

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de biochimie Biologie Cellulaire et Moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية- البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** biochimie générale

N° d'ordre :

N° de série :

**Intitulé :**

---

**Evaluation des activités biologiques de l'espèce citrus limon**

---

**Présenté par :** ABDERREZAK Kamilia

**Le :** 21/06/2023

MOKADEM Maissem

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** Dr. BENSOUICI Chawki (MRA-CRBT).

**Examineur 1:** Dr. KITOUNI Rachid (MCB- UFM Constantine).

**Examineur 2:** Dr. TAREK Bezi (MRB-CRBT).

**Année universitaire 2022 – 2023**

## Remerciements

Remerciant tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force de réaliser ce travail.

Je remercie très chaleureusement l'encadrant Dr. **BENSOUICI Chawki**, chef du laboratoire de contrôle de qualité au centre de Recherche en Biotechnologie, qui nous a encadrés avec patience durant la réalisation de ce travail. Ses conseils nous ont été bien utiles, notamment pour la rédaction de ce mémoire.

On adresse nos remerciements les plus sincères au **Dr kitouni rachid** pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce jury.

On tient à remercier profondément **Dr Bezi tarek** , d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements à tous les responsables du Centre national de recherche en biotechnologie (**CRBt**). Que dieu vous bénisse, vous êtes une fierté

Pour la science et la recherche scientifique spécialement l'ingénieur **SARA**.

Je remercie tout spécialement l'ensemble des doctorants que j'ai côtoyés au laboratoire de Biochimie, et qui m'ont apporté leur aide par leur compétence. Je leur souhaite un avenir plein de succès.

Nous vous souhaitons plus de succès.....

## Dédicace ...

Avec la générosité et l'aide d'ALLAH le majestueux qui m'a donné la patience, le courage et la santé, j'ai pu réaliser ce modeste travail.

Actuellement le stylo écrit ses derniers mots qui seraient une dédicace exprimer mon respect, mon amour éternel et ma reconnaissance pour mes Chers parents, qui m'ont toujours poussé et motivé durant mes études.

Pour tous les sacrifices qu'ils ont consenti pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que Dieu vous protège et vous garde en bonne santé.

A mes très chers frères Sohaib et Ahmed monssif et mes sœurs Mona et Meriem qu'sont mon modèle dans l'étude et mon la vie.

A Mon merveilleuse collègue Kamilia pour tous les moments inoubliables qu'on a passés ensemble.

A toutes mes amies et toutes les personnes qui me sont chères Afaf, Wiam, Sally, Imane, Rania, Ihssan, Ahlam...

À tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet, je vous dédie ce travail.

Décrivant les années que nous avons passé avec toi plaisir et amour, il a été ponctué de quelques différences anodines.... Actuellement mon stylo se tient en marge de la page de souvenirs que nous l'avons passée à l'université Que puis-je dire avec les yeux remplis de larmes de séparation et de manque de souhait de rencontre Vous être les meilleurs, et le plus merveilleux.

Vous resteriez toujours dans mon cœur

Maissem



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à mon amour éternel et ma reconnaissance pour mes parents **Ali** et **María** qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, pour tous les sacrifices qu'ils ont consenti pour mon instruction et mon bien être, j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que Dieu vous protège et vous garde en bonne santé.*

*A mes très chères sœurs **Manel**, **Aïcha**, **Hadjer**, pour leur appui, encouragements et pour leur aide incessante.*

*A mon seul chère frère **Oussama** pour l'encouragement et pour l'aide incessante.*

*Qui m'ont toujours soutenus ,et encourager tout au long de mon parcours Qui Dieu les garde.*

*A toutes mes amies et toutes les personnes qui me sont chères.*

*A tous ceux qui m'ont soutenu et épaulé pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

***Kamília...***

## Table des matières

Liste des abréviations .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des tableaux .....	III
Introduction générale .....	1
<b>Chapitre I : Recherche bibliographique</b>	
I. Généralité sur les agrumes .....	3
I.1. Historique sur les agrumes .....	3
I.2. Citron .....	3
I.2.1.Définition .....	3
I.2.2. Les variétés de citron .....	4
I.2.3.Classification botanique .....	5
I.2.4.Composition chimique .....	6
I.2.5.Utilisation et effets thérapeutiques .....	7
II. Huiles essentielles .....	8
II.1.Définition .....	8
II.2.Propriétés physico-chimiques .....	8
II.3.Composition des huiles essentielles .....	8
II.4.Huiles essentielles de citron .....	9

II.5.Toxicité des huiles essentielles .....	10
II.6.Modes d'extraction .....	10
II.6.1.Hydrodistillation .....	10
II.6.2.Entrainement à la vapeur d'eau .....	11
II.6.3.Expression ou pressage à froid .....	12
II.6.4.Extraction par les solvants .....	12
II.6.5.L'extraction par solvant assistée par micro-ondes .....	12
II.6.6.Extraction par le CO2 à l'état supercritique .....	12
III. Ver de farine Tenebrio molitor .....	12
III.1.Définition .....	12
III.2.Systématique .....	13
III.3.Classification .....	13
III.4.Morphologie .....	14
III.5.Cycle de vie .....	14
IV. Activité antioxydante .....	15
IV.1.Mise en évidence de l'activité antiradicalaire .....	15
IV.1.1.Activité antiradicalaire au DPPH .....	15
IV.1.2.Activité du piégeage du cation radical ABTS•+ .....	16
IV.1.3.Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	17

IV.1.4.Activité de réduction par la formation du complexe Fe+2- phénantroline .....	18
IV.1.5.Activité du silver nano particule (SNP) .....	18
V. Activité enzymatique .....	19
V.1.Evaluation de l'activité antidiabétique .....	19
V.1.1.Inhibition de L'α-amylase .....	20
VI.Inflammation et activité anti inflammatoire .....	20
VI.1.Généralités sur l'inflammation .....	20
VI.2.Les anti-inflammatoires .....	20
VII. Evaluation d'anti-moisissures .....	21
VIII. Evaluation d'anti-germination .....	22
IX. Croissance cristalline .....	23
<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>	
I. Matériel biologique .....	24
I.1 Matériel végétal .....	24
I.2. Méthodes d'extraction .....	24
2.1. Préparation des extraits .....	24
a. Première extrait .....	24
b. Deuxième extrait (huiles essentielles) .....	24
1. Hydrodistillation .....	24

1.1. Protocol expérimental .....	25
1.2. Taux d'extraction .....	25
II. Activités biologiques .....	25
II.1. Activité antioxydant .....	25
II.1.1. Activité anti-radicalaire au DPPH .....	25
II.1.2. Estimation de l'activité ABTS .....	26
II.1.3. Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline .....	26
II.1.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	27
II.1.5. Activité du silver nano particule (SNP) .....	27
II.2. Activité enzymatique .....	28
II.2.1. Inhibition de l'alpha-amylase .....	28
II.3. Activité anti inflammatoire in-vitro .....	28
II.4. Activité anti-germination .....	29
II. 5. Evaluation de l'activité d'anti-moisissures .....	29
III. Evaluation de l'effet toxicité .....	30
IV. Test de l'infection urinaire .....	31
IV.1. Préparation des urines .....	31
V. Insecticide .....	32
VI. Evaluation de l'évolution de cycle de vie des tenebrio molitor .....	32



### Chapitre III : Résultats et discussions

I.Activités biologiques .....	33
I.1. Activités antioxydantes .....	33
I.1.1.Activité anti-radicalaire au DPPH .....	33
I.1.2.Activité du piégeage du cation radical ABTS•+ .....	35
I.1.3.Activité de réduction par la formation du complexe Fe+2-phénantroline .....	36
I.1.4.Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	38
I.1.5.Activité du Silver nanoparticules (SNP) .....	40
I.2. Activité enzymatique .....	41
I.2.1.Evaluation de l'activité antidiabétique .....	42
I.3. Evaluation de l'activité anti inflammatoire .....	43
I.4.Evaluation d'anti-germination .....	45
I.5.Evaluation d'anti-moisissures .....	48
II.Evaluation de la cytotoxicité .....	49
III.Evaluation <i>in-vitro</i> de l'anti-infection urinaire .....	51
VI.anti-insecticide .....	52
V. Evaluation d'un nouveau milieu nutritif pour les vers de farine .....	53
<b>Conclusion</b> .....	55
<b>Références bibliographiques</b> .....	56

**Annexes**

**Résumé**

## Liste des abréviations

- ✓ **ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- ✓ **A0.5**: Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
- ✓ **°C** : Degré Celsius
- ✓ **CI50** : Concentration d'inhibition à 50%
- ✓ **DPPH** :  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl
- ✓ **EECL** : Extrait ethanolique citrus limon
- ✓ **FRAP** : Pouvoir réducteur
- ✓ **g** : Gramme
- ✓ **HECL**: Huile essentielles citrus limon
- ✓ **KCal** : Kilocaloria
- ✓ **mm** : millimètre
- ✓ **m** : Masse
- ✓ **M** : Molaire
- ✓ **mg** : Milligramme
- ✓ **min** : Minute
- ✓ **ml** : Millilitre
- ✓ **mM** : Millimolaire
- ✓ **MM** : Masse molaire
- ✓ **MM** : Masse molaire
- ✓ **mm** : millimètre
- ✓ **NA**: Non active
- ✓ **nm** : Nanomètre
- ✓ **PG** : Le pourcentage de la germination
- ✓ **pH**: Potentiel hydrogène
- ✓ **PM(%)** : Le pourcentage de moisissures et mortalité
- ✓ **Pnd** : pendant
- ✓ **s** : Seconde
- ✓ **Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique
- ✓ **U** : Unité
- ✓ **UV** : Ultraviolet
- ✓ **Vit c** : vitamine c ou acide ascorbique
- ✓ **µg** : Microgramme
- ✓ **µl** : Microlitre

## Liste des figures

Numéro	Titre	page
<b>Chapitre I</b>		
<b>Figure 01</b>	Photo de citron	3
<b>Figure 02</b>	Photo de plant de Citrus limon	5
<b>Figure 03</b>	Shéma d'Hydrodistillation	11
<b>Figure 04</b>	Shéma de Entrainement à la vapeur d'eau	11
<b>Figure 05</b>	Cycle de vie de ténébrion molitor	15
<b>Figure 06</b>	Transformation du radical DPPH <sup>•</sup> en DPPHH	16
<b>Figure 07</b>	Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H <sup>•</sup>	17
<b>Figure 08</b>	Mécanisme réactionnel du test FRAP	18
<b>Figure 09</b>	Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénantroline	18
<b>Figure 10</b>	Mécanisme de réduction d'Ag en nanoparticule (SNP)	19
<b>Figure 11</b>	Les différentes taille des cristaux	23
<b>Chapitre II</b>		
<b>Figure 12</b>	Photo de la plante citrus	24
<b>Figure 13</b>	Anatomie de <i>TenebrioMolitor</i>	31
<b>Chapitre III</b>		
<b>Figure 14</b>	La plaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH) des extraits de citrus limon	33
<b>Figure 15</b>	Les pourcentages d'inhibitions du test DPPH de l'extrait ethanologique et de l'huile essentielle	34
<b>Figure 16</b>	La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>•+</sup> des extraits de citrus limon	35
<b>Figure 17</b>	Les pourcentages d'inhibitions de l'extrait ethanologique et de l'huile essentielle	36
<b>Figure 18</b>	La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénantroline par les extraits de citrus limon	37

<b>Figure 19</b>	Les valeurs d'absorbances de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle	38
<b>Figure 20</b>	La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des extraits de citrus limon	38
<b>Figure 21</b>	Les valeurs d'absorbances de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle	39
<b>Figure 22</b>	La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (SNP) des extraits de citrus limon	40
<b>Figure 23</b>	Les valeurs des $A_{0,50}$ du test Silver nanoparticules pour l'extrait éthanolique et l'huile essentielle	41
<b>Figure 24</b>	Plaque de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase des extraits de <i>citrus limon</i>	42
<b>Figure 25</b>	Pourcentage d'inhibition de l'alpha-amylase par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle	43
<b>Figure 26</b>	La plaque de dosage de l'activité anti-inflammatoire des extraits de citrus limon	44
<b>Figure 27</b>	Les pourcentages d'inhibitions du test anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de <i>citrus limon</i>	45
<b>Figure 28</b>	Effet d'huile essentielle de citrus limon sur les grains d'orge	46
<b>Figure 29</b>	Effet d'extrait éthanolique de citrus limon sur les grains d'orge	46
<b>Figure 30</b>	Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'huile essentielle de citrus limon	47
<b>Figure 31</b>	Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'extrait éthanolique de citrus limon	47

<b>Figure 32</b>	L'effet des extraits de citrus limon sur la bio-conservation de sauce tomate avant et après	48
<b>Figure 33</b>	Image de tenebrio molitor après traitement par les extraits de citrus limon	49
<b>Figure 34</b>	les valeurs de pourcentage de mortalité des vers de farine à quantité Différents des extraits de citrus limon	50
<b>Figure 35</b>	les résultats des urines avant et après l'incubation.	51
<b>Figure 36</b>	Le résultat du test insecticide	52
<b>Figure 37</b>	Taux de mortalité en pourcentages	52
<b>Figure 38</b>	Les trois différents milieux nutritifs pour les ver de farine	53

## Liste des tableaux :

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Position systématique de <i>Citrus limon</i>	5
Tableau 2	Représente les valeurs nutritionnelles pour 100g	6
Tableau3	Représente les valeurs des Minéraux et oligo-éléments	7
Tableau4	Représente les valeurs des Vitamines et assimilés	7
Tableau 5	Composition chimique (%) d'huile essentielle de citron acclimatés en Algérieà partir de parties de peau fraîche identifiées par analyse GC-MS	9
Tableau 6	Classification systématique de <i>Tenebrio molitor</i>	13
Tableau 7	Inhibition du radical DPPH par les extraits <i>de citrus limon</i>	33
Tableau 8	Inhibition du radical ABTS par les extraits <i>de citrus limon</i>	35
Tableau 9	Absorbance du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline des extraits de citrus limon	37
Tableau 10	Absorbance du pouvoir réducteur par les extraits de citrus limon	39
Tableau 11	Absorbance du Silver nanoparticules par les extraits de citrus limon	41
Tableau 12	Inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits de <i>citrus limon</i>	42
Tableau 13	l'inhibition de dénaturation d'ovalbumine par les extraits <i>de citrus limon</i>	44
Tableau14	Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'huile essentielle de citrus limon	46

Tableau15	Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'extrait éthanolique de citrus limon	47
Tableau 16	Les valeurs de pourcentage de dégradation de la sauce tomate pour les extraits de citrus limon.	49
Tableau 17	les valeurs de pourcentage de mortalité des vers de farine à concentrations différents des extraits de citrus limon.	50
Tableau 18	l'évolution des tenebriomolitor dans des trois milieux différente	53



# INTRODUCTION GENERALE

## Introduction générale

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours pour but de résoudre leurs problèmes de santé. Elles forment la base de la médecine traditionnelle grâce à leur richesse en métabolites secondaires utilisées comme composés actifs. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire [1] [2].

Les plantes médicinales, considérées comme ayant des propriétés thérapeutiques, ont été utilisées depuis le début de la civilisation humaine pour traiter différentes maladies et l'utilisation de cette stratégie efficace pour la promotion de la santé humaine a considérablement augmenté au cours des dernières années [3].

Parmi ces plantes on a l'espèce *citrus limon* de la famille des *Rutaceae* et troisième le plus important de la famille des agrumes après l'orange et la [4]. Est l'une des cultures les plus largement cultivées dans le monde surtout dans les climats tropicaux et les régions tempérées. Elles sont très riches en composés actifs (polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, les huiles essentielles...etc) [5] [6].

Le système antioxydant du corps humain a la capacité d'éliminer les radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS), telles que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et l'oxyde nitrique ( $NO$ ), qui endommagent l'ADN et conduisent à l'oxydation des graisses et des protéines dans les cellules. Cela permet de maintenir l'équilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes de l'organisme [7].

La demande d'antioxydants naturels, en particulier d'origine végétale, est en augmentation dans le secteur de la cosmétique alimentaire et pharmaceutique, car ils peuvent être utilisés comme alternatives naturelles aux antioxydants synthétiques qui provoquent une toxicité [8].

Ce travail a pour objectif principal l'évaluation des activités biologiques et de l'espèce *citrus limon*. Ainsi, ce manuscrit est structuré comme suit :

Le premier chapitre est consacré à des généralités bibliographiques sur *citrus limon* et leur huiles essentielles ainsi que sur les techniques d'extraction et des généralités sur les activités antioxydant , antidiabétique, et anti-inflammatoire et autres activités enzymatiques ,ainsi que des généralité sur les Vers de farine (*Tenebrio molitor*)

Le deuxième chapitre concerne la partie expérimentale comportant la description du matériel biologique, les méthodes d'extraction, les méthodes d'évaluation *in vitro* des activités, antioxydantes, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-germination, anti-moisissures, cytotoxicité, anti-infection urinaire et anti-insecticide.

Le troisième chapitre comprend les résultats et discussions des activités mentionné dans Le deuxième chapitre

Enfin, une conclusion générale relative à nos travaux résumant ce manuscrit.

**CHAPITRE 1**  
**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Généralité sur les agrumes

### I.1. Historique sur les agrumes

Les agrumes sont originaires des pays du Sud-Est Asiatique. Leurs cultures se confondent avec l'histoire des civilisations chinoise. En effet c'est avec le rayonnement de la civilisation chinoise et indoue que la culture des agrumes, s'est propagée à l'ensemble des pays du Sud-Est Asiatique, le Sud de Japon et l'archipel de Malaisie [9].

En Algérie, les arabes avaient bien introduit le bigaradier dans l'empire des Almohades [10], toutefois, il embellisse déjà, pendant la période Ottomane (du 16<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> siècle), les jardins des Beys [11]. L'oranger y fut sans doute apporté quelques siècles après par les maures d'Andalousie [10]. Au début de la colonisation en 1850, le mandarinier fut introduit en Algérie par M. Harby. Au 19<sup>ème</sup> siècle, le père Clément de l'orphelinat agricole de Misserghin, effectuant un croisement de mandarinier (Commun) avec le bigaradier (Granito) découvrit (Clémentine) [11].



**Figure1** : Photo de citron

### I.2. Citron

#### I.2.1. Définition

Le *citrus limon* ou citron est le fruit du citronnier, ce dernier peut atteindre entre deux et cinq mètres de haut. Cet agrume de la famille des Rutacées (*Rutaceae*) possède une écorce épaisse qui passe du vert au jaune grâce à l'action du froid. Le fruit de citronner est une baie cortiquée.

Selon les espèces, la fleur se transforme en fruit mur, de forme ronde, allongée ou ovale (8 à 12 cm de long sur 5 à 6 cm de diamètre), présentant un téton à une extrémité et quelquefois à chaque extrémité [12]. Il reste longtemps sur l'arbre sans que le goût s'altère.

On le multiplie par semis au printemps, sur un sol bien drainé et très exposé au soleil. Les citronniers ont une résistance au gel assez limitée : entre -3 °C et -5 °C. En dehors des régions méditerranéennes, il est recommandé de les protéger en hiver. C'est pourquoi ils sont généralement plantés en pot afin d'être déplacés durant les périodes de froid. Leur croissance sera moins rapide et importante qu'en pleine terre et leur récolte sera moins abondante. Les fruits se récoltent en hiver, quand leur teneur en vitamine C est maximale. Pleine terre et leur récolte sera moins abondante.

### **I.2.2. Les variétés de citron**

Parmi les innombrables variétés de citron qu'on peut les trouver sur les marchés voici les plus courantes [12] :

#### **a. Citron eureka**

Variété la plus produite dans le monde. Très parfumée, acide, avec un très gros rendement de production. Elle peut produire toute l'année et tenir de faibles gelées à -5°C.

#### **b. Citron verna**

Variété très commune, également productive presque toute l'année. Produit peu de graines et plus rustique car supporte des gelées à -8°C.

#### **c. Citron lisbonne**

Proche des deux autres variétés mais avec la peau plus rugueuse et plus parfumée. Il a aussi une forme plus ronde avec une petite queue caractéristique avec des pulpes juteuses.

#### **d. Citron de menton**

Variété de Citron Française, très parfumé, écorce riche en huile essentielle, épiderme jaune clair intense, des reflets jaunes avec jus presque limpide.

### e. Citron de pezenas

Arbre vigoureux probablement issu de la variété Eureka mais plus résistant au froid (-8°). Beaucoup d'autres caractéristiques communes avec le Citronnier Eureka.

### f. Citron vanille

Fruit un peu plus petit qu'un citron standard, mais gros avantage de développer une pulpe et un jus sans acidité. Certains lui trouvent certaines petites notes de vanille d'où son nom.

### I.2.3. Classification botanique

Selon Nerovique et al. (2011), [13] la classification de citron est la suivante :



Figure2 : Photo de plant de Citrus limon

Règne	Plantae
L'ordre	Térébinthales
Classe	Dicotylédones
Famille	<i>Rutaceae</i>
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus limon</i>

Tableau 1 : Position systématique de *Citrus limon*

### I.2.4. Composition chimique

Comme les autres agrumes, les feuilles et les fruits très juteux de citron sont des sources de composés naturels, comportant un taux de 90% d'eau, fortement acide

(pH inférieur à 3), dont l'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le citron est un fruit remarquable par sa haute teneur en vitamine C et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (Naringosides, Hesperidosides) et des polyphénols.

Les citrons frais sont faibles en calories et en sucre, mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron, il est riche en calcium, magnésium et potassium qui est le minéral le plus abondant.

Le tableau 2 représente les valeurs des différentes compositions chimiques du citron [14]

Les éléments nutritionnels	Les valeurs
Énergie (kCal)	29 kCal
Protéines	0,8 g
Lipides	0,3 g
Glucides	2,45 g
Fibres	2 g
Eau	89,2 g

**Tableau 2** : Représente les valeurs nutritionnelles pour 100g

Minéraux et oligo-éléments	Les valeurs
Potassium	149 mg
Phosphore	16 mg
Calcium	18 mg
Sodium	<3 mg
Magnésium	8,93 mg
Fer	0,06 mg
Zinc	0,07 mg
Cuivre	0,037 mg
Manganèse	0,03 mg



Sélénium	0,4µg
----------	-------

**Tableau3** : Représente les valeurs des minéraux et oligo-éléments

Vitamines et assimilés	Les valeurs
Vitamine A et provitamine A	1 µg
Lutéine et zéaxanthine	11µg
Thiamine (Vitamine B1)	0,04 mg
Riboflavine (Vitamine B2)	0,02 mg
Vitamine B6	0,08 mg
Vitamines B12	0 µg
Vitamine C	53 mg
Vitamine D	0 µg
Vitamine D (UI)	0 UI
Vitamine E (tocophérols)	0,15 mg
Acide pantothénique (Vitamine B5)	0,19 mg

**Tableau4** : Représente les valeurs des Vitamines et assimilés

### I.2.5. Utilisation et effets thérapeutiques

Diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes de citron et la diminution de l'oxydation [15]. Les feuilles de citron sont utilisées conjointement avec d'autres plantes comme le thé et la menthe afin de stimuler la circulation, apporter tonus et vitalité, lutter contre l'anémie et traiter les troubles d'estomac [16], de l'insomnie et de l'asthme [17].

Les écorces et les graines sont employées pour renforcer les défenses immunitaires indispensables, et traiter les maladies dégénératives telles que l'hypertension [18], le cholestérol, le diabète, l'obésité et quelques cancers. Aussi, il prévient contre le rhumatisme et la thrombose [19]. Les huiles essentielles de citron est employée depuis l'antiquité par les industries de la parfumerie [20].

## **II. Huiles essentielles**

### **II.1. Définition**

La pharmacopée française définit une huile essentielle comme un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de composition [21].

Ces composés aromatiques localisés dans différents organes producteurs des végétaux (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches à essences [22].

Le terme « essence » correspond à la substance aromatique qui est sécrétée de façon naturelle par la plante, après distillation cette substance devient une huile essentielle. Ce terme ne peut être employé que pour certaines plantes comme celles contenant des citrals (orange, citron, mandarine... etc.) [23].

### **II.2. Propriétés physico-chimiques**

D'après Bruneton [24], les principales propriétés physico-chimiques des HE sont :

- Généralement liquides à température ambiante.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Leur densité est en générale inférieure à celle de l'eau.
- Leur indice de réfraction élevé.
- Sont solubles dans les solvants organiques usuels mais très peu soluble dans l'eau.

### **II.3. Composition des huiles essentielles**

D'après Maleckey les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variés, constitués de composés organiques de structures et de fonctions chimiques très diverses. Généralement, on classe ces composés en deux groupes : les hydrocarbures terpéniques et les composés oxygénés

**a. Le groupe des terpénoïdes :** Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique" [25].

**b. Groupe des composés aromatiques :** Ce groupe dérive des phénylpropane. Ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Leur voie biosynthétique est différente à celle des terpènes [26].

#### II.4. Huiles essentielles de citron

La composition des huiles de citron est dominée par les hydrocarbures monoterpéniques et contient en plus du limonène,  $\beta$ -pinène, une quantité considérable de  $\gamma$ -terpinène et une plus petites quantités d'autres monoterpènes : 2-thujène, l' $\alpha$ -pinène, le camphène, le  $\beta$ -phellandrène, o-cymène, et terpinolène [27].

L'aldéhyde-citral est également présente dans le citron, sous la forme de stéréoisomères néral et gérianique. Le citral et le linalol sont traités comme l'arôme le plus puissant des composés dans le limon. L'acide citrique est l'acide organique majeur du citron [22]

Selon l'étude de [28] l'analyse chimique des huiles essentielles du citron a identifié les principaux composés représentés dans le tableau I.

Composants	Huile essentielle de citron (%)
$\alpha$ -Pinene	03.07
$\beta$ -Pinene	17.04
$\beta$ -Myrcene	2.37
$\gamma$ -imonene	51.40
$\gamma$ -Terpinene	13.46
Nerol	1.50
Geraniol	2.43
Nerylacetate	1.05
Isocaryophyllene	01.23

**Tableau 5 :** Composition chimique (%) d'huile essentielle de citron acclimatés en Algérie à partir de parties de peau fraîche identifiées par analyse GC-MS (Djenane, 2015).

### II.5. Toxicité des huiles essentielles

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé présentant une toxicité par voie orale avec des doses létales à 50% (DL50) supérieures à 5 g/kg, peut provoquer des effets néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques...etc, et peut entraîner une insuffisance rénale chez l'enfant à doses élevées [29].

L'usage des huiles essentielles en application locale, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations et des allergies.

Les essences d'agrumes (pamplemousse, citron...etc) sont photo-sensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil [29].

L'utilisation des huiles essentielles doit s'accompagner de nombreuses précautions. La plupart des composés d'une huile essentielle sont lipophiles et sont donc rapidement absorbés, quel que soit la voie d'administration. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la dangerosité d'une huile essentielle comme la teneur en molécules toxiques, la manière d'appliquer l'huile essentielle, le dosage ou encore la durée de l'application.

Il convient donc de tester une huile essentielle avant toute utilisation. De plus, il convient de ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur les muqueuses (nez,

yeux...etc), ce type d'application nécessite une dilution systématique de l'huile essentielle. Elle est déconseillée aux femmes enceintes et aux femmes qui allaitent [30] [31].

## II.6. Modes d'extraction

Les principales méthodes d'extraction couramment utilisées sont :

### II.6.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est un procédé très ancien permettant de séparer des substances d'une mixture liquide. L'appareil utilisé pour cette méthode est de type Clevenger. Il est constitué d'un chauffe ballon, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et d'un collecteur en verre qui reçoit les extraits de la distillation.

L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement et à l'ombre [32].

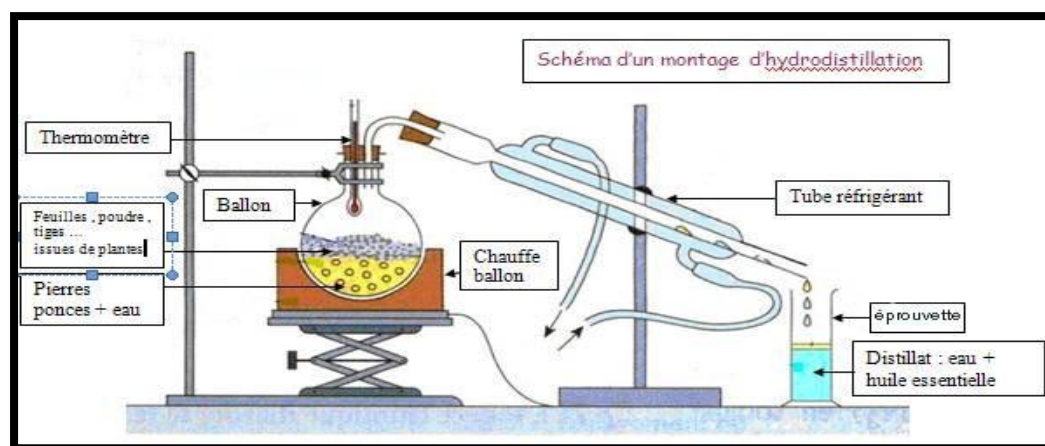


Figure 3 : Schéma d'Hydro-distillation.

### II.6.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Pour ce procédé, la vapeur est appliquée à partir du haut du matériel végétal. Ce processus peut également être exploité sous basse pression ou sous vide et réduit la température de la vapeur à moins 100°C [33].

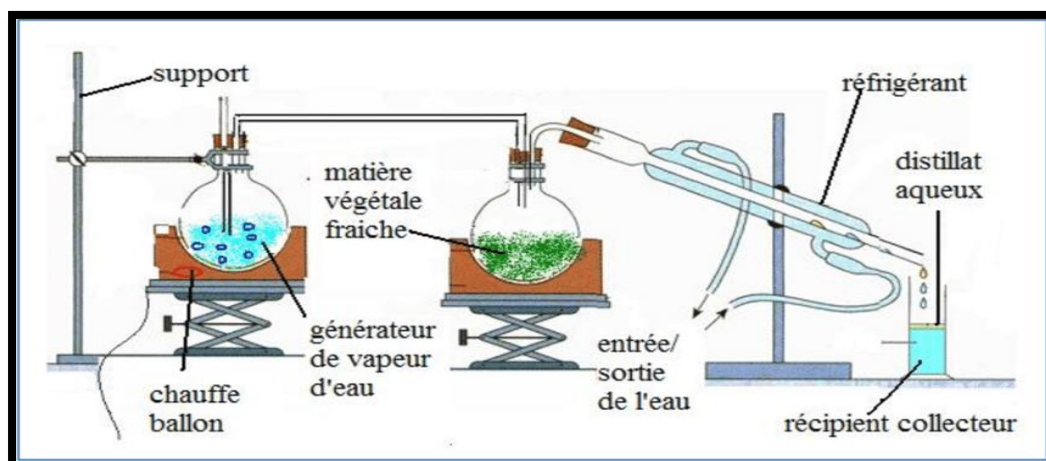


Figure 4 : Schéma de l'extraction à entrainement de vapeur.

### II.6.3. Expression ou pressage à froid

Le procédé est utilisé uniquement pour l'obtention des huiles essentielles contenues dans les zestes d'agrumes.

Il s'agit d'un processus physique dans lequel les glandes à huile essentielle de la peau du fruit sont percées, broyées ou concassées mécaniquement afin de libérer l'essence. Cette méthode est économiquement plus rentable que l'hydrodistillation et permet d'éviter d'éventuelles dégradations thermiques [34].

### II.6.4. Extraction par les solvants

Les solvants les plus utilisés sous réserve de législations restrictives particulières sont les hydrocarbures aliphatiques (éther de pétrole, hexane, propane), les solvants halogénés (dérivés chlorés, et fluorés du méthane et de l'éthane) et l'éthanol. L'inconvénient majeur de l'extraction par les solvants est leur manque de sélectivité et aussi leur toxicité [35].

### II.6.5. L'extraction par solvant assistée par micro-ondes

C'est une technique par solvant assistée par microondes en vue d'une analyse chromatographique. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes de la matière, végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les microondes (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.

Cette technique se présentait comme beaucoup plus efficace qu'une méthode conventionnelle et permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie [36].

### **II.6.6. Extraction par le CO<sub>2</sub> à l'état supercritique**

Ce procédé est basé sur le fait que le CO<sub>2</sub> dans des conditions dites critiques (fortes pressions) présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les HE, les arômes et les colorants (Mayer, 1989). L'avantage de cette technique est de minimiser les risques de dégradation thermiques [34].

## **III. Ver de farine *Tenebrio molitor***

### **III.1. Définition**

Les insectes prennent une place très importante dans le règne animal et appartiennent à l'embranchement des arthropodes [37].

D'une vision écologique, on peut trouver les insectes dans presque tous les écosystèmes excepté les régions polaires et des eaux profondes.

Les insectes exploitent une grande diversité de ressources alimentaires, ils peuvent être des omnivores ou strictement herbivores. ... [37].

L'intérêt mondial pour les insectes, en tant qu'aliment destiné aux animaux, ne cesse d'augmenter, et parmi les insectes les plus prometteuses pour la production industrialisée d'aliment d'engraissement sont les larves des Ténébrions meuniers couramment appelées ver de farine. Cet intérêt revient particulièrement à leur riche teneur en protéines [38].

Son nom scientifique est *Tenebrio molitor*, dit aussi *T. meunier* est une espèce cosmopolite banale, qu'on croise facilement dans les lieux communs domestiques des activités humaines, maisons, jardins et surtout les dépôts des céréales. Cet insecte est omnivore c'est-à-dire quand son appareil digestif lui permet d'absorber des aliments d'origines végétale et animale et selon des publications récentes cette capacité digestive exceptionnelle lui revient de sa flore microbienne colonisatrice de son propre tube digestif. En addition, ce ver de farine est considéré chez les céréaliers

comme une espèce ravageuse vu qu'elle s'attaque à leur stockage de céréales, d'où vient son nom *Tenebrio meunier* [39] [40].

### III.2. Systématique

*T. molitor* appartient à la famille des *ténébrionidés*, une famille comptant plus de 20 000 espèces de coléoptères qui représentent 40% de toutes les espèces d'insectes [40].

### III.3. Classification

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordre	Coleoptera
Famille	Tenebrionidae
Sous-famille	Tenebrioninae
Genre	<i>Tenebrio</i>
Espèce	<i>Tenebrio molitor</i> (Linnaeus, 1758).

**Tableau 6:** Classification systématique de *Tenebrio molitor*

### III.4. Morphologie

Comme la majorité des insectes, le ver de farine a six pattes et son corps se forme de: la tête, le thorax muni par les pattes et l'abdomen. L'adulte est de couleur noire, mesure environ 1,5 cm de long et 0,5 cm de large. Il possède deux paires d'ailes. La première paire, les élytres, elles ne servent pas à voler, mais plus tôt a un rôle de protection.

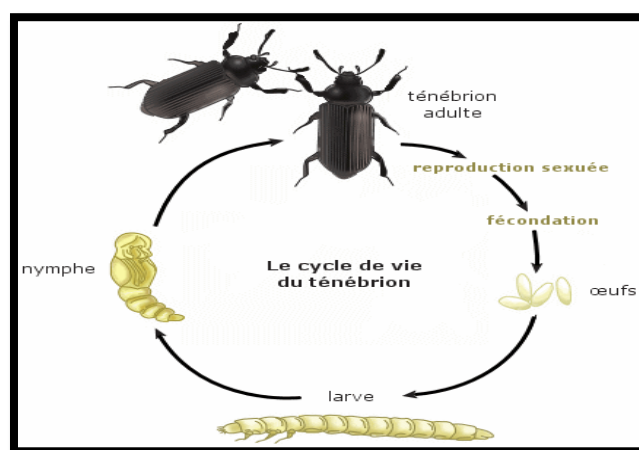
Lors du stade larvaire, le ver prend une couleur blanchâtre qui se noircit avec le temps en marron jaunâtre.

Cette larve est un des noyaux de notre projet. Après chaque mues, la larve grandit de quelques millimètres jusqu'à elle atteint 2,5 cm en fin de développement c'est à juste avant sa transformation en nymphe [41].



### III.5. Cycle de vie

Le cycle de développement passe par plusieurs stades de transformation qu'on peut aisément les observer à l'œil nu sauf le stade des œufs. Les adultes pondent des œufs qui donnent naissance à des larves. La larve se mue et se débarrasse de sa cuticule qui empêche la larve de grandir. Ainsi, son cycle de vie varie en fonction de la température et le stade larvaire compte entre 8 et 20 cycles qui durent quatre semaines à plusieurs mois, selon l'humidité et la température ambiantes [37].



**Figure5:** Cycle de vie de *ténébrion molitor*

## IV. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés capables à ralentir ou à empêcher les processus d'oxydation qui se produisent sous l'influence de l'oxygène atmosphérique ou d'une espèce réactive oxygénée. Ils sont employés pour la stabilisation des polymères, des produits pétrochimiques, des produits alimentaires, des produits cosmétiques et pharmaceutiques [42].

### IV.1. Mise en évidence de l'activité antiradicalaire

Les procédures utilisées pour évaluer l'activité antioxydante ont évolué considérablement de ceux utilisées précédemment quand l'efficacité des antioxydants a été simplement mesurée en surveillant la formation de l'espèce réactive oxygénée. Diverses analyses chimiques extrêmement sensibles et des technologies automatisées de détection sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante par des mécanismes particuliers, par exemple, la mesure de la capacité des antioxydants à

réduire le radical stable, pouvoir réducteur, réduction du cation radical ABTS<sup>•+</sup> etc. [43].

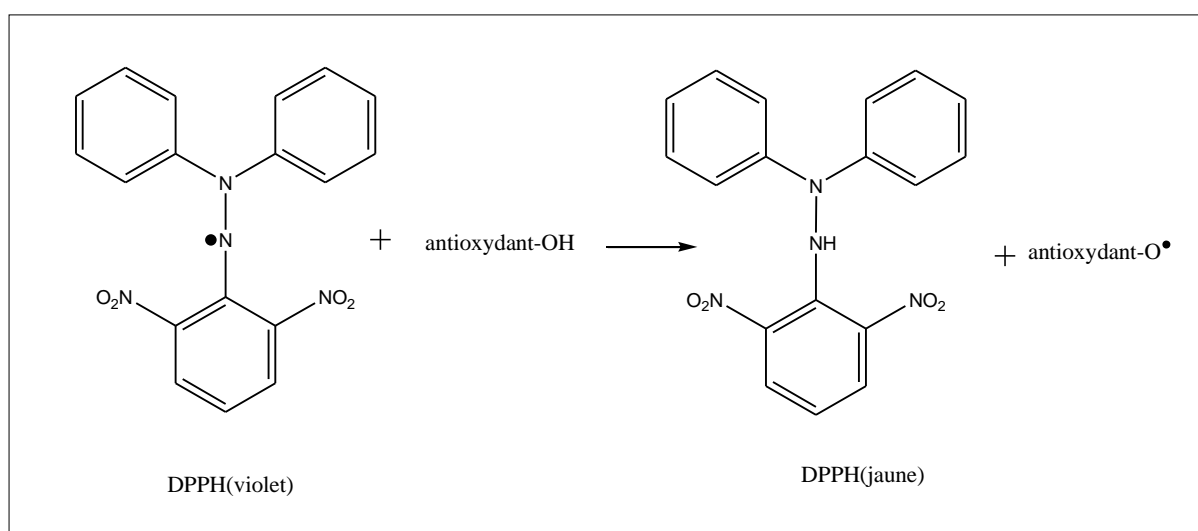
#### IV.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH :

Cette méthode a été développée par (Blois, 1958) dont l'objectif est de déterminer l'activité antioxydante en employant un radical libre stable l' $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl [44].

L'activité DPPH est simple et l'une des méthodes les plus largement utilisées.

Il est basé sur la réduction du radical violet DPPH par l'antioxydant via un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène pour provoquer un changement de couleur en molécules DPPH jaune pâle stable. Le radical violet DPPH restant est mesuré par spectrophotomètre UV-Visible à 517nm pour déterminer l'activité antioxydante. Ce test fournit des informations utiles sur la capacité antioxydante à donner des atomes d'hydrogène, sur la capacité réductrice de la réaction et sur le mécanisme entre le radical libre et l'antioxydant.

Le test est aussi simple puisqu'il n'est associé qu'au réactif radicalaire DPPH et à l'antioxydant [45].

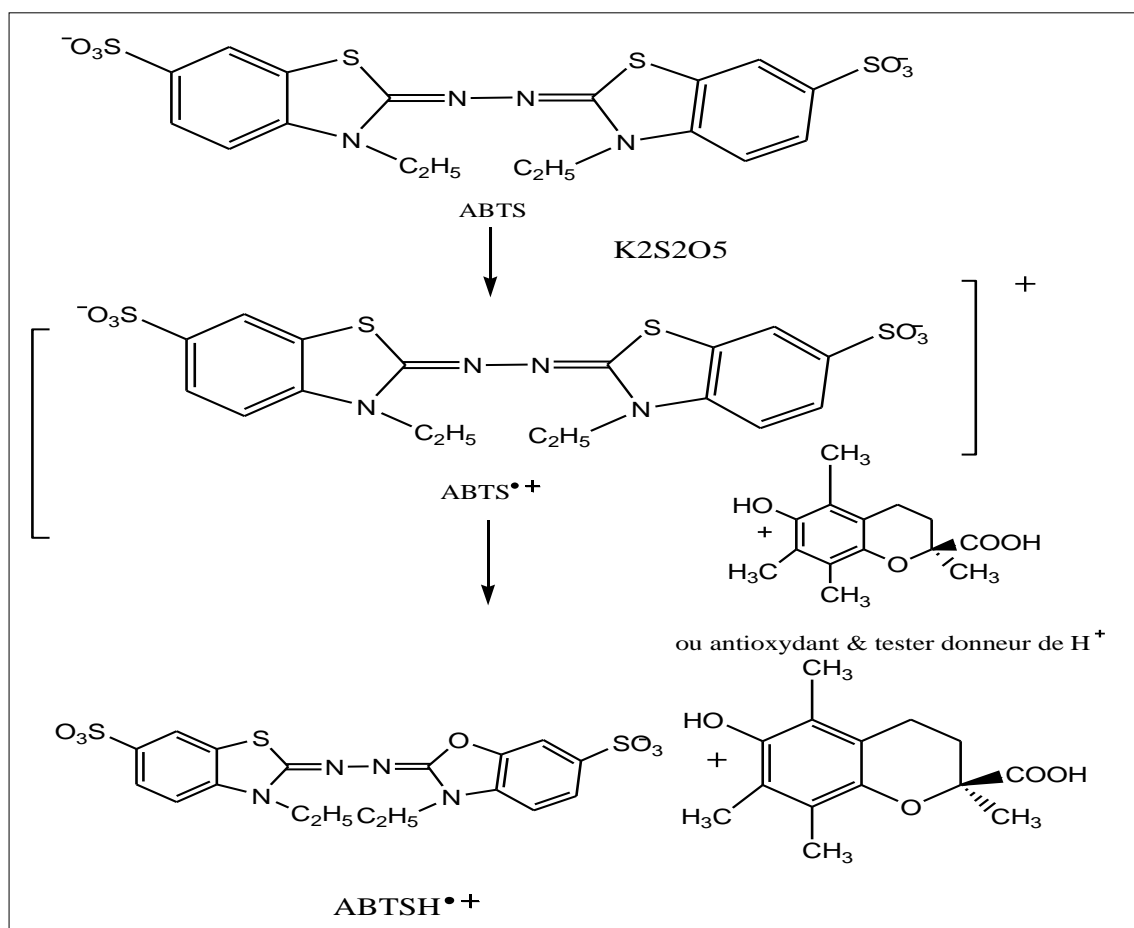


**Figure6** : Transformation du radical DPPH<sup>•</sup> en DPPHH

#### IV.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup>

La méthode ABTS (2,2- azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acide), également connue sous le nom de capacité antioxydante équivalente Trolox (TEAC), a été développée par Miller en 1993 [46].

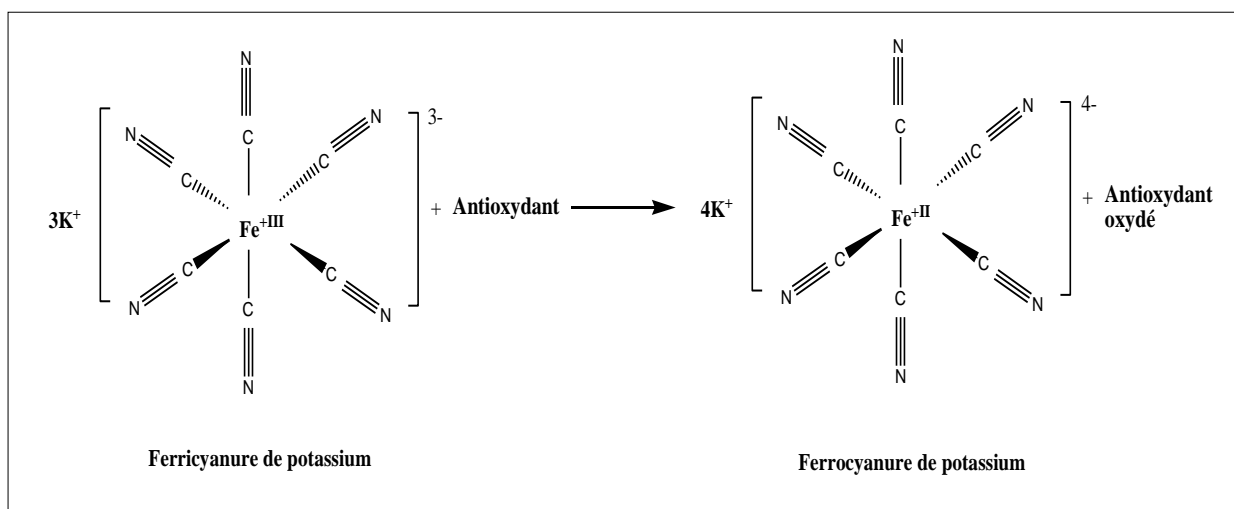
Il s'agit d'une méthode spectrophotométrique utilisée pour mesurer la capacité antioxydant totale (TAC), elle est basé sur l'oxydation de l'ABTS par le dioxyde de manganèse ou persulfate de potassium. Les antioxydants neutralisent le radical stable d'ABTS (l'acide 2,20-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS<sup>•+</sup>), de couleur bleu-verte, dont l'absorption maximale est estimée à 743nm . En présence de Trolox, une décoloration de la solution et une diminution de l'absorbance sont observés à 743 nm. Ce test dépend de l'activité des antioxydants, de leur concentration et de la durée de la réaction [47] [48] [49].



**Figure7:** Formation et piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H<sup>•</sup>

### IV.1.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

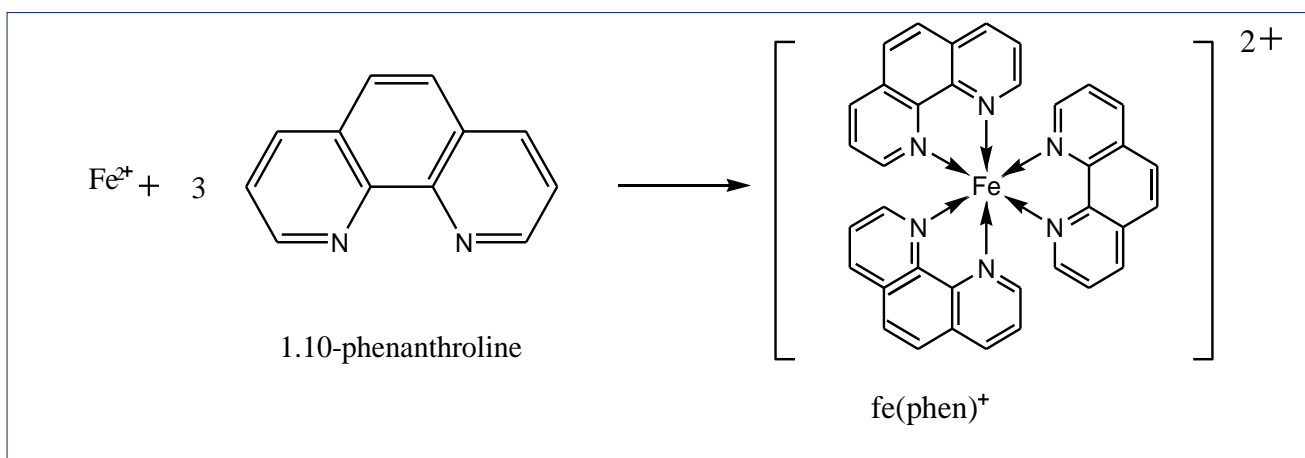
Ce test mesure la capacité de réduction ferrique (FRAP). A faible pH, quand un complexe ferrique est réduit à la forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ), une couleur bleue intense se développe avec une absorption maximum à 593nm [50].



**Figure 8 :** Mécanisme réactionnel du test FRAP

### IV.1.4. Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline :

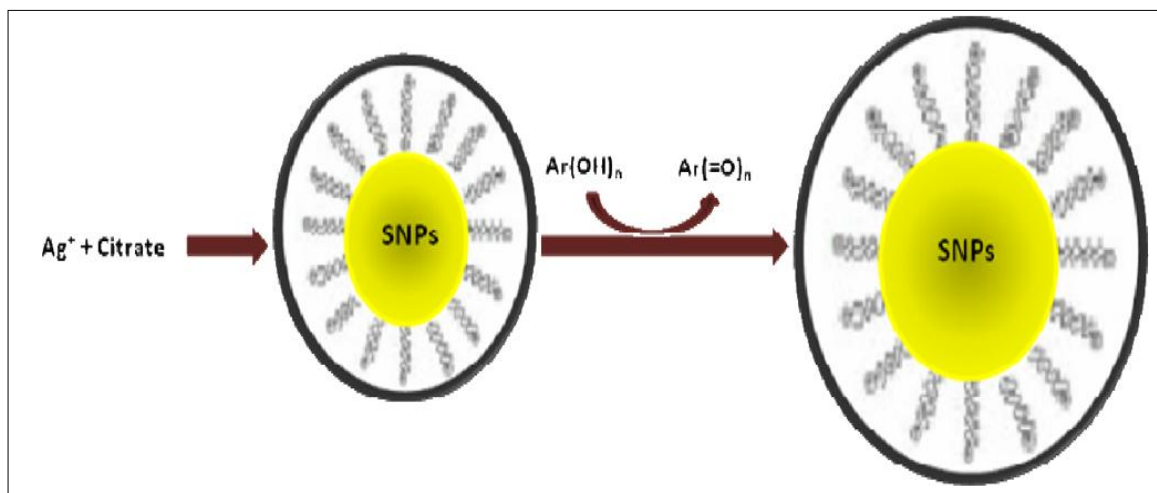
La méthode phénanthroline est basée sur le transfert des électrons d'un antioxydant provoquant la réduction des ions  $\text{Fe}^{3+}$  en ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Il se forme le  $\text{Fe}^{2+}$  qui réagit avec l'ortho-phénanthroline qui agit comme un ligand pour donner un complexe (le Tris de 1,10-phénanthroline -  $\text{Fe}^{2+}$ ) rouge-orange (Figure 9) [51]. Cette méthode est appliquée largement dans la spectrophotométrie classique pour la détermination du fer [52].



**Figure9:** Formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénanthroline

#### IV.1.5. Activité du silver nano particule (SNP)

C'est une méthode qui suit le principe du transfert des électrons, elle est basée sur la réduction de l' $\text{Ag}^+$  en  $\text{Ag}^0$  dans le sphère des nanoparticules par l'antioxydant en présence du tri-sodium de citrate produit un plasmonique de surface très intense, avec une bande d'absorption mesurée à 423 nm [53].



**Figure 10:** Mécanisme de réduction d'Ag en nanoparticule (SNP) (Özyürek et al.,2012)

#### V. Activité enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle important dans les réactions biochimiques nécessaires pour la croissance, la maturation et la reproduction des êtres vivants. Leur quantification par mesure de l'activité catalytique dans les échantillons biologiques est importante dans divers domaines [54]

##### V.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

Parmi les nombreuses enzymes largement utilisées, l' $\alpha$ -amylase est de plus en plus demandée en raison de son rôle crucial dans l'hydrolyse de l'amidon et des applications de cette action hydrolytique.

L' $\alpha$ -amylase est devenue une enzyme d'une importance cruciale dans la réduction de la glycémie postprandiale chez les personnes diabétiques de type 2 [55].

### **V.1.1. Inhibition de L' $\alpha$ -amylase**

L' $\alpha$ -amylase (E.C.3.2.1.1) est une enzyme hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1, 4-glycosidiques internes dans l'amidon pour donner des produits comme le glucose et le maltose. C'est un métallo enzyme calcique qui dépend de la présence d'un cofacteur métallique pour son activité.

La composition d'hydrolysats obtenue après hydrolyse de l'amidon est fortement dépendante de l'effet de la température, des conditions d'hydrolyse et de l'origine de l'enzyme.

## **VI. Inflammation et activité anti inflammatoire**

### **VI.1. Généralités sur l'inflammation**

La réaction inflammatoire est la réponse physiologique des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique [56].

Son but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore de régulations anormales du processus inflammatoire [57] [58].

L'inflammation se caractérise par des manifestations clés: la rougeur, la chaleur, l'enflure et la douleur. Elle est maintenant reconnue comme un type de réponse immunitaire non spécifique [59].

### **VI.2. Les anti-inflammatoires**

Un anti-inflammatoire est un médicament qui agit sur les conséquences physiopathologiques de la réaction inflammatoire quelle qu'en soit l'origine [60]. On en distingue deux grands groupes les anti inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), dont les cibles pharmacodynamiques sont différents [61].

#### **a. Les anti-inflammatoires stéroïdiennes**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des molécules synthétiques dérivées des hormones naturelles (cortisone et cortisol) ou hémisynthétisés à partir d'extraits animaux ou végétaux. [62]. Ils représentent le

traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto immunes [63]. Comme pour les AINS, l'utilisation de glucocorticoïdes est associée à une variété d'effets secondaires. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observés. Ces troubles peuvent être aigus tels que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle des glucocorticoïdes sous traitement, l'euphorie accompagnée d'insomnie conduisant à la psychose et apparition d'ulcères gastroduodénaux. Les troubles chroniques peuvent également se manifester par des cataractes et une prise de poids [64].

#### **b. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens :**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation depuis plus de 3000 ans et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde [65].

Ce sont des médicaments aux propriétés, anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques qui regroupent plusieurs familles chimiques. Ils ont en commun l'inhibition de la synthèse des médiateurs lipidiques responsables d'effets délétères. Les AINS ne se distribuent pas uniformément dans l'organisme, mais privilégient leurs tissus cibles, foyer inflammatoire et système nerveux central notamment [66].

#### **VII. Evaluation d'anti-moisissures**

Les infections provoquées par les champignons *Aspergillus* ou les levures *Candida* est un réel problème de santé publique comme l'alternariose est l'une des pathologies les plus répandues chez les tomates et la pourriture rose de la pomme de terre est causée par *Phytophthora erythroseptica* [67].

Elles sont de plus en plus difficiles à les inactiver et leurs fréquences sont en très forte progression. Les détériorations des plantes provoquées par les champignons sont devenues un réel problème pour l'homme, que ce soit pour sa consommation personnelle ou pour son économie. Car effectivement ces altérations peuvent être à

L'origine de la perte de plusieurs tonnes de produits destinés à l'alimentation [68].

Les extraits végétaux représentent une nouvelle alternative pour lutter contre les germes pathogènes : ils permettent d'inhiber ceux qui ont développé des résistances et agissent en causant moins de nuisance au consommateur humain ou animal [69] [70] [71].

Récemment, plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes médicinales, a bio-conservation des plantes est due aux composés phénoliques, alcaloïdes, saponines, tanins, stéroïdes, flavonoïdes, terpénoïdes, composés phénoliques et autres composés secondaires qu'elles contiennent [72].

Ces composés sont en effet des antimicrobiens très puissants, les différents extraits de ces plantes ont été utilisés dans le domaine de conservation alimentaire, d'industrie des parfums, des cosmétiques, de la pharmacie et de [73].

### **VIII. Evaluation d'anti-germination**

L'utilisation accrue d'un certain nombre d'herbicides chimiques a des effets négatifs sur la santé humaine et l'environnement. Cette influence a incité la recherche sur les méthodes biologiques de lutte contre les nuisibles sous plusieurs aspects.

Le phénomène de compétition mauvaises herbes-culture joue également un rôle dans les pertes de rendement [74] [75].

Certaines plantes adventices sont exotiques et causent de graves problèmes dans leur nouvel environnement et sont collectivement désignées comme des espèces envahissantes [76]. Cette dernière impose des coûts importants à l'agriculture et affecte les espèces indigènes et les écosystèmes de manière souvent irréversible [77]. L'allélopathie (herbicide) est un phénomène intéressant utilisé comme technique de lutte biologique prometteuse [78]. C'est un ensemble de réactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives d'une plante à une autre [78] [79]. L'allélopathie présente des capacités élevées de contrôle des mauvaises herbes dans des conditions réelles [80].



## IX. Croissance cristalline

Les calculs urinaires sont un problème clinique grave qui touche près de 20 % de tous les humains, et le niveau de récurrence reste à 50 % après le traitement, avec une augmentation de la fréquence chez les personnes vivant dans les pays industrialisés [81]. Les calculs urinaires se forment pathologiquement par une combinaison de processus physiques et chimiques. Ils sont composés d'une matrice organique qui comprend principalement les phases cristallines de diverses substances, avec différents types de pierres apparaissant en fonction de différents facteurs et matériaux [82] [83]. Le phosphate de magnésium et d'ammonium hexahydraté ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), également connu sous le nom de « struvite », est composé de magnésium, d'ammonium et de phosphate dans un rapport équimolaire. 10 à 30 % de tous les calculs urinaires contiennent de la struvite comme composant inorganique principal. Ces calculs de struvite sont également appelés « calculs d'infection » qui résultent de l'activité de micro-organismes produisant de l'urée [84] [85] [86]. Ces micro-organismes provoquent une infection principalement à partir des espèces de *Proteus*.



**Figure11** : Les différentes tailles des cristaux.

L'urée, une enzyme bactérienne, catalyse l'hydrolyse de l'urée pour former de l'ammoniac, qui augmente ensuite le pH de l'urine et élève les concentrations d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), qui se combinent avec le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) des ions dans l'urine et la cristallisation de la struvite de plomb [87].

Une des causes des calculs rénaux est la qualité de l'urine : une urine trop chargée en sels minéraux favorisera en effet la formation de calculs rénaux ou calculs urinaires [88] [89].

**CHAPITRE 2**  
**MATERIELS ET**  
**METHODES**

## I. Matériel biologique

### I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par l'arbre de *Citrus limon* appelés localement citronnier.

Les feuilles pour extraction de l'extrait ethanologique et les zestes pour l'extraction d'huile essentielle.



**Figure12** : Photo de la plante citrus

### I.2. Méthodes d'extraction

#### 2.1. Préparation des extraits

##### a. Première extrait

Après un séchage à l'air libre des feuilles de *Citrus limon* broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'un poudre fine, nous avons fait une extraction (liquide/solide) à partir de 100 g de poudre de feuille de citron que nous faisons infuser dans 400ml d'éthanol. Ce mélange est agité par un agitateur magnétique. Ensuite la solution est filtrée sur du coton hydrophile et sur papier Wattman (3 mm) 3fois .Puis à l'aide d'une rota-vapeur (séparation liquide/solide) on a l'extrait utilisé après le séchage.

##### b. Deuxième extrait (huiles essentielles)

#### 1. Hydrodistillation

### 1.1. Protocole expérimental

560g de matière végétale (les zestes frais de citron) ont été introduites dans un ballon contenant 800 ml de l'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 5 heures [92]. Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau d'huile essentielle qui la surnage. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C [93].

### 1.2. Taux d'extraction

Après l'hydro-distillation, le rendement en huiles essentielles est le rapport entre le poids d'huile essentielle extraite et le poids de la biomasse végétale utilisé. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) [94].

Il est calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = \frac{PHE}{Pmv}$$

**Équation1** : Le rendement d'extraction

R: Le rendement en huiles essentielles (%).

PHE: Poids d'huile essentielle extraite (g).

Pmv: Poids de matériel végétal utilisé

## II. Activités biologiques

Les mesures des absorbances des activités biologiques ont été faites à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque Perkin Elmer (USA) avec son logiciel EnSpire au niveau du laboratoire de Contrôle de qualité au CRBt de Constantine.

### II.1. Activité antioxydant

L'activité anti-oxydante des extraits de *Citrus limon* été réalisé par l'utilisation de cinq méthodes: Piégeage du radical libre DPPH, pouvoir réducteur (FRAP), piégeage de l'ABTS, réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phenanthroline, et l'activité SNP

#### II.1.1. Activité anti-radicalaire au DPPH

L'activité anti-radicalaire au DPPH est déterminée selon la méthode décrite par [95]. Le mélange contient 160 µl d'une solution du DPPH<sup>\*</sup> (Annexe II) et 40 µl de différentes concentrations de l'extrait sur une microplaque a 96 puits. Le contrôle a été préparé de la

même manière, sauf que le H<sub>2</sub>O a été utilisé à la place de l'extrait. Et le blanc utilisé dans le cas de l'extrait coloré préparé de la même manière, le trolox et l'acide ascorbique (Annexe III) sont utilisés comme standards.

Le mélange a été incubé à une température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition}(\%) = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

**Équation 2 :** Pourcentage d'inhibition du DPPH

### II.1.2. Estimation de l'activité ABTS

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de [96], Sur une microplaque à 96 puits, 160 µl de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> (Annexe II) a été mélangé avec 40 µl d'extrait à différentes concentrations.

Les absorbances sont mesurées à 734 nm après une incubation de 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

Trolox et l'acide ascorbique ont utilisés comme standards (Annexe III) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Inhibition}(\%) = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

**Équation 3 :** Pourcentage d'inhibition d'ABTS

### II.1.3. Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline

L'activité de phénantroline est déterminée par la méthode de [97]. Un volume de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations est déposé avec, 50 µl de chlorure de fer (0,2%) (Annexe II), 30 µl de phénantroline (0,5%) (Annexe II) et 110 µl de éthanol. Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min et l'absorbance est mesurée à 510 nm.

Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards (Annexe III) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### **II.1.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)**

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode d'Oyaizu [98]. Un volume de 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations est additionné à 40  $\mu\text{l}$  d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de ferricyanide de potassium (1%). L'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min.

Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  d'acide tri-chloroacétique (10%) sont ajoutés pour stopper la réaction. Enfin, un volume de 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure de fer (0,1%) sont ajoutés. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été à 700 nm.

L'acide ascorbique et trolox sont utilisés comme standards (Annexe III) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### **II.1.5. Activité du silver nano particule (SNP)**

L'activité est déterminée selon la méthode de Özyürek [99] basée sur la réduction de l' $\text{Ag}^+$  en nanoparticules d'argent sphériques  $\text{Ag}^0$ . Un volume de 20  $\mu\text{l}$  extrait différentes concentrations est additionné à 130  $\mu\text{L}$  du solution SNP (Annexe II), puis 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  ont été ajoutés. Enfin après une incubation à 25 °C pendant 30 min l'absorbance a été mesurée à 423 nm.

Le Trolox et l'acide ascorbique (Annexe III) est utilisés comme standard dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition de SNP (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \times 100$$

**Équation 4 :** Pourcentage d'inhibition de SNP

## II.2. Activité enzymatique

### II.2.1. Inhibition de l'alpha-amylase

L'activité inhibitrice de l'alpha amylase a été déterminée par la méthode de [100] avec quelques modifications. Sur une microplaque de 96 puits, un volume de 25 µl d'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 50 µl d'une solution d'α-amylase (1U), puis incubé pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 50 µl d'amidon (0,1%) sont ajoutés. Le mélange est incubé une autre fois pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, 25 µl d'acide hypochlorique (1M) HCL et 100 µl d'iodure de potassium iode IKI sont ajoutés.

le AE est préparé de la même manière sauf que l'extrait est remplacé par le méthanol et le AC est préparé de la même manière sauf que l'extrait est remplacé par le méthanol et la solution d'α-amylase remplacé par le tampon phosphate (PH 6.9)

Le blanc est préparé de la même manière sauf que la solution d'α-amylase et l'amidon et HCL (125 µl) est remplacé par le tampon phosphate (PH 6.9)

L'Acarbose (Annexe III) est utilisés comme standard. La lecture de l'absorbance est réalisée à 630 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l' α-amylase a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Inhibition(\%)} = 1 - \left[ \frac{(A_c - A_e) - (A_s - A_b)}{(A_c - A_e)} \right]$$

**Équation 5 :** Pourcentage d'inhibition de l' α-amylase

**A<sub>c</sub>**=Absorbance [Amidon+IKI+HCL+Vol de solvant d'extrait+Vol tampon Enzyme]

**A<sub>e</sub>**=Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+ Vol de solvant d'extrait]

**A<sub>s</sub>**=Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCL]

**A<sub>b</sub>**=Absorbance [Extrait+IKI+125 µl de tampon]

### II.3. Activité anti inflammatoire in-vitro

L'activité anti-inflammatoire in-vitro est déterminée par la méthode de Kandikattu K, (2013) [101]



Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation d'ovalbumine provoquée par la chaleur (65°C) par les extraits.

Le protocole consiste à mélanger un volume de 350 µl d'extrait à différentes concentrations avec 350 µl d'une solution à 5% d'ovalbumine fondu dans l'eau. Le mélange est incubé deux fois respectivement, la première à 37°C pendant 15min et la deuxième à 65°C pendant 5min. Après un volume de 200µl du mélange est ajouté dans une microplaque à 96 puits et l'absorbance est mesurée à 660 nm. L'acide salicylique et le dichlofenac sont utilisés comme standards.

#### II.4. Activité anti-germination

L'activité a été évaluée aux stades germinatif. Cette étude a été effectuée par la méthode de contact direct (Tworkoski 2002). Dans des boîtes de pétri, 30 graines d'orge sont mises à germer dans du papier filtre en présence de 10 ml de solution d'huile essentielle diluée dans l'eau contenant 30 µl de tween 20 (0.1). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque essai, le témoin contient uniquement 10ml d'eau distillée.

Après sept jours d'incubation à 25 °C dans une enceinte de germination, les mesures des longueurs de la partie aérienne (LPA) ont été prises. Le pourcentage de germination des graines pour chaque extrait dans les boîtes de pétri est déterminé selon la formule suivante [102] et [103] :

$$I\% = \frac{(\text{témoin} - \text{extrait})}{\text{témoin}} \times 100$$

**Équation 6** : Pourcentage de germination des graines

#### II. 5. Evaluation de l'activité d'anti-moisissures

La bio-conservation alimentaire est l'utilisation des composés d'origines organique provenant de sources naturelles, pour la protection de la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs. Actuellement les huiles essentielles et leurs composants représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires.

### ➤ Evaluation d'anti-moisissures de la sauce tomate

L'objectif de cette étude était de trouver un moyen de la bio-conservation de la sauce de tomate contre les moisissures qui pouvaient les altérer, les tests de la bio-conservation sont réalisés dans une microplaque à 160 µl d'une solution de sauce de tomate (10g dans 30 ml d'eau distillée) est mise dans chaque puits, après un volume de 40µl de chaque extraits est ajoutés. Le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>), l'huile végétale et le méthanol sont utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement. L'expérimental a été mis à +4 °C et observée durant dix jours.

Le pourcentage de dégradation de la sauce tomate pour chaque extrait dans la microplaque est déterminé selon la formule suivante :

$$PI\% = (\text{nombre des sauce tomate dégradés} / \text{nombre des sauce tomate Totale}) \times 100$$

**Équation 7 :** Pourcentage de dégradation de la sauce tomate.

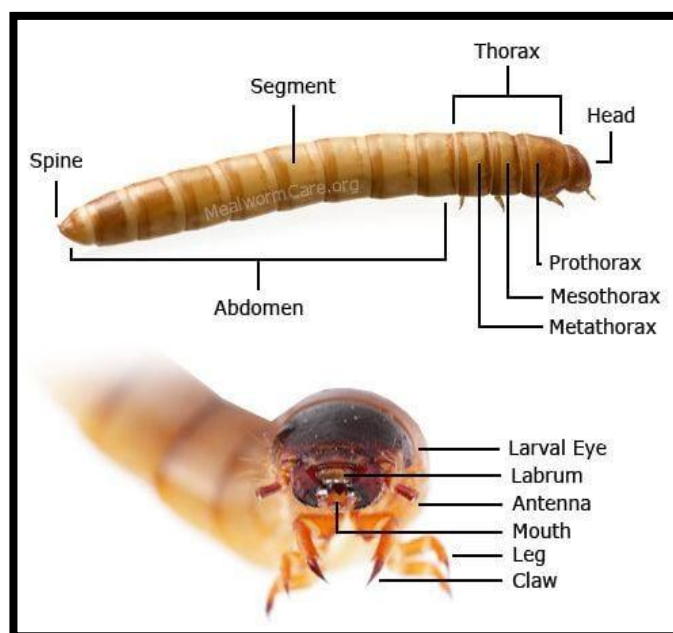
### III. Evaluation de l'effet toxicité

Le test de toxicité a été déterminée selon la méthode développée par (vanderValk& van der Meijden, 2014). Les vers de farine ont été sélectionnés pour cette expérience car elles sont facilement disponibles, robustes et relativement petites.

L'expérimental a été réalisé par l'injection au niveau abdominal d'un volume de 3µl d'extraits a différentes concentrations dans 3 répétitions contenir 5 larves à l'aide d'une seringue Hamilton.

Les injections ont été faites caudalement dans la face ventrale des larves, latéralement à la médiane car cela évite les systèmes d'organes les plus essentiels.

Les larves sont ensuite incubées à température ambiante avec une bonne aération de 5à7 jours. La mortalité a été évaluée par la décoloration des larves. (3 répétition dans chaque essai) .Après 7j les larves mortes ont été comptées dans chaque essai.



**Figure13:** Anatomie de *Tenebrio Molitor* [104]

La mortalité est le premier critère de jugement de l'efficacité d'un traitement chimique ou biologique. Le pourcentage de la mortalité et des larves observée chez les adultes témoins et traités par les extraits de citron est estimé en appliquant la formule suivante [105].

$$\text{Mortalité (\%)} = \frac{\text{Nombre de morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$

**Équation 8 :** Pourcentage de mortalité de la toxicité

#### IV. Test de l'infection urinaire

##### IV.1. Préparation des urines

Nous avons utilisé 0.48g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ;0.18g MgSO<sub>4</sub>- ;0.48g NH<sub>4</sub>cl ;0.94g Kcl ;1.23g Nacl ;0.89g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ;0.18g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.Ensuit, nous mettons chaque bloc dans 10ml d'eau distillée ,nous mélanger tous et complet le volume jusqu'à 200ml par l'eau distillée.

Et dans 4tube à essai avec un coton-tige (écouvillon) et dans une zone stérile, nous mettons 10 ml urine+10mg extrait dans le 1<sup>er</sup> tube, 10 ml urine +10 mg huile essentielle dans le 2<sup>ème</sup> tube, 10ml urine+10mg acide ascorbique dans le 3<sup>ème</sup> tube (contrôle positive) et 10ml urine uniquement dans le 4<sup>ème</sup> tube (contrôle négative).

Au niveau du laboratoire de la microbiologie du CRBT de Constantine, nous mettons une bactérie *Pseudomonas aeruginosa* dans les 4 tubes, l'incubation à 37c° pendant 10jour.

#### **V. Insecticide**

Dans cette expérience, nous avons utilisé 3 milieux, dans chaque milieu 5 insectes (*Tenebrio molitor*) où nous avons pulvérisé une solution contenant : la 1ère milieu contenait 0,02 g d'huile dissoute dans 5 ml d'eau, la 2ème milieu contenait 0,02 g d'extrait dissous dans 5 ml d'eau et la 3ème milieu contenait 5 ml d'eau uniquement. Après nous avons laissés pendant une heure.

#### **VI. Evaluation de l'évolution de cycle de vie des *tenebrio molitor***

Dans cette expérience, nous avons utilisé 3 milieux :

Dans le 1ère milieu contenait 50 g de farine et 50g de poudre de feuille de citron et 25g de *Tenebrio molitor*, le 2ème milieu contenait 50 g de farine et 50 g de zeste de citron et 25g de *Tenebrio molitor* et le 3ème milieu contenait que 50g de farine et 25g de *Tenebrio molitor*. Après nous les avons laissés et enregistrons des notes chaque jours pendant une semaine.

**CHAPITRE 3**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSION**

## I. Activités biologiques

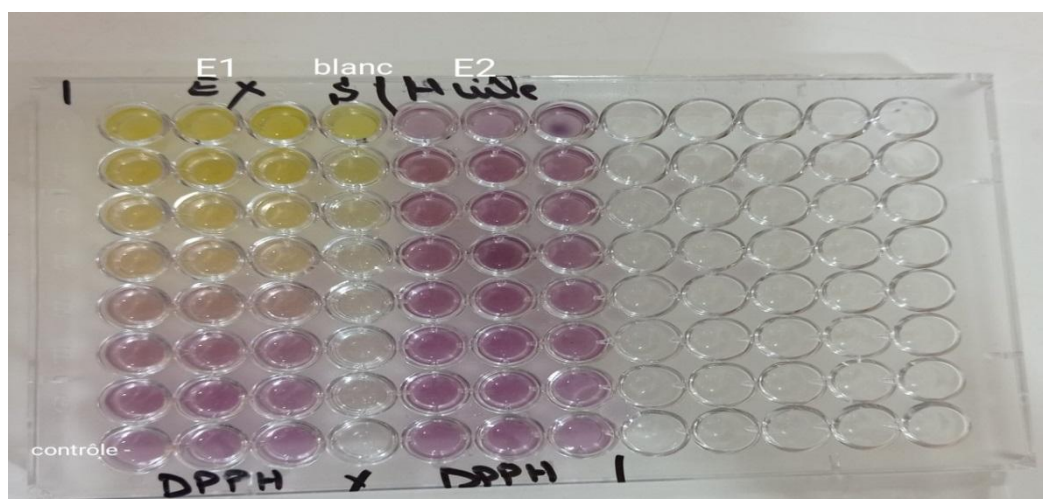
L'activité biologique de *Citrus limon* a été réalisée par l'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes. Antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-germination, anti-moisissures, cytotoxicité, anti-infection urinaire et anti-insecticide.

### I.1. Activités antioxydantes

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait ethanolique et d'huile essentielle a été réalisée par l'utilisation de cinq méthodes.

#### I.1.1. Activité anti-radicalaire au DPPH

Dans cette étude, l'activité anti-radicalaire de l'extrait ethanolique et de huiles essentielles de *citrus limon* été évalué par la mesure de la capacité d'un échantillon à réduire le radical DPPH ; par rapport à deux antioxydants de références, le Trolox et l'acide ascorbique. Les résultats sont présentés au- dessous :



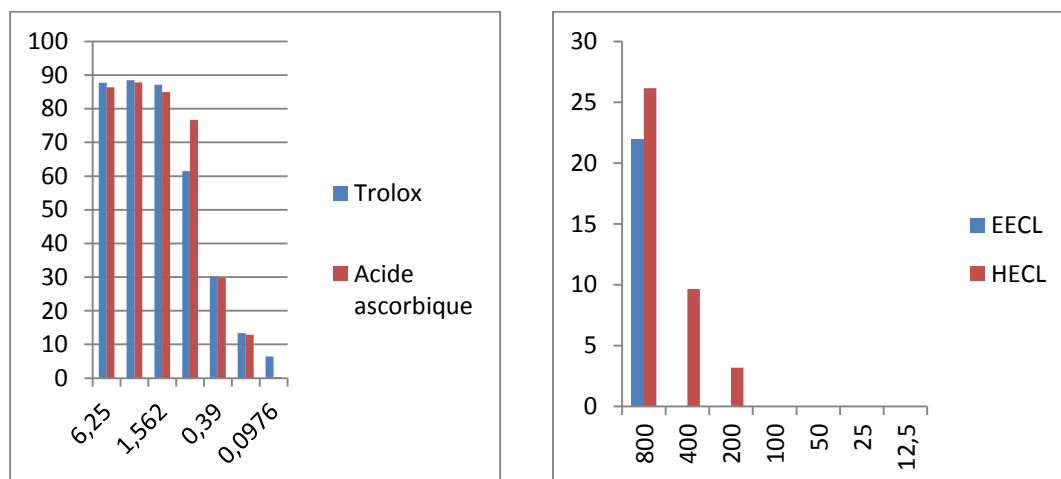
**Figure 14** : La plaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH) de l'extrait ethanolique et de l'huile essentielle

**Tableau 7** : Inhibition du radical DPPH par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle

	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800µg	IC <sub>50</sub> (µ/ml)
EECL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	21,94±4,36	>800
HECL	NA	NA	NA	NA	3,18±1,05	9,65±1,70	26,14±1,94	>800
	0.7812 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	IC <sub>50</sub> (µ/ml)
Trolox	6.42±0.91	13.33±2.14	30.19±0.67	61.48±2.98	87.16±0.28	88.46±0.11	87.72±0.47	5.12±0.21
Acide ascorbique	0.31±1.02	12.90±0.28	29.69±0.39	76.67±0.37	84.94±0.84	87.78±0.49	86.36±0.21	4.39±0.01

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.



**Figure 15:** Les pourcentages d'inhibitions du test DPPH de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle

D'après les résultats obtenus l'extrait éthanolique et l'huile essentielle ont présenté une faible activité (>800 µg/ml) (Tableau 7, Figure 19).

Par comparaison avec les travaux de **Ben hsouna et al., (2017)** [104], l'HE de citron tunisienne étudiée a montré une forte activité antioxydant avec un taux de piégeage équivalent à 90% à la concentration 100 µg/ml.

D'après **Hojjati et Barzegar (2017)** [105], l'activité antioxydante des huiles essentielles d'écorces de citron dépend essentiellement de la composition chimique de l'huile. En plus, **Saidani et Merzouk (2002)** [106], ont rapporté que le potentiel

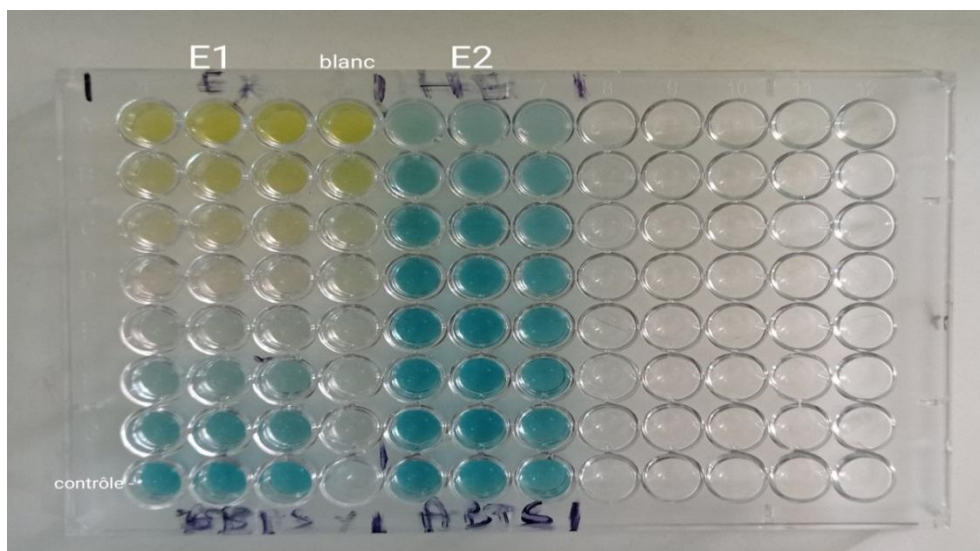
antioxydant de l'huile essentielle de l'écorce de citron est directement lié à la teneur en limonène.

Dans l'étude de **Hamdan *et al.* (2013)** [107], l'huile essentielle tester a présenté une activité modéré avec une  $IC_{50} = 26,66 \pm 2,07$  mg/ml, une autre étude de **Golmakani et Moayyedi. (2015)** [108], a montré une faible activité ( $IC_{50} = 44,06$  mg/ml) comparable à nos résultats.

D'autre part, ces résultats sont complètement différents des résultats de **Loizzo *et al.* (2016)** [109] de l'huile essentielle de la même espèce citrus limon où ils ont trouvé une activité modéré ( $IC_{50}$  de 1,17 mg/ml.)

### I.1.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup>

Dans ce test, l'antioxydant réagit avec l'ABTS<sup>•+</sup> de couleur bleu/vert par transfert d'électrons pour donner l'ABTSH<sup>•+</sup> incolore. Cette transformation est suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec le trolox et l'acide ascorbique. Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous :



**Figure 16** : La plaque de dosage de l'activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup> par l'extrait ethanolique et l'huile essentielle.

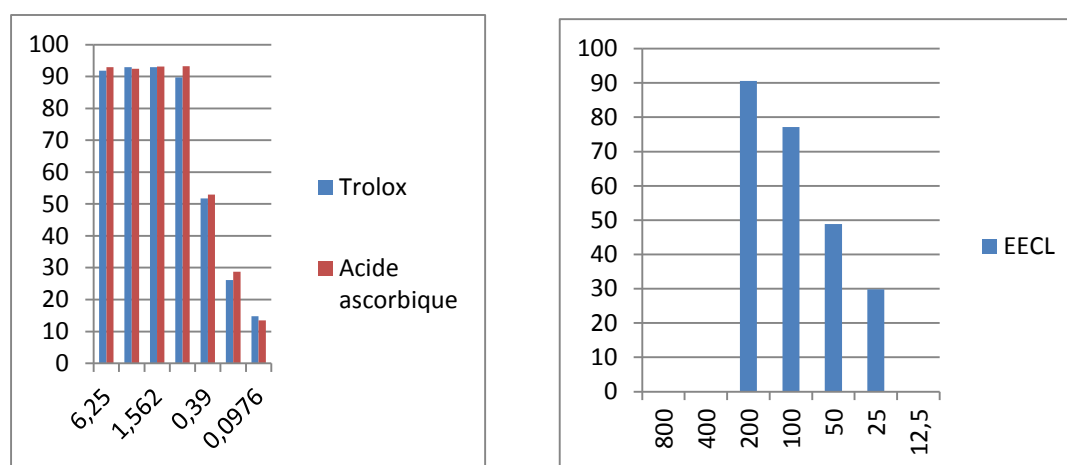
**Tableau 8** : Inhibition du radical ABTS par l'extrait ethanolique et l'huile essentielle



	12.5	25	50	100	200	400	800	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EECL	29.80±1.19	48.87±0,37	77.11±2.10	90.57±0,66	Sat	Sat	Sat	27,62±0,23
HECL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Trolox	14.74±0.37	26.15±0.65	51.70±1.51	89.72±0.67	92.89±0.19	92.89±0.19	91.84±1.19	3.21±0.06
Acide ascorbique	13.43±0.82	28.76±0.67	52.94±0.94	93.21±0.11	93.08±0.19	92.40±0.88	92.96±0.11	3.04±0.05

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.



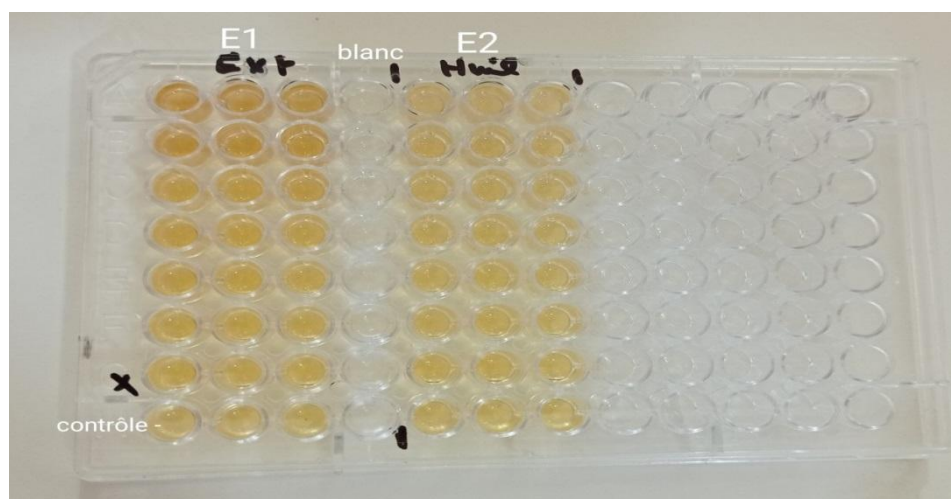
**Figure 17 :** Les pourcentages d'inhibitions de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle

Dans ce test, la capacité de piégeage des radicaux libres présentée par l'extrait éthanolique (CI<sub>50</sub>= 27.62±0,23 µg/ml) est huit fois plus faible que le standard trolox (CI<sub>50</sub>= 3.21±0,06 µg/ml) et neuf fois plus faible que le standard l'acide ascorbique (CI<sub>50</sub>= 3.04±0,05 µg/ml) tandis que l'huile essentielle est avéré not actif (Tableau8, Figure21)

**Ramful (2011)** [110] qui ont travaillé sur le fruit du *Citrus*, ont obtenus une faible activité antioxydante (2.92 à 5.63 µmol équivalent trolox/g matières sèche).

### I.1.3. Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénantroline

Le suivi de cette activité est basé sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) qui se complexe avec la phénantroline de couleur rouge, les résultats sont comparés avec les deux standards le trolox et l'acide ascorbique.



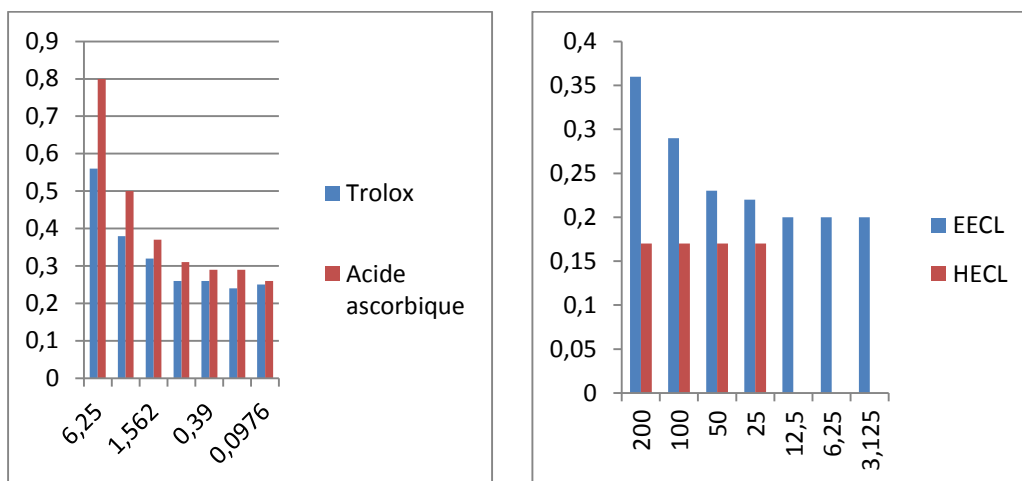
**Figure 18** : La plaque de dosage de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénantroline par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle

**Tableau 9** : Absorbance du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénantroline des par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de citrus limon

	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
EECL	0,20±0,00	0,20±0,01	0,20±0,00	0,22±0,01	0,23±0,23	0,29±0,03	0,36±0,04	>200
HECL	NA	NA	NA	0,17±0,01	0,17±0,00	0,17±0,00	0,17±0,00	>200
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
Trolox	0.25±0.01	0.24±0.01	0.26±0.01	0.26±0.00	0.32±0.01	0.38±0.01	0.56±0.02	5.21±0.27
acide Ascorbique	0.26±0.01	0.29±0.00	0.29±0.02	0.31±0.01	0.37±0.01	0.50±0.00	0.80±0.00	3.08±0.02

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.

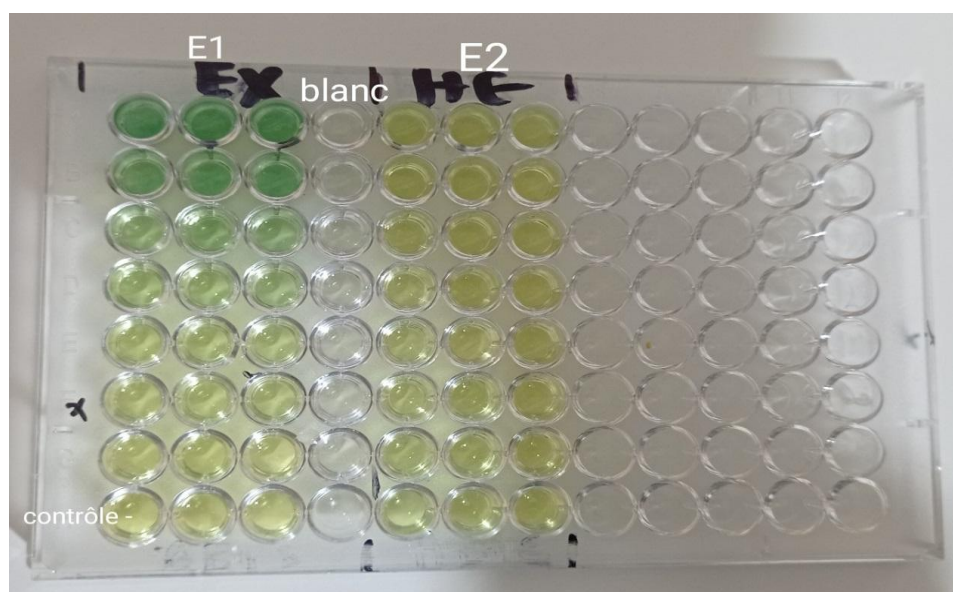


**Figure 19 :** Les valeurs d'absorbances de l'extrait ethanologique et de l'huile essentielle

D'après les résultats obtenus l'extrait ethanologique et de l'huile essentielle ont présenté une faible activité de réduction avec une ( $A_{0,50} > 200 \mu\text{g/ml}$ ) (Tableau 9 , Figure 23 ).

#### I.1.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le ferricyanide de potassium est réduit en présence d'un antioxydant pour former le ferrocyanide de potassium qui va réagir ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe fer ferreux de couleur bleu-vert, qui a un maximum d'absorbance à 700 nm. les résultats sont comparés avec les deux standards le Trolox et l'acide ascorbique.



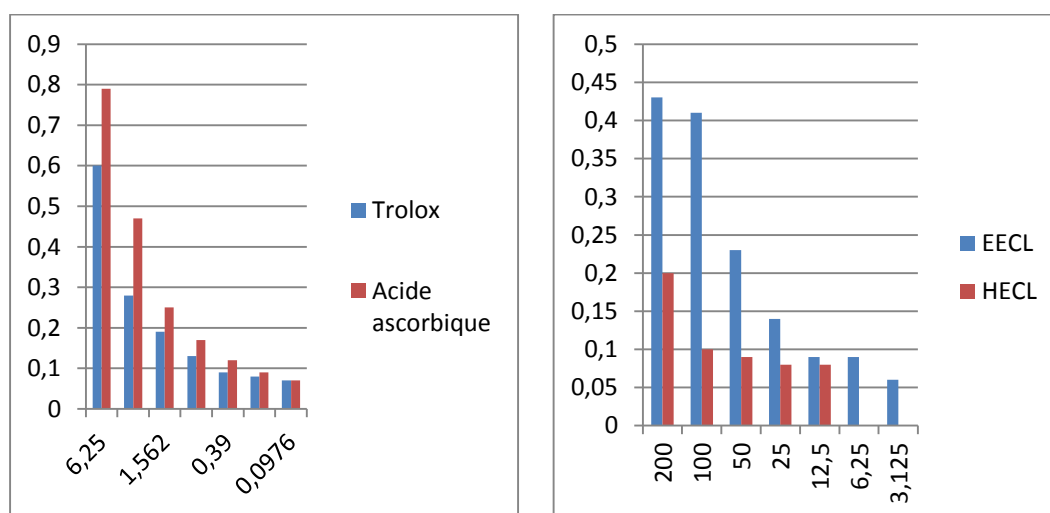
**Figure 20** : La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (FRAP) des l'extrait éthanolique et l'huile essentielle

**Tableau 10** : Absorbance du pouvoir réducteur par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle

	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
EECL	0,06±0,02	0,09±0,01	0,09±0,00	0,14±0,02	0,23±0,05	0,41±0,01	0,43±0,09	>200
HECL	0,09±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,09±0,02	0,10±0,00	0,10±0,02	0,20±0,02	>200
	0.0976	0.195	0.390	0.781	1.562	3.125	6.25	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
Trolox	0.07±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01	0.13±0.00	0.19±0.02	0.28±0.05	0.60±0.04	5.25±0.20
Acide ascorbique	0.07±0.00	0.09±0.01	0.12±0.01	0.17±0.01	0.25±0.02	0.47±0.03	0.79±0.09	3.62±0.29

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.



**Figure 21** : Les valeurs d'absorbances de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle

L'extrait éthanolique et l'huile essentielle ont présenté une plus faible activité antioxydante avec une ( $A_{0,50} > 200 \mu\text{g/ml}$ ) (Tableau10 , Figure 25).

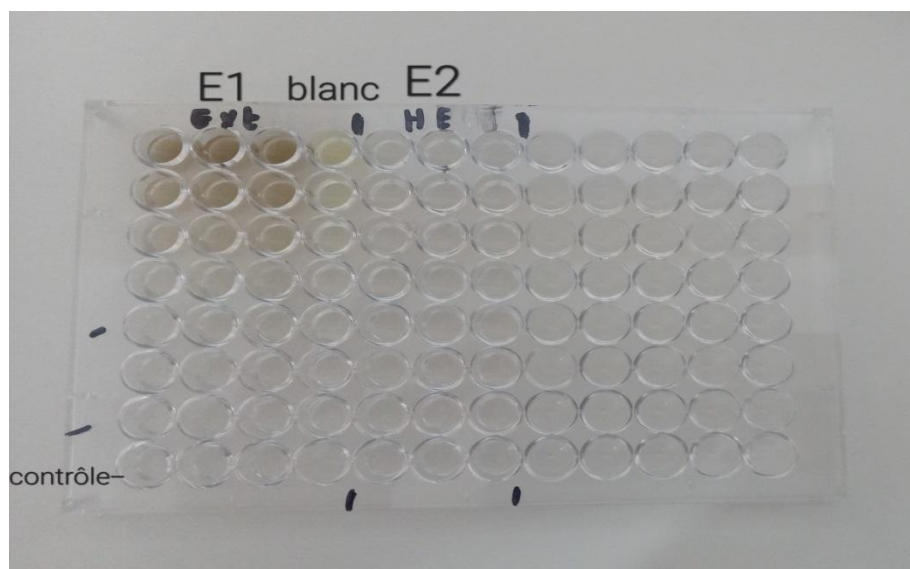
Dans l'étude de **Wu et al. (2013)** [111] effectuée sur une autre espèce de la même famille de citron, *Citrus medica* L.var. *sarcodactylis*, ils ont trouvé un pouvoir réducteur de 0,65 et 0,5 à une concentration de 15µg/ml pour le fruit avant maturation et au stade de maturité respectivement.

Ce résultat n'est pas en accord avec le travail effectué sur l'écorce de citron. Ceci peut être expliqué par la différence de l'espèce étudié ainsi que l'étude à différents stades de maturation. (étude à différents stades de maturation).

D'autre part, le pouvoir réducteur de l'huile essentielle d'une autre plante de *Citrus paradisi a* été mesuré en pourcentage, a montré un pourcentage de 78% pour la concentration de 1 mg/ml **Ou et al. (2015)** [112].

### I.1.5. Activité du Silver nanoparticules (SNP)

Le suivi de cette activité est basé sur l'aptitude des extraits testés à réduire le nanoparticule d'argent ( $Ag^+$ ) de couleur marron clair en nanoparticule d'argent sphérique  $Ag^0$  en couleur marron foncé. Les résultats sont exprimés en termes d' $A_{0.5}$



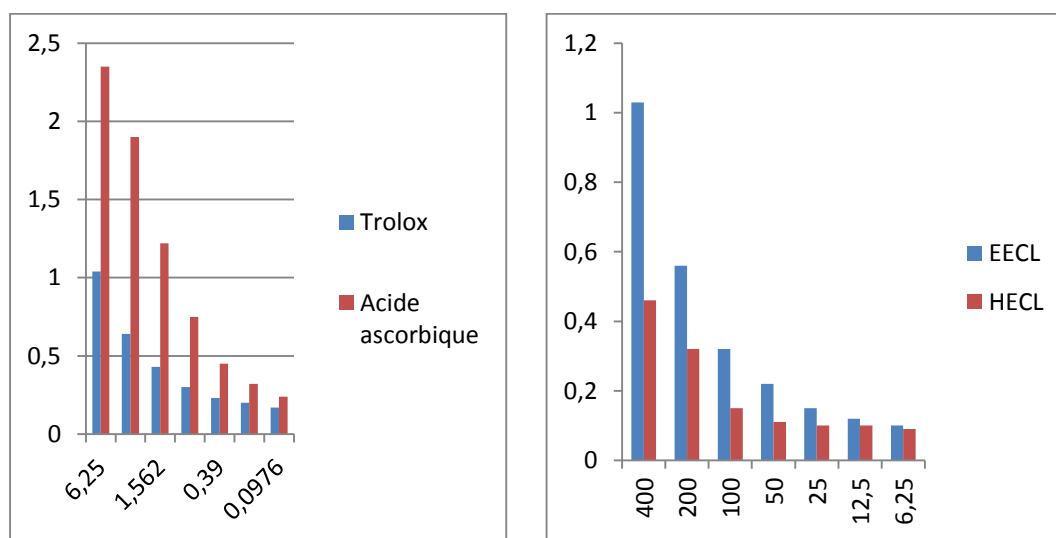
**Figure 22** : La plaque de dosage de l'activité de pouvoir réducteur (SNP) de l'extrait ethanologique et l'huile essentielle

**Tableau 11** : Absorbance du silver nanoparticules par l'extrait ethanologique et l'huile essentielle.

	6.25	12.5	25	50	100	200	400	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
EECL	0.10±0.00	0.12±0.00	0.15±0.01	0.22±0.00	0.32±0.02	0.56±0.00	1.03±0.04	173,04±1,88
HECL	0.09±0.00	0.10±0.00	0.10±0.00	0.11±0.00	0.15±0.01	0.32±0.03	0,46±0.02	>400
	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
Acide ascorbique	0.24±0.00	0.32±0.01	0.45±0.01	0.75±0.01	1.22±0.02	1.90±0.03	2.35±0.01	7.14±0.05
trolox	0.17±0.00	0.20±0.01	0.23±0.00	0.30±0.01	0.43±0.01	0.64±0.03	1.04±0.01	34.17±1.23

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.



**Figure 23** : Les valeurs des A<sub>0,50</sub> du test Silver nanoparticules pour l'extrait éthanolique et l'huile essentielle

Le résultat de cette activité montre que l'extrait éthanolique et l'huile essentielle ont une faible activité de réduction de la nanoparticule d'argent (Ag<sup>+</sup>) en nanoparticule d'argent sphérique Ag<sup>0</sup> avec une (A<sub>0,5</sub>= 173.04.±1.88) pour l'extrait éthanolique et (A<sub>0,50</sub> >400 µg/ml) pour l'huile essentielle. Le résultat est loin d'être comparé aux deux standards utilisés.

## I.2. Activité enzymatique

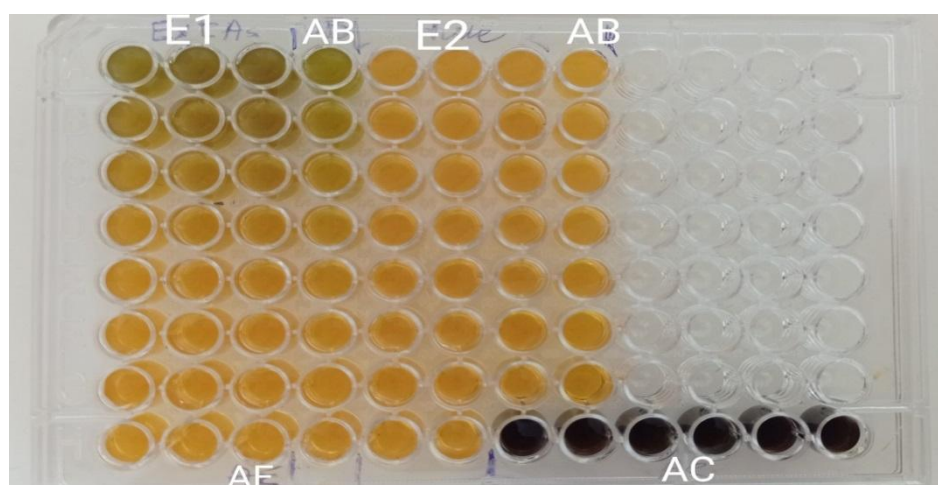
L'évaluation de l'activité enzymatique de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle a été réalisé contre l'inhibition de l'enzyme l'alpha-amylase responsable de la dégradation des sucres complexes et donc entrant dans la diminution des effets du diabète de type 2.

### I.2.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

L'activité enzymatique de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon* a été évaluée en mesurant leurs capacités à inhiber l'enzyme alpha-amylase

#### -Inhibition de l'alpha amylase

Dans cette étude, l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase a été évaluée par la détermination des concentrations inhibitrices par rapport au standard l'acarbose en se basant sur la capacité d'une substance à inhiber cette enzyme. Les résultats sont présentés au dessous :



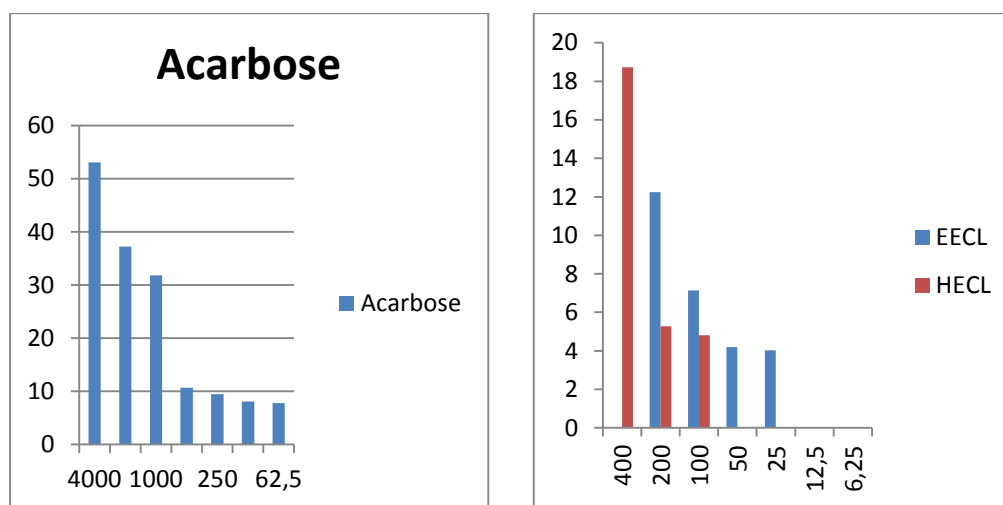
**Figure 24** : Plaque de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon*

**Tableau 12 :** Inhibition de l' $\alpha$ -amylase par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon*

% d'inhibition								
Extraits	6.25 $\mu$ g	12.5 $\mu$ g	25 $\mu$ g	50 $\mu$ g	100 $\mu$ g	200 $\mu$ g	400 $\mu$ g	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
EECL	NA	NA	4.02 $\pm$ 0,15	4.20 $\pm$ 0,28	7.13 $\pm$ 2,29	12.24 $\pm$ 1.41	19.24 $\pm$ 3.09	>400
HECL	NA	NA	NA	NA	4.81 $\pm$ 0.00	5.27 $\pm$ 0.32	18.72 $\pm$ 2.88	>400
	62,5 $\mu$ g	125 $\mu$ g	250 $\mu$ g	500 $\mu$ g	1000 $\mu$ g	2000 $\mu$ g	4000 $\mu$ g	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Acarbose	7,76 $\pm$ 0,17	8,08 $\pm$ 0,30	9,46 $\pm$ 0,11	10,70 $\pm$ 0,96	31,81 $\pm$ 2,89	37,21 $\pm$ 3,54	53,05 $\pm$ 1,59	3650,93 $\pm$ 10,70

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.



**Figure 25 :** Pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle



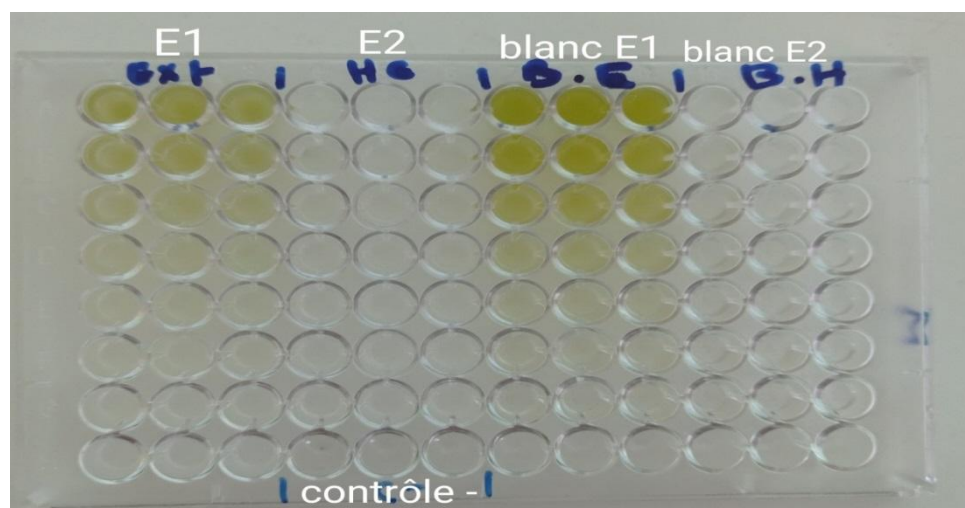
A la concentration 400  $\mu\text{g/ml}$ , l'extrait ethanolique et l'huile essentielle ont manifestés respectivement une bonne activité anti-alpha-amylase avec les pourcentages  $19.24 \pm 3.09$  et  $18.72 \pm 2.88$ , ce résultat est considéré meilleure comparé au standard l'acarbose ( $10,70 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$ ) et cela est presque a la même concentration (500  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tableau12 , Figure29 ).

Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés par Sarker et *al.* (2014) où l'extrait méthanolique à inhiber à 28,71% l' $\alpha$ - amylase a la concentration 0,5 mg/mL et avec une  $\text{IC}_{50}$  égale à  $3,638 \pm 0,190 \text{ mg /mL}$

### I.3. Evaluation de l'activité anti inflammatoire

Dans cette étude, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait ethanolique et l'huile essentielle *de citrus limon* ont été évalués par la mesure des concentrations inhibitrices à 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) ; en se basant sur l'inhibition de la dénaturation de l'ovalbumine par rapport au standard le diclofénac et l'acide salicylique. Les résultats

sont présentés au- dessous :



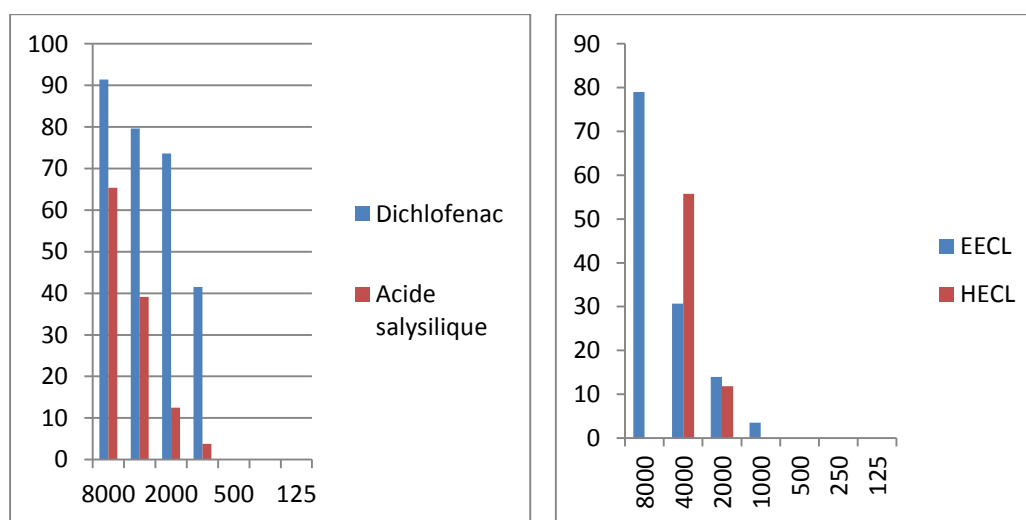
**Figure 26** : La plaque de dosage de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait ethanolique et l'huile essentielle de citrus limon

**Tableau 13 :** l'inhibition de la dénaturation de l'ovalbumine par de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon*

Extraits	% d'inhibition							
	125	250	500	1000	2000	4000	8000	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
EECL	NA	NA	NA	3.51±3.32	13.98±2,85	30.72±2.62	78.94±1,75	5579,34±65,59
EECL	NA	NA	NA	NA	11.83±0.80	55.78±2.12	Sat	3691,82±14,83
Diclofénac	NA	NA	NA	41.51±0.56	73.59±1.11	79.60±0.68	91.41±0.00	1263,83±8,24
Acide Salicylique	NA	NA	3.80±2.16	12.48±2.18	39.16±4.40	65.42±1.96	Sat	2654,22±62,76

EECL : extrait éthanolique de *citrus limon*.

HECL : huile essentielle de *citrus limon*.



**Figure 27 :** Les pourcentages d'inhibitions du test anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon*.

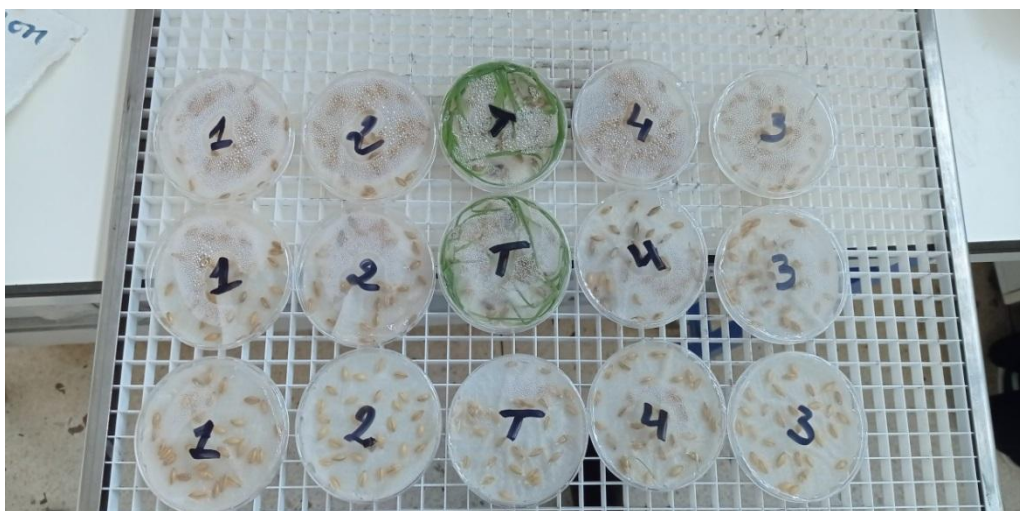
D'après les résultats obtenus, l'extrait éthanolique a manifesté une bonne activité avec un pourcentage d'inhibition égale à 78.94 % à la concentration 8000 µg/ml, le résultat est proche à celui du standard le dichlofenac avec un pourcentage d'inhibition de 91.41 % à la même concentration. Tandis que l'huile essentielle a présenté une activité moyenne (Tableau13, Figure31 ).

Nos résultats sont en accord avec le travail de (ouali ,sadouni , 2017) [113] , où l'huile essentielle de C.limon a donné un pourcentage d'inhibition important réalisé par la dénaturation de l'albumine et la stabilisation membranaire d'un model érythrocytaire.

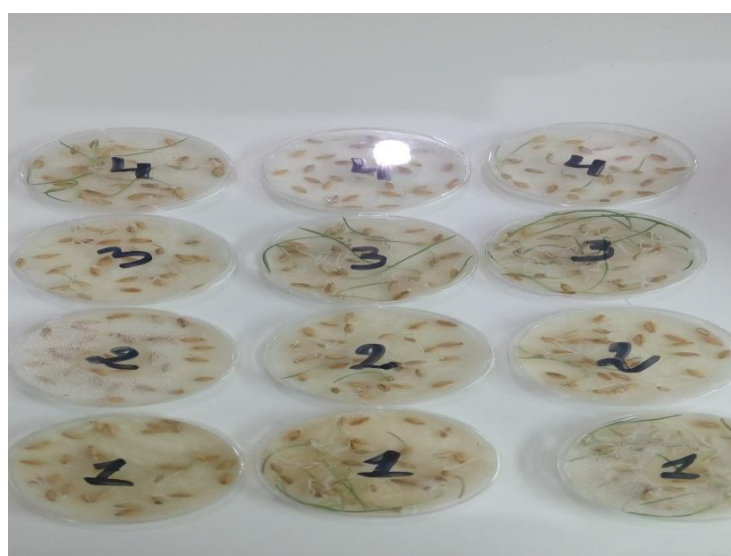
#### I.4. Evaluation d'anti-germination

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait ethanologique et l'huile essentielle de *citrus limon* sur la germination, les graines d'orge ont été sélectionnées vue leur temps rapide de germination.

Les résultats de cette expérimentation sont présentés ci-dessous :



**Figure 28** : Effet d'huile essentielle de *citrus limon* sur les grains d'orge



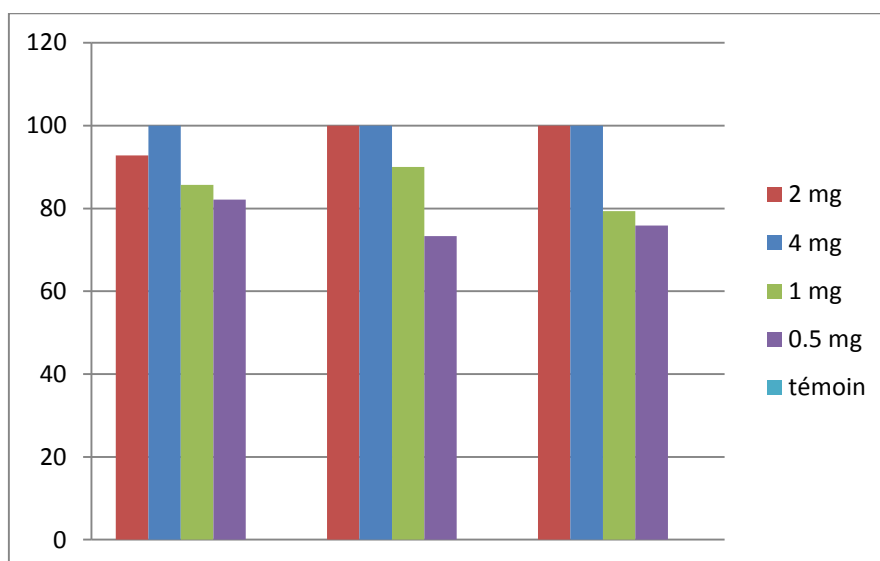
**Figure 29** : Effet d'extrait ethanologique de *citrus limon* sur les grains d'orge

**Tableau14 :** Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'huile essentielle de *citrus limon*

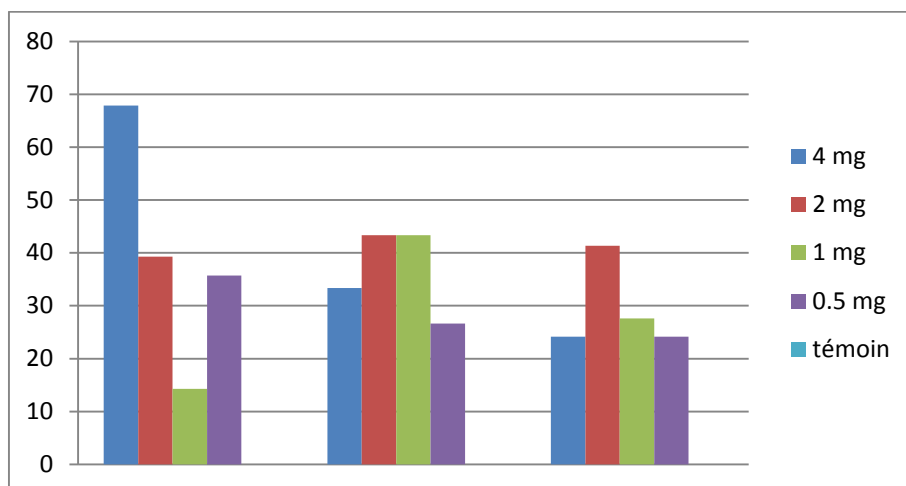
4mg	2mg	1mg	0.5mg
100	92.8	85.71	82.14
100	100	90	73.33
100	100	79.31	75.86

**Tableau15 :** Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'extrait éthanolique de *citrus limon*

4mg	2mg	1mg	0.5mg
67.85	39.28	14.28	35.71
33.33	43.33	43.33	26.66
24.13	41.37	27.58	24.13



**Figure 30 :** Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'huile essentielle de *citrus limon*

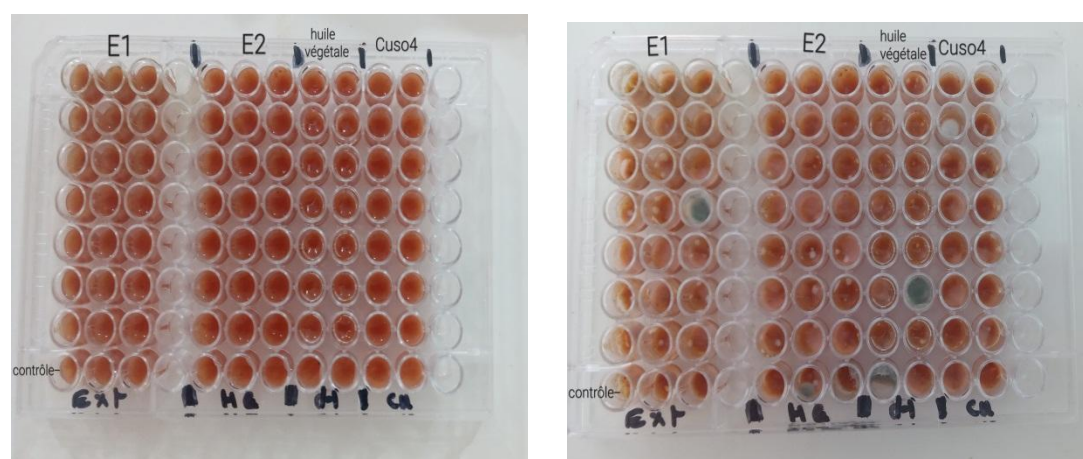


**Figure 31** : Le pourcentage d'inhibition de germination des graines pour chaque dose de l'extrait éthanolique de *citrus limon*

L'huile essentielle de *citrus limon* à inhiber la germination des grains d'orge presque à 100% et cela allant de la concentration de 0.5 mg avec 82.14% et 4 mg avec 100% d'inhibition. Aussi l'extrait éthanolique à inhiber la germination a un niveau presque égal à l'huile essetielle, allant de 35.71 % à 67.85 % pour les concentrations 0.5 et 4 mg respectivement.

### I.5. Evaluation d'anti-moisissures

L'effet de la bio-conservation de l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon* a été évalué contre le développement des moisissures sur la sauce tomate. Les résultats de cette expérimentation sont présentés ci-dessous :



**Figure 32** : Effet de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle de *citrus limon* sur la bio-conservation de la sauce tomate.

Après 20 jours d'incubation, le résultat obtenu du pourcentage de dégradation de la sauce tomate sont présenté au Tableau 16 suivant :

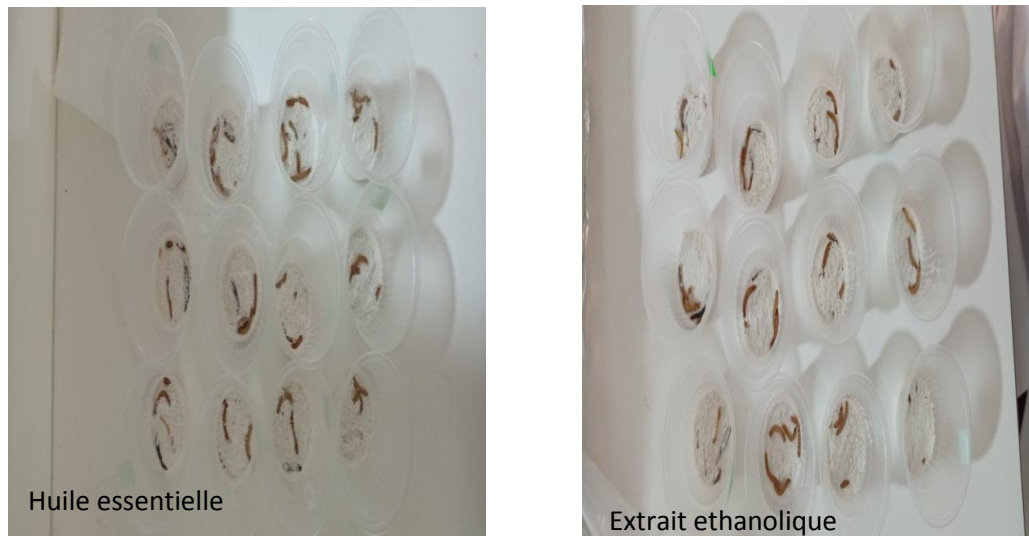
**Tableau 16** : Les valeurs de pourcentage de dégradation de la sauce tomate de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle de *citrus limon*.

Les extraits et les standards	PI (%)
Huile essentielle	42.85 %
Extrait éthanolique	90.47 %
Huile végétal	21.42 %
Sulfate de cuivre (CuSO <sub>4</sub> )	7.14 %

L'huile essentielle de *citrus limon* à inhiber la croissance des moisissures à 57,15 % proche à celle du premier produit de référence utilisé l'huile végétal avec 78,58% d'inhibition et loin d'être comparé avec le deuxième produit de référence le sulfate de cuivre avec 92,86 % d'inhibition. Tandis que l'extrait éthanolique a modérément inhibé la croissance des moisissures avec 9,53 % d'inhibition.

## II. Evaluation de la toxicité

La toxicité de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle de *citrus limon* a été évaluée sur les vers de farine, les résultats sont présentés ci-dessous :

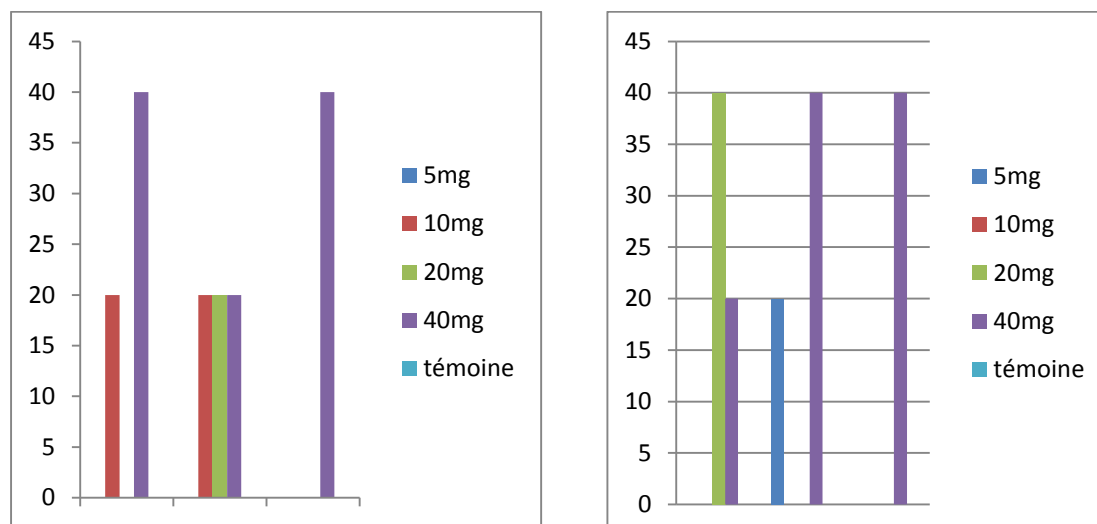


**Figure 33 :** Image de *tenebrio molitor* après traitement par l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de *citrus limon*

**Tableau 17 :** les valeurs de pourcentage de mortalité des vers de farine à concentrations différents des extraits de citrus limon.

Concentrations (mg/ml)	Huile	Essentielle	PM(%)	Extrait	Ethanolique	PM(%)
5	0	0	0	0	20	0
10	20	20	0	0	0	0
20	0	20	0	40	0	0
40	40	20	40	20	40	40





**Figure 34 :** les valeurs de pourcentage de mortalité des vers de farine nourrit par l'extrait ethanolique et de l'huile essentielle

D'après les résultats illustrés dans la Figure40 qui représente l'évolution durant sept jours du taux de mortalité, des ver de farine après l'injection des solutions a différentes concentrations de l'extrait ethanolique et de l'huile essentielle.

Le méthanol, le contenu vide de la seringue et l'acide ascorbique ont été utilisés comme des contrôles négatif et positif respectivement. Les résultats de ce test est comme suit :

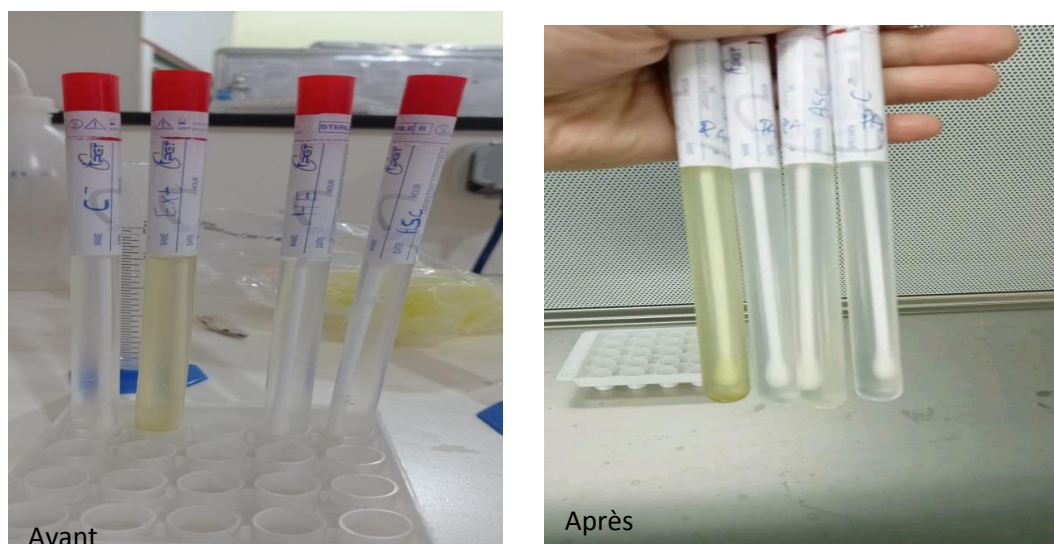
Les contrôles négatifs et positifs : le méthanol, le contenu vide de la seringue et l'acide ascorbique, ont présentés un taux de 0 % de mortalité.

L'extrait ethanolique et de l'huile essentielle ont présentés un faible taux de mortalité allant de 20% à 40% (Tableau18, Figure40)

### III. Evaluation *in-vitro* de l'anti-infection urinaire

L'effet de l'anti-infection urinaire de l'extrait ethanolique et de l'huile essentielle a été évalué sur le développement de la bactérie *pseudomonas aeruginosa* sur les urines artificiel provoquant la production de cristaux solide. Les résultats de cette expérimentation sont présentés ci-dessous :





**Figure 35 :** Les résultats des urines avant et après incubation.

L'observation ce fait selon le trouble et la croissance bactérienne dans les quatre milieux : Milieu 1 (contrôle négative) : présence de trouble et la croissance bactérienne.

Milieu 2(contrôle positive) : absence de trouble et la croissance bactérienne.

Milieu 3(extrait éthanolique) : présence de peu de trouble et la croissance bactérienne.

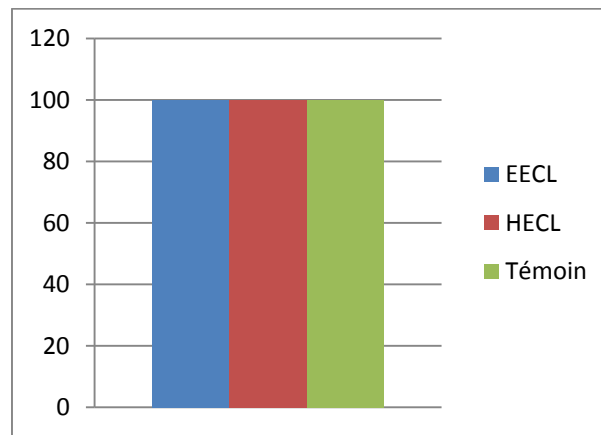
Milieu 4(Huile essentielle) : absence de trouble et la croissance bactérienne.

## VI. Anti-insecticide

Dans cette étude, l'activité insecticide de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle de *citrus limon* a été évaluée par pulvérisation des insectes et le résultat est exprimé en pourcentage de mortalité. L'eau distillée est utilisé comme témoin négatif.

Les résultats sont présentés au- dessous :



**Figure 36** : Test insecticide par pulvérisation**Figure 37** : Taux de mortalité en pourcentages

D'après les résultats obtenus (Figure 43), l'extrait ethanologique et l'huile essentielle non pas présenté une activité insecticide

#### V. Evaluation d'un nouveau milieu nutritif pour les vers de farine

**Figure 38** : Les trois différents milieux nutritifs pour les vers de farine

Jours Milieux	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup> J	4 <sup>ème</sup>	7 <sup>ème</sup>	8 <sup>ème</sup>	9 <sup>ème</sup>
zeste de citron +la farine (1)	0	3	7	8	14	14	18
Poudre de feuille de citron +la farine(2)	0	4	9	15	24	28	35
Farine sec (3)	0	2	4	6	10	12	15

**Tableau 18 :** l'évolution des vers de farine dans les trois milieux différente

D'après les premières observations (tableau 19), le mouvement des vers de farine était rapide après leur mise dans les deux milieux, zeste et feuille de citron. Cependant un mouvement ordinaire a été observé dans le contrôle négatif contenant seulement la farine. Après deux jours d'observations, les vers de farine étaient observés adaptés et leur mouvement était rétabli à l'état normal. Le résultat obtenu peut être conduit à utiliser les zeste et les feuille de citron comme milieu nutritif et protecteur dans l'élevage des vers de farine.

# CONCLUSION GENERALE

## Conclusion

Les agrumes occupent aujourd'hui une place importante dans les échanges mondiaux des produits végétaux, tel que le citron (*Citrus limon*) qui est riche en différents métabolites secondaires. Les huiles essentielles qui sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe et caractérisées par des propriétés biologiques importantes, ce qui leur confère d'être utilisées dans plusieurs domaines : industrie pharmaceutique, le cosmétique et l'industrie alimentaire..

La présente étude avait pour objectif l'évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique de *citrus limon* par les méthodes *in vitro*: antioxydantes, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-germination, anti-moisissures, cytotoxicité, anti-infection urinaire et anti-insecticide.

Les meilleurs résultats obtenus dans cette étude et qui peuvent être considérés comme point de départ pour la production d'un produit à impact socioéconomique sont les suivants :

Pour l'anti-germination : L'huile essentielle de *citrus limon* a inhibé la germination des grains d'orge presque à 100% cela peut refléter un produit un mélange alléopathique ayant l'huile essentielle de *citrus limon* comme principe actif

Pour l'anti-inflammatoire : D'après les résultats obtenus, l'extrait éthanolique a manifesté une bonne activité avec un pourcentage d'inhibition égale à 78.94 % à la concentration 8000 µg/ml, le résultat est proche à celui du dichlofenac

Pour l'anti-moisissure : L'huile essentielle de *citrus limon* a inhibé la croissance des moisissures à 57,15 % proche à celle l'huile végétal utilisé comme référence avec 78,58% d'inhibition.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIES**

**Références bibliographique**

- [1] Ventrella, m.c. et marinho, c.r. (2008). morphology and histochemistry of glandular trichomes of cordiaverbenacead.(boraginaceae) leaves. *revistabrasil. bot*,31(3) : 457-467.
- [2] Ladohyemeda, c.f., dibong, s.d., nyegue, m.a., djembissitalla, r.p., lenta ndjakou, b., mpondompondo, e., yinyang, j. et wansi, j.d. (2014). activité antioxydante des extraits méthanoliques de phragmantheracapitata (loranthaceae) récoltée sur citrus sinensis. *j.applbiosci*, 84:7636– 7643.
- [3] Campêlo, l.m., de almeida, a.a., mendes de freites, r., cerqueira, g.s., de souza, g.f., saldanha, g.b., feitosa, c.m., de Freitas, r.m. (2011).antioxidant and antinociceptive effects of citrus limon essential oil in mice. *journal of biomédecine and biotechnology*.p8
- [4] Kelechi, a.k., elias,d.t., lawrence,e.o.,chukwuma,o.j.(2017).effects of citrus limon juice serum bilirubin, high density lipoprotein and low density lipoprotein in adult male wistar rats under variable models of stress. *journal of advances in medical and pharmaceutical sciences*
- [5] Chutia, m., dekabhyuan, p., pathak, m.g., sarma, t.c. et boruah, p. (2009). antifungal activity and chemical composition of citrus reticulatablanco essential oil against phytopathogens from north east india.*lwt - food sci. technol*, 42: 777–780.
- [6] Kamal, g.m., anwar, f., hussain, a.i., sarri, n. et ashraf, m.y. (2011).yield and chemical composition of citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels.*food res int*, 18(4): 1275-1282.
- [7] Xu, d.-p., li, y., meng, x., zhou, t., zhou, y., zheng, j., zhang, j.-j., & li, h.-b. (2017).natural antioxidants in foods and medicinal plants : extraction, assessment and resources.*international journal of molecular sciences*, 18(1), 96.
- [8] Nicolai, m., pereira, p., vitor, r. f., reis, c. p., roberto, a., &rijo, p. (2016). antioxidantactivity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *measurement*, 89, 328-332

- [9] Loussert ,R., (1989) : techniques agricoles méditerranéennes, les agrumes, l'agriculture la voisier, paris. Vol i et ii.
- [10] Morel., (1969). Le livre des arbres et arbustes et arbrisseaux (1er ed.).
- [11] Anonyme., (2007). Agriculture et développement. Revue de vulgarisation et de communication. N004, inva, 7
- [12] Espirade ,E., 2002 introduction à la transformation industrielle des fruits ed tec a doc fao, 2016 :fao stat 2016. Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016.([www.fao.org/faostat](http://www.fao.org/faostat)).
- [13] Nerovique., Ben slama, H., Azagoh, N., et Favet, R. (2011). Extraction et purification de composés végétaux d'intérêt fonctionnel : Elaboration d'une crème de nuit à base d'huile essentielle de citron. ed, montpellier sup-agro. Universités montpellier.44p.
- [14] Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. (1996). Fruit. In "food composition and nutrition tables". ed. crc. pp: 892, 893, 928, 929.
- [15] Gonzàlez-molina, E., Domínguez-perles, R., Moreno, D.A. et García-viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. J. Pharm. Biomed. Anal, 51: 327–345.
- [16] Whistle R. W .A. (1997). Samoan he rbalmedicine . Isle botanical. Honolulu wong, S. P.; Leong, l. p., and Koh, J. H. W. (2005). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food chemistry, 99, 775–783.
- [17] Okwnd.E., Emenike ,I.N. (2006). Evaluation of ph ytonutrientsandvitaminscontentsof citrus fruits. International journal of molecular medecine and advance science 1: 1-6.
- [18] Oboh .A.,Ademosun O. (2012). Characterization of the antioxidant properties of phenolice x tractsfromsom e citrus p ls: 729–736.
- [19] Manish, K., Mahesha. R., m som ash e kh ar. (2013). Evaluation of anti tubercular activity of me thanolic extract of citrus sinensis: 18-22.



- [20] Janatis.S.F, Beheshtih.R.; Feizy .J, Fahimn. K. (2012). Chemical composition of lemon (citrus lemon) and peelits considered as animal food. *Journal of food gida*, 5: 267-271.
- [21] Cazau-Beyret, N. (2013). Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université toulouse iii sabatier. 194p
- [22] Gonzàlez-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A. et García-Viguera,C. (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *J. pharm.biomed. anal*, 51: 327–345.
- [23] Gauriat, E. (2015). Accompagnement d'une rééducation physique post traumatique par l'aromathérapie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de limoges. 150p
- [24] Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4eme edition. Ed. Tecet doc, la voisier, paris.
- [25] Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Cadre, J.(1994). Biogenèse des monoterpènes, chaine isoprénique, *bull. soc. Pharm.* 133,79-99
- [26] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and chemical toxicology*. 46: 446– 475.
- [27] Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D. et Van Griensven, L.J.L.D.(2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15: 7532-7546.
- [28] Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of algerian citrus essential oils and their application in sardinapilchardus. *Foods*, 4: 208 228.
- [29] Lakhdar, L. (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur aggregati bacter actino mycetemcomitans : étude in vitro. thèse de doctorat. Université mohammed v de rebat. 164p.
- [30] Chavanne, P. (2011). 200 remèdes au citron. Editions first – grund, paris, 255p

- [31] Muther, L. (2015). Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université d'auvergne.156p
- [32] Fadil, M., Farah, A., Ihssan, B., Talouni, T., Rachiq, S. (2015). Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *rosmarinus officinalis* L. Par la méthodologie de surface de réponse. J. mater. Environ. sci.6 (8)2346-2357. p 12.
- [33] Tongnuanchan, P., Benjakul, S. (2014). Essential oil: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. Concistere view in food science.
- [34] Venturini, N. (2012). Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples des spiritueux de myrte (*myrtus communis* L) et de cédrat (*citrus medical*) de corse. Thèse doctorat en chimie. Ecole doctorale environnement et société umr cnrs 6134 (spe). p 242
- [35] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3eme edition, ed. Tec et doc. Lavoisier, paris
- [36] Chemat, F., Lucchessi, M, E. (2005). Extraction assistée par microonde des huiles essentielles et des extraits aromatique, J. soc. ouest-afr. chim, 020 ; 77-99
- [37] Lavalette m.2013. Les insectes: une nouvelle ressource en protéines pour l'alimentation humaine. Thèse de doctorat d'état, université de lorraine, france, 95p.
- [38] Biasato I., de Marco M., Rotolo L., Renna M., Lussiana C., Dabbou S., Pozzo L. 2016. Effects of dietary *tenebrio molitor* meal inclusion in free-range chickens. Journal of animal physiology and animal nutrition 100(6) : 1104-1112
- [39] Brandon A. M., Gao S. H., Tian, R., Ning D., Yangs. S., Zhou, J., Criddle C. S. 2018. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. Environmental science & technology 52(11) : 6526-6533
- [40] Vangs. S., Brandona. M., Flanagan J. C. A., Yang, J., Ning, D., Cais. Y., Ren N. Q. 2018. Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *tenebrio molitor linnaeus*): factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. Chemosphere 191: 979-989

- [41] Van der bremp, X., Moneret-Vautrin, D. A. (2014). Le risque allergique de tenebrio molitor pour la consommation humaine. *Revue française d'allergologie*, 54(1), 34-36
- [42] Pisoschi, A.M., and Negulescu, G.P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry and analytical biochemistry*. 01, 1-10.
- [43] Zhong, Y., and Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In *handbook of antioxidants for food preservation*. Woodhead publishing, pp.287-333.
- [44] Contreras-Guzmán, E. S., & Strong iii, F. C. (1982). Determination of tocopherols (vitamine) by reduction of cupric ion. *Journal of the association of official analytical chemists*, 65(5), 1215-1221
- [45] Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical sciences*, 34(7), 795-800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18p014>
- [46] Echegaray, N., Pateiro, M., Muneke, P.E., Lorenzo, J.M., Chabani, Z., Farag, M. A., & Domínguez, R. (2021). Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: methods and applications *molecules*, 26(13), 3880.
- [47] Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., and Fritsch, P.(2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *m/s : médecine sciences*, 20(4), 458–463
- [48] Jarbi, I. (2018). Etude de l'activité antioxydante et anti hyperglycémiant in vitro d'une nouvelle série des dérivés des pyridazin-3 (2h)-ones. Université de Mohamed v rabat, thèse de doctorat. pp59-60. Maroc.
- [49] Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3380
- [50] Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of "antioxidant power": the frap assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

- [51] Yefrida, H. Suyani, A. Alif, Maiefdi, & Azizhermansyah. (2018, avril). Modification of phenanthroline method to determine antioxidant content in tropical fruits methanolic extract.
- [52] Szydłowskaczerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *talanta*, 76(4), 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>
- [53] Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., & Apak, R. (2012). Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *analytical chemistry*, 84(18), 8052-8059. <https://doi.org/10.1021/ac301925b>
- [54] Glatz, Z. (2006). Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography b*, 841(1), 23-37. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.02.051>
- [55] Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014).  $\alpha$ -amylase production and applications : a review. *environmental microbiology*, 10.
- [56] Ndoye foe, F.M.C., Kemegnitchinang, T.F., Nyegue, A.M., abdou, J-P., Gbawengyaya, A.J., Tchinda, A.T., Oyonoessame, J-L. Etetoa F-X. (2016). chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from cameroon. *Bmc complementary and alternative medicine*, 16:117.
- [57] Poubelle, P.E. et Borgeat, P. (2000). Perspectives thérapeutiques de l'inflammation. *m/s*, 16: 917-23.
- [58] Hellal, M. (2007). Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine: synthèses et activités anti-cytokine. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université louis pasteur (strasbourg i). Université louis pasteur (strasbourg i). 324p.
- [59] Srdan V. Stankov. (2012). Definition of inflammation, causes of inflammation and possible anti-inflammatory strategies. *Open inflammation. J*, 5: 1-9.

- [60] Muster, D, (2005). Médicaments de l'inflammation. Emc-stomatologie, 21.
- [61] Adepoapie Annick, (2018). Présentée en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, évaluation des activités anti-inflammatoire et antioxydant de l'extrait hydro- éthanolique de l'écorce de racines de *dichrostachys cinerea* L. Wight et Arn. (Fabaceae), administration et personnel enseignant de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologique, 8-9, 13-15
- [62] Kadaseoussen, (2018). Pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences, recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques, université Ferhat Abbas Sétif 1 faculté des sciences de la nature et de la vie, 13
- [63] Mansour Sadia, (2015). Pour l'obtention du diplôme de doctorat en science, évaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scaberrimum* L - étude in vivo-, université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, 18.
- [64] Henzen C, (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. Forum médical suisse, 19, 442,446
- [65] Meziti Hicham, (2012). Évaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora* L. Université Ferhat Abbas –Setif faculté des sciences département de biologie, 17.
- [66] Ziane Keltoum; Tiab Sidali ,(2013). Activité anti-inflammatoire et évaluation de la toxicité in vivo des extraits éthanoliques de l'écorce de *Ulmus campestris* ; université Abderrahmane Mira de Bejaia faculté des sciences de la nature et de la vie département de biologie physico-chimie ; 1.
- [67] Khitri, W., Lachgueur, N., Tasfaout, A., Lardjam, A., & Khalfa, A. (2016). Plantes anti lithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie. Doi: 10.4000/ethnoecologie.2511.
- [68] Sadki, C., et Atmani, F. (2017). Évaluation de l'effet anti lithiasique, oxalo-calcique et phospho-ammoniac-magnésien d'extrait aqueux d'*Erica multiflora* L. progrès en urologie ,27(16), 1058–1067. doi:10.1016/j.purol.2017.09.011

- [69] Cotton, F., Wolff, F., Simon, I., Idrissi, M., Tielemans, C., Vandenbossche, M., Roumère, T., et Pozdzik, A., (2014)
- [70] Lozowicka, B., Abzeitova, E., Sagitov, A., Kaczynski, P., Toleubayev, K., & Li, A. (2015). studies of pesticide residues in tomatoes and cucumbers from kazakhstan and the associated health risks. *environmental monitoring and assessment*, 187(10), 609. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4818-6>
- [71] Hashem, A. S., Awadalla, S. S., Zayed, G. M., Maggi, F., & Benelli, G. (2018). Pimpinella anisum essential oil nanoemulsions against tribolium castaneum— insecticidal activity and mode of action. *environmental science and pollution research*, 25(19), 18802-18812. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2068-1>
- [72] Sharma, P. K., Singh, V., Ali, M., & Kumar, S. (2016). effect of ethanolic extract of zingiber officinale roscoe on central nervous system activity in mice.
- [73] Rempe, C. S., Burris, K. P., Lenaghan, S. C., & Stewart jr, C. N. (2017). The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. *Frontiers in microbiology*, 8, 422.
- [74] Hussain, S., Sadaruddinsiddiqu, Shahida khalid, Atifjamal, & Abd ul qayyum and Zahoor Ahmad. (2007). Allelopathic potential of senna (cassia angustifolia vahl.) on germination and seedling characters of some major cereal crops and their associated grassy weeds.
- [75] Walia, U. S., & Walia, S. S. (2015). Crop management.
- [76] Cronk, Q. C. B., & Fuller, J. L. (2001). Plant invaders : the threat to natural ecosystems. earthscan.
- [77] Keller, R. P., Cadotte, M. W., & Sandiford, G. (2014). Invasive species in a globalized world : ecological, social, and legal perspectives on policy. University of Chicago press. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226166216.001.0001>.
- [78] Rice, E. L. (2012). Allelopathy
- [79] Macías, F. A., Molinillo, J. M., Varela, R. M., & Galindo, J. C. (2007). Allelopathy—a natural alternative for weed control. *Pest management science*, 63(4), 327-348. <https://doi.org/10.1002/ps.1342>

- [80] Olofsdotter, M. (2001). Getting closer to breeding for competitive ability and the role of allelopathy—an example from rice (*Oryza sativa*) 1. *Weed technology*, 15(4), 798-806. [https://doi.org/10.1614/0890-037x\(2001\)015\[0798:gctbfc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0890-037x(2001)015[0798:gctbfc]2.0.co;2)
- [81] L. Estepa, M. Daudon, contribution of fourier transform infrared spectroscopy (1997) 347–369.
- [82] D. Bazin, G. Andr´ E, R. Weil, G. Matzen, V. Emmanuel, X. Carpentier, M. Daudon, absence of bacterial imprints on struvite-containing kidney stones: a structural investigation at the mesoscopic and atomic scale, *urology*. 79 (4) (2012) 786–790, <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.08.054>.
- [83] J. Prywer, A. Torzewska, bacterially induced struvite growth from synthetic urine: experimental and theoretical characterization of crystal morphology, *cryst. growth des.* 9 (8) (2009) 3538–3543, <https://doi.org/10.1021/cg900281g>.
- [84] J. Prywer, R.R. Sadowski, A. Torzewska, Aggregation of struvite, carbonate apatite, and proteus mirabilis as a key factor of infectious urinary stone formation, *cryst. Growth des.* 15 (3) (2015) 1446–1451, <https://doi.org/10.1021/cg5018032>.
- [85] P. Das, G. Gupta, V. Velu, R. Awasthi, K. Dua, H. Malipeddi, formation of struvite urinary stones and approaches towards the inhibition—a review, *biomed. pharmacother.* 96 (2017) 361–370, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.015>.
- [86] L. Chen, Y. Shen, A. Xie, F. Huang, W. Zhang, S. Liu, seed-mediated synthesis of unusual struvite hierarchical superstructures using bacterium, *cryst. Growth des.* 10 (5) (2010) 2073–2082, <https://doi.org/10.1021/cg900974n>.
- [87] J. Prywer, L. Sieron, A. Czynkowska, struvite grown in gel, its crystal structure at 90 k and thermoanalytical study, *crystals*. 9 (2) (2019) 89, <https://doi.org/10.3390/cryst9020089>.
- [88] C.K. Chauhan, M.J. Joshi, in vitro crystallization, characterization and growth inhibition study of urinary type struvite crystals, *j. Cryst. growth*. 362 (2013) 330–337, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2011.11.008>.
- [89] P.D. Rekha, A. Hameed, M.A.P. Manzoor, M.V. sur Yavanshi, S.D. Ghate, A.B. Arun, s.s. Rao, athmika, S.K. Bajire, M. Mujeeb Urahiman, C.-C. Young, first report of pathogenic bacterium *Kalamiellapiersonii* isolated from urine of a kidney stone

patient: draft genome and evidence for role in struvite crystallization, *pathogens*. 9 (9) (2020) 711, <https://doi.org/10.3390/pathogens9090711>.

[90] Khodabakhsh, p., shafaroodi, h. et asgarpanah, j. (2015). analgesic and antiinflammatory activities of citrus aurantiuml. Blossoms essential oil (neroli): involvementof the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway

[91] Jazetdongmo, p.m., kuate, j., ngouana, v., damesse, f., sonwa, e.t.,amvanzollo, p.h. etmenut, c. (2008). comparaison des propriétés anti-radicalaires etanti-inflammatoires des huiles essentielles de *citrus reticulata*var. madagascar et *citrus sinensis*var. casagrande du cameroun. *fruits*, 63: 201–208.

[92] Ndoyefoe, f.m.c., kemegnitchinang, t.f., nyegue, a.m., abdou, j-p.,gbaweng yaya, a.j., tchinda, a.t., oyonoessame, j-l. et etoa f-x. (2016). chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essentialoils of four dietary and medicinal plants from cameroon.bmc complementary andalternative medicine, 16:117.

[93] Blois, m. s. (1958). antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>

[94] Re, r.,pellegrini, n., protegente, a., pannala, a., yang, m., &rice-evans, c. (1999). antioxidant activity applying an improved abts radical cationdecolorization assay. *free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

[95] Szydłowskiaczerniak, a., dianoczki, c., recseg, k., karlovits, g., &szlyk, e. (2008). determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *talanta*, 76(4), 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>

[96] Oyaizu, m. (1986). studies on products of browning reaction. antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *the japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

[97] Özyürek, m., güngör, n., baki, s., güçlü, k., &apak, r. (2012). development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *analytical chemistry*, 84(18), 8052-8059. <https://doi.org/10.1021/ac301925b>

[98] Zengin, g., sarikurkcu, c., aktumsek, a., ceylan, r., and ceylan, o. (2014). a comprehensive study on phytochemical characterization of haplophyllummyrtifoliumboiss. endemic to turkey and its inhibitory potential against



key enzymes involved in alzheimer, skin diseases and type ii diabetes. *industrial crops and products*. 53, 244-251.

[99] Kandikattu k, bharathrathna kumar p, venupriya r, sunil kumar k, ranjithsingh.b.rathore. evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in-vitro method. *indian journal of research in pharmacy and biotechnology* 2013; 1(5) : 729-730.

[100] Dhima, k. v., vasilakoglou, i. b., eleftherohorinos, i. g., &lithourgidis, a. s. (2006). allelopathic potential of winter cereal cover crop mulches on grass weed suppression and sugarbeet development. *crop science*, 46(4), 1682-1691. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.09-0311>

[101] Chung, i. m., kim, k. h., ahn, j. k., lee, s. b., kim, s. h., &hahn, s. j. (2003). comparison of allelopathic potential of rice leaves, straw, and hull extracts on barnyardgrass. *agronomy journal*, 95(4), 1063-1070. <https://doi.org/10.2134/agronj2003.1063>

[102] *Mealworm—alchetron, the free social encyclopedia*. (2018). <https://alchetron.com/mealworm>

[103] Kemassi, a., laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides université kasdi-merbah, ouargla., bp511 ouargla 30000 algérie, herouini, a., laboratoire de mathématique et sciences appliquées, université de ghardaïa, b.p 455, ghardaïa, 47000, algérie., laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides université kasdi-merbah, ouargla., bp511 ouargla 30000 algérie, hadj, s., département des hydrocarbures universitékasdi-merbah, ouargla., bp511 ouargla 30000 algérie, cherif, r., laboratoire de mathématique et sciences appliquées, université de ghardaïa, b.p 455, ghardaïa, 47000, algérie., ouldelhadj, m., & laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides université kasdi-merbah, ouargla., bp511 ouargla 30000 algérie. (2019). effet insecticide des extraits aqueux d'euphorbiaguyoniana (euphorbiaceae) récoltée dans oued sebseb (sahara algérien) sur le triboliumcastaneum. *lebanese science journal*, 20(1), 55-70. <https://doi.org/10.22453/lcj-020.1.055-070>

[104] Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat. *In lipids in health and disease* 16:146.

[105] Hojjati, M., Barzegar, H. (2017). Chemical composition and biological activities of lemon (Citrus Limon) leaf essential oil. *Nutrition and food sciences research*. Vol 4, No 4, P: 15-24

- [106] Saidani, M., Merzouk, B. (2002). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Laboratoire adaptation et d'amélioration des plantes. Phytochemistry* 62:1283-1289
- [107] Hamdan, D., Ashour, M.L., Mulyaningsih, S., El-Shazly, A. et Wink, M. (2013). Chemical composition of the essential oils of variegated pink-fleshed lemon (*Citrus x limon* L. *Burm. f.*) and their anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Z. Naturforsch*, 68 c: 275 – 284.
- [108] Golmakani, M.T. et Moayyedi, M. (2015). Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from *Citrus limon* (Lisbon variety) peel. *Food Sci. Nutr*, 3(6): 506–518
- [109] Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Di Sanzo, G., Verardi, A., Lopresto, C.G., Pugliese, A., Menichini, F., Balducchi, R. et Calabro, V. (2016). Chemical profile and antioxidant properties of extracts and essential oils from *Citrus x limon* (L.) *Burm. cv. Femminello Comune. Chem. Biodiversity*, 13: 571 – 581.
- [110] Ramful D., Tarnus E. , Aruoma O. I., Bourdon E., Baborun T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps; *Food Research International*; 44: 2088-2099.
- [111] Wu, Z., Li, H., Yang, Y., Zhan, Y. et Tu, D. (2013). Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Ind. Crop Prod*, 46: 311– 316.
- [112] Ou, M-C., Liu, Y-H., Sun, Y-W. et Chan, C-F. (2015). The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9 pages
- [113] Ouali T et sadouni Y, Evaluation in vitro des activités antioxydante et anti inflammatoire des huiles essentielles de l'écorce de Citrus limon, thèse de master en Pharmacologie Moléculaire, Bejaia : Université A. MIRA, 2017,41p.

# ANNEXES

## Annexes

### Annexe I : matériels et instruments utilisés

#### 1. Matériel du laboratoire

Béchers, tubes eppendorf, micropipettes de volumes différents, microplaques, ballons, béchers, erlenmeyers, éprouvettes, flacons, spatules, portoirs, verres de montre, Mortier, Fioles, Seringue Hamilton, Barreaux magnétiques, Entonnoir, Boîte de pétri, Ecouvillon

#### 2. Instruments

- Rotavap (BUCHI).
- Balance de précision (KERN).
- Lecteur de microplaque (PerkinElmer).
- bain d'eau
- Etuve (Mettmert).
- pH mètre (METTLER TOLEDO).
- centrifugeuse
- Une chambre UV par lampe 254 nm -mixeur
- microscope-Ultrason (fisherscientific FB 15047)
- PH mètre (METTLER TOLEDO) -Balance de précision (KERN)
- Enceinte de germination FT-IR - FTIR-6800 – JASCO Europe)

### Annexe II : Réactifs des activités antioxydantes :

Réactifs	Compositions	Quantités
DPPH•	DPPH	6 mg
ABTS•+ (7 mM) Persulfate de potassium	ABTS K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (2.45 mM)	19,2 mg 3,3 mg
Ferricchloride FeCl <sub>3</sub> (0.2%)	FeCl <sub>3</sub> (0.2%) H <sub>2</sub> O	0,02 g 10 ml
Phénantroline (0.5%)	1,10- Phénantrolinemonohydraté Méthanol	0,05g q.s.p10 ml
SNP	Ag NO <sub>3</sub> Trisodium citrate	50 ml 5 ml

<b>réactif basique</b>	NaOH	0,7125 g
	NaOCl (liq)	25 ml 1.175 ml 25ml

**Annexe III : Standards :**

<b>standards</b>	<b>Compositions</b>	<b>Quantités</b>
<b>Acide ascorbique</b>	Acide Ascorbique Méthanol	4 mg 1 ml
<b>Acarbose</b>	Acarbose	4 mg
	Méthanol	1 ml
<b>Trolox</b>	Trolox	0,5 mg 1 ml
<b>Huile végétale</b>	Huile végétale	40µl
<b>Cu SO4</b>	Cu SO4 Eau distillée	0.025 g 25 ml

**Annexe IV : Solutions chimiques :**

<b>Solutions chimiques</b>	<b>Compositions</b>	<b>Quantités</b>
<b>Tampon phosphate pH 6,6</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	62,5 ml 37,5 ml
<b>Ferricyanide de potassium (1%)</b>	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1 g
<b>Acide trichloracétique (10%)</b>	TCA	1 g
<b>Chlorure de fer III anhydre (0.1%)</b>	FeCl <sub>3</sub>	0,1 g
<b>Chlorure de fer III anhydre (0.2%)</b>	FeCl <sub>3</sub>	0,02g
<b>Persulfate de potassium</b>	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	3,3 mg

# RESUMES

## Résumé

L'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique de *citrus limon* appartenant à la famille *des Rutaceae* a été réalisé par les méthodes *in vitro* : antioxydantes, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-germination, anti-moisissures, cytotoxicité, anti-infection urinaire et anti-insecticide.

Les meilleurs résultats obtenus sont les suivants :

Pour l'anti-germination : L'huile essentielle de *citrus limon* à inhiber la germination des grains d'orge presque à 100% cela peut refléchir a produit un mélange allélopathique ayant l'huile essentielle de *citrus limon* comme principe actif

Pour l'anti-inflammatoire : D'après les résultats obtenus, l'extrait éthanolique *a* manifesté une bonne activité avec un pourcentage d'inhibition égale à 78.94 % à la concentration 8000 µg/ml, le résultat est proche à celui du dichlofenac

Pour l'anti-moisissure : L'huile essentielle de *citrus limon* à inhiber la croissance des moisissures à 57,15 % proche à celle l'huile végétal utilisé comme référence avec 78,58% d'inhibition.

Ce résultat peut être considéré comme point de départ pour la production d'un produit à impact socioéconomique

Mot clé : huile essentielle, citrus limon, anti-inflammatoire, anti-germination

## Abstract

The biological activity of the essential oil and the ethanolic extract of citrus limon belonging to the Rutaceae family was carried out by in vitro methods: antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, anti-germination, anti-mold, cytotoxicity, anti-urinary infection and anti-insecticide.

The best results obtained are as follows:

For anti-germination: Citrus limon essential oil to inhibit the germination of barley grains almost 100% this can reflect produced an allelopathic mixture having citrus limon essential oil as active ingredient

For the anti-inflammatory: According to the results obtained, the ethanolic extract showed good activity with a percentage of inhibition equal to 78.94% at the concentration of 8000 µg/ml, the result is close to that of dichlofenac

For anti-mold: Citrus limon essential oil inhibits mold growth by 57.15% close to that of the vegetable oil used as a reference with 78.58% inhibition.

This result can be considered as a starting point for the production of a product with socio-economic impact.

Key word: essential oil, citrus limon, anti-inflammatory, anti-germination



تم إجراء النشاط البيولوجي للزيت العطري والمستخلص الإيثانولي لليمون الحمضيات الذي ينتمي إلى عائلة Rutaceae بطرق مختبرية: مضادات الأكسدة ، مضادات السكر ، مضاد للالتهابات ، مضاد للإنبات ، مضاد للعفن ، السمية الخلوية ، مضاد عدوى المسالك البولية و مضاد للحشرات.

أفضل النتائج التي تم الحصول عليها هي كما يلي:

لمقاومة الإنبات: زيت الليمون الحامض الأساسي لمنع إنبات حبوب الشعير بنسبة 100% تقريبًا ، وهذا يمكن أن يعكس مزيجًا أليوباثيًا يحتوي على زيت الليمون الحامض الأساسي كمكون نشط

بالنسبة لمضاد الالتهاب: وفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها ، أظهر المستخلص الإيثانولي فعالية جيدة مع نسبة تثبيط تساوي 78.94% بتركيز 8000 ميكروجرام / مل ، وكانت النتيجة قريبة من نتيجة ديكلوفيناك.

لمقاومة العفن: يمنع زيت الليمون الحمضي الأساسي نمو العفن بنسبة 57.15% بالقرب من الزيت النباتي المستخدم كمرجع مع تثبيط 78.58%.

يمكن اعتبار هذه النتيجة كنقطة انطلاق لإنتاج منتج له تأثير اجتماعي واقتصادي.

الكلمة المفتاحية: زيت عطري ، ليمون حمضيات ، مضاد للالتهابات ، مضاد للإنبات

## Evaluation des activités biologiques de l'espèce citrus limon

### Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie générale

#### Résumé

L'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique de *citrus limon* appartenant à la famille *des Rutaceae* a été réalisé par les méthodes *in vitro* : antioxydantes, antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-germination, anti-moisissures, cytotoxicité, anti-infection urinaire et anti-insecticide.

Les meilleurs résultats obtenus sont les suivants :

Pour l'anti-germination : L'huile essentielle de *citrus limon* à inhiber la germination des grains d'orge presque à 100% cela peut réfléchir a produit un mélange allélopathique ayant l'huile essentielle de *citrus limon* comme principe actif

Pour l'anti-inflammatoire : D'après les résultats obtenus, *l'extrait éthanolique a manifesté une bonne activité avec un pourcentage d'inhibition égale à 78.94 %* à la concentration 8000 µg/ml, le résultat est proche à celui du dichlofenac

Pour l'anti-moisissure : L'huile essentielle de *citrus limon* à inhiber la croissance des moisissures à 57,15% proche à celle l'huile végétal utilisé comme référence avec 78,58% d'inhibition.

Ce résultat peut être considéré comme point de départ pour la production d'un produit à impact socioéconomique.

**Mots clés :** Huile essentielle, citrus limon, anti-inflammatoire, anti-germination.

#### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de contrôle de qualité au centre de Recherche en Biotechnologie.

**Encadreur :** Dr. BENSOUICI Chawki (MRA-CRBT).

**Examineur 1 :** Dr KITOUNI Rachid (MCB- UFM Constantine).

**Examineur 2 :** Dr. TAREK Bezi (MRB-CRBT).

