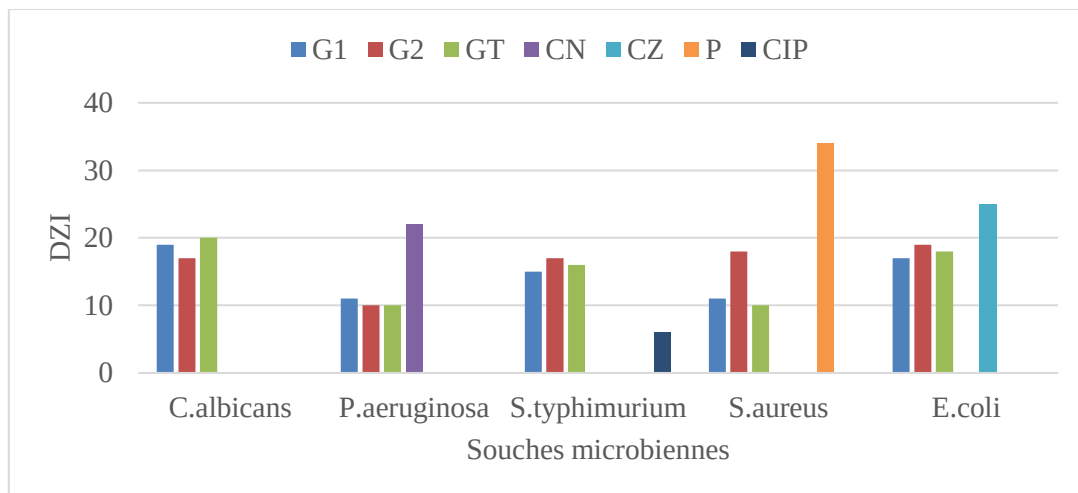


Figure III.38 : Diamètres d'inhibition en mm des gels.

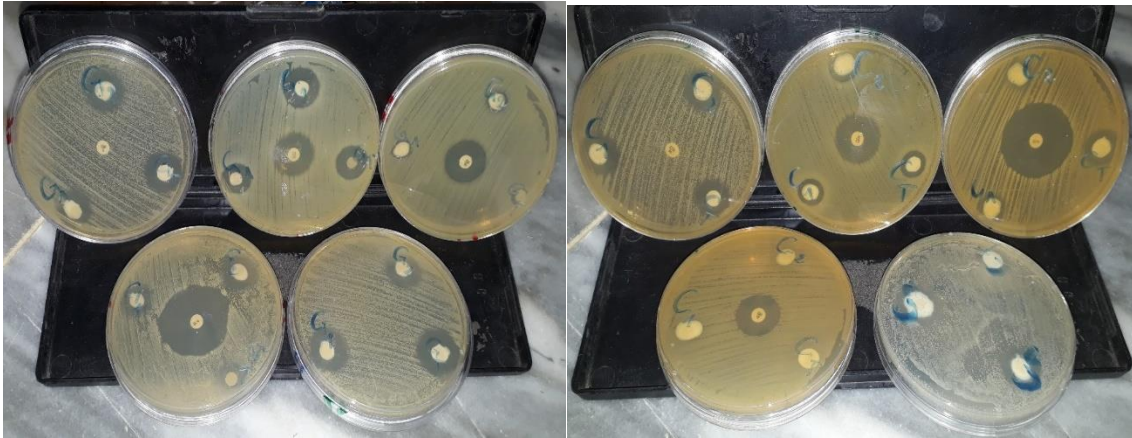


Figure III.39 : Activités antimicrobiennes des gels et des crèmes formulés respectivement.

III.4.12.3. Concentration minimale inhibitrice

Les CMI des gels et des crèmes formulés (Figure III.40) ont montré que les six formulations ont une activité antimicrobienne contre la souche *E.coli* à la CMI de 500µl/ml. La souche *P.aeruginosa* a montré que les formulations ont un effet antimicrobien de 500µl/ml sauf pour le G_T qui n'a aucune activité antimicrobienne. Pour la souche *S.typhimurium* C₂ et C_T n'ont présenté aucun effet antimicrobien, tandis que C₁, G₂ et G_T ont montré un effet antimicrobien à la CMI de 500µl/ml et G₁ à la CMI de 62,5µl/ml. Des activités antifongique de C_T (CMI 250 µl/ml) et G₁ et G₂ (CMI 500 µl/ml) contre la souche *C.albicans* ont été noté alors que C₁, C₂ et G_T n'ont montré aucun effet contre la même souche. Les formulations C₁, C₂, C_T et G₂ présente une activité contre la souche *S.aureus* à la CMI de 500 µl/ml. Aucun effet antimicrobien n'a été observé contre *S.aureus* pour G et G_T.

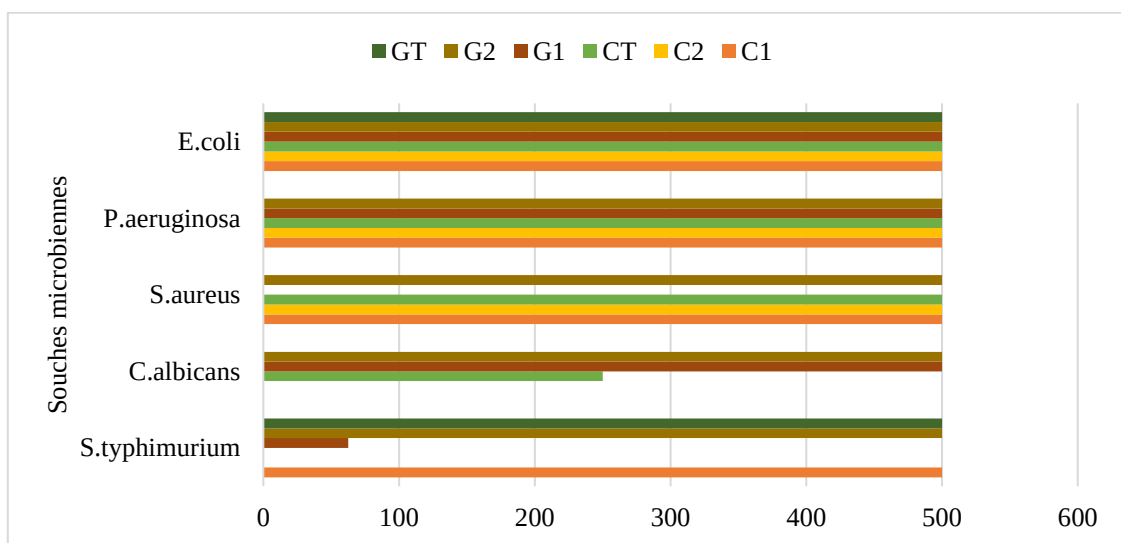


Figure III.40 : Valeurs des CMI des gels et des crèmes formulés.

III.4.13. Caractérisation des émulsions formulés après vieillissement (cycle froid/chaud)

III.4.13.1. Caractéristiques organoleptiques et observations macroscopiques

Les propriétés organoleptiques et les observations macroscopiques des formulations ayant subi 4 cycles (froid/chaud). Les résultats ont montré que les gels et les crèmes formulés ont maintenu leurs propriétés organoleptique et macroscopique après le vieillissement accéléré subi sauf pour l'homogénéité. De ce fait, les formulations étudiées ont maintenu des apparences semi-solides, des textures onctueuses, des touchés doux et non collants lors de leurs applications sur la peau, ainsi qu'une facilité de leur élimination lavage à l'eau. La couleur et l'odeur de chaque formulation ont été maintenues.

Concernant l'homogénéités, C_T et G_T ont maintenu leur homogénéité contrairement à C_1 , C_2 , G_1 et G_2 où un déphasage a été observé (Figure III.41). Ainsi, l'indice de crémage des 04 échantillons a été calculé. Ce dernier est un indicateur de déphasage des formulations. Un indice de crémage élevé est un indicateur d'instabilité. Il se calcul comme suit :

$$IC\% = (HS / HT) \times 100$$

Tel que :

HS : hauteur de la couche supérieure de l'échantillon (i.e. sérum) (cm).

HT : hauteur totale de l'échantillon (cm).

La taille des gouttelettes est associée à l'indice de crémage.

L'indice de crémage C_2 est inférieur à celui de C_1 et l'indice de crémage G_2 est inférieur à celui de G_1 aussi. Ceci indique une meilleure stabilité de cette dernière aux cycles (froid/chaud). Cette différence de déphasage pourrait être due à la composition des HEs incorporés dans chacune des crèmes.

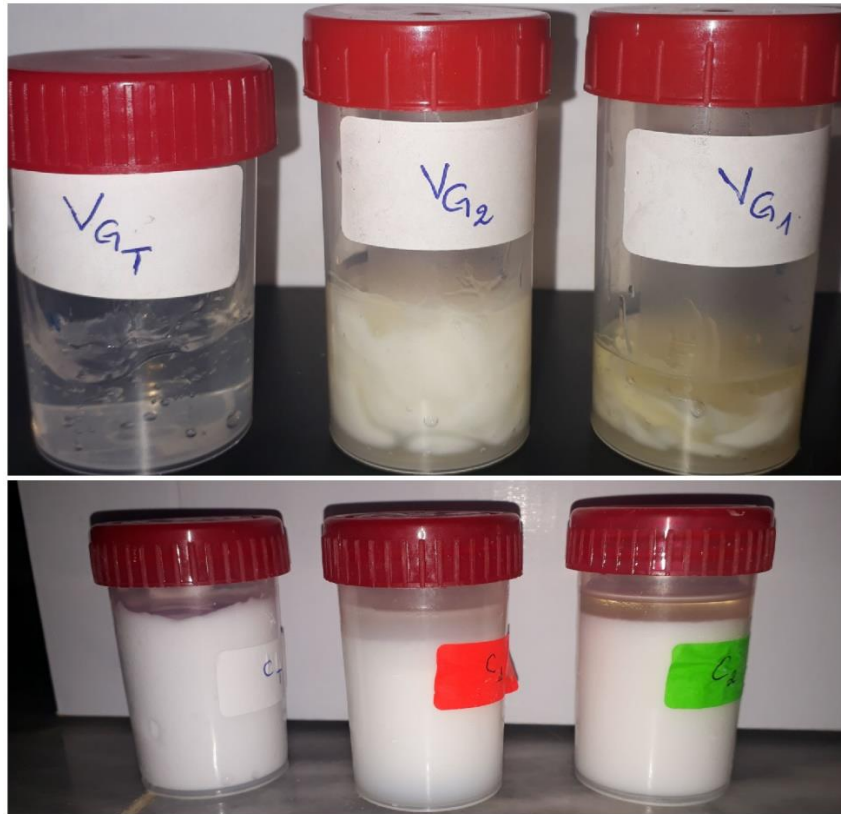


Figure III.41 : Aspect des émulsions après vieillissement.

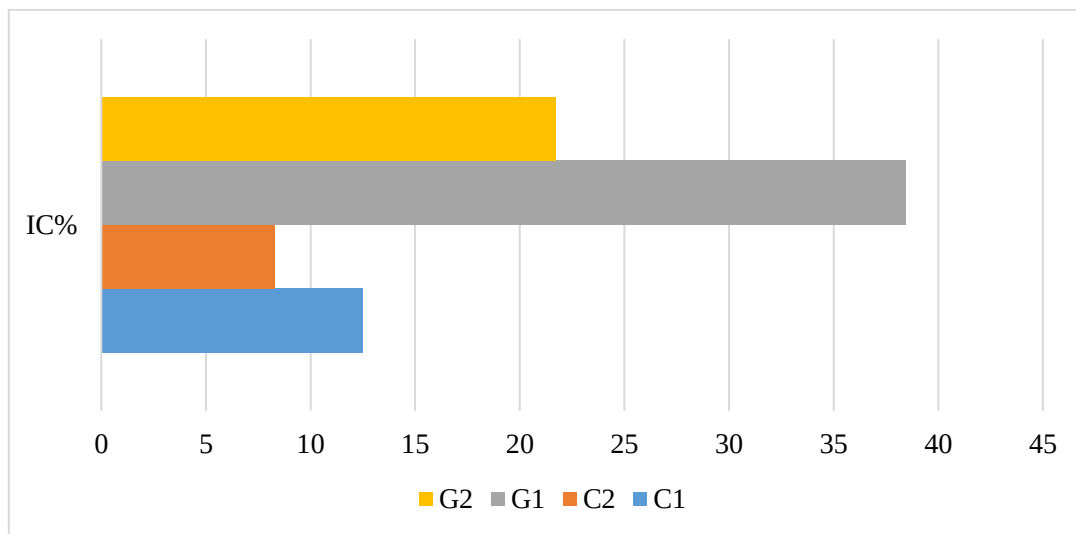


Figure III.42: Indice de crémage des formulations C_1 et C_2 .

III.4.13.2. Teneurs en humidité et indices chimiques

Le Tableau III.11 ci-dessous regroupe la teneur en humidité et les indices chimiques des crèmes et des gels formulés après vieillissement. Les crèmes et les gels ont globalement maintenu le même taux d'humidité. La légère baisse des taux d'humidité est probablement à l'évaporation de l'eau de chaque échantillon lors du cycle chaud.

Les indices d'acide des formulations après vieillissement ont été maintenus alors que les indices de saponification ont augmenté. Les indices de saponification des crèmes vieillis restent satisfaisants [41] et ceux des gels sont compris dans l'intervalle des gels commerciaux de référence.

Tableau III.11 : Teneurs en humidité et indices chimiques des formulations après vieillissement.

Formulations	H (%)	Ia (mg/g)	Is (mg/g)	Ie (mg/g)
C ₁	76,72	8,18	32,09	23,91
C ₂	74,20	6,43	31,33	24,9
C _T	82,80	5,55	27,86	22,31
G ₁	95,88	2,61	68,50	65,89
G ₂	97,14	2,78	65,50	62,72
G _T	97,63	2,23	72,74	70,51

III.4.13.3. Sens de l'émulsion

Le test au bleu de méthylène sur les formulations après vieillissement (Figure III.43) indique le maintien du sens de l'émulsion pour les crème qui sont de types H/E. En ce qui concerne le gel, les mêmes observations ont été noté avant et après vieillissement indiquant que la phase majoritaire et celle aqueuse.



Figure III.43 : Test au bleu de méthylène des crèmes et des gels vieillis.

III.4.13.4. Potentiel d'hydrogène

Les pH des formulations vieilles sont d'environ 6 (Figure III.44). Ces résultats montrent la stabilité de ce paramètre qui reste dans l'intervalle du pH cutané.

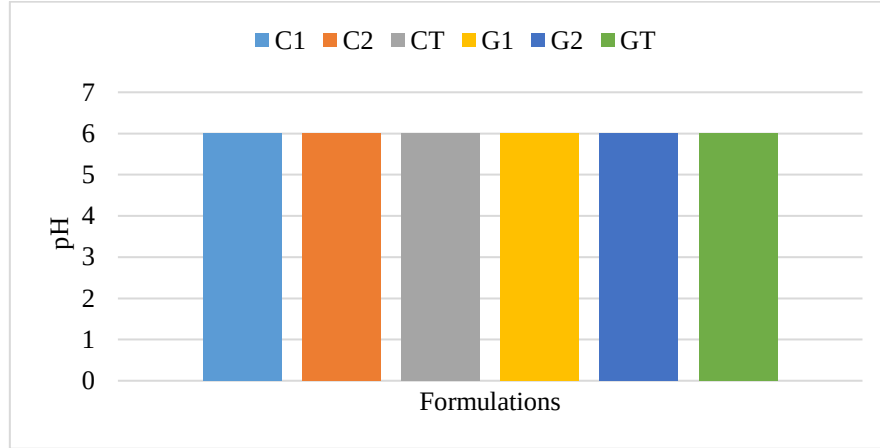


Figure III.44 : Evolution du pH des gels et des crèmes après vieillissement.

III.4.13.5. Conductivité électrique

Le vieillissement des gels et des crèmes formulés n'a pas eu d'influence sur leurs conductivités électriques (Figure III.45) dont les valeurs respectives sont restées les mêmes.

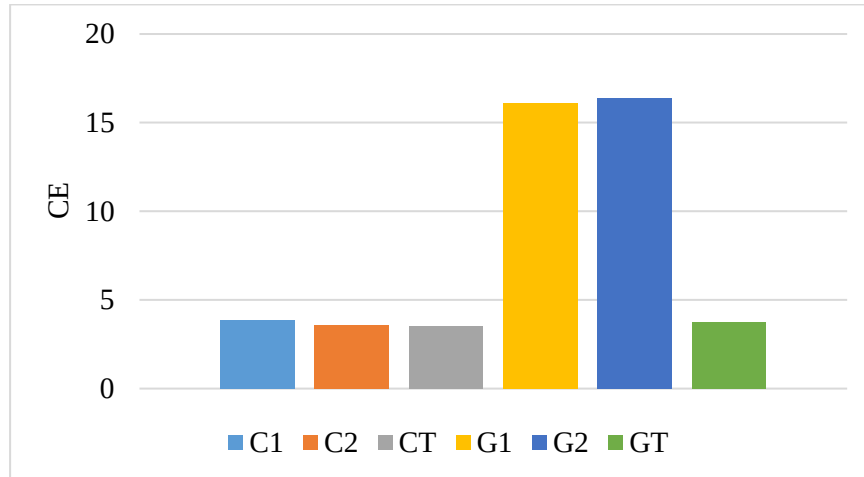


Figure III.45 : Conductivité électrique (en μS) des gels et des crèmes après vieillissement.

III.4.13.6. Indice de réfraction

Le vieillissement des gels et des crèmes formulés n'a pas influé sur leurs indices de réfraction qui sont similaires aux échantillons correspondant maintenus à température ambiante (Figure

III.46). Les indices de réfraction des crèmes formulées, proches de l'indice de réfraction de l'eau (1,33), montrent et confirment que la phase aqueuse est la phase continue.

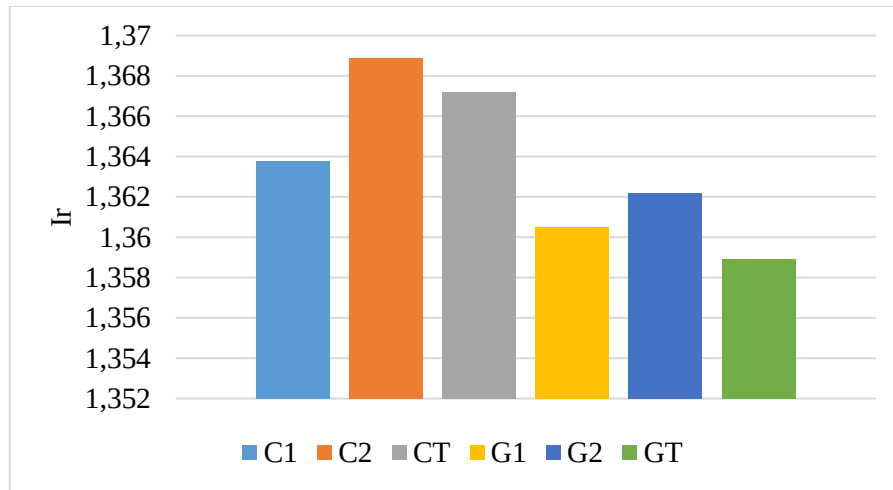


Figure III.46 : Indice de réfraction des gels et des crèmes après vieillissement.

III.4.13.7. Turbidité

Les turbidités des formulations vieilles sont maintenues pour les crèmes et les gels G1 et G2 (Figure III.47) en comparaison avec les valeurs obtenues pour les mêmes échantillons conservés à température ambiante (Figure III.28). Ainsi, ces formulations ont gardé la même opacité après vieillissement. Cependant, une augmentation de la turbidité du GT est observée (~0,8).

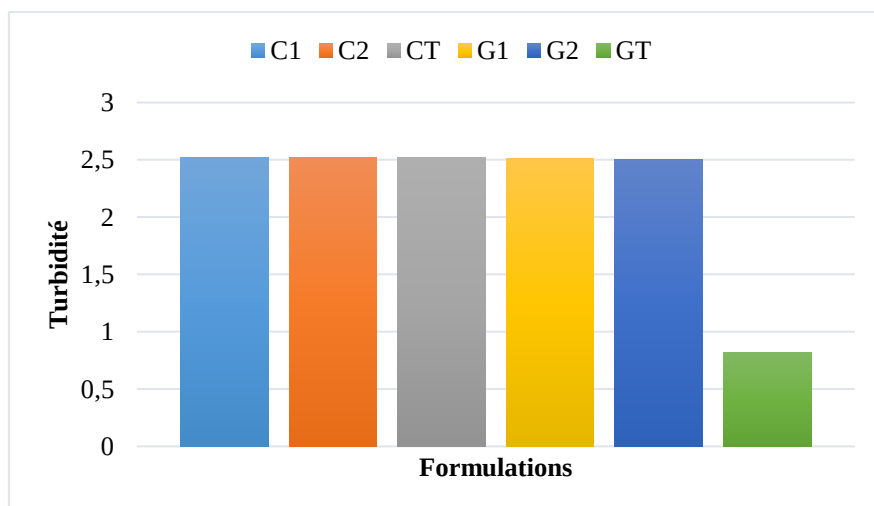


Figure III.47 : Turbidité du vieillissement.

III.4.13.8. Potentiel zêta

Les résultats du potentiel zêta des formulations montre que les potentiels zêta des crèmes et des gels vieillis subissent globalement une légère baisse (Figure III.48). Cette diminution de charge est un indicateur de baisse de stabilité avec le vieillissement [49].

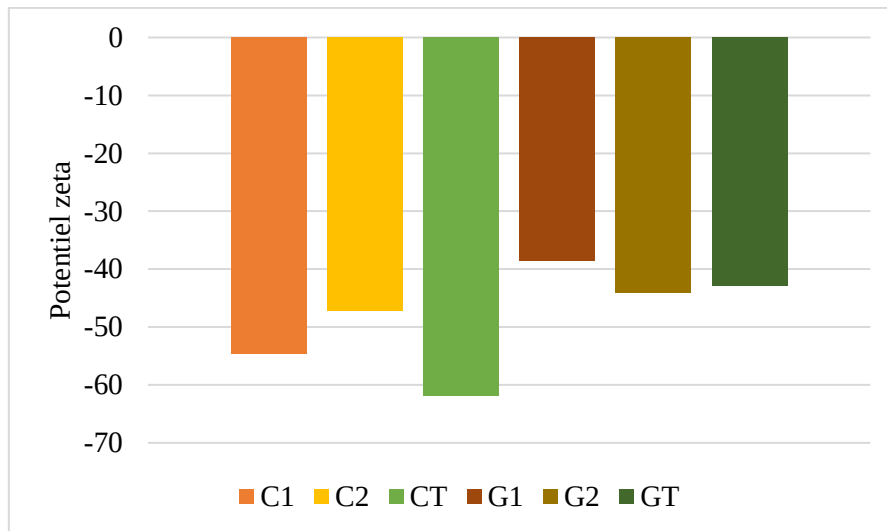


Figure III.48 : Résultats du potentiel zêta après vieillissement.

III.4.13.9. Viscosité

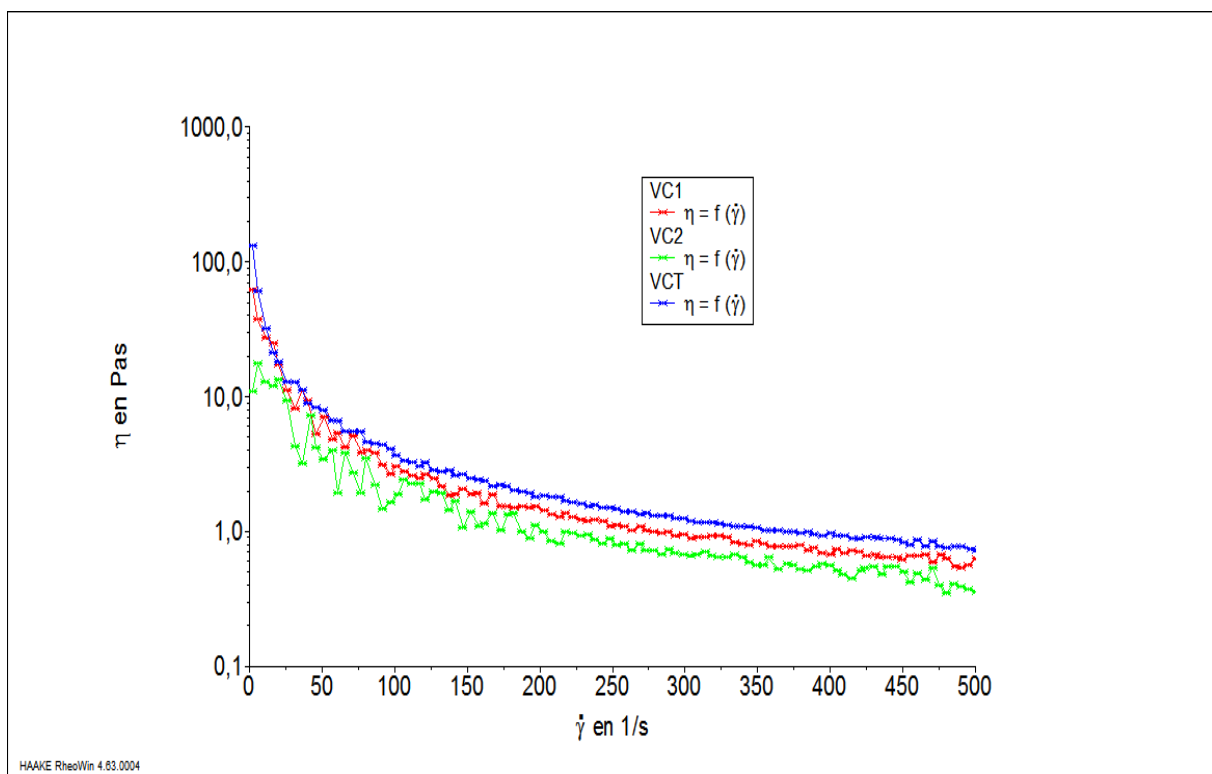


Figure III.49 : Rhéogramme des crèmes après vieillissement.

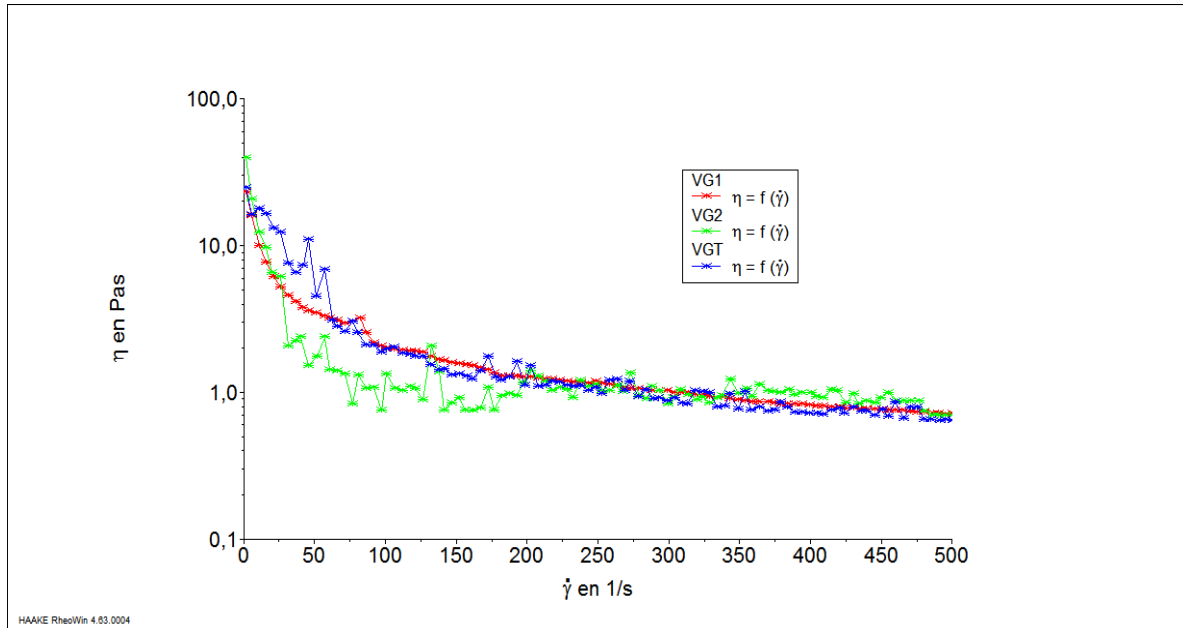


Figure III.50 : Rhéogramme des gels après vieillissement.

Les rhéogrammes illustrés sur les Figure III.49 et III.50 représentent les évolutions de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement des crèmes et des gels vieillis respectivement. Nous constatons un maintien du comportement rhéologique des crèmes et des gels malgré le vieillissement indiquant un comportement rhéofluidifiant pour tous les échantillons.

III.4.13.10. Observations microscopiques

Les observations microscopiques des crèmes vieillis C_1 et C_2 (Figure III.51), contrairement à la C_T , montrent une hétérogénéité traduite par un grossissement des gouttelettes qui ont différentes tailles. Ceci qui expliquerai le déphasage de C_1 et C_2 et la stabilité de C_T . Les gels G_1 et G_2 montrent une moindre hétérogénéité par rapport aux crèmes vieillis C_1 et C_2 (Figure III.51). L'observation microscopique du G_T vieilli est la même que celle du conservé à température ambiante.

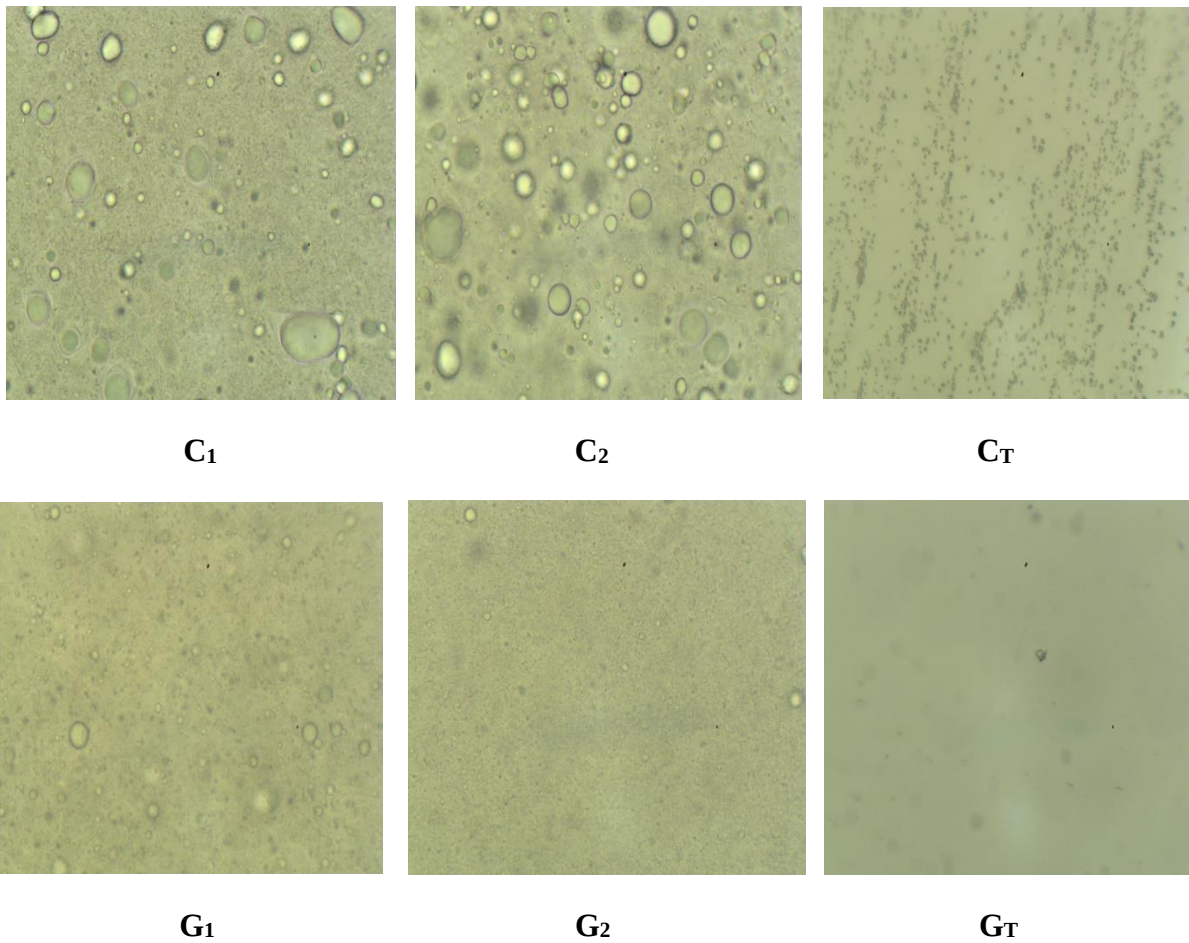


Figure III. 51 : Observations microscopiques des crèmes et des gels après vieillissement.

III.4.13.11. Activité antimicrobienne

✚ Stérilité après vieillissement



Figure III.52 : Stérilité des gels et des crèmes après vieillissement.

Les résultats de la stérilité des formulations vieillies dans les différents milieux, illustrés dans la Figure III.52, montre que les crèmes et les gels formulés sont stériles car les boîtes contenant chacun des échantillons n'ont présenté aucun contaminant après incubation de 24h à 37°C.

Aromatogramme

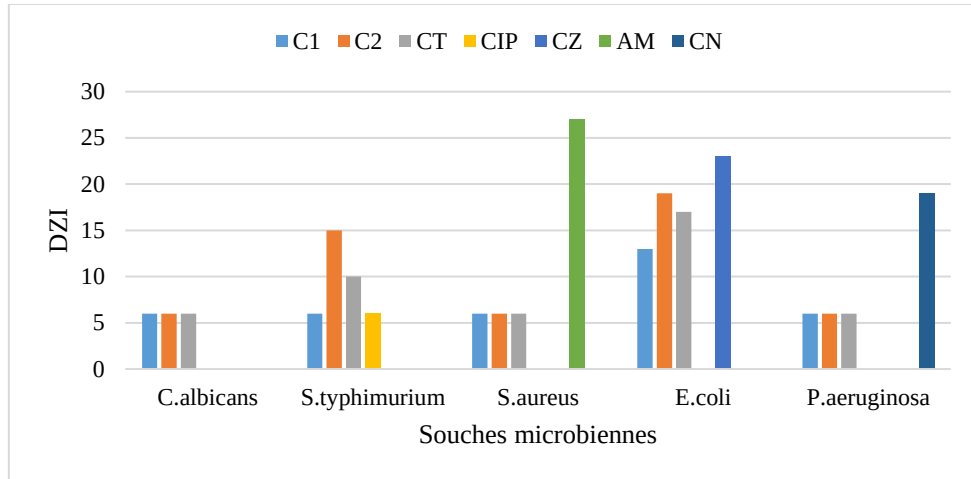


Figure III.53 : Diamètres d'inhibition en mm des crèmes après vieillissement.

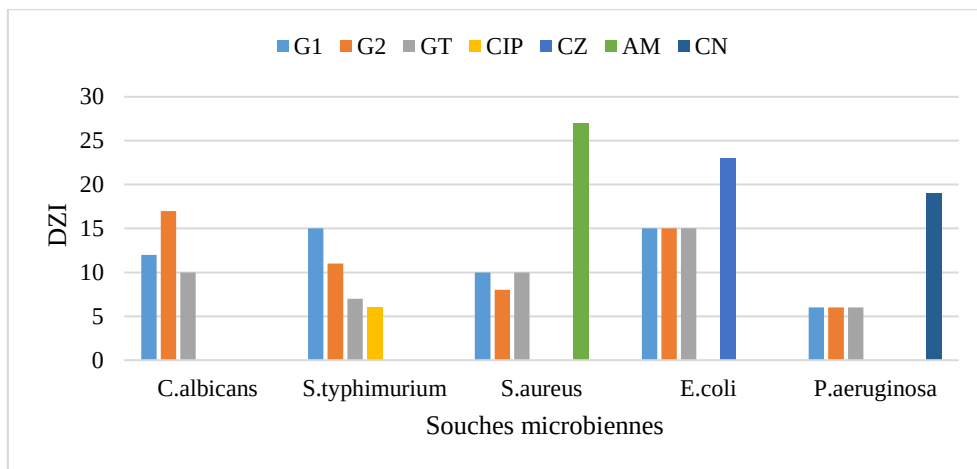


Figure III.54 : Diamètres d'inhibitions en mm des gels après vieillissement.

Les résultats de l'aromatogramme des crèmes et des gels après vieillissement (Figures III.53 et III.54) montre que la souche à Gram (-) *P.aeruginosa* se caractérise par une résistance pour les crèmes et les gels vieilli. La souche *C.albicans* est résistante pour les crèmes, sensible pour G_1 et G_T , et très sensible pour G_2 . La souche *S.typhimurium* est résistante pour $C1_1$ et G_T , très sensible pour C_2 et G_1 , et sensible pour C_T et G_2 . La souche à Gram (+) *S.aureus* est résistante aux crèmes et G_2 , et est sensible pour G_1 et G_T . La souche à Gram (-) *E.coli* est sensible pour C_1 et très sensible pour les autres formulations.

Concentration minimale inhibitrice

Les résultats de la CMI (Figure III.55) montre que les crèmes vieilles ont une activité antimicrobienne contre la souche *S.aureus* à la CMI de 500µl/ml et aucun effet antibactérien pour les gels. La souche *P.aeruginosa* ne présente aucun effet antimicrobien sauf le G₁ avec une CMI de 500µl/ml . La souche *E.coli* présente un effet antimicrobien à la CMI de 500µl/ml et aucun effet pour C_T et G₂ . La souche *S.typhimurium* a montré un effet antimicrobien à la CMI de 500µl/ml hors que la C_T et le G_T n'ont aucun effet antibactérien. La souche *C.albicans* a montré une activité antifongique pour C₁, C₂ et G₁ à la CMI de 500µl/ml mais aucun effet pour C_T, G₂ et G_T.

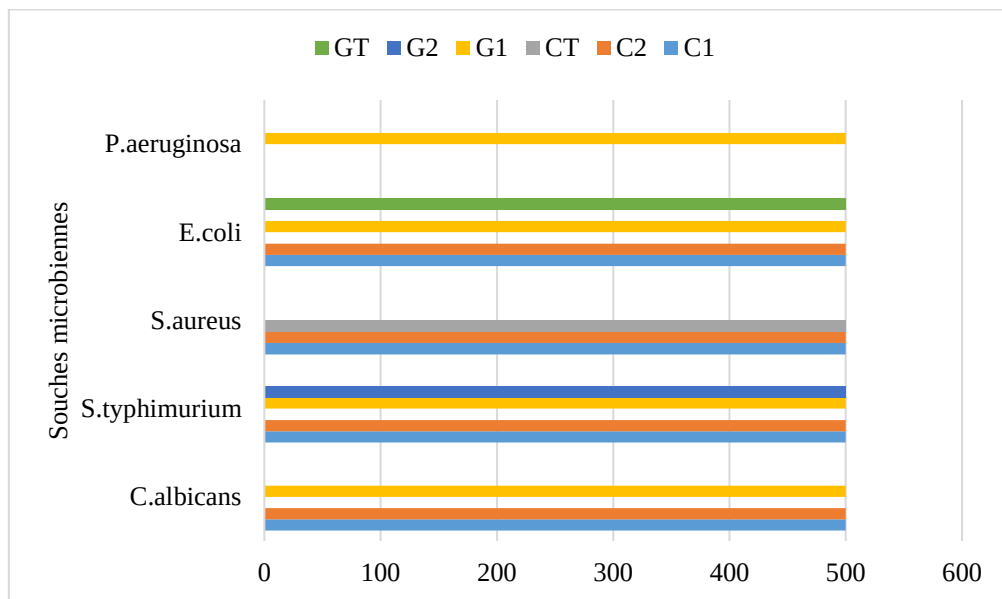


Figure III.55 : Valeurs de la CMI des gels et des crèmes après vieillissement.

Conclusion générale

L'objectif de ce mémoire était la caractérisation des huiles essentielles de mandarine, de clémentine, du bigaradier fruit, du bigaradier petit grain et de son hydrolat ainsi que l'étude de stabilité de gels et de crèmes formulés à base de ces derniers.

Ce présent travail est passé par plusieurs étapes en débutant par les propriétés organoleptiques, les caractéristiques physico-chimiques, les analyses spectrales d'infra-rouge et à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de l'hydrolat. Suite à cela, et sous la lumière d'une étude bibliographique détaillée, les HEs et l'HD ont été employés dans la formulation de deux crèmes et deux gels à usage topic. Un gel et crème sans HE ni HD ont été élaborés pour servir comme témoins. L'étude de stabilité de chacune des six émulsions a été établie chaque semaine pendant 28 jours par le suivi des caractéristiques organoleptiques et macroscopiques, les propriétés physico-chimiques, les analyses rhéologiques et la mesure des activités antimicrobiennes de chaque formulation. Quelques paramètres ont même été suivis pendant 60 jours.

Les résultats obtenus ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

- ✚ Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques ont indiqué, dans leur globalité, que les HEC, HEM, HEBF et HEBPG sont en accord avec les normes ISO 21631, ISO 3528, ISO 9844 et ISO 8901 respectivement. Les propriétés physico-chimiques de l'HD montrent sa richesse en eau.
- ✚ Les spectres infrarouges ont montré la présence de divers groupements fonctionnels aussi bien dans les huiles essentielles que dans l'hydrolat étudiés à de variables intensités.
- ✚ L'activité antibactérienne a permis de montrer, par la méthode de l'aromatogramme, un grand effet inhibiteur de des huiles étudiées sur les bactéries à Gram – et à Gram +, ainsi qu'une activité antifongique sur *C.albicans*. Les résultats en micro-atmosphère des HEs contre les souches *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* et *S.typhimurium* n'a donné aucun diamètre d'inhibition jusqu'à 6 jours d'incubation.
- ✚ L'étude de l'activité antibactérienne des combinaisons des HEs et l'HD a présenter différentes interactions : des interactions d'indifférences sur *S.aureus*, des interactions antagonistes et synergique sur *C.albicans*. Pour la souche *P.aeruginosa* des effets d'indifférence et synergique ont été noté. Quant à la souche *S.typhimurium* un effet de synergie, d'addition et d'indifférence a été relevé. *E.coli* a montré un effet synergique, d'indifférence, antagoniste et d'addition.

- ✚ Les CMI observées pour *S.aureus* sont égales à 125µl/ml, la souche *S.typhimurium* à 62,5µl/ml pour HEC et 250µl/ml pour HEM, pour la souche *C.albicans* à 62,5µl/ml pour HEC et 125µl/ml pour HEM, *E.coli* à 500µl/ml pour HEC, 250µl/ml pour HEM et 125µl/ml pour HEBF et HEBPG.
- ✚ Les résultats des associations en micro-atmosphère des quatre huiles essentielles avec différents antibiotiques ont donné diverses interactions pendant les 6 jours d'incubation.
- ✚ L'étude de stabilité du gel et de la crème chaque semaine pendant un mois a été établie par le suivi des caractéristiques organoleptiques et macroscopiques, et les propriétés physico-chimiques, d'une part, ainsi que par les analyses microscopiques, et rhéologique d'autre part. Les résultats obtenus ont relevé une stabilité globale de la formulation et une instabilité physiques des formulations vieilles.

En perspectives, ce travail pourrait être complété comme suit :

- ✚ Analyse CG-SM et CG-FID des huiles essentielles et de l'hydrolat afin de comparer leurs compositions chimiques.
- ✚ Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles, de l'hydrolat et des formulations.
- ✚ Suivi de la stabilité des formulations sur le long terme pour déterminer la durée de conservation de ces derniers à température ambiante.

Références bibliographiques

- [1] Mehani.M., Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la région d'Ouargla, Thèse de Doctorat, Université de Kasdi Merbah, Ouargla, 2015.
- [2] Duraffourd C., Lapraz J.C., Hervicourt L., Introduction à la médecine de terrain application de la phytothérapie clinique. Introduction à l'oncobiologie, Ed Masson, France, novembre 1996, p50.
- [3] Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F., Hakim Y., Benomier K., Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat *Pelargonium graveolens* dans la dermopharmacie, Nature et Technologie, 02, 2010, p59-64.
- [4] Madhi., Madhessentielles. Guide familial d'aromathérapie, Plante médicinale de Madagascar, Ed 7, France, 21 octobre 2013, p37-40.
- [5] Bruneton. J., Pharmacognosie et phytochimie, Plante médicinales, Ed tech et doc (3ème Ed), Paris, 2004, p101-120.
- [6] Ntezurubanza L., Les huiles essentielles du Rwanda, Ed Laseve, Québec Canada, 2000, p88.
- [7] Clarke S., Essential oils, Churchill Livingstone, Ed 2, Elsevier, 2008, p42-77.
- [8] Deschepper R., Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie, Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille, 2017.
- [9] Bouarfa M., Aromathérapie. Propriétés thérapeutiques et réglementation des huiles essentielles, Techniques de l'ingénieur, 2019, p89-96.
- [10] Davidson P.M., Methods for testing the efficacy of food antimicrobial, Food Technology, 43(1), 1997, p148-155.
- [11] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R., Wyllie S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca Alternifolia* (tee tree oil), Journal of Applied Microbiology, 88(1), 2000, p170-175.
- [12] Pauli A., Antimicrobien properties of essential oil constituents. International Journal of Aromatherapy, 11(3), 2001, p126-133.
- [13] Vokou D., Kokkini, S, Geographic variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare ssp. hirtum*) essential Oils, 21, 1993, p287-295.

- [14] Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Tkahara Y., Ichimura K, Antimicrobial activity of dalmatian sage oil from different regions of the Yugo Slav Adriatic coast, *Agric boil Chem*, 43(11), 1979, 23-65. Antifungal activity of component of essential oil, 45(4), 1981, 945.
- [15] Pharmacopée Européenne, 8.0. Tome I, 8^e Ed : Conseil de l'Europe, Strasbourg, 2013, p1568.
- [16] Atmani H., Baira K., Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères. Physicochimie de l'huile essentielle du clou de girofle, Mémoire de Master, Université frères Mentouri 1, Constantine, 2015.
- [17] Bechaalany P., Utilisation des huiles essentielles dans les affections inflammatoires en complément du traitement ostéopathique, Mémoire du diplôme ostéopathie animal, European School of Animal Osteopathy, 2005, p10-11.
- [18] Piochon M., Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne, Thèse de Doctorat, Université du Québec à Chicoutimi (UQAC), 2008.
- [19] ISO 3528 : 2012 : Huile essentielle de la mandarine (*Citrus reticulata* Blanco).
- [20] Benabdi B., Otmani A., Mémoire de Master, Evaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*, Université Akli Mohand Oulhadj, Bouira, 2019.
- [21] ISO 21631 : 2020 : Huile essentielle de clémentine (*Citrus clementina*).
- [22] ISO 9844 : 2006 : Huile essentielle d'orange amère (*Citrus aurantium* L).
- [23] ISO 8901 : 2003 : Huile essentielle de petit grain bigaradier (*Citrus aurantium* L).
- [24] Seddik M., Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique d'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région d'Adrar. Étude de son activité biologique et anti-oxydante, Mémoire de Magister, Université d'Oran Es-senia, 2010.
- [25] ISO 875 : 1999 : Huiles essentielles – évaluation de la miscibilité des huiles essentielles à l'éthanol.
- [26] ISO 3657 : 2020 : Détermination de l'indice de saponification.

- [27] Merabet A., Mouhoubi N., étude de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et l'effet de leurs associations avec les antibiotiques par la méthode en micro-atmosphère, Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira, 2013.
- [28] Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale. 6^{ème} édition, 2011. Disponible sur le site : www.sante.dz/aarn
- [29] Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S.I., Activité antimicrobienne des huiles essentielles sur la microflore native de la bette à carde biologique, *Lebensmittel-Wissenschaftund – Technologie*, 36(7), 2003, p 679-684.
- [30] Bendjilali B, Tantaoui-Elaraki AG, Ayadi A et Ihlal M. Method to study antimicrobial effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *Journal of Food Protection*. 47(10), 1984, p748-752.
- [31] Mondello F., Girolamo A., Scaturro M et Ricci ML., Détermination de la sensibilité de *Legionella pneumophila* à l'huile de *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) par une méthode améliorée de micro-dilution de bouillon dans des conditions contrôlées par la vapeur, *Journal des méthodes microbiologiques*, 77(2), 2009, p 243-248.
- [32] Pibiri MC., Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 2005.
- [33] Mouhi L., Etude des activités biologiques de l'association des huiles essentielles de plantes de la flore Algérienne. Elaboration d'une forme pharmaceutique, Thèse de Doctorat, Université des sciences et de technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar 2017.
- [34] Hellal Z., Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et anti-oxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *citrus*. Application sur la sardine, Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 2011.
- [35] Rodrigues FFG., Costa JGM., Coutinho HDM., Effets de synergie de l'antibiotique gentamicine et de l'huile essentielle de *Croton Zehntneri*, *Phyto médecine*, 2009, p1052-1055.

- [36] Zabeirou H., Étude comparative entre les huiles essentielles de la menthe verte (*Mentha Spicta L*) et de la menthe Poivrée (*Mentha Piperita L*) dans la région d'Ouargla. Mémoire de DES Biochimie, Université de Kasdi Merbbah d'Ouargla, 2005.
- [37] Fakayode O. A. and Abobi K. E. Optimization of oil and pectin extraction from orange (*Citrus sinensis*) peels: a response surface approach. *Journal of Analytical Science and Technology* (2018) 9:20, 1-16.
- [38] AL Majidi M. I. H et Bader A. T. Physicochemical Characteristics of Some Imported Edible Vegetable Oils in Iraq. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015, 6(5), 488-494.
- [39] Novidzro K. M., Wokpor K., Fagla B. A., Koudouvo K, Dotse K., Osseyi E et Koumaglo K. H. Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines de *Griffonia simplicifolia*. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 13(4): 2360-2373, August 2019.
- [40] Bharat P., Sharma P., Kabra A., Formulation & evaluation of polyherbal face cream. *Internationale Pharmaceutica Scienca*, Vol3, 2013, 63-68.
- [41] S. Sakthi Priyadarsini., P. R. Kumar., M. Thiruma, Formulation and evaluation of a herbal antibacterial cream from ethyl acetate extract of leaves of *Spinacia oleracea* Linn. against *Aeromonas* skin and soft tissue infections. *International Journal of Green Pharmacy*, 12 (3) 12 (3), 2018, p537-542.
- [42] Duraivel S., Sk. Asma shaheda., Sk. Rabbani Basha., Sk. Eesaf Pasha., Sk. Jilani., Formulation and evaluation of Antiwrinkle activity of Cream and Nano emulsion of *Moringa oleifera* seed oil. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Vol 9, 2014, p58-73
- [43] Proksch E., pH in nature, humans and skin. *Journal of Dermatology*, 45, 2018, p1044–1052.
- [44] Thakur R.K a, C. Villette b, J.M. Aubry b, G. Delaplace., Formulation–composition map of a lecithin-based emulsion. *Colloids and Surfaces*, 310, 2007, p55–61.
- [45] Ordu J.I and Jaja G., Evaluation of Pulp Oil from *Persea Americana* (Avocado Fruit) in Pharmaceutical Cream Formulation. *International Journal of Advances in Scientific Research and Engineering (ijasre)*, Vol 4 (5), 2018, p14-24.

- [46] Baboota.S., Shakeel.F., Alka.A., Javed.A., Sheikh.S., Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm*, 57, 2007, p315–332.
- [47] Huang.B., Chen W, W Zhang., Cheng F., Haibo L and Hongwei W., Study on the Stability of Produced Water from Alkali/Surfactant/Polymer Flooding under the Synergetic Effect of Quartz Sand Particles and Oil Displacement Agents. *Processes*,8, 315, 2020, p1-20.
- [48] Pinto D., Lameirão F., Delerue-Matos C., Francisca Rodrigues and Paulo Costa., Characterization and Stability of a Formulation Containing Antioxidants-Enriched *Castanea sativa* Shells Extract. *Cosmetics*, 8, 49,2021, p1-8.
- [49] Cossetin L.F, Garlet Q.L., Callegaro Velho M., Gündel S., Ourique A.F., Heinzmann B.M., Monteiro S.G., Development of nanoemulsions containing *Lavandula dentata* or *Myristica fragrans* essential oils: Influence of temperature and storage period on physical-chemical properties and chemical stability. *Industrial Crops & Products*, 160, 2021, p1-9.

Résumé :

L'objectif de ce travail est de caractériser les huiles essentielles des zestes de mandarine, de clémentine et du bigaradier, ainsi que l'huile essentielles et l'hydrolat du petit grain de bigaradier afin de déterminer leurs différents paramètres de qualité, leurs éventuelles conformités aux normes, leurs compositions chimiques globales par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier ainsi que leurs activités antimicrobienne sur les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Candida albicans*. Les aromatogrammes des huiles essentielles ont montré des pouvoirs antibactériens importants alors que la méthode en micro-atmosphère n'a donné aucune interaction. L'association huile/antibiotique et la combinaison des huiles essentielles ont donné différents types d'interactions. L'étude de l'activité inhibitrice a montré que les HEs ont différentes valeurs selon la souche. Les huiles essentielles et de l'hydrolat ont été incorporés dans la formulation de gels et de crèmes. L'étude de stabilité de ces derniers au cours du temps a montré que les propriétés organoleptiques, microscopiques, physico-chimiques, rhéologiques ont été maintenues. Seules les formulations ayant subi un vieillissement ont eu quelques modifications de leurs propriétés dues au déphasage. Néanmoins les activités antimicrobiennes obtenues sont considérables pour tous les échantillons.

Mots clés : Huile essentielle, hydrolat, clémentine, mandarine, bigaradier, formulation, étude de stabilité, vieillissement, caractérisation, activité antimicrobienne.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو توصيف الزيوت الأساسية لقشر الليمونين و نارنج ، بالإضافة إلى الزيت العطري والهيدروسول لحبوب صغيرة من البرتقال الحامض من أجل تحديد معايير الجودة المختلفة، ومطابقتها المحتملة. وفقًا للمعايير، فإن التركيبات الكيميائية الشاملة بواسطة فورييه تقوم بتحويل التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء بالإضافة إلى أنشطتها المضادة للميكروبات على *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* و *Candida albicans*. أظهرت الرسوم البيانية للزيوت الأساسية قوى مضادة للجراثيم بينما لم تعط طريقة *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* و *Candida albicans* . أظهرت الغلاف الجوي الدقيق أي تفاعل أنتج مزيج الزيت / المضاد الحيوي ومزيج الزيوت الأساسية أنواعًا مختلفة من التفاعلات. أظهرت دراسة النشاط المثبط أن لها قيم مختلفة اعتمادًا على السلالة. تم دمج الزيوت الأساسية والهيدروسول في تركيبة المواد الهلامية والكريمات. وقد أظهرت دراسة الثبات لهذا الأخير بمرور الوقت أنه قد تم الحفاظ على الخصائص الحسية والمجهريّة والفيزيائية والكيميائية والريولوجية. فقط التركيبات التي خضعت للشيخوخة لديها بعض التعديلات في خصائصها بسبب تحول الطور. ومع ذلك، فإن الأنشطة المضادة للميكروبات التي تم الحصول عليها كبيرة لجميع العينات .

لكلمات المفتاحية: زيت عطري، هيدروسول ، ليمونين ، الليمونين ، نارنج ، تركيبة ، دراسة الثبات ، الشيخوخة ، التوصيف ، نشاط مضاد للميكروبات

Abstract :

The objective of this work is to characterise the essential oils of mandarin, clementine and bigaradier zest, as well as the essential oil and hydrolat of the small grain of bigaradier in order to determine their different quality parameters, their possible conformities to the standards, their overall chemical compositions by Fourier transform infrared spectroscopy and their antimicrobial activities on the bacterial strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Candida albicans*. The aromatograms of the essential oils showed significant antibacterial powers while the micro-atmosphere method gave no interaction. The combination of oil/antibiotic and the combination of essential oils gave different types of interactions. The study of inhibitory activity showed that HEs have different values depending on the strain. The essential oils and hydrolat have been incorporated into the formulation of gels and creams. The stability study of the latter over time showed that the organoleptic, microscopic, physico-chemical, and rheological properties were maintained. Only formulations that have undergone aging have had some changes in their properties due to phase shift. Nevertheless, the antimicrobial activities obtained are considerable for all samples.

Keywords: Essential oil, hydrolat, clementine, mandarin, bigaradier, formulation, stability study, aging, characterization, antimicrobial activity.