

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض

Faculté Des Sciences de la Nature et de
la Vie et des Sciences de la Terre



جامعة الجيلالي بونعاما – خميس مليانة

Université Djilali Bounaama
Khemis Miliana

Réf : 24/FSNVST/D...../Ms/.....

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Physiopathologie

Screening phytochimique et activités biologique de l'huile
essentielle de Nèroli bigarde. *Citrus aurantium L.*

Présenté par:

BOUALEM RIHAB

TIKIALINE SAIDA

Soutenu publiquement le 23/06/2024 devant le jury composé de :

Présidente	Mme	BEKHEROUF.A.	MAA	U. Khemis Miliana
Promoteur	Mme	DELHOUM . H.	MCB	U. Khemis Miliana
Examineur	Mme	HALFOUI. Z.	MAA	U. Khemis Miliana

Année universitaire : 2023 / 2024

Remerciement

Nous exprimons nos remerciements tout d'abord à ALLAH, le tout puissant de nous avoir donné la santé, la puissance et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nos sincères gratitudes vont à notre noble promotrice Mme Delhoum H pour avoir accepté de nous encadrer et pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses encouragements.

Nous remercions également les membres de jury Mme Benkhrouf A et Mme Halfaoui Z pour avoir fait honneur d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos vifs remerciements à Mr. CHAOUCHI Mohammed l'ingénieur de laboratoire d'analyses et de chromatographie pour son aide durant le stage pratique.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin durant l'élaboration de ce travail.

DEDICACES

*À l'aide de ALLAHle tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que
je dédie :*

À mes chers parents,

*Je souhaite exprimer ma gratitude envers mes parents pour l'éducation exemplaire qu'ils m'ont
prodiguée, ainsi que pour leur amour, leur encouragements, leur soutien constant, leur affection et la
confiance qu'ils ont placée en moi. Qu'ALLAH veille sur eux et leurs accorde une vie longue et
heureuse, empreinte de tendresse, de noblesse et d'affection. Je tiens à leur témoigner ici toute ma
profonde reconnaissance.*

*À ma chère sœur, FEDWA et sa fille Layan, NADJWA et son fils Idriset à mon cher frère Abd Aljalil,
Abd El MOUIZ je suis reconnaissante pour leur soutien et leurs encouragements constants.*

Qu'Allahles protège et leur accorde bonheur et réussite..

*Un grand merci à mes chères amies, véritables sœurs de cœur, pour leur soutien et leur amitié. Je
tiens à exprimer ma reconnaissance particulière envers ma collègue, Saida, pour son aide et son
soutien précieux tout au long de ce travail.*

*Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude envers toute la promotion de **Physiologie Cellulaire et
Physiopathologie 2023-2024.***

Boualem Rihab

DEDICACES

À l'aide de ALLAHle tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

À mes chers parents,

Je souhaite exprimer ma gratitude envers mes parents pour l'éducation exemplaire qu'ils m'ont prodiguée, ainsi que pour leur amour, leurs encouragements, leur soutien constant, leur affection et la confiance qu'ils ont placée en moi. Qu'ALLAHveille sur eux et leur accorde une vie longue et heureuse, empreinte de tendresse, de noblesse et d'affection. Je tiens à leur témoigner ici toute ma profonde reconnaissance.

a mon cher frère Mohamed et sa femme Bakheta et ses enfants : Sorour, Moustapha Abd Allah et Lokmane. Et à mes chères soeur :Sourya et son mari Mouloud et ses enfants : Mohamed Abd Aldjalil et Islam, Houda, Nezha et sa fille Asma Taqwa. Je suis reconnaissante pour leurs soutien et leurs encouragements constants. Qu'Allahles protège et leur accorde bonheur et réussite.

Un grand merci à mes chères amies, véritables sœurs de cœur, pour leur soutien et leur amitié. Je tiens à exprimer ma reconnaissance particulière envers ma collègueRihab, pour son aide et son soutien précieux tout au long de ce travail.

Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude envers toute la promotion de Physiologie Cellulaire et Physiopathologie 2023-2024.

Tikialine Saida

Table des matières

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION GENERALE	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : <i>Citrus aurantium. L</i>	
1. Taxonomie.....	5
2. Botaniques :	5
3. Histoire et répartition géographique :.....	6
4. Constituants actifs de <i>C. aurantium</i> :	6
4.1. Jus de <i>C. aurantium</i> :.....	6
4.2. Fleurs de <i>C. aurantium</i>	6
4.3. Graines de <i>C. aurantium</i> :	6
4.4. Feuilles de <i>C. aurantium</i> :	7
4.5. Pelures de <i>C. aurantium</i> :.....	7
Chapitre 2: L'huile essentielle Néroli bigarade	
1. Histoire de Néroli bigarade	10
1. L'huile essentielle Néroli bigarade.....	10
2. Caractéristiques.....	10
4. Composition chimique et profil stéréochimique :	10
4.1. La valeur commerciale.....	10
4.2. Les constituants de l'HE de Néroli bigarade	10
4.3. Les travaux sur le profil énantiomérique.....	11
4.4. L'influence des paramètres environnementaux	11
4.5. Les divergences énantiomériques.....	12
5. Activités biologiques de Néroli bigarade	12
5.1. Effet sur les symptômes de la ménopause :.....	12
5.2. Effets sur l'hypotension.....	12
5.3. Effet antifongique	13
5.4. Effet antioxydant :.....	13
5.5. Effet antimicrobien:	13
5.6. Effet analgésique.....	14
5.7. Effet radioprotecteur	14

5.8.Effets sur le système cardiovasculaire :	14
2.Propriétés et indications thérapeutiques :	14
3.Réponse physiopathologique à l'aromathérapie des soins de santé :	16
4.Précautions d'emploi :	17

Chapitre 3 :Méthodes d'extraction des huiles essentielles

I.Méthodes d'extraction des huiles essentielles :	19
1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :	19
2. Extraction par Hydrodistillation :	19
3. Distillation « sèche»	20
4. Enfleurage :	21
5. Expression à froid	21
6. Extraction par solvant organique	21
6.1.Extraction assistée par micro-ondes	22
6.2.Extraction par CO2 supercritique	22
7. L'expression mécanique :	23
Matériels et Méthodes	24
1.Objectif de l'étude	25
2.Site de récolte	25
3. Matériel végétal	25
4. Extraction d'huile essentielle.....	26
5. Le rendement d'extraction	26
6. Screening phytochimique	27
7. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de Néroli	27
7.1. Dosages des composés phénoliques totaux	27
7.1.1 Principe.....	27
7.1.2. Protocole.....	27
7.1.3. Expression des résultats.....	28
7.2. Dosage des flavonoïdes.....	28
7.2.1.Principe.....	28
7.2.2. Protocole.....	28
7.2.3. Expression des résultats.....	28
8. Etude des activités biologiques.....	29
8.1. Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle	29
8.1.1. Test du pouvoir antioxydant par Réduction du Fer (FRAP)	29
8.1.2. Test de piégeage de radical libre DPPH	30

9. Evaluation de l'activité anti inflammatoire <i>invitro</i>.....	30
9.1. Principe.....	30
9.2. Protocol.....	30
10. Analyses statistiques.....	31
Résultats et discussion.....	32
2. Screening phytochimique des huiles essentiel de Nèroli	34
3. Quantification des composés phénoliques d'HE	35
3.1. Dosage des polyphénols.....	35
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	36
4. Evaluation de l'activité antioxydante	37
4.1. Test de réduction de fer FRAP.....	37
2.1. Test de réduction de radical libre de DPPH	39
5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	41
Conclusion et perspective	35

Les Références Bibliographiques

Annexes.....	xlvii
---------------------	--------------

Résumé :

Citrus aurantium L.famille

Liste des figures

Figure 1 : : D'extraction par entraînement à la vapeur	19
Figure 2:De l'hydrodistillation	20
Figure 3 : Schéma de préparation de l'extrait de rose en Herzégovine	21
Figure 4: schéma d'extraction par l'enfleurage.....	21
Figure 5 : montage d'extraction assistée par micro-onde	22
Figure 6:Montage de l'expression à froid.....	23
Figure 7: Localisation de la zone d'étude (Google Mapp, 2024).	25
Figure 8:les fleurs de Néroli bigarade <i>Citrus aurantium L</i> (Photo originale 2024).....	26
Figure 9 : Appareil hydrodistillation (Clevenger).....	26
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	36
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	37
Figure 12 : Histogramme de pourcentage d'inhibitions de l'activité antioxydante de huile de Néroli par methode de FRAP.....	38
Figure 13 : Concentration d'inhibition à 50 % (ug/ml) d'huile sur le piègeage FRAP.....	38
Figure 14 : le pourcentage d'inhibitions de l'activité antioxydant DPPH	39
Figure 15 : concentration d'inhibition à 50 % (ug/ml) d'huile essentielle sur le piègeage de radical libre de DPPH.....	40

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification de <i>Citrus aurantium L.</i>	5
Tableau 2: Composition chimique et profil énantiomérique de l'HE de Néroli bigarade.	11
Tableau 3: Voies d'administration et posologies de l'HE de Néroli bigarade	15
Tableau 4 : Différents test de Screening phytochimique.....	27
Tableau 5 : Rendement en huile essentielle de néroli bigarade	34
Tableau 6 :Résultats des tests phytochimiques d'huile essentielle de Néroli bigarde.....	35
Tableau 7: pourcentage d'inhibitions de l'activité anti-inflammatoire.....	41

Liste des abréviations

HE :Huile essentielle

THS :Sigle de traitement hormonal substitutif

ABTS : 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)

FRAP :Ferric Reducing Antioxidant Power

DPPH :2,2-diohène-1-picrylhydrazyl

NaOH :Hydroxyde de sodium

BHT :Butylated Hydroxy Toluene (hydroxytoluène butylé)

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium

KOH : Hydroxyde de potassium

Abs C:Absorbance de contrôle.

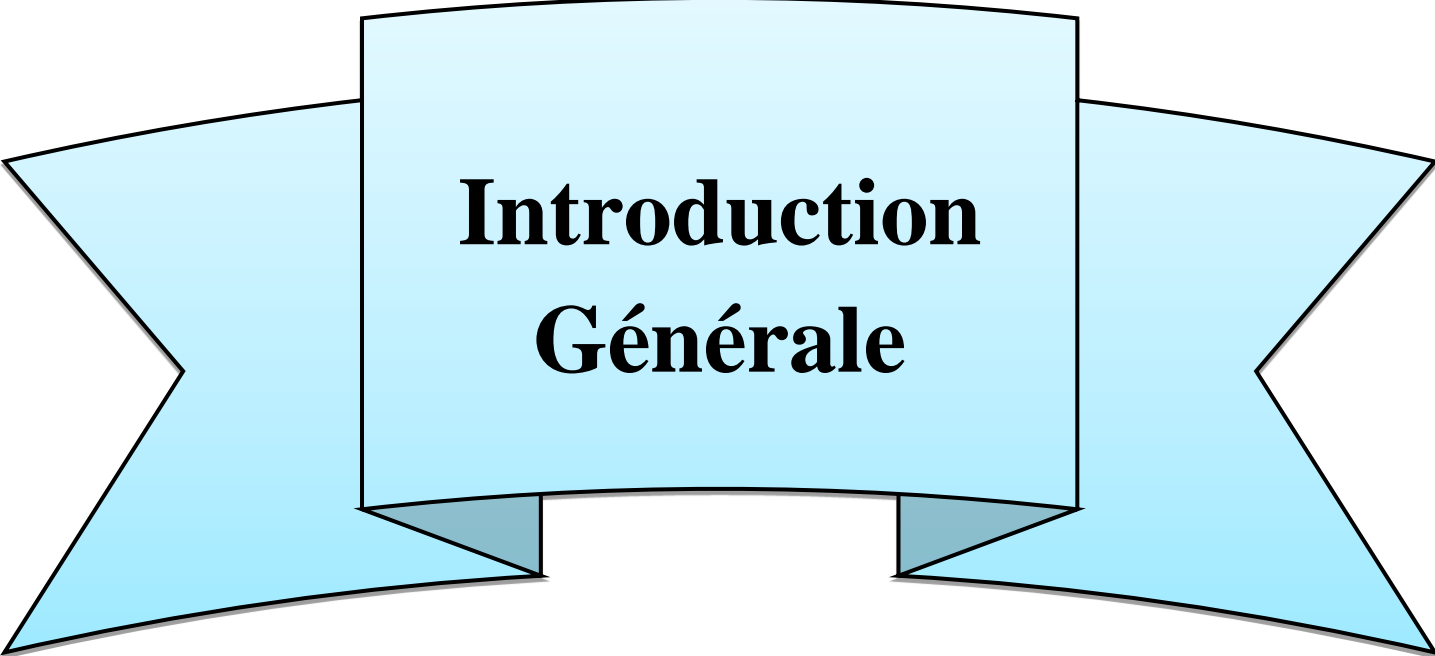
Abs T:Absorbance de test

HEs :Huiles essentiell

IC₅₀: Concentration de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50%

R% : Pourcentage de rendement

H₂SO₄ : Acide phosphorique



**Introduction
Générale**

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes forment la base de la médecine traditionnelle grâce à leur richesse en métabolites secondaires utilisées comme composés actifs. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (Ventrella and Marinho 2008; Ladoh, Dibong et al. 2014).

Depuis toujours, les huiles essentielles (HEs), et plus généralement les plantes aromatiques, ont été utilisées quotidiennement par l'homme pour se parfumer, cuisiner et se soigner. Dans les temps les plus anciens, les plantes aromatiques étaient utilisées entières, généralement en infusion ou décoction. Dans une seconde époque, elles ont été brûlées ou mises à macérer dans des huiles végétales (Aburjai and Natsheh 2003).

Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, de leur potentiel important en activité biologique ; antioxydante, anti-inflammatoires ; antiseptiques, antimicrobiennes, antivirales, antifongiques, bactéricides ; antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc. (Dung, Kim et al. 2008).

Le *Citrus aurantium L.*, communément appelé orange amère ou orange acide, est un arbre appartenant à la famille des Rutaceae. En Tunisie, *C. aurantium L.* est cultivé dans les régions chaudes et à l'abri des vents forts. L'oranger amer est très résistant au froid, aux excès d'eau et à plusieurs maladies. Grâce à ces qualités principales, l'orange amère est largement utilisée comme porte-greffe (Lota, de Rocca Serra et al. 2001).

C. aurantium L. est l'une des espèces les plus fréquemment utilisées à des fins médicinales traditionnelles et modernes. Des études antérieures ont souligné que les préparations à base d'écorces, de fleurs et de feuilles de *C. aurantium L.* sont populaires pour traiter les troubles du tractus gastro-intestinal, pour son action diurétique contre la tachycardie et les rhumatismes et pour minimiser les troubles du système nerveux central (Momes et al., 2009). De plus, *C. aurantium L.* est une plante fréquemment utilisée comme sédatif dans les consultations externes (Hernandez, Munoz et al. 1984; de Moraes Pultrini, Galindo et al. 2006). Récemment, les extraits de fruits non mûrs ont gagné en popularité pour le traitement de l'obésité, comme alternative aux alcaloïdes d'éphédrine (Arbo, Schmitt et al. 2009).

Ces fleurs donnent l'eau de fleur d'oranger, cette eau florale est utilisée comme arôme alimentaire (sirops, salades de fruits, café et pâtisserie). Ainsi que comme parfum pour le corps et le linge (Arbo, Schmitt et al. 2009). Elle est également utilisée dans des produits thérapeutiques (Ayadi, Ayed et al. 2004). Traditionnellement, l'eau florale était utilisée, en Tunisie, comme stimulant cardiaque et carminatif pour le système digestif, et pour calmer les bébés et les aider à s'endormir.

Elle serait également utile pendant les programmes de désintoxication ou pour arrêter une habitude ou une addiction comme le tabac (Arias and Ramón-Laca 2005; Jeannot, Chahboun et al. 2005)

En plus des eaux aromatiques, la distillation des fleurs d'oranger amer donne le Néroli, une huile essentielle rare. Cette huile volatile possède un parfum sensuel et constitue le cœur de l'un des parfums les plus durables au monde, l'eau de Cologne. Elle est également utilisée en pharmacie comme agent de saveur. En fait, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé l'utilisation de fleurs d'orange amère en petites quantités même dans certains médicaments (Jeff 2002).

INTRODUCTION GENERALE

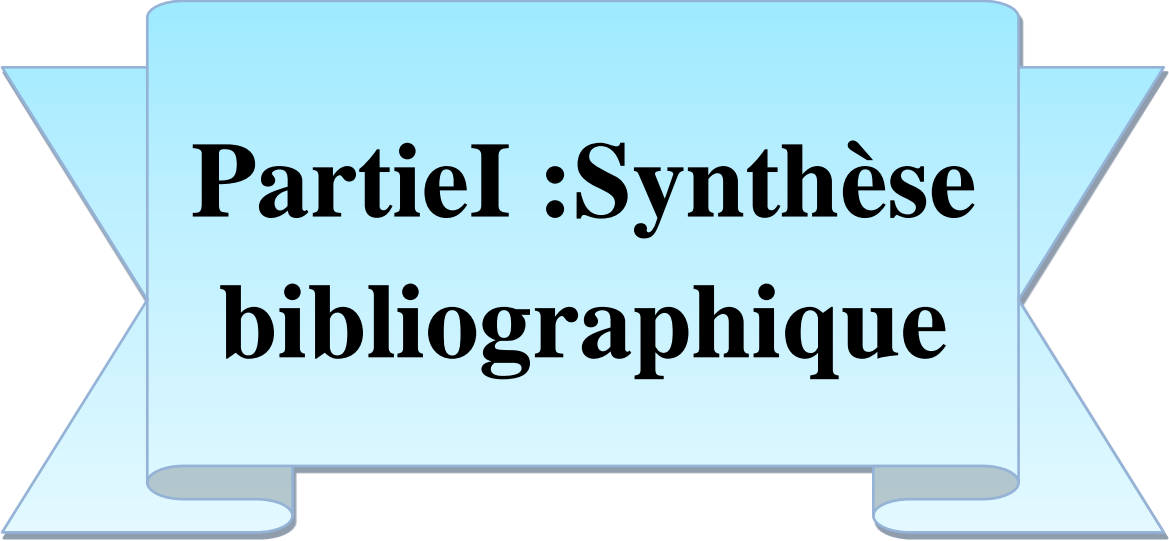
Bien que l'huile de Néroli soit produite dans de nombreux pays comme l'Algérie, le Maroc, l'Égypte, la France et l'Espagne, les huiles produites en Tunisie ont toujours été considérées comme les plus fines et les plus chères. L'activité de distillation des fleurs de *C. aurantium L.* représente une valeur considérable pour l'économie tunisienne puisqu'elle dégage des revenus de trois à quatre millions de dinars par an à l'exportation. Le néroli est principalement exporté vers la France, en particulier vers la région de Grasse (NIS, 2008).

Malgré l'importance économique de l'huile de Néroli Algérienne, aucune étude n'a été menée pour étudier ses activités biologiques. Cela nous a incités à étudier les fleurs de *C. aurantium L.* pour les constituants de l'huile de néroli et leurs activités antioxydantes et anti inflammatoires.

L'objectif de ce travail est l'étude phytochimique d'huile essentielle de Néroli, en l'occurrence les activités antioxydantes, et anti-inflammatoires sont également étudiées.

Le plan de notre travail est structuré comme suit :

- Une introduction générale dans laquelle la problématique est posée.
- Dans la première partie, nous examinons une recherche bibliographique sur les plantes aromatiques générale, les huiles essentielles et leurs propriétés biologiques en particulier.
- Dans la deuxième partie, on aborde l'étude expérimentale en mentionnant le matériel utilisé et en décrivant les méthodes opératoires.
- Dans la troisième partie, tous les résultats expérimentaux obtenus sont présentés et discutés.
- Enfin, une conclusion générale vient achever ce travail renfermant également des perspectives dans le futur.



**Partie I : Synthèse
bibliographique**



Chapitre 1 :
Citrus aurantium. L

Le bigaradier, oranger amer ou oranger de Séville (*Citrus aurantium L.*) est une espèce d'arbres de la famille des *Rutacées* (agrumes). Le fruit — *la bigarade* ou orange amère — les feuilles, les rameaux et les fleurs parfumées ont de nombreuses applications pharmaceutiques, alimentaires et en parfumerie, c'est également un porte-greffe pour d'autres agrumes et un arbre décoratif (Wu, Prochnik et al. 2014).

C'est à l'origine un hybride entre le pamplemoussier *Citrus maxima* et le mandarinier *Citrus reticulata* (Curk, Ancillo et al. 2015).

1. Taxonomie

Citrus aurantium (orange amère) est une plante appartenant à la famille des *Rutacées* Nom commun est *Orange amère, Orange de Séville, Zhi Shi, Chongcao, Ch'Eng, Chin Ch'Iu, Hua Chu Hung, Kuang Chu, Orange bitter, Naranja Agria, Néroli, Petitgrain, Orange de Séville, Orange bitter, Néroli*(Suryawanshi 2011).

Tableau 1 : classification de *Citrus aurantium L.*(Ghédira and Goetz 2015).

Règne	Plante (végétal)
Sous-règne	Viridiplantae
Division	Magnoliophyta (Tracheophyta)
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidées
Ordre	Sapindales
Famille	<i>Rutacée</i>
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>C.aurantium L.</i>
Sous-espèce	<i>Citrus amara, Citrus bergamia, Citrus bigaradia</i> et <i>Citrus vulgaris</i> .

2. Botaniques :

Tous les agrumes appartiennent au genre *Citrus*, famille des *Rutacées*. L'orange amère (« aigre ») fait référence à *C. aurantium L.* et est hybride entre *Citrus maxima* (Pomelo) et *Citrus reticulata* (Mandarin) (Curk, Ancillo et al. 2015). Cette plante est originaire d'Asie du Sud- Est. Les autochtones des îles des mers du Sud comme Guam, Samoa et Fidji pensent que cet arbre a été introduit sur leurs terres à l'époque préhistorique. Cette plante est désormais largement cultivée dans toute la région méditerranéenne, en Guinée, aux Antilles, au Brésil ainsi qu'en Californie et en Floride.

L'oranger amer pousse dans les climats subtropicaux et quasi tropicaux et peut facilement tolérer des conditions défavorables. Il s'adapte à un large éventail de conditions pédologiques et survit dans des conditions extrêmes. La hauteur du *bigaradier* varie de 2 à 9 m et possède un pinacle plus compact que celui de l'oranger doux ; il a une écorce lisse et brune, des rameaux verts et est anguleux et flexible. La plante produit des feuilles tout au long de l'année. Les fleurs sont très parfumées, seules ou en petites grappes dans à l'aisselle des feuilles et mesurent environ 3,7 cm de large. Le fruit est rond, aplati ou oblong-ovale, de 7 à 8 cm de large, à surface rugueuse, avec une peau épaisse et aromatique amère qui vire au rouge-orange vif à maturité. La peau des fruits possède un grand nombre de petites glandes

sébacées enfoncées. Le centre du fruit devient creux lorsque le fruit atteint sa pleine croissance (Anwar, Ahmed et al. 2016).

3. Histoire et répartition géographique :

Citrus aurantium L. L'oranger, ou bigaradier, est un petit agrume, aux fleurs blanches parfumées, appartenant à la famille des *Rutacées* (Mannucci, Calapai et al. 2018). Les agrumes sont originaires d'Asie tropicale (Suryawanshi 2011). mais on les trouve également dans tous les pays tropicaux et subtropicaux. On le trouve également en Afrique de l'Est, péninsule arabique, Syrie et Cultivé en Espagne, en Italie et en Amérique du Nord (Mannucci, Calapai et al. 2018). mais il est également présent en Algérie, Tunisie, Maroc, Égypte, France et Espagne (Ammar, Bouajila et al. 2012).

4. Constituants actifs de *C. aurantium* :

Les métabolites secondaires des plantes, ou composés phytochimiques, ont des propriétés bien établies qui sont d'une importance cruciale pour la santé humaine, comprenant, entre autres, des activités anticancéreuses, antiprolifératives, hypolipémiantes et cardio-protectrices (Mannucci, Calapai et al. 2018). Leur puissante activité antioxydante est évidemment liée à leur capacité naturelle à chasser les radicaux libres et à perturber les chaînes radicalaires. La plante *C. aurantium* regorge de composés phytochimiques. Les flavonoïdes, les principaux composés bioactifs contenus dans *C. aurantium*, sont regroupés en flavanones, flavones et flavonols. Des limonoïdes, tels que la limonine et la nomiline, et des alcaloïdes, tels que la p-synéphrine, sont également rencontrés (Suntar, Khan et al. 2018).

Dans ce qui suit, et comme le montre, les parties de *C. aurantium* comprenant le jus, les fleurs, les graines, les feuilles et les écorces sont méthodiquement discutées en ce qui concerne leur teneur en molécules bioactives. Il est à noter que la composition chimique ou le pourcentage de biomolécules est évidemment affecté par la zone géographique, la saison de croissance et la période de récolte.

4.1. Jus de *C. aurantium* :

Le jus de *C. aurantium* est principalement utilisé dans les vinaigrettes comme alternative au jus de citron, fournissant sa saveur typique (Ersus and Cam 2007). Le jus de *C. aurantium* contiendrait 86% d'acides phénoliques sur le total des composés phénoliques (Tounsi, Wannan et al. 2011).

4.2. Fleurs de *C. aurantium*

Les fleurs de *C. aurantium* sont largement utilisées dans la région méditerranéenne comme agent aromatisant alimentaire et dans plusieurs boissons et pâtisseries. Ils sont également utilisés dans les produits médicaux pour leurs propriétés antidépressives, anti-infectieuses et sédatives, ainsi que dans les produits de soin de la peau (Sarrou, Chatzopoulou et al. 2013). Les fleurs d'oranger amer contiennent plusieurs produits comprenant des huiles essentielles, l'hydrolat et l'absolu. Les hydrolats sont les coproduits de l'hydrodistillation ou de la distillation à la vapeur d'eau des plantes aromatiques. Ce sont des huiles essentielles précieuses qui sont moins présentes en abondance (Labadie, Ginies et al. 2015). L'absolu est un mélange obtenu à partir des fleurs de plantes aromatiques en utilisant de l'alcool éthylique comme solvant d'extraction (après précipitation des cires) (Değirmenci and Erkurt 2020).

4.3. Graines de *C. aurantium* :

Les graines d'agrumes sont connues pour contenir des constituants bioactifs, notamment des limonoïdes, des caroténoïdes et des composés phénoliques. Ils étaient utilisés en médecine comme propriétés analgésiques, anti-irritantes et comme antidotes contre les poisons et les toxines (Hamedi, Zarshenas et al. 2019). Comme cela est couramment rapporté dans la littérature, les flavonoïdes les plus

abondants dans les graines de *C. aurantium* sont l'hésperidine, la néohésperidine, la naringine et la narirutine. Ces composés sont d'une grande importance pour la santé humaine en raison de leurs propriétés protectrices anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydantes et cardiovasculaires (Abou Baker, Ibrahim et al. 2020).

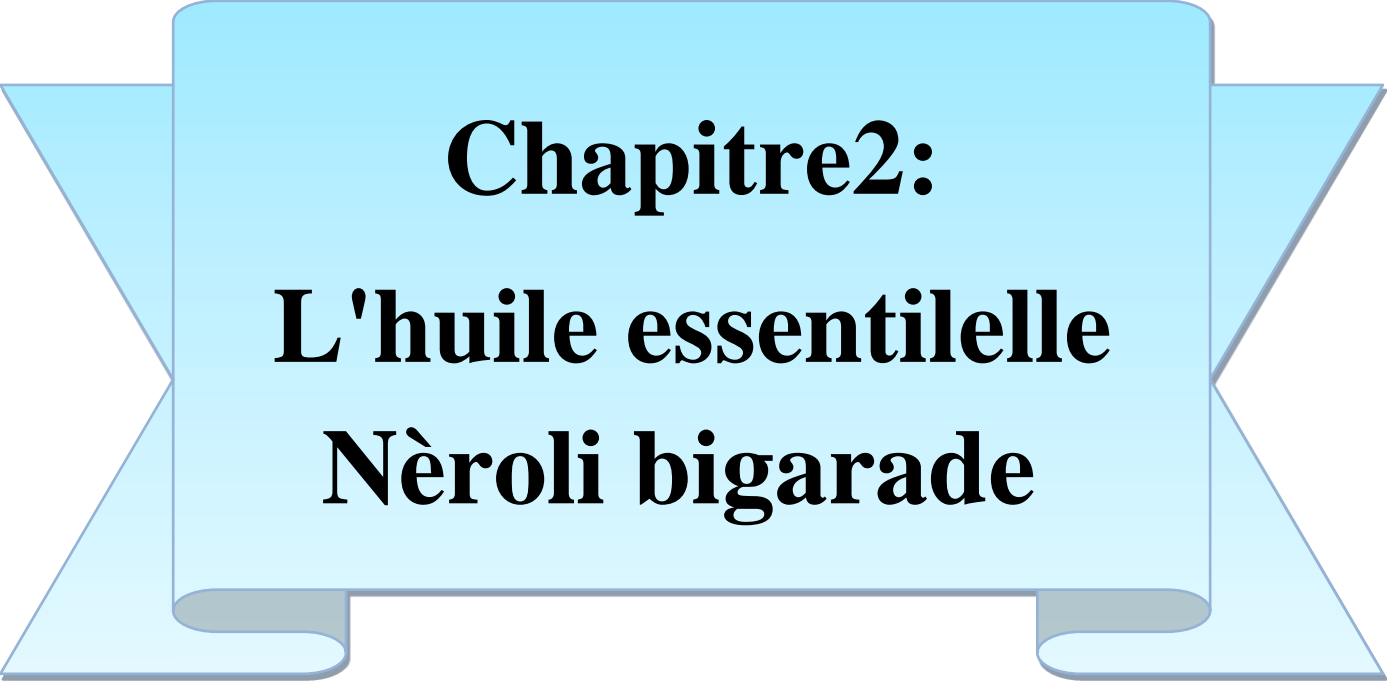
4.4. Feuilles de *C. aurantium* :

Les feuilles d'agrumes sont également une source importante de constituants bioactifs, notamment des flavonoïdes, de l'acide ascorbique et des constituants phénoliques reconnus comme antioxydants naturels (Khettal, Kadri et al. 2017). Les feuilles de *C. aurantium* peuvent être utilisées dans les industries pharmaceutiques car elles peuvent être intégrées dans des formulations médicamenteuses (Suryawanshi 2011).

De nombreuses études ont été menées sur les feuilles de *C. aurantium*; elles sont connues pour contenir diverses huiles essentielles, notamment principalement du limonène, du linalol, de l' α -terpinéol et de l'acétate de linalyle (Gholivand, Piryaei et al. 2013). L'analyse phytochimique des feuilles de *C. aurantium* a révélé la présence de plusieurs composés, notamment des flavanoïdes, des phytostérols, des glucides, des saponines, de l'huile volatile, des tanins, des terpénoïdes et des protéines (Periyanyagam, Dhanalakshmi et al. 2013).

4.5. Pelures de *C. aurantium* :

À l'échelle industrielle, le rendement en jus des agrumes est d'environ la moitié du poids du fruit, tandis que la masse partielle résiduelle est principalement constituée d'écorces (40 à 50%). Des milliers de tonnes d'écorces d'agrumes sont produites chaque année en tant que déchets des industries de transformation. Ils peuvent causer de graves problèmes d'élimination et polluer considérablement l'environnement, car seule une petite quantité est utilisée et la majeure partie restante est brûlée (Shan 2016). Néanmoins, ces pelures contiennent une multitude d'huiles volatiles telles que les sesquiterpènes, les monoterpènes et leurs dérivés, et de nombreux autres constituants, notamment des flavones et des alcaloïdes tels que l'octopamine, la synéphrine, la N-méthylthyramine et les caroténoïdes (Singh, Singh et al. 2021). Ils sont considérés comme des produits sûrs couramment utilisés dans diverses industries: dans les industries des cosmétiques, des parfums, des produits de soins corporels et du savon (en raison de leur parfum commercialisable) et dans les industries des aliments, des boissons et des crèmes glacées en tant qu'agents aromatisants et acidifiants (Burnett, Fiume et al. 2019). *C. aurantium* a une peau épaisse qui est plus riche en pectine que la peau d'orange douce (Suryawanshi 2011), et qui contient des quantités plus élevées d'huiles essentielles par rapport aux autres espèces d'agrumes (Hosni, Zahed et al. 2010). La teneur en huiles essentielles des pelures de *C. aurantium* variait entre 0,1 et 1,7% (Burnett, Fiume et al. 2019), le limonène étant le composant volatil le plus abondant (Teneva, Denkova-Kostova et al. 2019). Les détails des composés trouvés dans la peau italienne de *C. aurantium* ont été fournis comme suit: hydrocarbures monoterpéniques représentant 72,5% tandis que les monoterpènes oxygénés représentant 7% avec le principal composant limonène (66%) (Tundis, Loizzo et al. 2012). Récemment, une composition chimique légèrement différente des huiles essentielles de *C. aurantium* a été signalée.



Chapitre2:
L'huile essentielle
Nèroli bigarade

1. Histoire de Néroli bigarade

Le bigaradier est un arbre implanté sur les côtes méditerranéennes aux alentours du XIIème siècle. Il est utilisé depuis des siècles pour apaiser les maux d'estomac, et l'on utilise ses fruits, ses fleurs et ses feuilles pour fabriquer trois huiles essentielles différentes : l'huile essentielle d'orange amère, obtenue à partir du zeste, l'huile essentielle de Néroli, obtenue par distillation des fleurs, et l'huile essentielle de petit grain bigarade obtenue à partir de la distillation des jeunes rameaux. Au final, chacune d'entre elles a une composition chimique bien différente (Chapot 1964)

1. L'huile essentielle Néroli bigarade

Citrus aurantium, également connu sous le nom d'huile de Néroli, C'est un liquide amer fortement parfumé, obtenue par la hydro distillation des fleurs du Bigaradier, arbre produisant l'orange amère. Son nom vient de la Princesse Néroli qui l'utilisait pour se parfumer. Produit par hydrodistillation des fleurs de *Citrus aurantium* fraîches (Ellouze, Abderrabba et al. 2012).

2. Caractéristiques (Laurain-Mattar, Couic-Marinier et al. 2023).

- **Autre appellation** : Oranger *bigarade* fleurs.
- **Famille** : *Rutacées*.
- **Organes producteurs** : fleurs.
- **Particularités botaniques** : petit arbre au feuillage toujours vert dont le fruit est une baie amère et acide.
- **Origine géographique** : Paraguay et rives de la Méditerranée (Espagne, Maroc).
- **Densité** : 0,864 à 0,873, à 20°.
- **Rendement** : 0,1 %. Il faut environ une tonne de fleurs pour obtenir un litre d'HE par distillation à la vapeur d'eau.
- **Caractéristiques organoleptiques** : à la sortie de l'alambic, l'HE est de couleur jaunâtre. Au contact de l'air et de la lumière, elle s'oxyde et devient très rapidement brun-rouge. En présence d'alcool, elle développe une fluorescence bleu-violet due à la présence d'anthranilate de méthyl dont l'odeur suave est caractéristique des fleurs d'oranger. L'HE de Néroli est très utilisé pour créer des parfums auxquels son odeur fraîche et acidulée donne une note de cœur. La récolte et la distillation des fleurs ont lieu de fin avril à début juin sous le climat méditerranéen.
- **Norme alimentaire** : Afnor NF.

4. Composition chimique et profil stéréochimique :

Pour garantir sa qualité pharmaceutique et être utilisée en aromathérapie, il est essentiel que l'huile essentielle de Néroli bigarade respecte les normes Afnor, ISO 3 517.

4.1. La valeur commerciale

Liée à une forte demande et à une production limitée à quelques zones géographiques, de multiples modes d'adultération de plus en plus sophistiqués sont constatés (Pierson, Fernandez et al. 2021). La précision du profil énantiomérique s'avère l'outil le plus efficace pour évaluer sa qualité et son authenticité en tenant compte de sa variabilité entre les différentes origines.

4.2. Les constituants de l'HE de Néroli bigarade

Chapitre 2 : L'huile essentielle Néroli bigarade

En grande majorité de molécules chirales (tableau 02)(Mosandl and Juchelka 1997; Dugo, Bonaccorsi et al. 2011). Elle se caractérise par une dominance de leur forme lévo-gyre : (S, S)-(-)- α -pinène, (S, S)-(-)- β -pinène, (R)-(-)-linalol, (R)-(-)- acétate de linalyle et (R)-(-)- terpinène-4-ol. En outre, les énantiomères, (R)-(+)- limonène, (R)-(+)- α -terpinéol et (S)-(+)-(E) -nérolidol, sont principalement dextrogyres. En raison de leur pureté énantiomérique élevée (93 à 99 %), les molécules (R)-(+)- limonène, (S, S)-(-)- β -pinène, (R)-(-)- acétate de linalyle et (S)-(+)-(E) Néroli dol pourrait constituer des marqueurs stéréo-chimiques d'authenticité.

Tableau 2: Composition chimique et profil énantiomérique de l'HE de Néroli bigarade.

Principales molécules	%	Énantio type	%
Linalol	43.7-54.3	(R)-(-)- linalol	70,8-81,5
Limonène	6.0 à 10.2	(R)-(+)- limonène	98,1-93,1
β -pinène	3.5à 5.3	(S,S)-(-)- β -pinène	99,2-99,9
Géranol	2.8-3.6	Non chirale	
α -terpinéol	3.9-5.8	(R)-(+)- α -terpinéol	69,1-72,3
Acétate de linalyle	3.5-8.6	(R)-(-)- acétate de Linalyle	95,4-98,2
(E)-nérolidol	1.3-4.0	(S)-(+)-(E) -nérolidol	> 98
Acétate de géranyle	3.4-4.1	Non chirale	
Nérol	1.1-1,3	Non chirale	
Terpinène-4-ol	3.9-5.8	(R)-(-)- terpinène-4-ol	32,6-64
(2E, 6E)-farnésol	1.6-3.2	Non chirale	
Acétate de néryle	1.7-2.5	Non chirale	
α -pinène	< 2	(S, S)-(-)- α -pinène	86-97,8
β -caryophyllène	< 2	Non précisé	–

4.3. Les travaux sur le profil énantiomérique

Huiles essentiell de Néroli bigarade issues de différents pays ont montré que celles qui sont originaires du Maroc, de Tunisie et du Liban présentent le même énantiotype, caractérisé par la dominance de la forme lévogyre des α -pinène, β -pinène, linalol, acétate de linalyle et terpinène-4-ol (Cuchet, Anchisi et al. 2021). Les énantiomères du limonène, de l' α -terpinéol et du (E)-nérolidol sont principalement dextrogyres. L'ensemble des résultats de ces travaux étaient en accord avec les profils énantiomériques décrits précédemment (Schipilliti, Dugo et al. 2012).

4.4. L'influence des paramètres environnementaux

La forte influence des paramètres environnementaux sur la composition chimique de l'HE est rapportée. Cette variabilité est considérée comme une manifestation de différences génotypiques (Lawrence 1986). Par exemple, l'HE de Néroli bigarade Brésilienne présente une teneur plus élevée en β -pinène (11,1 %) et en farnésol (7,4 %), mais moindre en linalol (30,1 %). En revanche, dans l'HE de Néroli bigarade Corse, l'acétate de linalyle (14,3 %), l' α -terpinéol (5,3 %), l'acétate de néryle (1,8%), l'acétate de géranyle (3,8 %) et le nérol (1,6 %) sont plus présents. Il apparaît que les fluctuations des pourcentages constitutifs de certains des composants de *Citrus aurantium L. var amara*(bigarade) de diverses provenances persistent, même si elles sont soumises à des conditions horticoles similaires(Boussaada, Skoula et al. 2007). Des différences entre les échantillons d'HE de Néroli bigarade d'Égypte et celles d'autres origines géographiques sont en outre signalés(Bonaccorsi,

Sciarrone et al. 2011), avec une composition chimique plus riche en géraniol (1-5 %), α -terpinéol (2-8 %), acétate de linalyle (3-20 %) et acétate de néryle (7 %), mais moins riche en β -pinène (2-8 %) et β -caryophyllène (< 0,94 %). Les rapports énantiomérique du limonène, du linalol, du terpinène-4-ol et de l' α -terpinéol sont en accord avec les données de la littérature, le rapport énantiomérique du β -pinène est légèrement différent, tandis que celui de l' α -pinène l'est fortement ; l'excès énantiomérique de l'acétate de (-)-linalyle est également très élevé.

4.5. Les divergences énantiomériques

Ont été relevées pour des composés mineurs (α -pinène, sabinène, terpinène-4-ol et β -phellandrène), tous présents à moins de 2 % dans les HE de Néroli bigarade. La détermination du rapport énantiomérique de ces composés chiraux mineurs permettrait d'obtenir une signature énantiomérique des HE étudiées et d'améliorer leur authentification.

5. Activités biologiques de Néroli bigarade

5.1. Effet sur les symptômes de la ménopause :

Les femmes en transition ménopausique présentent fréquemment des symptômes vasomoteurs et psychologiques, mais les deux ont des facteurs sous-jacents différents. Les symptômes psychologiques sont associés au mode de vie et aux facteurs comportementaux du sujet, alors que les symptômes vasomoteurs montrent des corrélations beaucoup plus fortes avec les stades de la ménopause qu'avec le mode de vie et les éléments environnementaux (Hardy and Kuh 2002). De plus, la diminution des œstrogènes est un facteur important dans le mécanisme complexe des bouffées de chaleur (Deecher 2005). La présente étude a montré que les symptômes vasomoteurs s'amélioraient significativement après un traitement avec 0,1% d'huile de Néroli. Les neurotransmetteurs tels que la 5-HT sont impliqués dans la régulation de la température corporelle; en utilisant le même mécanisme, le THS active la noradrénaline ou des neurotransmetteurs comme la 5-HT pour traiter les symptômes vasomoteurs (Deecher 2005).

Les améliorations significatives des symptômes vasomoteurs observées chez les sujets qui ont inhalé de l'huile de Néroli étaient probablement dues à l'activation des neurotransmetteurs 5-HT, un mécanisme similaire aux effets anxiolytiques de l'huile de Néroli chez les modèles animaux (Costa, Cury et al. 2013).

Les terpènes, composés d'isoprène comme élément constitutif, peuvent être trouvés dans la plupart de ces herbes, ainsi que dans l'huile de Néroli. Bien que les taux sériques d'œstrogènes n'aient pas augmenté de manière significative après le traitement à l'huile de Néroli, les œstrogènes sériques ont légèrement augmenté. Semblable à d'autres herbes, l'huile de Néroli peut affecter le système endocrinien en soulageant les symptômes de la ménopause (Choi, Kang et al. 2014).

5.2. Effets sur l'hypotension

L'huile de Néroli peut également réduire la pression artérielle en agissant sur le système nerveux autonome. La stimulation olfactive avec du limonène, qui est abondante dans l'huile essentielle de Néroli, s'est avérée augmenter l'activité nerveuse sympathique en activant les récepteurs H1 dans un modèle animal (Shen, Nijima et al. 2005). De plus, il a été rapporté que l'huile de Néroli contient des amines adrénérgiques telles que la synéphrine, l'octopamine et la tyramine (Pellati, Benvenuti et al.

2002). Ces résultats suggèrent que le traitement à l'huile de Néroli module les nerfs autonomes pour réduire la pression artérielle.

5.3. Effet antifongique

les travaux réalisés par Hsouna, Hamdi et al (2013). qui ont été étudiés l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* en mesurant la zone d'inhibition de la croissance (GIZ) et Concentrations fongicides minimales (MFC) contre diverses espèces fongiques. Ils ont signalé la capacité de cet huile essentielle à contrôler *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus fumigatus* (GIZ = 15-22 mm; CFM = 0,078-1,25 mg/mL), *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium culmorum* (GIZ = 19-22 mm; CFM = 0,078-0,156 mg/mL) et *Alternaria alternata* (GIZ = 15±0,4 mm; MFC=1,25±0,8 mg / mL), tous considérés comme un défi pour les industries alimentaires car ils sont responsables de la détérioration de nombreux aliments. Les activités antifongiques de l'huile essentielle ont été attribuées au limonène et (E) nérolidol en particulier, car la littérature rapporte une forte activité antifongique de ces molécules (Kim, Marshall et al. 1995).

(Caccioni, Guizzardi et al. 1998). Ont examiné l'effet des composants volatils des huiles essentielles d'agrumes sur *P. digitatum* et *P. italicum* croissance. L'activité antifongique a été étudiée en déterminant le poids sec du mycélium pathogène après incubation dans un liquide le milieu ajouté aux huiles et les doses efficaces médianes (DE50, ppm) ont été déterminées par des graphiques logs probit.

5.4. Effet antioxydant :

L'activité antioxydante de l'huile de Néroli dépend en grande partie de sa composition chimique, le composant majeur de l'huile de Néroli, le limonène, avait une faible activité de piégeage des radicaux libres ABTS. Ce résultat a été confirmé par des études antérieures dans lesquelles le limonène obtenu commercialement présentait une activité antioxydante négligeable (Ruberto and Baratta 2000). Bien que le γ -terpinène, un composant mineur de l'huile de Néroli, soit connu pour présenter une activité antioxydante élevée, aucune activité n'a été observée ici, car sa concentration était trop faible (0,3%).

5.5. Effet antimicrobien:

Des études montrent que l'huile de Néroli n'a pas d'activité antibactérienne sélective sur la base des différences de paroi cellulaire des microorganismes bactériens (bactéries Gram-positives ou Gram-négatives) comme indiqué précédemment (Karaman, Şahin et al. 2003). En fait, une observation générale dérivée d'études avec des huiles essentielles de nombreuses autres espèces végétales (Nostro, Germanò et al. 2000). Ont montré que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testée était plus prononcée contre les bactéries à Gram positif que contre les bactéries à Gram négatif. Cette résistance généralement plus élevée chez les bactéries à Gram négatif pourrait être attribuée à la présence de leur membrane phospholipidique, presque imperméable aux composés lipophiles (Nikaido and Vaara 1985). L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, où ils provoquent leur effet, provoquant soit une augmentation de la perméabilité ionique et une fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une altération des systèmes enzymatiques bactériens (Cosentino, Tuberoso et al. 1999).

L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est liée dans la plupart des cas à ses principaux composants. En se référant à la littérature, les constituants les plus fréquents de l'huile de Néroli

présentant une activité antifongique élevée étaient le limonène, le (E)-nérolidol et le (E, E)-farnésol (Lee, Han et al. 2007). Bien que le limonène (27%) et le (E)-nérolidol (17,5%), deux composants majeurs de l'huile de Néroli, aient présenté une activité antifongique fortement positive, ils sont inactifs en tant qu'agents antibactériens (Kim, Marshall et al. 1995). Il a été rapporté que l' α -terpinéol, qui se trouvait en quantités appréciables dans l'huile de cette étude (14%), inhibe la croissance d'un certain nombre de bactéries et de champignons, notamment *E. coli*, *S. epidermes* et *C. albicans* (Raman, Weir et al. 1995). Il est nécessaire de signaler que d'autres composés en plus faible quantité peuvent également contribuer à améliorer cette activité plus forte.

En effet, les effets synergiques de la diversité des constituants majeurs et mineurs présents dans les huiles essentielles doivent être pris en considération pour tenir compte de leur activité biologique. Dans ce contexte, le terpinène-4-ol, un constituant mineur de l'huile étudiée (0,4%), est signalé (Carson and Riley 1995) comme présentant une activité contre ces organismes. Il serait également responsable de l'activité à large spectre de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Cox, Mann et al. 2001).

Un autre constituant mineur, l'oxyde de β -caryophyllène (0,1%), est connu pour avoir des propriétés antibactériennes très efficaces (Magiatis, Skaltsounis et al. 2002). Bien que ces composés ne soient pas abondants dans l'huile essentielle, leur activité pourrait être importante.

a. Effet analgésique

Les expérimentations sur l'effet antalgique du Nérolimontrent qu'il réduit significativement l'œdème de la patte induite par la carragénine (à 40 mg/kg) ce qui est proche d'un effet de 50 mg/kg de diclofenac. Le Nérolisemble posséder les constituants chimiques qui peuvent avoir un effet significatif sur l'inflammation, et un effet anti nociceptif central et périphérique (Khodabakhsh, Shafaroodi et al. 2015).

b. Effet radioprotecteur

L'injection intra péritonéale de 250, 500, 1000 mg/kg de poids d'extrait d'oranger amer 1 heure avant l'exposition aux rayons gamma (1.5 Gy) réduit la fréquence d'érythrocytes micronucléés polychromatiques et d'érythrocytes monochromatiques dans la moelle osseuse de souris. Les flavonoïdes possèderaient un effet préventif de la moelle contre l'irradiation et ses effets clastogéniques (Hosseinimehr, Tavakoli et al. 2003).

c. Effets sur le système cardiovasculaire :

L'huile de Néroli, obtenue à partir des fleurs du *Citrus aurantium var. amara*, est utilisée pour ses effets apaisants sur le rythme cardiaque, le sommeil et la digestion. Une étude a été menée pour comprendre le mécanisme d'action du néroli sur l'aorte de souris. Il a été constaté que le Néroli avait une activité vasodilatatrice chez les souris dont l'aorte était précontractée par la prostaglandine (PG)-F2 α . Cependant, cette relaxation était réduite en absence de l'endothélium ou en présence d'un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthase. De plus, la relaxation induite par le Néroli était partiellement réduite par un inhibiteur de la guanylyl cyclase soluble. Le Néroli a également inhibé les réactions dépendantes du Ca²⁺ et la contraction musculaire induite par la dépolarisation de manière dose-dépendante. Les résultats suggèrent que la relaxation induite par le néroli est médiée en partie par la guanylyl cyclase soluble à l'oxyde nitrique et le récepteur de la ryanodine (Kang, Ryu et al. 2016).

2. Propriétés et indications thérapeutiques :

Chapitre 2 : L'huile essentielle Néroli bigarade

L'huile de Néroli est utilisée comme sédatif pour ses effets apaisants, calmants et relaxants moteurs par les centres de santé de Porto Rico, du Guatemala, du Mexique, de l'Italie, de la Martinique et de l'Espagne (de Moraes Pultrini, Galindo et al. 2006). L'huile de Néroli est efficace contre les palpitations cardiaques résultant d'un choc ou d'une peur (Battaglia 2003). Semblable à l'huile d'écorce de fruit, l'odeur du Néroli diminue les symptômes d'anxiété, améliore l'humeur et crée une sensation de bien-être (Anwar, Ahmed et al. 2016). S'est avéré efficace pour réduire l'anxiété préopératoire avant des opérations mineures (Akhlaghi, Shabani et al. 2011). L'huile de Néroli réduit les scores d'anxiété moyens chez les femmes ménopausées (Farshbaf-Khalili, Kamalifard et al. 2018). L'huile de Néroli est utilisée comme agent anticonvulsivant et anticonvulsivant naturel (Azanchi, Shafaroodi et al. 2014). Il a été utilisé dans le traitement de l'insomnie, de l'épilepsie et des convulsions (Rahnama, Rabiei et al. 2015). L'huile de Néroli a des effets anti-nociceptifs centraux et périphériques qui soutiennent les allégations ethno-médicales de son utilisation.

Dans la gestion de la douleur et de l'inflammation. L'huile de Néroli possède une activité anti-inflammatoire significative contre l'inflammation aiguë et chronique (Khodabakhsh, Shafaroodi et al. 2015). L'huile de Néroli est efficace pour réduire le stress et améliorer le système endocrinien.

L'inhalation d'huile de Néroli aide à soulager les symptômes de la ménopause, à réduire la tension artérielle et à augmenter le désir sexuel chez les femmes ménopausées (Choi, Kang et al. 2014). Il a également diminué les symptômes globaux du syndrome prémenstruel. Il a montré des effets positifs sur l'humeur, la tension artérielle, la douleur, l'inflammation, les ballonnements et l'indigestion en plus de ses effets antidépresseurs (Heydari, Abootalebi et al. 2018). L'inhalation de l'odeur du Néroli améliore le désir sexuel (Namazi, Akbari et al. 2014). L'huile de Néroli est un vasodilatateur dépendant de l'endothélium et des muscles lisses qui peut soulager les symptômes cardiovasculaires.

La composante endothéliale est par l'oxyde nitrique, tandis que la composante musculaire lisse implique l'inhibition de l'afflux extracellulaire de Ca^{2+} et la libération de Ca^{2+} stockée médiée par la voie de signalisation du récepteur de la ryanodine (RyR). L'inhalation d'un mélange de lavande, de marjolaine et de Néroli a diminué la pression artérielle systolique et diastolique, ainsi que la concentration de cortisol salivaire chez les sujets qu'une hypertension. Ces effets positifs ont été immédiats et continus (Kim, Kim et al. 2012).

Tableau 3: Voies d'administration et posologies de l'HE de Néroli bigarade (Laurain-Mattar, Couic-Marinié et al. 2023)

Âge	Voie olfactive diffusion/inhalation	Voie cutanée	Voie orale
Nourrisson (3 mois-1 an) Moins de 6 kg	++++ 5 minutes par heure en l'absence de l'enfant	Oui, diluée à 0,5 % au maximum dans une huile végétale	Non
Bébé (1 an-3 ans) 6 à 13 kg	++++ 5 minutes par heure en l'absence de l'enfant	Oui, diluée à 1 % au maximum dans une huile végétale	Non
Petit enfant (3 à 6 ans) 13 à 18 kg	++++	Oui, diluée à 2 % au maximum	Non

	5 minutes par heure en l'absence de l'enfant	dans une huile végétale	
Enfant (6 à 12 ans) 18 à 30 kg	++++ 5 minutes par heure	+++ Dilué à 5 % dans une huile végétale	++
Adolescent (12 à 15 ans) 30 à 45 kg	++++ 15 minutes par heure	+++ Dilué à 30 % dans une huile végétale	++
Adulte (15 à 65 ans) Plus de (Kumar, Kaur et al. 2011) 45 kg	++++ 15 minutes par heure	+++ Pure sur une petite surface ou alors diluée dans une huile végétale pour une plus grande surface	++
Femme enceinte/allaitante (Plus de 15 ans) Plus de 45 kg	++++ 15 minutes par heure excepté pour la femme enceinte	+++ Dilué à 5 % dans une huile végétale Ne pas appliquer sur la zone abdominale	+
Senior (Plus de 65 ans) Plus de 45 kg	++++ 15 minutes par heure	+++ Dilué à 5 % dans une huile végétale	++

3. Réponse physiopathologique à l'aromathérapie des soins de santé :

Lorsque l'huile essentielle en aromathérapie est inhalée, les molécules activent les systèmes olfactif, respiratoire, gastro-intestinal et/ou tégumentaire en fonction de la voie d'activation.

Ces molécules sont capables de libérer des neurotransmetteurs, comme les endorphines, pour déclencher une sensation de bien-être et un effet analgésique (Farrar and Farrar 2020).

Il existe 2 voies communes déclenchant une réponse physiopathologique aux molécules d'aromathérapie. La voie la plus courante est l'inhalation, par exemple par un diffuseur. L'activation de la stimulation olfactive produit un changement immédiat des paramètres de la pression artérielle, du pouls, de la tension musculaire, de la dilatation des pupilles, de la température corporelle et du flux sanguin (Farrar and Farrar 2020). Ce qui suit résume cette voie:

- La stimulation olfactive par aromathérapie se déplace via les narines vers le bulbe olfactif
- Le stimulus se déplace ensuite vers le cerveau pour y être traité, où l'amygdale déclenche une réponse émotionnelle et l'hippocampe récupère et/ou forme des souvenirs.
- Le système limbique interagit avec le cortex cérébral, activant les pensées et les sentiments.
- Les molécules d'aromathérapie inhalées se déplacent vers les voies respiratoires supérieures puis vers les voies respiratoires inférieures.

- Les molécules se déplacent ensuite vers les vaisseaux sanguins pulmonaires jusqu'à la circulation sanguine, puis vers les organes et les tissus (Farrar and Farrar 2020).

- En résumé, les molécules d'aromathérapie inhalées affectent l'esprit, le corps et l'esprit.

La deuxième voie commune est à travers la peau, par exemple par un massage, dans lequel les molécules sont absorbées à travers la peau. Le parcours est résumé:

- Les molécules se déplacent vers la voie respiratoire supérieure puis les voies respiratoires inférieures.

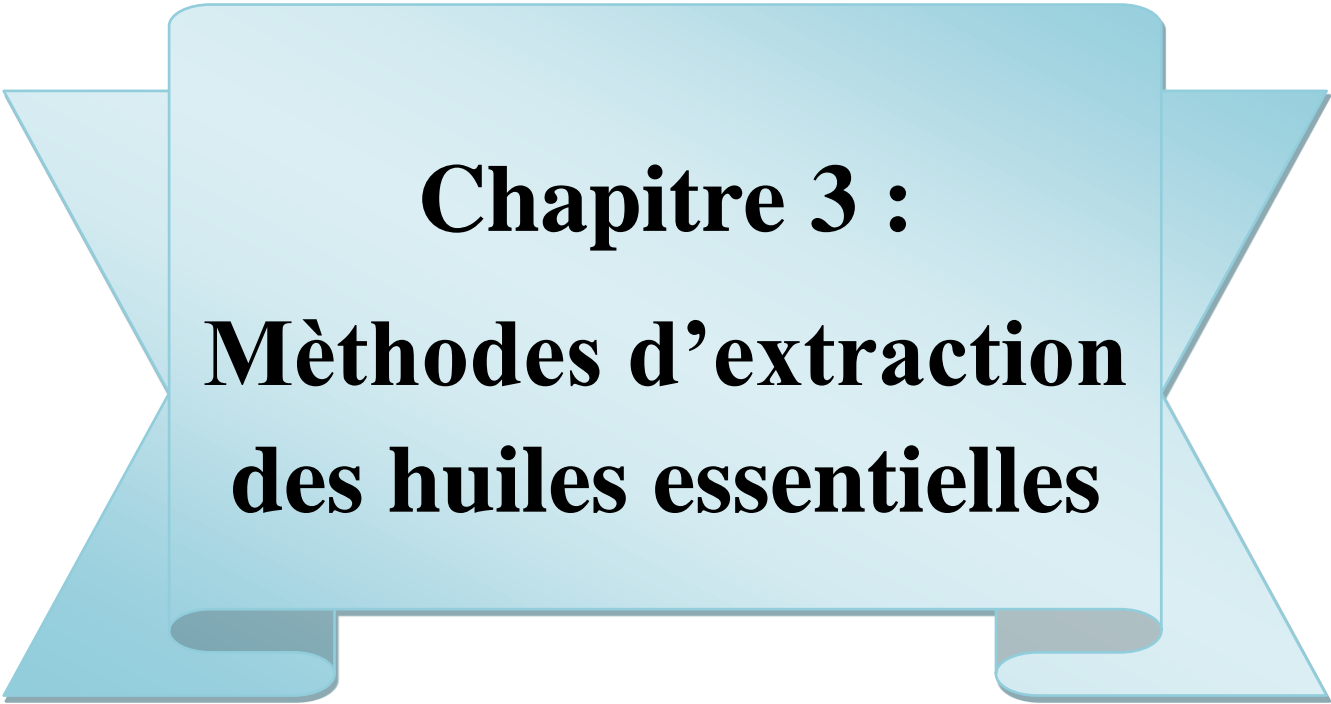
- Les molécules se déplacent ensuite vers les vaisseaux sanguins pulmonaires, vers la circulation sanguine, puis vers les organes et les tissus (Farrar and Farrar 2020).

- La voie cutanée peut activer la stimulation olfactive et active également l'application d'huile parfumée sur la voie cutanée déclenchant une réponse mentale et physiologique.

- L'absorption cutanée des huiles essentielles par la voie cutanée peut réduire le stress perçu par le patient, améliorer la guérison et augmenter la communication.

4. Précautions d'emploi :

Même en cas de prise orale et/ou à fortes doses, aucun effet indésirable n'a été signalé au cours de toutes les études cliniques. De même, il n'y a pas d'effets secondaires. N'est mentionné dans les doses recommandées habituellement, L'HE de Néroli bigarade bio peut être utilisée extérieurement sur une peau aussi fragile et aussi fine que celle d'un nourrisson, par voie topique, HE a donc un profil de sécurité exceptionnel, une tolérance très élevée et un excellent rapport bénéfice-risque (Couic-Marinier and Laurain-Mattar 2020).



Chapitre 3 :
Méthodes d'extraction
des huiles essentielles

I. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Il existe diverses méthodes pour extraire les huiles essentielles, celle la plus utilisée étant la distillation par entraînement à la vapeur.

L'extraction des huiles essentielles peut être réalisée à partir des fleurs, des feuilles, des racines ou encore des graines de la plante.

1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE (Fig 01) (Européenne 2007) .Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. De plus, le parfum de l'HE obtenue est plus délicat et la distillation, régulière et plus rapide, fait que les notes de tête sont riches en esters (Raaman 2006). Les fractions dites « de tête », fragrances très volatiles dues à des molécules légères apparaissent en premier. Le plus souvent, une demi-heure permet de recueillir 95 % des molécules volatiles, ce qui suffit aux besoins de l'industrie et de la parfumerie, comme pour la lavande. L'emploi en aromathérapie impose de prolonger l'opération aussi longtemps qu'il est nécessaire afin de récupérer la totalité des composants aromatiques volatils.

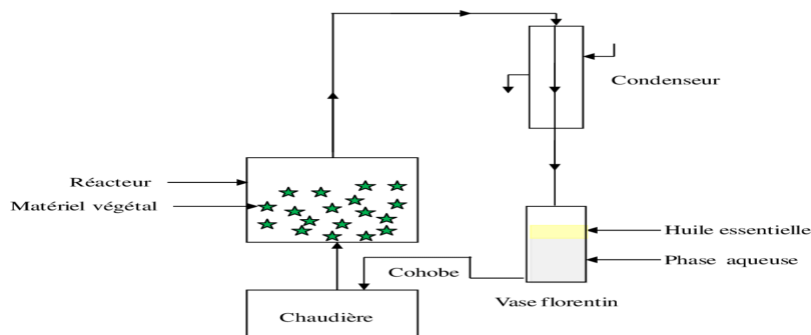


Figure 1 : Extraction par entraînement à la vapeur (Farhat 2010).

2. Extraction par Hydrodistillation :

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition (Fig 02). Elle est généralement conduite à pression atmosphérique.

La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. Ce procédé présente des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition ; Certains organes végétaux, en particulier les fleurs, Sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (HD) (Farhat 2010).

Cependant, le contact direct des constituants de l'HE avec l'eau occasionne des réactions chimiques conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait(Walton, Brown et al. 1999).

Les conditions opératoires et, notamment, la durée de distillation ont une influence considérable sur le rendement et la composition de l'HE.

Chapitre 3 : Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

C'est pourquoi sont développés, aujourd'hui, des modèles mathématiques qui permettent d'optimiser, au mieux, ces conditions afin de produire des HE de manière reproductible.

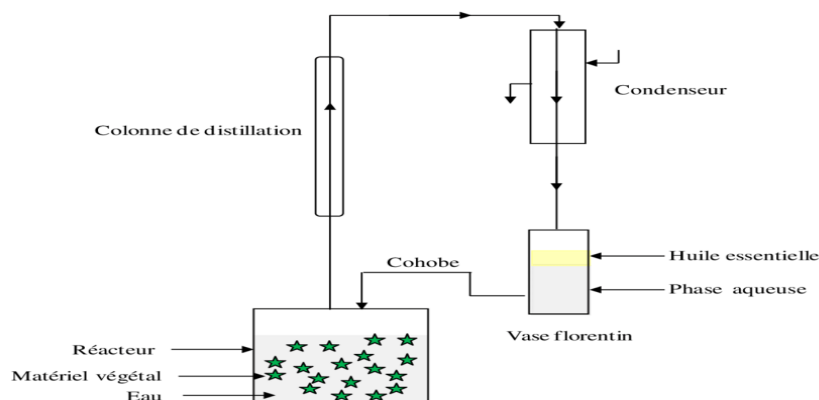


Figure 2 :Hydrodistillation (Farhat 2010).

La labilité des constituants des HE explique que la composition du produit obtenu par HD soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal(Lucchesi 2005; Boukhatem 2018).

L'hydrodistillation possède des limites. Le chauffage prolongé et puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, oxydations(Bruneton and Pharmacognosie 1999).

On comprend mieux les variations importantes de composition que fait ressortir l'analyse de la bibliographie sur l'HE.

3. Distillation « sèche»

La distillation « sèche », aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. On peut ainsi obtenir, à partir du bois, par calcination, de la créosote (mélange de phénols), de l'alcool méthylique et de nombreux autres produits.

En revanche, rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils. Pourtant, il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristique des végétaux fragiles tels que les pétales de rose. Dans le domaine de l'extraction végétale, la distillation sèche consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction : inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles.

La(fig 03)représente les montages de distillation sèche utilisés pourl'isolement de l'huile essentielle de rose par distillation Sèche. Mais si cette technique présente un avantage certain au

Chapitre 3 : Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

niveau de la qualité, elle aboutit cependant à des rendements extrêmement faibles en huile essentielle (Lucchesi 2005).

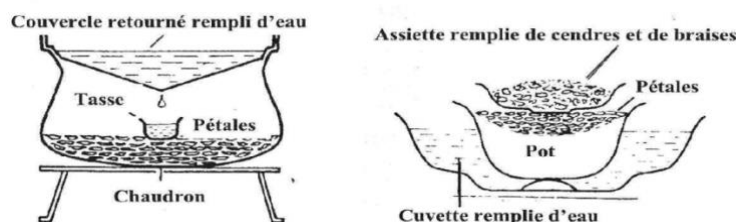


Figure 3 : Schéma de préparation de l'extrait de rose en Herzégovine

(Lucchesi 2005).

4. Enfleurage :

Ces procédés d'extraction sont plus rarement utilisés (coût, travail, rendement moindre). Il s'agissait de placer les fleurs sur un corps gras purifié et de laisser les arômes pénétrer le corps gras.

Une fois l'arôme des fleurs "pompe", on les retirait et on remettait des fleurs fraîches, jusqu'à saturation du corps gras. La pommade ainsi obtenue, il suffisait de la nettoyer, puis d'y ajouter de l'alcool. Au bout de 24 heures, le corps gras et les huiles essentielles étaient séparés. Il ne restait plus qu'à recueillir la précieuse huile essentielle (Neves 2011).



Figure 4 : schéma d'extraction par l'enfleurage(Neves 2011).

5. Expression à froid

La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification.

Les essences de *Citrus* ont longtemps été extraites manuellement, la mécanisation et l'industrialisation de la technique d'expression à froid ne s'étant effectuées qu'au début du XXe siècle, afin de diminuer les coûts de production et d'améliorer les rendements pour faire face à l'augmentation de la demande. Les systèmes récents, comme la « Food Machinery Corporation-in-line» (FMC), permettent d'extraire le jus de fruit et l'essence de manière quasi-simultanée sans contact des deux. C'est pourquoi l'expression à froid est la méthode de choix pour extraire ces essences, d'autant que la distillation n'est plus une technique très appropriée. En effet, la distillation produit des huiles aromatiques de moindre qualité principalement due à une présence importante d'aldéhydes, composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur(Belsito, Carbone et al. 2007; Ferhat, Boukhatem et al. 2016).

6. Extraction par solvant organique

Chapitre 3 : Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils, mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (Richard and à l'ENSIA 1992).

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient des hydrolysats (eau comme solvant), des alcoolats (éthanol dilué), des teintures (éthanol/eau), des résinoïdes (extraits éthanoliques concentrés) et des concrètes (extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers) (Ochoa 2005).

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer, dans un extracteur, un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement. Cependant, les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de la vapeur d'eau (Lucchesi 2005).

Face à cette situation, deux nouvelles techniques ont été mises au point, ces dernières années, pour la distillation des substances d'arômes à partir des plantes : l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par le CO₂ supercritique.

6.1. Extraction assistée par micro-ondes

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques (Wang, Ding et al. 2006). Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement.

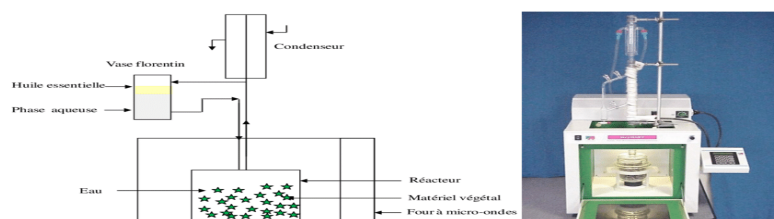


Figure 5 : montage d'extraction assistée par micro-onde (El Haib 2011).

6.2. Extraction par CO₂ supercritique

Chapitre 3 : Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Cette technique se rapproche énormément de l'extraction par solvant, le CO₂ supercritique à la même fonction qu'un solvant sauf qu'il n'est pas nocif et qu'il ne reste plus aucune trace de celui-ci dans l'huile essentielle obtenu.

L'état supercritique d'un élément s'obtient à le soumettant à forte pression ou température. On utilise l'état super critique du CO₂ car il est très facile de l'obtenir : il suffit de le chauffer à une température égale à 31 °C ou bien de le mettre sous pression de 74 bars.

Mais n'importe qu'elle autre fluide à l'état supercritique pourrait être utilisé.

Ce procédé consiste à placer les végétaux préalablement broyés dans un extracteur puis les mettre en contact avec le CO₂ super critique qui vient d'être comprimé et chauffé à une température maximale de 40 °C.

Ainsi, l'huile essentielle est dissoute et le CO₂, ici à l'état supercritique redevient gazeux et se sépare très facilement de l'huile essentielle obtenue. Cette huile est pure et restet très proche de la substance d'origines produite par la plante grâce à l'absence totale du dioxyde de carbone.

Cependant, son utilisation est très peu répandue car les prix de l'équipement sont très élevé.

7. L'expression mécanique :

Encore appelée « expression à froid », cette méthode s'applique particulièrement pour une variété de plantes : les agrumes. En effet, l'HE d'un agrume s'accumule dans des petites poches (nommées sacs oléifères) présentes dans l'écorce du fruit. L'expression mécanique consiste donc à exercer une forte pression sur la partie de la plante concernée à l'aide d'une presse hydraulique (Rullière and Porraz 2015).



Figure 6: Montage de l'expression à froid.



**Matériels et
Méthodes**

1. Objectif de l'étude

L'objectif de notre travail est de réaliser un screening phytochimique afin d'identifier et de quantifier les différents composés chimiques présents dans l'huile essentielle des fleurs fraîches du bigarade de *Citrus aurantium* L., et évaluer son effet biologique par détermination de l'activité antioxydante par deux méthodes, DPPH (le piégé de radical libre) et FRAP (Pouvoir Antioxydant Réducteur Ferrique). Ainsi que la détermination de l'activité anti-inflammatoire.

2. Site de récolte

La zone d'étude (Oued Alleug) est située dans la région de Blida à une altitude de 47 mètres au-dessus du niveau de la mer. Bordé au nord par la commune de Koléa, wilaya de Tipaza, au sud par la wilaya de Blida et Béni Tamou, à l'ouest par la commune de Mouzaïa et Chiffa, et à l'est par la commune de Béni Tamou. Elle possède un climat dont les étés sont chauds, humides, secs et généralement clairs, tandis que les hivers sont froids et partiellement nuageux.

Les précipitations moyennes à Oued Alleug étaient de 31 mm, la température moyenne était de 26°C et l'humidité de 79%. (Figure 07)



Figure 7: Localisation de la zone d'étude (Google Mapp, 2024).

3. Matériel végétal

Citrus aurantium L., communément appelé l'oranger amer est un arbre qui appartient à la famille des *Rutacées*, les fleurs bien fraîches et en pleine floraison ont été récoltées à la main délicatement en avril 2023, après nettoyage et élimination de toute saleté ou impureté les fleurs du *C. aurantium* L passent à l'extraction.

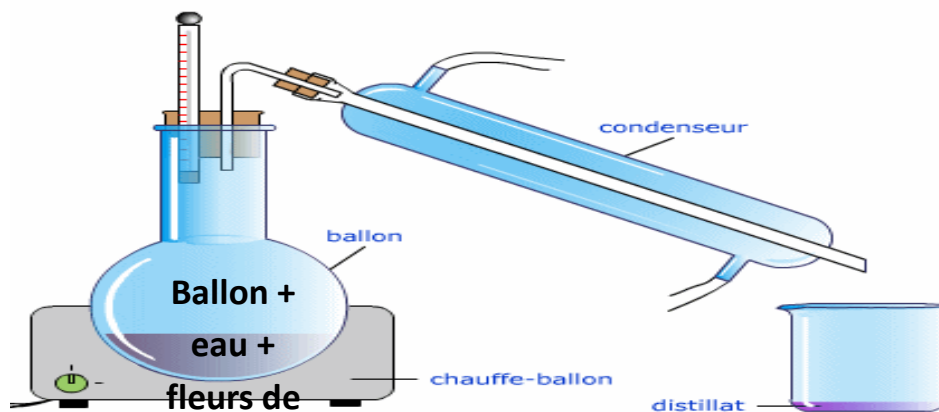


Figure 8: les fleurs de Néroli bigarade *Citrus aurantium L* (Photo originale 2024).

4. Extraction d'huile essentielle

Des fleurs fraîches ont été soumises à l'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Ammar, Bouajila et al. 2012).

Pour préparer l'extraction des fleurs d'oranger amer, on a suivi les étapes suivantes :



C.
Aurantium
L

Figure 9 : Appareil hydrodistillation (Clevenger).

5. Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel du départ, il est déterminé par la relation suivante (Djahra 2014).

$$R (\%) = \frac{\text{Masse d'huile essentielle}}{\text{Masse de fleurs fraîches}} \times 100$$

6. Screening phytochimique

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques quantitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques et organique (Molécules Bioactives).

Tableau 4: Différents test de Screening phytochimique

Test	Référence
Test d'Alcaloïdes (Le test de Wagner)	((Raaman 2006; Singh and Kumar 2017))
Test de Sucres réducteurs (Le test de Fehling)	(Raaman 2006; Singh et Kumar 2017)
Test de Glycosides Cardiaques) L'essai de Keller-Killani)	(Nanna, Banala et al. 2013; Singh and Kumar 2017)
Test de Flavonoïdes (Essai au chlorure ferrique)	(Audu, Mohammed et al. 2007)
Test de Tanins (Le test de Braymer)	(CHOORANAM 2017; Singh and Kumar 2017)
Test de Saponines (Test de mousse)	(Kumar, Kaur et al. 2011).
Test de Phytostérols (test de Salkowski)	(Kumar, Kaur et al. 2011; Singh and Kumar 2017).
Test de Triterpénoïdes (test de Salkowski)	(Singh et Kumar 2017).
Test de Quinones (Test de KOH alcoolique)	(Kumar 2013; Singh and Kumar 2017).
Test de Coumarines (test de NaOH)	(Kumar, Sharma et al. 2018).

7. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de Néroli

7.1. Dosages des composés phénoliques totaux

7.1.1 Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, En un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène(Ribéreau-Gayon 1968).

7.1.2. Protocole

Selon la méthode de(Belviso, Ghirardello et al. 2013).

Matériels et Méthodes

- Une quantité de 200 µl de l'huile essentielle est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) agitation pendant 3 minutes.

- Ajouté 300ml de carbonate de sodium à 7,5% (Na₂CO₃) et 2ml d'eau distillé (Favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction).

- L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 2h à l'obscurité.

- Une courbe d'étalonnage est réalisée parallèle dans les mêmes conditions utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (100 ; 300 ; 400 ; 500 ; 600 ; 700 ; 900 ; 1000) en µg/ml.

- La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm.

7.1.3. Expression des résultats

La quantification des phénoliques totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. A été faite en fonction d'une courbe d'étalonnages linéaire ($y=ax+b$) réalisé par l'acide gallique comme standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents de l'acide gallique par (µg EAG/ml).

7.2. Dosage des flavonoïdes

7.2.1. Principe

Un dosage colorimétrique est basé sur la formation d'un complexe de couleur jaune, entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium (AlCl₃). La soude forme un autre complexe qui rend la couleur rose, dont l'intensité nous indique l'importance du contenu de l'huile essentielle en flavonoïdes (Zhishen, Mengcheng et al. 1999).

7.2.2. Protocole

Le dosage des flavonoïdes d'huile essentielle a été effectuée en suivant la méthode de (Zhishen, Mengcheng et al. 1999).

- Placer dans des tubes à essai d'une manière successive, 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (2%) (AlCl₃-6H₂O) et 500 µl d'huile essentielle (200 µl d'huile essentielle dissout dans 1 ml d'éthanol).

- Le mélange a été vigoureusement agité, est incubé pendant 10 minutes dans l'obscurité à température ambiante et l'absorbance est ensuite lue à 430.

- Une courbe d'étalonnage est réalisée parallèle dans les mêmes conditions utilisant la quercétine comme standard à différentes concentrations (5, 10, 15, 20, 40 µg/ml).

7.2.3. Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage. A été faite en fonction d'une courbe d'étalonnages linéaire ($y=ax+b$) réalisé par la quercétine comme standard à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents de quercétine par (µg EQ/ml).

8. Etude des activités biologiques

8.1. Evaluation de l'activité antioxydante d'huile essentielle

L'activité antioxydante est l'une des capacités principales recherchées dans les produits naturels, il y'a plusieurs méthodes pour l'évaluer. Dans cette étude on a utilisé le test de pouvoir réducteur ferrique FRAP et le test de piégeage de radical libre DPPH.

8.1.1. Test du pouvoir antioxydant par Réduction du Fer (FRAP)

8.1.1.1. Principe

L'évaluation est basée sur la réaction de réduction du (Fe^{+3}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en (Fe^{+2}), la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{+3}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{+2}), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotomètre à 700 nm (Bougandoura and Bendimerad 2013).

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par (Oktay, Gülçin et al. 2003) avec de légères modifications.

8.1.1.2. Protocol

- 1 ml de l'huile essentielle à différents concentrations (20,40,60,80,100,200).

est mise dans un mélange de 1 ml d'une solution tampon phosphaté 0,2 M (pH=6,6) et 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%.

- On laisse les tubes dans l'étuve à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidir les tubes à la température ambiante.

- Pour stopper la réaction 1 ml de l'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés, le tout est centrifugé à 3000 rmp pendant 10 minutes.

- Un volume de 1 ml du surnageant est ajouté à 1.5 ml d'eau distillée et 1ml d'une solution de FeCl_3 (0,1%).

- La lecture des absorbances est faite par spectrométrie, contre un blanc à 700 nm.

- L'acide ascorbique et BHT est utilisé comme control positif.

- L'inhibition du pouvoir réducteur de FARP en pourcentage (I %) a été calculé de la manière suivante:

$$I (\%) = [100 - (A1 - A2) / A1] \times 100$$

Avec:

I (%): pourcentage d'inhibition.

A1: absorbance du contrôle négative (solution du FARP sans huile).

A2: absorbance en présence d'huile

8.1.1.3. Expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en EC50 (ug/ml) qui est la concentration d'huile à laquelle l'absorbance est de 0,5 pour le pouvoir réducteur a été calculée à partir du graphique de l'absorbance à 700 nm en fonction de la concentration d'huile.

L'acide ascorbique et le BHT ont été utilisés comme contrôle positif.

8.1.2. Test de piégeage de radical libre DPPH

8.1.2. 1. Principe

Le test DPPH mesure la capacité d'un composé antioxydant à agir en tant que donneur d'hydrogène ou piègeur de radicaux libres. Il est basé sur la réduction du DPPH violet en molécules stables de DPPH jaune pâle en présence d'un agent antioxydant (Benkhaira et al, 2022).

8.1.2. 2. Procédure

- Une série de concentration d'huile essentielle (10 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100) est préparée dans l'éthanol, 1ml de chacune sont ajoutés à 1ml d'une solution éthanolique de DPPH (0,025g/L).

- Après une période d'incubation de 30 mn à 25°C, l'absorbance a été lue à 517 nm. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl d'éthanol avec 1 ml de la solution éthanolique de DPPH (Benkhaira et al. ,2022).

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I %) a été calculé de la manière suivante:

$$I (\%) = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

Avec: I (%): pourcentage de l'activité antiradicalaire.

A1: absorbance du contrôle négatif (solution du DPPH sans huile).

A2: absorbance en présence d'huile.

L'activité antioxydante est exprimée ensuite par la détermination d'IC₅₀, sachant que l'IC₅₀ est la concentration d'huile essentielle nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

9. Evaluation de l'activité anti inflammatoire *invitro*

9.1. Principe

Le principe de cette technique est basé sur la capacité d'huile essentielle à réduire la dénaturation thermique de l'albumine bovine (protéine de référence choisie pour sa stabilité lors du processus anti-inflammatoire) (AISSANI 2022).

9.2. Protocol

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon le protocole de (CHANDRA et al; 2012) avec quelques modifications. Les différentes étapes sont résumées comme suite :

Matériels et Méthodes

-Un volume de 1ml de solution d'albumine bovine (BSA) à 2%, préparée dans de l'eau distillée, est ajouté à 1 ml de solution d'huile essentielle à différentes concentrations (50 ; 100; 200; 250; 300; 400).

-Le contrôle est préparé en remplaçant l'huile essentielle par l'eau distillée .

-De l'aspirine et de la Diclofenac sodique ont été utilisés comme standard .

-Les tubes ont été incubés à 72°C pendant 5 min .

-La lecture est faite à 660 nm.

Des pourcentages d'inhibition de la dénaturation ont été calculés selon la formule suivante (BOUHLALI et al, 2016).

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{AbsC} - \text{AbsT}}{\text{AbsC}} \times 100$$

Abs T: absorbance de test.

Abs C: absorbance de contrôle.

10. Analyses statistiques

Toutes les données obtenues sont la moyenne des trois essais.

Les courbes d'étalonnages sont réalisées avec Microsoft Excel 2007. Les résultats des polyphénols ; flavonoïdes sont exprimés en moyenne ± écart type, calculés par le logiciel statistique Minitab.



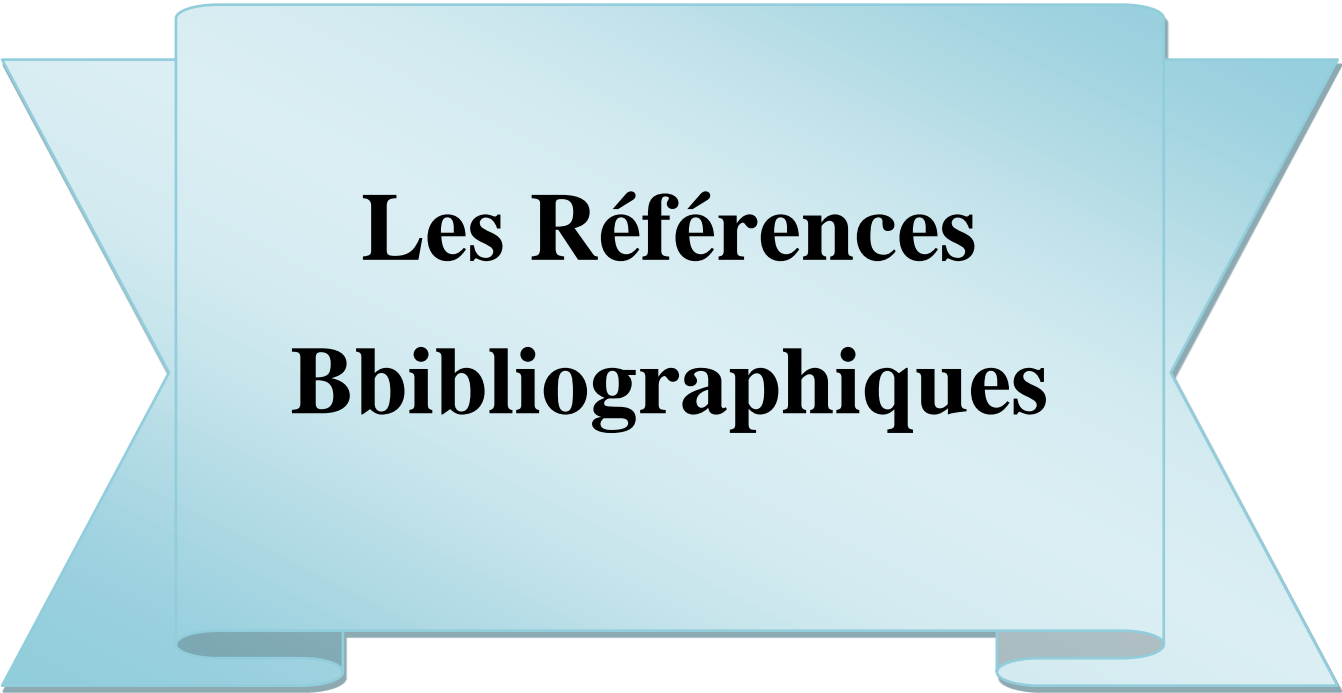
**Résultats et
discussion**



**Conclusion et
perspective**

Huiles essentielles de Néroli bigarade constituent une huile de référence, très connue et reconnue par son odeur et ses bienfaits. En raison de sa parfaite innocuité.

L'objectif de notre travail est de réaliser un screening phytochimique afin d'identifier les différents composés chimiques présents dans l'huile essentielle des fleurs fraîches de la bigarade de *Citrus aurantium L.*, et évaluer son effet biologique par détermination de l'activité antioxydante par deux méthodes: DPPH (le piégé du radical libre) et FRAP (Pouvoir Antioxydant Réducteur Ferrique) et l'activité anti inflammatoire in vitro.



Les Références Bibliographiques

Les Références Bibliographiques

- Abou Baker, D. H., B. M. Ibrahim, et al. (2020). "Exploiting Citrus aurantium seeds and their secondary metabolites in the management of Alzheimer disease." Toxicology reports**7**: 723-729.
- Aburjai, T. and F. M. Natsheh (2003). "Plants used in cosmetics." Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**17**(9): 987-1000.
- Akhlaghi, M., G. Shabaniyan, et al. (2011). "Citrus aurantium blossom and preoperative anxiety." Revista brasileira de anestesiologia**61**: 707-712.
- Ammar, A. H., J. Bouajila, et al. (2012). "Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of Citrus aurantium L. flowers essential oil (Neroli oil)." Pakistan Journal of Biological Sciences**15**(21): pp. 1034-1040.
- Anwar, S., N. Ahmed, et al. (2016). Bitter orange (Citrus aurantium L.) oils. Essential oils in food preservation, flavor and safety, Elsevier: 259-268.
- Anka, L., Rammal, H., Kobeissi, A., & Saab, H. B. (2020). Chemical composition and biological potentials of Lebanese Cupressus sempervirens L. leaves extracts. Journal of Medicinal Plants Research, 14(6), 292-299.
- Arbo, M. D., G. C. Schmitt, et al. (2009). "Subchronic toxicity of Citrus aurantium L.(Rutaceae) extract and p-synephrine in mice." Regulatory Toxicology and Pharmacology**54**(2): 114-117.
- Arias, B. A. and L. Ramón-Laca (2005). "Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region." Journal of Ethnopharmacology**97**(1): 89-95.
- Ayadi, A. J., N. Ayed, et al. (2004). "Tunisian aromatic waters profile." Journal of Essential Oil Bearing Plants**7**(2): 136-145.
- Azanchi, T., H. Shafaroodi, et al. (2014). "Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvement of the GABAergic system." Natural Product Communications**9**(11): 1615-1618.
- Battaglia, S. (2003). The complete guide to aromatherapy, International Centre of Holistic Aromatherapy Queensland, AU.
- Belsito, E. L., C. Carbone, et al. (2007). "Comparison of the volatile constituents in cold-pressed bergamot oil and a volatile oil isolated by vacuum distillation." J. of Agricultural and Food Chemistry**55**(19): 7847-7851.
- Bonaccorsi, I., D. Sciarrone, et al. (2011). "Composition of Egyptian neroli oil." Natural Product Communications**6**(7): 1934578X1100600723.
- Borrelli, F. and E. Ernst (2010). "Alternative and complementary therapies for the menopause." Maturitas**66**(4): 333-343.
- Boukhatem, M. N. (2018). Plantes Aromatiques et Médicinales: Le Géranium Odorant: Description Botanique, Composition Chimique et Vertus Thérapeutiques, Éditions universitaires européennes.
- Bousbia, N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires, Université d'Avignon.
- Boussaada, O., M. Skoula, et al. (2007). "Chemical variability of flowers, leaves, and peels oils of four sour orange provenances." Journal of Essential Oil Bearing Plants**10**(6): 453-464.
- Bruneton, J. and P. Pharmacognosie (1999). "Plantes médicinales." Lavoisier, Paris**4**.
- Budavari, S. (1996). "The Merck Index on CD-Room. By Merck & Co." Inc., White House Station, NJ**12**.
- Burnett, C. L., M. M. Fiume, et al. (2019). "Safety assessment of citrus-derived peel oils as used in cosmetics." International journal of toxicology**38**(2_suppl): 33S-59S.



Les Références Bibliographiques

- Caccioni, D. R., M. Guizzardi, et al. (1998). "Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*." International journal of food microbiology**43**(1-2): 73-79.
- Carson, C. and T. Riley (1995). "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*." Journal of applied bacteriology**78**(3): 264-269.
- Choi, S. Y., P. Kang, et al. (2014). "Effects of inhalation of essential oil of *Citrus aurantium* L. var. *amara* on menopausal symptoms, stress, and estrogen in postmenopausal women: a randomized controlled trial." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**2014**.
- Constantin, R. P., R. P. Constantin, et al. (2014). "Molecular mechanisms of citrus flavanones on hepatic gluconeogenesis." Fitoterapia**92**: 148-162.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, et al. (1999). "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils." Letters in applied microbiology**29**(2): 130-135.
- Costa, C. A., T. C. Cury, et al. (2013). "Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT 1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment." BMC complementary and alternative medicine**13**: 1-10.
- Couic-Marinier, F. and D. Laurain-Mattar (2020). "Huile essentielle de Lavande aspic." Actualités Pharmaceutiques**59**(593): 57-59.
- Cox, S. D., C. M. Mann, et al. (2001). "Determining the antimicrobial actions of tea tree oil." Molecules**6**(2): 87-91.
- Cuchet, A., A. Anchisi, et al. (2021). "Determination of enantiomeric and stable isotope ratio fingerprints of active secondary metabolites in neroli (*Citrus aurantium* L.) essential oils for authentication by multidimensional gas chromatography and GC-C/P-IRMS." Journal of Chromatography B**1185**: 123003.
- Curk, F., G. Ancillo, et al. (2015). "Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties." PloS one**10**(5): e0125628.
- de Moraes Pultrini, A., L. A. Galindo, et al. (2006). "Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice." Life sciences**78**(15): 1720-1725.
- Deecher, D. C. (2005). "Physiology of thermoregulatory dysfunction and current approaches to the treatment of vasomotor symptoms." Expert Opinion on Investigational Drugs**14**(4): 435-448.
- Değirmenci, H. and H. Erkurt (2020). "Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers." Journal of infection and public health**13**(1): 58-67.
- Dugo, G., I. Bonaccorsi, et al. (2011). "Characterization of oils from the fruits, leaves and flowers of the bitter orange tree." Journal of Essential Oil Research**23**(2): 45-59.
- Dung, N. T., J. M. Kim, et al. (2008). "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds." Food and chemical Toxicology**46**(12): 3632-3639.
- Ellouze, I., M. Abderrabba, et al. (2012). "Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: chemical composition and biological activities." Journal of food science**77**(9): T173-T180.
- Ersus, S. and M. Cam (2007). "Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits." Chemistry of Natural Compounds**43**(5).
- Européenne, P. (2007). "Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM)." Strasbourg, France.

Les Références Bibliographiques

- Farhat, A. (2010). Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application, Avignon.
- Farrar, A. J. and F. C. Farrar (2020). "Clinical aromatherapy." Nursing Clinics**55**(4): 489-504.
- Farshbaf-Khalili, A., M. Kamalifard, et al. (2018). "Comparison of the effect of lavender and bitter orange on anxiety in postmenopausal women: A triple-blind, randomized, controlled clinical trial." Complementary therapies in clinical practice**31**: 132-138.
- Ferhat, M.-A., M. Boukhatem, et al. (2016). "Rapid extraction of volatile compounds from Citrus fruits using a microwave dry distillation." Journal of Fundamental and Applied Sciences**8**(3): 753-781.
- Fagbemi, K. O., Aina, D. A., & Olajuyigbe, O. O. (2021). Soxhlet extraction versus hydrodistillation using the clevenger apparatus: A comparative study on the extraction of a volatile compound from Tamarindus indica seeds. The Scientific World Journal, 2021(1), 5961586.
- Gholivand, M. B., M. Piryaei, et al. (2013). "Analysis of volatile oil composition of Citrus aurantium L. by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction with nanoporous based fibers." Journal of Separation Science**36**(5): 872-877.
- Hamedi, A., M. M. Zarshenas, et al. (2019). "Citrus aurantium (bitter orange) seeds oil: pharmacognostic, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties." Trends in Pharmaceutical Sciences**5**(3): 153-164.
- Hardy, R. and D. Kuh (2002). "Change in psychological and vasomotor symptom reporting during the menopause." Social science & medicine**55**(11): 1975-1988.
- Hernandez, L., R. A. Munoz, et al. (1984). "Use of medicinal plants by ambulatory patients in Puerto Rico." American Journal of Hospital Pharmacy**41**(10): 2060-2064.
- Heydari, N., M. Abootalebi, et al. (2018). "Investigation of the effect of aromatherapy with Citrus aurantium blossom essential oil on premenstrual syndrome in university students: A clinical trial study." Complementary therapies in clinical practice**32**: 1-5.
- Hosni, K., N. Zahed, et al. (2010). "Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence." Food chemistry**123**(4): 1098-1104.
- Hosseinimehr, S. J., H. Tavakoli, et al. (2003). "Radioprotective effects of citrus extract against γ -irradiation in mouse bone marrow cells." Journal of radiation research**44**(3): 237-241.
- Hsouna, A. B., N. Hamdi, et al. (2013). "Characterization of essential oil from Citrus aurantium L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities." Journal of Oleo Science**62**(10): 763-772.
- Jeannot, V., J. Chahboun, et al. (2005). "Quantification and determination of chemical composition of the essential oil extracted from natural orange blossom water (Citrus aurantium L. ssp. aurantium)." International Journal of Aromatherapy**15**(2): 94-97.
- Jeff, M. (2002). "Therapeutic research facility, natural medicines comprehensive database." Therapeutic Research Center.
- Kang, P., K.-H. Ryu, et al. (2016). "Endothelium- and smooth muscle-dependent vasodilator effects of Citrus aurantium L. var. amara: Focus on Ca²⁺ modulation." Biomedicine & Pharmacotherapy**82**: 467-471.
- Karaman, I., F. Şahin, et al. (2003). "Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L." Journal of Ethnopharmacology**85**(2-3): 231-235.
- Khettal, B., N. Kadri, et al. (2017). "Phenolic compounds from Citrus leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition." Journal of Complementary and Integrative Medicine**14**(1): 20160030.
- Khodabakhsh, P., H. Shafaroodi, et al. (2015). "Analgesic and anti-inflammatory activities of Citrus aurantium L. blossoms essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway." Journal of natural medicines**69**: 324-331.

Les Références Bibliographiques

- Kim, I.-H., C. Kim, et al. (2012). "Essential oil inhalation on blood pressure and salivary cortisol levels in prehypertensive and hypertensive subjects." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**2012**.
- Kim, J., M. R. Marshall, et al. (1995). "Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens." Journal of agricultural and food chemistry**43**(11): 2839-2845.
- Labadie, C., C. Ginies, et al. (2015). "Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota." Food Research International**76**: 576-586.
- Ladoh, Y., S. Dibong, et al. (2014). "Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*." Journal of Applied Biosciences**84**: 7636-7643.
- Laurain-Mattar, D., F. Couic-Marinier, et al. (2023). "L'huile essentielle de Néroli bigarade." Actualités Pharmaceutiques**62**(627): 53-56.
- Lawrence, B. M. (1986). *Essential oil production: A discussion of influencing factors*, ACS Publications.
- Lee, S.-J., J.-I. Han, et al. (2007). "Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporium gypseum* in a guinea pig model." Biological and Pharmaceutical Bulletin**30**(1): 184-188.
- Lota, M. L., D. de Rocca Serra, et al. (2001). "Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange." Flavour and fragrance journal**16**(2): 89-96.
- Lucchesi, M.-E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*, Université de la Réunion.
- Magiatis, P., A.-L. Skaltsounis, et al. (2002). "Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species." Zeitschrift für Naturforschung **C57**(3-4): 287-290.
- Mannucci, C., F. Calapai, et al. (2018). "Clinical Pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety." Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**2018**.
- Mencherini, T., L. Campone, et al. (2013). "HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. *amara* peel with antiedematogenic activity." Journal of agricultural and food chemistry**61**(8): 1686-1693.
- Mosandl, A. and D. Juchelka (1997). "Advances in the authenticity assessment of citrus oils." Journal of Essential Oil Research**9**(1): 5-12.
- Namazi, M., S. A. A. Akbari, et al. (2014). "Effects of *Citrus aurantium* (bitter orange) on the severity of first-stage labor pain." Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**13**(3): 1011.
- Neves, J. S. (2011). "Aromaterapia: um tema para o ensino de química."
- Nikaido, H. and M. Vaara (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability." Microbiological reviews**49**(1): 1-32.
- Nostro, A., M. P. Germanò, et al. (2000). "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity." Letters in applied microbiology**30**(5): 379-384.
- Ochoa, L. R. H. (2005). *Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné" solvant-actif" d'origine végétale.*
- Parkar, N. and V. Addepalli (2014). "Amelioration of diabetic nephropathy by orange peel extract in rats." Natural Product Research**28**(23): 2178-2181.
- Pellati, F., S. Benvenuti, et al. (2002). "Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *amara* by LC." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**29**(6): 1113-1119.

Les Références Bibliographiques

- Periyamayagam, K., S. Dhanalakshmi, et al. (2013). "Phytochemical studies and GC/MS analysis on the isolated essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* Linn." J Nat Prod Plant Resour**3**(6): 19-23.
- Pierson, M., X. Fernandez, et al. (2021). "Type and magnitude of non-compliance and adulteration in neroli, mandarin and bergamot essential oils purchased on-line: potential consumer vulnerability." Scientific reports**11**(1): 11096.
- Percy, D.W.; Adcock, J.L.; Conlan, X.A.; Barnett, N.W.; Gange, M.E.; Noonan, L.K.; Henderson, L.C.; Francis, P.S. Determination of *Citrus aurantium* protoalkaloids using HPLC with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Talanta* 2010, 80, 2191–2195.
- Pultrini A, de M, Galindo LA, Costa M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci* 2006; 78 (15) : 1720 – 5 .
- Raaman, N. (2006). Phytochemical techniques, New India Publishing.
- Rahnama, S., Z. Rabiei, et al. (2015). "Anti-amnesic activity of *Citrus aurantium* flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats." Neurological Sciences**36**: 553-560.
- Raman, A., U. Weir, et al. (1995). "Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*." Letters in applied microbiology**21**(4): 242-245.
- Richard, H. and E. à l'ENSIA (1992). "Épices et herbes aromatiques." Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- Richter, G. (1993). "Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie."
- Ruberto, G. and M. T. Baratta (2000). "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems." Food chemistry**69**(2): 167-174.
- Rullière, M. and A. Porraz (2015). Conseils en aromathérapie à l'officine: création d'un site internet destiné aux pharmaciens d'officine, Thèse]. Grenoble: Université Joseph Fourier.
- Sarrou, E., P. Chatzopoulou, et al. (2013). "Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece." Molecules**18**(9): 10639-10647.
- Schipilliti, L., P. Dugo, et al. (2012). "Authenticity control on lemon essential oils employing gas chromatography–combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC–C-IRMS)." Food chemistry**131**(4): 1523-1530.
- Shan, Y. (2016). Comprehensive utilization of citrus by-products, Academic Press.
- Shen, J., A. Nijima, et al. (2005). "Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats." Neuroscience letters**380**(3): 289-294.
- Singh, B., J. P. Singh, et al. (2021). "Insights into the chemical composition and bioactivities of citrus peel essential oils." Food Research International**143**: 110231.
- Suntar, I., H. Khan, et al. (2018). "An overview on *Citrus aurantium* L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent." Oxidative medicine and cellular longevity**2018**.
- Suryawanshi, J. A. S. (2011). "An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases." African Journal of Plant Science**5**(7): 390-395.
- Teneva, D., R. Denkova-Kostova, et al. (2019). "Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L. zest against some pathogenic microorganisms." Zeitschrift für Naturforschung **C74**(5-6): 105-111.

Les Rêfêrence Bbibliographique

- Tounsi, M. S., W. A. Wannes, et al. (2011). "Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties." Journal of the Science of Food and Agriculture**91**(1): 142-151.
- Tundis, R., M. R. Loizzo, et al. (2012). "Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of Citrus aurantifolia Swingle, C. aurantium L., and C. bergamia Risso and Poit. peel essential oils." Journal of food science**77**(1): H40-H46.
- Ventrella, M. C. and C. R. Marinho (2008). "Morphology and histochemistry of glandular trichomes of Cordia verbenacea DC.(Boraginaceae) leaves." Brazilian Journal of Botany**31**: 457-467.
- Walton, N. J., D. E. Brown, et al. (1999). Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products, World Scientific.
- Wu, G. A., S. Prochnik, et al. (2014). "Complex history of admixture during citrus domestication revealed by genome analysis."
- Abou Baker, D. H., B. M. Ibrahim, et al. (2020). "Exploiting Citrus aurantium seeds and their secondary metabolites in the management of Alzheimer disease." Toxicology reports**7**: 723-729.
- Aburjai, T. and F. M. Natsheh (2003). "Plants used in cosmetics." Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**17**(9): 987-1000.
- AISSANI, F. (2022). Caractérisation phytochimique, valorisation biologique et toxicologique des différents extraits d'une espèce Algérienne Sonchus oleraceus L.
- Akhlaghi, M., G. Shabanian, et al. (2011). "Citrus aurantium blossom and preoperative anxiety." Revista brasileira de anesthesiologia**61**: 707-712.
- Ammar, A. H., J. Bouajila, et al. (2012). "Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of Citrus aurantium L. flowers essential oil (Neroli oil)." Pakistan Journal of Biological Sciences**15**(21): pp. 1034-1040.
- Anwar, S., N. Ahmed, et al. (2016). Bitter orange (Citrus aurantium L.) oils. Essential oils in food preservation, flavor and safety, Elsevier: 259-268.
- Arbo, M. D., G. C. Schmitt, et al. (2009). "Subchronic toxicity of Citrus aurantium L.(Rutaceae) extract and p-synephrine in mice." Regulatory Toxicology and Pharmacology**54**(2): 114-117.
- Arias, B. A. and L. Ramón-Laca (2005). "Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region." Journal of Ethnopharmacology**97**(1): 89-95.
- Audu, S. A., I. Mohammed, et al. (2007). "Phytochemical screening of the leaves of Lophira lanceolata (Ochanaceae)." Life Science Journal**4**(4): 75-79.
- Ayadi, A. J., N. Ayed, et al. (2004). "Tunisian aromatic waters profile." Journal of Essential Oil Bearing Plants**7**(2): 136-145.

Les Références Bibliographiques

- Azanchi, T., H. Shafaroodi, et al. (2014). "Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvement of the GABAergic system." Natural Product Communications**9**(11): 1615-1618.
- Battaglia, S. (2003). The complete guide to aromatherapy, International Centre of Holistic Aromatherapy Queensland, AU.
- Belsito, E. L., C. Carbone, et al. (2007). "Comparison of the volatile constituents in cold-pressed bergamot oil and a volatile oil isolated by vacuum distillation." J. of Agricultural and Food Chemistry**55**(19): 7847-7851.
- Belviso, S., D. Ghirardello, et al. (2013). "Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (Syagrus coronata (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process." Food Research International**51**(1): 39-45.
- Bonaccorsi, I., D. Sciarrone, et al. (2011). "Composition of Egyptian neroli oil." Natural Product Communications**6**(7): 1934578X1100600723.
- Bougandoura, N. and N. Bendimerad (2013). "Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq." Nature & Technology(9): 14.
- Boukhatem, M. N. (2018). Plantes Aromatiques et Médicinales: Le Géranium Odorant: Description Botanique, Composition Chimique et Vertus Thérapeutiques, Éditions universitaires européennes.
- Boussaada, O., M. Skoula, et al. (2007). "Chemical variability of flowers, leaves, and peels oils of four sour orange provenances." Journal of Essential Oil Bearing Plants**10**(6): 453-464.
- Bruneton, J. and P. Pharmacognosie (1999). "Plantes médicinales." Lavoisier, Paris**4**.
- Burnett, C. L., M. M. Fiume, et al. (2019). "Safety assessment of citrus-derived peel oils as used in cosmetics." International journal of toxicology**38**(2_suppl): 33S-59S.
- Caccioni, D. R., M. Guizzardi, et al. (1998). "Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and Penicillium italicum." International journal of food microbiology**43**(1-2): 73-79.
- Carson, C. and T. Riley (1995). "Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia." Journal of applied bacteriology**78**(3): 264-269.
- Chapot, H. (1964). "LES BIGARADIERS BOUQUETIERS 1"" Partie." Al Awamia**10**: 55-95.
- Choi, S. Y., P. Kang, et al. (2014). "Effects of inhalation of essential oil of Citrus aurantium L. var. amara on menopausal symptoms, stress, and estrogen in postmenopausal women: a randomized controlled trial." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**2014**.

Les Rêfêrence Bbibliographique

- CHOORANAM, V. (2017). "PHARMACOGNOSTICAL AND PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL SCREENING OF AAVAARAI." Asian J Pharm Clin Res**10**(10): 111-116.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, et al. (1999). "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils." Letters in applied microbiology**29**(2): 130-135.
- Costa, C. A., T. C. Cury, et al. (2013). "Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT 1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment." BMC complementary and alternative medicine**13**: 1-10.
- Couic-Marinier, F. and D. Laurain-Mattar (2020). "Huile essentielle de Lavande aspic." Actualités Pharmaceutiques**59**(593): 57-59.
- Cox, S. D., C. M. Mann, et al. (2001). "Determining the antimicrobial actions of tea tree oil." Molecules**6**(2): 87-91.
- Cuchet, A., A. Anchisi, et al. (2021). "Determination of enantiomeric and stable isotope ratio fingerprints of active secondary metabolites in neroli (Citrus aurantium L.) essential oils for authentication by multidimensional gas chromatography and GC-C/P-IRMS." Journal of Chromatography B**1185**: 123003.
- Curk, F., G. Ancillo, et al. (2015). "Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties." PloS one**10**(5): e0125628.
- de Moraes Pultrini, A., L. A. Galindo, et al. (2006). "Effects of the essential oil from Citrus aurantium L. in experimental anxiety models in mice." Life sciences**78**(15): 1720-1725.
- Deecher, D. C. (2005). "Physiology of thermoregulatory dysfunction and current approaches to the treatment of vasomotor symptoms." Expert Opinion on Investigational Drugs**14**(4): 435-448.
- Değirmenci, H. and H. Erkurt (2020). "Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of Citrus aurantium L. flowers." Journal of infection and public health**13**(1): 58-67.
- Diwan, A., A. Ninawe, et al. (2017). "Gene editing (CRISPR-Cas) technology and fisheries sector." Canadian Journal of Biotechnology**1**(2): 65-72.
- Djahra, A. (2014). "Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L." Thèse de doctorat en science. Université Badji Mokhtar, Annaba. P73p.
- Dugo, G., I. Bonaccorsi, et al. (2011). "Characterization of oils from the fruits, leaves and flowers of the bitter orange tree." Journal of Essential Oil Research**23**(2): 45-59.

Les Références Bibliographiques

Dung, N. T., J. M. Kim, et al. (2008). "Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds." Food and chemical Toxicology**46**(12): 3632-3639.

El Haib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

Ellouze, I., M. Abderrabba, et al. (2012). "Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: chemical composition and biological activities." Journal of food science**77**(9): T173-T180.

Ersus, S. and M. Cam (2007). "Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits." Chemistry of Natural Compounds**43**(5).

Européenne, P. (2007). "Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM)." Strasbourg, France.

Farhat, A. (2010). Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application, Avignon.

Farrar, A. J. and F. C. Farrar (2020). "Clinical aromatherapy." Nursing Clinics**55**(4): 489-504.

Farshbaf-Khalili, A., M. Kamalifard, et al. (2018). "Comparison of the effect of lavender and bitter orange on anxiety in postmenopausal women: A triple-blind, randomized, controlled clinical trial." Complementary therapies in clinical practice**31**: 132-138.

Ferhat, M.-A., M. Boukhatem, et al. (2016). "Rapid extraction of volatile compounds from *Citrus* fruits using a microwave dry distillation." Journal of Fundamental and Applied Sciences**8**(3): 753-781.

Ghédira, K. and P. Goetz (2015). "*Citrus aurantium* L. var. *amara* Link Oranger amer–Bigaradier (Rutaceae)." Phytothérapie**13**(5): 320-327.

Gholivand, M. B., M. Piryaee, et al. (2013). "Analysis of volatile oil composition of *Citrus aurantium* L. by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction with nanoporous based fibers." Journal of Separation Science**36**(5): 872-877.

Hamedi, A., M. M. Zarshenas, et al. (2019). "*Citrus aurantium* (bitter orange) seeds oil: pharmacognostic, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties." Trends in Pharmaceutical Sciences**5**(3): 153-164.

Hardy, R. and D. Kuh (2002). "Change in psychological and vasomotor symptom reporting during the menopause." Social science & medicine**55**(11): 1975-1988.

Hernandez, L., R. A. Munoz, et al. (1984). "Use of medicinal plants by ambulatory patients in Puerto Rico." American Journal of Hospital Pharmacy**41**(10): 2060-2064.

Les Rêfêrence Bbibliographique

Heydari, N., M. Abootalebi, et al. (2018). "Investigation of the effect of aromatherapy with Citrus aurantium blossom essential oil on premenstrual syndrome in university students: A clinical trial study." Complementary therapies in clinical practice**32**: 1-5.

Hosni, K., N. Zahed, et al. (2010). "Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence." Food chemistry**123**(4): 1098-1104.

Hosseinimehr, S. J., H. Tavakoli, et al. (2003). "Radioprotective effects of citrus extract against γ -irradiation in mouse bone marrow cells." Journal of radiation research**44**(3): 237-241.

Jeannot, V., J. Chahboun, et al. (2005). "Quantification and determination of chemical composition of the essential oil extracted from natural orange blossom water (Citrus aurantium L. ssp. aurantium)." International Journal of Aromatherapy**15**(2): 94-97.

Jeff, M. (2002). "Therapeutic research facility, natural medicines comprehensive database." Therapeutic Research Center.

Kang, P., K.-H. Ryu, et al. (2016). "Endothelium-and smooth muscle-dependent vasodilator effects of Citrus aurantium L. var. amara: Focus on Ca²⁺ modulation." Biomedicine & Pharmacotherapy**82**: 467-471.

Karaman, I., F. Şahin, et al. (2003). "Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L." Journal of Ethnopharmacology**85**(2-3): 231-235.

Khettal, B., N. Kadri, et al. (2017). "Phenolic compounds from Citrus leaves: Antioxidant activity and enzymatic browning inhibition." Journal of Complementary and Integrative Medicine**14**(1): 20160030.

Khodabakhsh, P., H. Shafaroodi, et al. (2015). "Analgesic and anti-inflammatory activities of Citrus aurantium L. blossoms essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway." Journal of natural medicines**69**: 324-331.

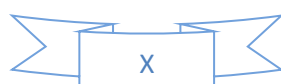
Kim, I.-H., C. Kim, et al. (2012). "Essential oil inhalation on blood pressure and salivary cortisol levels in prehypertensive and hypertensive subjects." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**2012**.

Kim, J., M. R. Marshall, et al. (1995). "Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens." Journal of agricultural and food chemistry**43**(11): 2839-2845.

Kumar, M. K., G. Kaur, et al. (2011). "INTERNATIONALE PHARMACEUTICA SCIENCIA."

Kumar, P. (2013). "Piezo-smart roads." International Journal of Enhanced Research in Science Technology & Engineering, ISSN: 2319-7463.

Kumar, R., S. Sharma, et al. (2018). "Investigation of total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity from extracts of Azadirachta indica of Bundelkhand Region." Int. J. Life. Sci. Scienti. Res. eISSN**2455**(1716): 1716.



Les Rêfêrence Bbibliographique

Labadie, C., C. Ginies, et al. (2015). "Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota." Food Research International**76**: 576-586.

Ladoh, Y., S. Dibong, et al. (2014). "Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*." Journal of Applied Biosciences**84**: 7636-7643.

Laurain-Mattar, D., F. Couic-Marinier, et al. (2023). "L'huile essentielle de Néroli bigarade." Actualités Pharmaceutiques**62**(627): 53-56.

Lawrence, B. M. (1986). *Essential oil production: A discussion of influencing factors*, ACS Publications.

Lee, S.-J., J.-I. Han, et al. (2007). "Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model." Biological and Pharmaceutical Bulletin**30**(1): 184-188.

Lota, M. L., D. de Rocca Serra, et al. (2001). "Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange." Flavour and fragrance journal**16**(2): 89-96.

Lucchesi, M.-E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*, Université de la Réunion.

Magiatis, P., A.-L. Skaltsounis, et al. (2002). "Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species." Zeitschrift für Naturforschung C**57**(3-4): 287-290.

Malle, B. and H. Schmickl (2015). The Essential Oil Maker's Handbook: Extracting, Distilling and Enjoying Plant Essences, Spikehorn Press.

Mannucci, C., F. Calapai, et al. (2018). "Clinical Pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety." Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**2018**.

Mosandl, A. and D. Juchelka (1997). "Advances in the authenticity assessment of citrus oils." Journal of Essential Oil Research**9**(1): 5-12.

MR Patlolla, J. and C. V Rao (2012). "Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects." Current pharmaceutical biotechnology**13**(1): 147-155.

Namazi, M., S. A. A. Akbari, et al. (2014). "Effects of *Citrus aurantium* (bitter orange) on the severity of first-stage labor pain." Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**13**(3): 1011.

Nanna, R. S., M. Banala, et al. (2013). "Evaluation of phytochemicals and fluorescent analysis of seed and leaf extracts of *Cajanus cajan* L." International journal of pharmaceutical sciences Review and Research**22**(1): 11-18.

Neves, J. S. (2011). "Aromaterapia: um tema para o ensino de química."

Les Références Bibliographiques

Nikaido, H. and M. Vaara (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability." Microbiological reviews**49**(1): 1-32.

Nostro, A., M. P. Germanò, et al. (2000). "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity." Letters in applied microbiology**30**(5): 379-384.

Ochoa, L. R. H. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné" solvant-actif" d'origine végétale.

Oktay, M., İ. Gülçin, et al. (2003). "Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts." LWT-Food Science and Technology**36**(2): 263-271.

Pellati, F., S. Benvenuti, et al. (2002). "Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *amara* by LC." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**29**(6): 1113-1119.

Periyamayagam, K., S. Dhanalakshmi, et al. (2013). "Phytochemical studies and GC/MS analysis on the isolated essential oil from the leaves of *Citrus aurantium* Linn." J Nat Prod Plant Resour**3**(6): 19-23.

Pierson, M., X. Fernandez, et al. (2021). "Type and magnitude of non-compliance and adulteration in neroli, mandarin and bergamot essential oils purchased on-line: potential consumer vulnerability." Scientific reports**11**(1): 11096.

Raaman, N. (2006). Phytochemical techniques, New India Publishing.

Rahnama, S., Z. Rabiei, et al. (2015). "Anti-amnesic activity of *Citrus aurantium* flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats." Neurological Sciences**36**: 553-560.

Raman, A., U. Weir, et al. (1995). "Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*." Letters in applied microbiology**21**(4): 242-245.

Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les Composés phénoliques des végétaux: par Pascal Ribéreau-Gayon, Dunod.

Richard, H. and E. à l'ENSIA (1992). "Épices et herbes aromatiques." Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Ruberto, G. and M. T. Baratta (2000). "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems." Food chemistry**69**(2): 167-174.

Rullière, M. and A. Porraz (2015). Conseils en aromathérapie à l'officine: création d'un site internet destiné aux pharmaciens d'officine, Thèse. Grenoble: Université Joseph Fourier.

Sarrou, E., P. Chatzopoulou, et al. (2013). "Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece." Molecules**18**(9): 10639-10647.

Les Référence Bibliographique

Schipilliti, L., P. Dugo, et al. (2012). "Authenticity control on lemon essential oils employing gas chromatography–combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC–C-IRMS)." Food chemistry**131**(4): 1523-1530.

Shan, Y. (2016). Comprehensive utilization of citrus by-products, Academic Press.

Shen, J., A. Nijima, et al. (2005). "Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats." Neuroscience letters**380**(3): 289-294.

Singh, B., J. P. Singh, et al. (2021). "Insights into the chemical composition and bioactivities of citrus peel essential oils." Food Research International**143**: 110231.

Singh, V. and R. Kumar (2017). "Study of phytochemical analysis and antioxidant activity of Allium sativum of Bundelkhand region." International Journal of Life-Sciences Scientific Research**3**(6): 1451-1458.

Suntar, I., H. Khan, et al. (2018). "An overview on Citrus aurantium L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent." Oxidative medicine and cellular longevity**2018**.

Suryawanshi, J. A. S. (2011). "An overview of Citrus aurantium used in treatment of various diseases." African Journal of Plant Science**5**(7): 390-395.

Teneva, D., R. Denkova-Kostova, et al. (2019). "Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from Citrus aurantium L zest against some pathogenic microorganisms." Zeitschrift für Naturforschung C**74**(5-6): 105-111.

Tiran, D. (2016). Aromatherapy in midwifery practice, Singing Dragon.

Tounsi, M. S., W. A. Wannes, et al. (2011). "Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties." Journal of the Science of Food and Agriculture**91**(1): 142-151.

Tundis, R., M. R. Loizzo, et al. (2012). "Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of Citrus aurantifolia Swingle, C. aurantium L., and C. bergamia Risso and Poit. peel essential oils." Journal of food science**77**(1): H40-H46.

Ventrella, M. C. and C. R. Marinho (2008). "Morphology and histochemistry of glandular trichomes of Cordia verbenacea DC.(Boraginaceae) leaves." Brazilian Journal of Botany**31**: 457-467.

Walton, N. J., D. E. Brown, et al. (1999). Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products, World Scientific.

Wang, Z., L. Ding, et al. (2006). "Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried Cuminum cyminum L. and Zanthoxylum bungeanum Maxim." Journal of Chromatography a**1102**(1-2): 11-17.

Les Rèference Bbibliographique

Wu, G. A., S. Prochnik, et al. (2014). "Complex history of admixture during citrus domestication revealed by genome analysis."

Zhishen, J., T. Mengcheng, et al. (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals." Food chemistry**64**(4): 555-559.



Annexes

I. Screening phytochimique

1. Test d'Alcaloïdes (Le test de Wagner)

Environ 1 ml de Néroli a été placé dans un tube à essai, quelques gouttes de réactif de Wagner. La formation d'un précipité brun / rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes (Raaman 2006; Singh and Kumar 2017).

2. Test de Sucres réducteurs (Le test de Fehling)

Environ 1 ml d'huile essentielle de Néroli a été placé dans un tube à essai. On y ajoute 1 ml de solution A et B de Fehling. La formation d'un précipité rouge indique la présence de sucres réducteurs (Raaman 2006; Singh and Kumar 2017).

3. Test de Glycosides Cardiaques (L'essai de Keller-Killani)

Environ 1 ml d'huile essentielle de Néroli a été placé dans un tube à essai. On y ajoute 1.5 ml d'acide acétique glacial et une goutte de chlorure ferrique à 5% + H_2SO_4 (sur le côté d'éprouvette). La formation d'une solution de couleur bleue (dans la couche d'acide acétique) indique la présence de Glycosides Cardiaques (Nanna, Banala et al. 2013; Singh and Kumar 2017).

4. Test de Flavonoïdes (Essai au chlorure ferrique)

Environ 1 ml d'huile essentielle de Néroli a été placé dans un tube à essai. On y ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique 10%, la formation d'un précipité vert indique la présence de Flavonoïdes (Audu, Mohammed et al. 2007).

5. Test de Tanins (Le test de Braymer)

Environ 1 ml d'huile essentielle de Néroli a été placé dans un tube à essai. On y ajoute 3 ml d'eau distillée et 3 gouttes de chlorure ferrique 10%, la formation d'une couleur bleu-vert indique la présence de Tanins (CHOORANAM 2017; Singh and Kumar 2017).

6. Test de Saponines (Test de mousse)

Environ 1 ml d'huile essentielle de Néroli a été placé dans un tube à essai. On y ajoute 2 ml d'eau (vigoureusement secoué). La formation d'une mousse persistante pendant 10 min indique la présence de Saponines (Kumar, Kaur et al. 2011).

7. Test de Phytostérols (test de Salkowski)

On met dans un tube à essai 1 ml de Néroli, après on ajoute quelques gouttes d' H_2SO_4 (Bien secoué et laissé au repos). Une couleur rouge (dans la couche inférieure) apparaît dans la présence des Phytostérols (Kumar, Kaur et al. 2011; Singh and Kumar 2017).

8. Test de Triterpénoïdes (test de Salkowski)

Dans un tube à essai mélangé 1 ml de Néroli avec quelques gouttes d' H_2SO_4 (Bien secoué et laissé au repos) la contenance de l'huile essentielle de Néroli Triterpénoïdes résulte en une couche jaune d'or (en bas), (Singh et Kumar 2017).

9. Test de Quinones (Test de KOH alcoolique)

On ajoute dans un tube à essai 1 ml d'huile essentiel de Nérolol mélangé avec quelques gouttes hydroxyde de potassium alcoolique. L'observation d'une couleur rouge à bleue indique la présence de Quinones (Kumar 2013; Singh and Kumar 2017).

10. Test de Coumarines (test de NaOH)

On met dans un tube à essai 1 ml d'huile essentiel de Nérolol, quelques gouttes de NaOH à 10% et quelques gouttes de chloroforme, la présence des Coumarines indique une couleur jaune (Kumar, Sharma et al. 2018).