

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة محمد بوضياف/المسيلة
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF DE M'SILA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE
MEMOIRE : MASTER ACADEMIQUE
FILIERE: BIOLOGIE
OPTION: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Présenté par

BOUDAUD Megdouda
et
NOUI MEHIDI Ilham

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante et
antimicrobienne de graines de *Citrus reticulata*
et d'écorce de *Citrus sinensis***

Devant le jury

M^r SELLOUM Mounir

MAA- UMB –M'sila

Président

M^r HENDEL Noui

MCA- UMB –M'sila

Encadreur

M^{me} GUESMIA Khaoukha

MAA- UMB –M'sila

Examinatrice

Soutenu le : /06/2021 à h00

Promotion : 2020-2021

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

A mon mari, pour sa patience, son soutien et ses nombreux encouragements.

A mes chères enfants **AMIR** et **AMEL**

A ma douce sœur **BELKISS** et mes frères **AZOUZ** et **MAHDI**, à Ma cher binôme **Megdouda** ainsi qu'à toute ma famille et mes amis.

Ilham

Je dédie ce modeste travail à, Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir ou tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur port :

mes très chère parents qui m'ont soutenu et encouragé durant tout le long de ma vie.

A mes très chère sœurs : **Khadidja** , **Douaa** , mes chères frères et à toute ma famille, proche ou éloignée

A Ma cher binôme **Ilham** et tous les membres de sa familles.

A mes amies et à toute la promotion de MASTER en Microbiologie Appliquée.

Megdouda

Remerciements



Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre DIEU qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous voudrions remercier Mr HENDEL NOUI, pour avoir accepté de nous encadrer, pour nous avoir bien orienté et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'il trouve ici nos sentiments de gratitude et l'expression de notre vive reconnaissance.

Nous remercions Mr SELLOUM Mounir d'avoir accepté de présider le jury. Nous remercions également Mme GUESMIA Khaoukha, pour avoir accepté de bien vouloir examiner et juger ce travail.

Nous tenons à remercier Mr SEGHIRI K., le chef de service des laboratoires de biologie, pour nous avoir bien accueilli au sein des laboratoires, pour sa disponibilité cordiale et pour son soutien à tous les moments.

Nous remercions, nos collègues et nos amies pour les moments sympathiques qu'on a passé ensemble.

Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Résumé	
Liste des abréviations	
Listes des figures	
Listes de tableaux	
Introduction.....	1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Plantes médicinales et phytothérapie.....	3
1.1 Phytothérapie.....	3
1.2 Plantes médicinales.....	3
2. Métabolites secondaires	3
2.1 Polyphénols.....	3
2.2 Flavonoïdes	4
3. Méthodes d'extraction des composés phénoliques.....	5
3.1 Macération	5
3.2 Exctraction au Soxhlet	5
4. Huile essentielle	5
5. Activité antioxydante	7
5.1 Radicaux libres.....	7
5.2 Le stress oxydant et les facteurs le favorisant	8
5.3 Les défenses antioxydantes	8
5.3.1 Source d'antioxydants exogènes (non enzymatique)	9
5.3.2 Source d'antioxydant endogène (enzymatique)	9
5.4 Mécanismes d'action des antioxydants :.....	9
6. Activité antimicrobienne	9
6.1 Définitions.....	10
6.1.1 Antimicrobiens et antibiotiques.....	10
6.1.2 Résistance aux antimicrobiens	10
6.2 Mode d'action des agents antimicrobiens sur la cellule bactérienne	10
6.3 Mécanisme de résistance aux antifongiques	12
7. Généralités sur les agrumes.....	12
7.1 Présentation et origine.....	12
7.2 Le genre <i>Citrus</i>	13
7.3 L'espèce <i>Citrus sinensis</i>	13
7.4 L'espèce <i>Citrus reticulata</i>	13
8. Données botaniques.....	14
9. Description morphologique et physiologique	14
10. Parties de fruit étudiées	14
11. Utilisation thérapeutique	15

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériels.....	16
1.1 Matériel non biologique	16
1.2 Matériel biologique	16
1.2.1 Matériel végétal	16
1.3 Matériel microbiologique.....	16
2. Méthodes	17
2.1 Objectif et méthodologie.....	17
3. Extraction de polyphénols des graines de mandarine.....	19
3.1 Extraction au Soxhlet (Extraction à chaud)	19
3.2 Extraction méthanolique par macération (extraction à froid)	19
4. Extraction des huiles essentielles à partir de l'écorce d'orange	20
5. Étude phytochimique de composés polyphénoliques.....	20
5.1 Analyse qualitative.....	21

5.1.1	Screening phytochimique par réactions colorées	21
5.1.2	Screening phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	21
5.1.3	Identification des composées phénoliques	22
5.2	Analyse quantitative.....	23
5.2.1	Dosage des phénols totaux	23
5.2.2	Dosage des flavonoïdes	23
6.	Evaluation de l'activité antioxydante	23
6.1	Le test de piégeage du radical DPPH.....	23
7.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
7.1	Préparation de l'inoculum.....	25
7.1.1	Bactéries	25
7.1.2	Moisissures	25
7.2	Activités antibactérienne.....	25
7.3	Activités antifongique	25
8	Analyse statistique.....	26

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Rendement en extraits	27
2.	Etude phytochimique qualitative.....	28
2.1	Screening phytochimique par réactions colorées	28
2.2	Screening phytochimique par CCM.....	29
3.	Contenus en polyphénols totaux et en flavonoïdes	31
4.	Activité antioxydante	32
4.1	Test au DPPH.....	32
5.	Activité antibactérienne.....	33
	Conclusion.....	37
	Références bibliographique.....	39
	Annexes	

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des agrumes en Algérie et de la connaissance de leurs propriétés thérapeutiques. Nous sommes intéressés à étudier deux parties de deux variétés d'agrumes (*Citrus reticulata* et *Citrus sinensis*) qui sont : les graines et les écorces. Nous avons évalué le pouvoir antioxydant et antimicrobien de l'extrait de graines de mandarine *Citrus reticulata* et de déterminer leurs teneurs en composés phénoliques à savoir, les polyphénols totaux les flavonoïdes, ainsi que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'écorce d'orange *Citrus sinensis*, vis-à-vis de certains germes pathogènes. Les graines de *Citrus reticulata* sont soumises d'une part à une extraction par Soxhlet en utilisant cinq solvants à polarité croissante (AcOEt-Acétone-MeOH- MeOH-eau 80:20) et d'autre part à une macération par le méthanol, cette dernière enregistre le rendement le plus élevé qui est de 5.3%, alors que l'extraction des HE de *Citrus sinensis* par hydrodistillation a donné un rendement de 0.6%. Un criblage phytochimique qualitatif par réactions colorées, suivi d'une confirmation par chromatographie sur couche mince a été élaboré pour l'ensemble des extraits organiques qui ont montré que les extraits AcOET, Acétone, MeOH brut se sont révélés riches en composés phénoliques, ce qui confirme les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes par la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode d' AlCl_3 , où les teneurs sont respectivement 177.660 ± 3.62 ; 175.106 ± 5.20 et de 91.702 ± 1.37 mg EAG/g MS et de 64.687 ± 2.16 ; 45.574 ± 1.12 et de 35.220 ± 0.657 mg EQ/ g MS. L'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH a montré que les meilleures concentrations inhibitrices exprimées en IC_{50} a été obtenues par l'extrait acétonique suivi par l'extrait MeOH brut respectivement 0.072 ± 0.002 ; 0.091 ± 0.001 . Cependant, le BHT (utilisé comme témoin) a montré une activité approximativement équivalente ($\text{IC}_{50} = 0.018 \mu\text{g/ml}$). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 08 souches bactériennes (Gram⁺ et Gram⁻) selon la méthode des puits de diffusion. Tous les souches ont manifestées une résistance vis-à-vis tous les extraits et même à l'HE d'écorce de *C. sinensis*, sauf à l'extrait MeOH brut qui a montré une activité moyennement efficace à 900mg/ml vis-à-vis des quatre souches *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Liste des abréviations

AcOET	Acétate d'éthyle
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butylhydroxytoluène
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CHCl₃	Chloroforme
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA	Désoxyribonucléic acid
DPPH	2,2-diphényl-1picrylehydrazile
EAG/MS	Equivalent d'acide gallique par apport matière sèche
EM	Extrait méthanolique
EOR / ROS	Espèces réactives de l'oxygène
FAO	the Food and Agriculture Organization
GN	Gélose nutritive
HE	Huile essentiel
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
I%	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀	Concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition
MeOH	Methanol
MHA	Mueller-Hinton Agar
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDA	Potato Dextrose Agar
RF	Rapport frontal
RMN	La résonance magnétique nucléaire
UV	Ultra-violet

Liste des figures

Figure 1: Différentes classifications des polyphénols végétaux et des classes polyphénoliques en fonction du nombre de cycles phénoliques et de leurs éléments structuraux (Belščak-Cvitanović <i>et al.</i> , 2018).	4
Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes : En bleu ciel, pont 3 carbones ; en bleu médian, partie provenant de la voie de l'acide shikimique ; en bleu foncé, partie provenant de la voie de l'acétate (Chira <i>et al.</i> , 2008).	4
Figure 3: Structure chimique des chémotypes contenus dans les huiles essentielles (Bouyahya <i>et al.</i> , 2018).	6
Figure 4: Représentation schématique de la théorie du stress oxydant (Gueye, 2019).	8
Figure 5: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemilet <i>et al.</i> , 2002).	9
Figure 6: Mécanismes d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Bouyahya <i>et al.</i> , 2017).	11
Figure 7: Différents types de résistance aux antibiotiques (Duval and Cossart, 2019).	11
Figure 8: <i>Citrus sinensis</i> (Saraoui, 2010).	13
Figure 9: <i>Citrus reticulata</i> (Laurain <i>et al.</i> , 2020).	13
Figure 10: Anatomie des agrumes (Rafiq <i>et al.</i> , 2018).	14
Figure 11: graines de <i>Citrus reticulata</i> (a) ; écorce de <i>Citrus sinensis</i> (b).	16
Figure 12: Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude ; F : fraction	18
Figure 13: Dispositifs d'extraction : a) Soxhlet ,b) Macération ,c) Hydrodistillation.	20
Figure 14: Réduction du radical DPPH.	24
Figure 15: Observation sous des CCM (sys solvant CHCl ₃ /MeOH; (10 : 2)): UV _{λ366 nm} (a) ; UV _{λ254nm} (b); visible (c) ; et UV _{λ366 nm} après révélation par la vanilline sulfurique (d).	30
Figure 16: Valeurs IC ₅₀ des différents extraits de <i>C. reticulata</i> en mg/ml.	32
Figure 17: Activité antimicrobienne de l'extrait MeOH brut par la méthode des puits de diffusion.	34

Liste des tableaux

Tableau 1: Dérivés radicalaires et non-radicalaires de l'oxygène.....	7
Tableau 2: Sources de stress oxydant endogènes et exogènes	8
Tableau 3: Composition (%poids sec) des sous- produits.....	15
Tableau 4: Bactéries, levures et moisissures utilisées pour l'activité antimicrobienne.....	17
Tableau 5: Systèmes solvants utilisés en CCM.....	22
Tableau 6: composés phénoliques identifiés par CCM	22
Tableau 7: rendements en % des extraits phénoliques et d'HE de citrus.	27
Tableau 8: Les résultats des tests phytochimiques pour l'extrait méthanolique brut.	28
Tableau 9: Résultat de la CCM des cinq extraits étudiés dans le système Chloroforme/méthanol (10 : 2).	29
Tableau 10: Contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits organiques de <i>C. reticulata</i>	32
Tableau 11: Zones d'inhibition des extraits organiques et de HE d'agrumes vis-à-vis des souches microbiennes.	34

INTRODUCTION

Introduction

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème extrêmement déterminant dans la santé publique. La recherche des agents anti-infectieux s'avère un besoin incontournable. De plus, les effets nuisibles du stress oxydant sur la santé des personnes sont devenus un problème grave. Les antioxydants synthétiques, couramment employés dans l'industrie alimentaire peuvent être responsables des dommages du foie et de la carcinogenèse ; d'où l'intérêt de l'utilisation des antioxydants et antibactériens d'origine naturelle ([Bouyahya et al., 2017](#)).

Les plantes telles que les fruits génèrent une variété de métabolites secondaires dans le cadre de leur système de défense pendant la croissance. Des études épidémiologiques suggèrent qu'une consommation élevée de fruits peut réduire le risque de certains cancers et maladies cardiovasculaires, maladie d'Alzheimer et certains des déclin fonctionnels associés avec le vieillissement, ce qui pourrait expliquer diverses bioactivités, comme antioxydant, anticancéreux, antibactérien et antifongique ([Mutahar et al., 2012](#)).

Les agrumes, appartiennent à l'une des grandes familles des plantes aromatiques surnommées les Rutacées ([Panwar et al., 2021](#)), qui représentent une source importante d'une immense variété de molécules bioactives, ils sont intégrés dans l'alimentation humaine quotidienne depuis toujours. Ils constituent un des éléments essentiels du régime alimentaire ([Grigoraş, 2012](#)). Ils sont devenus l'un des fruits les plus produits, consommés et transformés dans le monde ([Satari and Karimi, 2018](#)).

Selon la FAO (Food and Agriculture Organization) ([2017](#)), la production annuelle d'agrumes a connu une augmentation rapide au cours des dernières décennies, passant d'environ 30 millions de tonnes en 1960 à plus de 147 millions de tonnes en 2017. En Algérie, le verger agrumicole est constitué de tous les groupes citrus avec prédominance des oranges, qui occupent 73 % de la surface agrumicole totale, suivie du groupe de clémentines avec 16% puis du groupe citronniers avec 6,9 % et des mandariniers avec un taux de 4% ([Agagna, 2016](#)).

De plus, il a été établi que les sous-produits d'agrumes (graines, écorce, pulpe ...) sont une source de composés biologiquement actifs, y compris les vitamines, les fibres alimentaires, la pectine, les polyphénols et les huiles essentielles; qui sont doués par les effets antioxydants, antimicrobiens, anticancéreux, anti-inflammatoires et antidiabétiques, qui ont amélioré leur utilisation en tant que compléments de santé et développement des aliments nutraceutiques / fonctionnels ([Papoutsis et al., 2018](#)).

Par ailleurs, le potentiel de valorisation des sous-produits d'agrumes a permis non seulement d'alléger l'impact écologique en minimisant la pollution mais aussi a conduit à la transition vers

une économie circulaire durable en développant un nouveau paradigme connu sous le nom de concept de «bioraffinerie», qui repose sur «l'utilisation ou le recyclage» des sous-produits d'agrumes. Dans cette approche, la biomasse et les sous-produits sont exploités pour récupérer les molécules bioactives pour le développement de produits commercialisables à valeur ajoutée utilisant des technologies durables (Nayak and Bhushan, 2019).

Notre étude est une tentative d'explorer;

- Le pouvoir antioxydant et antimicrobien d'extrait de graines de mandarine *Citrus reticulata*, ainsi que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'écorce d'orange *Citrus sensensis*, vis-à-vis de certains germes pathogènes.
- Un screening phytochimique qualitatif sur l'extrait de graine de mandarine suivi d'une confirmation par chromatographie sur couche mince en vue d'une caractérisation des substances chimiques bioactives à savoir les polyphénols et les flavonoïdes, susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique...) ainsi qu'un screening quantitatif de ces derniers par dosage colorimétrique.

CHAPITRE I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Plantes médicinales et phytothérapie

1.1 Phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes, qu'elles soient consommées ou utilisées par voie externe ([Wichtl and Anton, 2003](#)).

L'atout premier de la phytothérapie est l'exceptionnelle tolérance des plantes médicinales, si elles sont choisies soigneusement en respectant des indications bien précises pour éviter des effets secondaires et des problèmes négatifs ([Chabrier, 2010](#)).

1.2 Plantes médicinales

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), "une plante médicinale est une plante qui contient, dans un ou plusieurs de ses organes, des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, ou qui sont des précurseurs de la chimio-pharmaceutique hémi-synthèse". Cette définition permet de distinguer entre les plantes médicinales déjà connues dont les propriétés thérapeutiques ou comme un précurseur de certaines molécules ont été scientifiquement établis, et d'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle ([Neffati and Sghaier, 2014](#)).

2. Métabolites secondaires

Les métabolites sont des composés organiques qui peuvent intervenir pendant le processus de métabolisme. Ils sont strictement nécessaires pour le développement, l'activité et la reproduction des cellules vivantes. Les métabolites peuvent provenir de l'extérieur des cellules ou peuvent être produits par celles-ci. Généralement, les activités métaboliques des plantes conduisent à deux catégories de métabolites ; **les métabolites primaires** qui sont des molécules organiques à rôle essentiel dans le métabolisme et le développement (glucides, protéines, lipides et acides nucléiques) ; et **les métabolites secondaires** qui ne participent pas directement au développement mais interviennent plutôt dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction. Ils sont classés en plusieurs grands groupes, tels que les composés phénoliques, les terpènes, stéroïdes et les alcaloïdes ([Grigoraş, 2012](#)).

2.1 Polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-

même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004). Généralement, les polyphénols sont classés en deux grandes classes ; Flavonoïdes et non flavonoïdes (**Figure 1**). Ces derniers comprennent structurellement molécules simples comme les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques) et des stilbènes, et très complexes molécules telles que les oligomères de stilbène, les tanins et les lignines (Khan and Dangles, 2014).

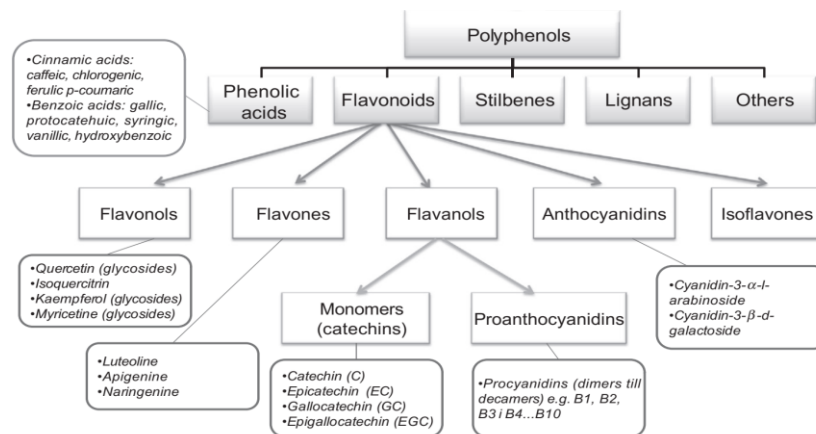


Figure 1: Différentes classifications des polyphénols végétaux et des classes polyphénoliques en fonction du nombre de cycles phénoliques et de leurs éléments structuraux (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018).

Les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement UV, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes et aussi les résistances aux diverses maladies (Chira *et al.*, 2008; Ajila *et al.*, 2011; M'hiri, 2015).

2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de phénoliques végétaux, représentant plus de la moitié des huit milles composés phénoliques naturels. Les flavonoïdes sont des composés de bas poids moléculaire composés de quinze atomes de carbone, disposés en une configuration C6–C3–C6. Essentiellement, la structure se compose de deux cycles aromatiques A et B, joints par un pont à 3 carbones (**Figure 2**). Les principales classes de flavonoïdes sont les flavonols, les flavones, flavanones, flavanols (catéchines), isoflavones, flavanonols et anthocyanidines. Les flavones et flavonols sont les plus répandus et des composés structurellement divers (Ajila *et al.*, 2011).

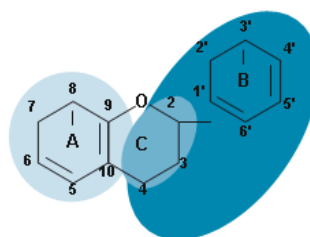


Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes : En bleu ciel, pont 3 carbones ; en bleu médian, partie provenant de la voie de l'acide shikimique ; en bleu foncé, partie provenant de la voie de l'acétate (Chira *et al.*, 2008).

3. Méthodes d'extraction des composés phénoliques

L'extraction implique la séparation des composants actifs de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes en utilisant des solvants sélectifs dans des procédures d'extraction standard. Les produits ainsi obtenus à partir de plantes sont des liquides, semi-solides ou poudres relativement impurs destinés uniquement à un usage oral ou externe ([Handa et al., 2008](#)). Selon [Azmir et al. \(2013\)](#), les composés bioactifs des matières végétales peuvent être extraits par diverses techniques d'extraction conventionnelles (classiques) et non conventionnelles.

La plupart des techniques classiques sont basées sur le pouvoir d'extraction des différents solvants utilisés et l'application de chaleur et/ou de mélange : les plus utilisées sont **(1)** Extraction au Soxhlet, **(2)** Macération et **(3)** Hydrodistillation.

Les techniques d'extraction non conventionnelles les plus utilisées comprennent **(1)** l'extraction assistée par micro-ondes, **(2)** l'extraction liquides sous pression, **(3)** l'extraction par ultrasons (sonication), **(4)** l'extraction de fluides supercritique ([Ajila et al., 2011](#)).

3.1 Macération

Dans ce processus, l'échantillon brut entier ou grossièrement en poudre est placé dans un récipient bouché avec le solvant et laissé au repos à température ambiante pendant une période d'au moins 3 jours avec une agitation fréquente jusqu'à ce que la matière soluble soit dissoute. Le mélange est ensuite filtré, le marc (le matériau solide humide) est pressé et les liquides combinés sont clarifiés par filtration ou décantation après repos ([Handa et al., 2008](#)).

3.2 Extraction au Soxhlet

L'extracteur Soxhlet a été proposée pour la première fois par le chimiste allemand Franz Ritter Von Soxhlet (1879). Il a été conçu principalement pour l'extraction de lipides mais maintenant il est utilisé pour extraire de précieux composés bioactifs à partir de diverses sources naturelles. Généralement, l'échantillon sec est placé dans une cartouche en cellulose placée dans un extracteur, ce dernier est placé dans un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances. Le processus s'exécute à plusieurs reprises jusqu'à ce que l'extraction soit terminée ([Azmir et al., \(2013\)](#)).

4. Huile essentielle

Les huiles essentielles (HE) sont des composés organiques naturels complexes de structures très variées. Le terme «huile» vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que

le terme «essentielle» désigne l'odeur dégagée par la plante productrice. Ce sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes aromatiques dans des structures sécrétrices bien spécialisées et par l'épicarpe de certains fruits (Bouyahya *et al.*, 2018).

L'extraction des HE se fait par différentes techniques, mais les plus utilisées sont celles de distillation (l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion), essentiellement à des fins commerciales. Elles peuvent être obtenues aussi par extraction à froid, dioxyde de carbone supercritique, extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes (Bouyahya *et al.*, 2018).

Chaque HE se compose de plusieurs éléments biochimiques parfois très nombreux ; il s'agit de liaisons d'hydrocarbures classées selon leurs caractéristiques en différentes classes de terpènes et de leurs dérivés oxygénés (Figure 3) (Bouyahya *et al.*, 2017). Comme les monoterpénols, les sesquiterpénols, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les esters, les aldéhydes, les oxydes, les phénols, les coumarines, les cétones ou d'autres encore qui n'apparaissent que sous forme de traces (Lardry and Haberkorn, 2007).

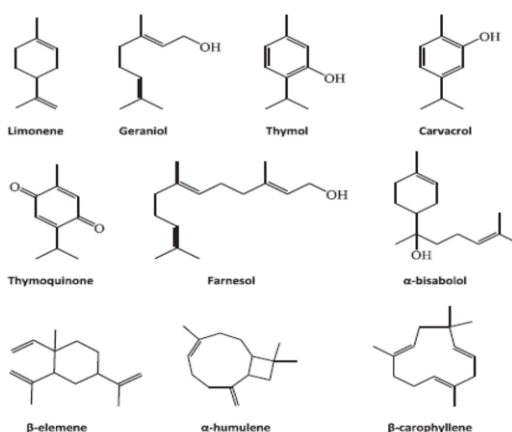


Figure 3: Structure chimique des chémotypes contenus dans les huiles essentielles (Bouyahya *et al.*, 2018).

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. Ils sont également utilisés en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Aussi les huiles essentielles font l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (Mohamedi, 2013).

5. Activité antioxydante

L'oxydation est un processus spontané qui constitue le principal facteur de détérioration des aliments, des produits cosmétiques et pharmaceutiques et qui conduit à l'altération de la valeur nutritive et/ou cosmétique de ces produits. Cette réaction est causée par l'oxygène atmosphérique, par les peroxydes, par les oxydes métalliques etc. Généralement, les substances favorisant la dégradation oxydative ou les pro-oxydants sont des espèces d'oxygène ou d'azote réactif, les premières étant les plus importantes.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou (ROS) se partagent en deux groupes principaux ; radicalux et non-radicalux (Tableau 1) (Grigoraş, 2012).

- **Les dérivés radicalaires** : détiennent au moins un électron libre autour du noyau atomique ayant une réactivité élevée.
- **Les dérivés non-radicalaires** : incluent une variété de substances neutres sans électrons libres et très réactives. L'organisme humain doit contrôler, en continu, la présence des pro-oxydants et des oxydants.

Tableau 1: Dérivés radicalaires et non-radicalaires de l'oxygène.

Appellation	Symbole	Appellation	Symbole
Radicaux de l'oxygène		Dérivés de l'oxygène (non-radicaux)	
Ion superoxyde	O_2^-	Eau oxygénée	H_2O_2
Hydroxyle	OH^*	Peroxyde organique	ROOH
Peroxyde	ROO^*	Acide hypochloreux	HOCl
Alcoxyde	RO^*	Aldéhyde	HCOR
Oxyde nitrique	NO^*	peroxynitrite	ONOOH

5.1 Radicaux libres

Il s'agit d'un atome ou d'une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non pairé(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s) (Halliwell *et al.*, 2006).

Ces radicaux libres, bénéfiques à l'organisme (à faible doses), sont produits par divers mécanismes physiologiques, concernent les réactions énergétiques (la mitochondrie et les macrophages) ainsi que les réactions de médiation tissulaires. Cette production physiologique est maîtrisée par des systèmes antioxydants réalisant une adaptation par rapport aux taux d'oxydants présents. Dans ces conditions, la balance antioxydants/pro-oxydants est donc en équilibre. En cas de déséquilibre (**Figure 4**) soit par déficit en antioxydants ou par excès d'oxydants (endogènes ou exogènes), l'excès de ces radicaux libres est appelé stress oxydatif (Bamba *et al.*, 2021).

Balance oxydative

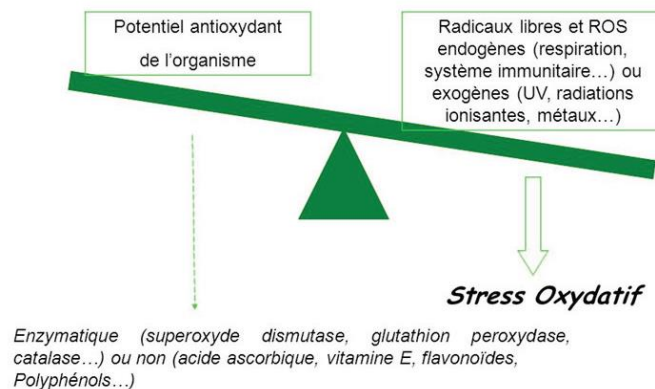


Figure 4: Représentation schématique de la théorie du stress oxydant (Gueye, 2019).

5.2 Le stress oxydant et les facteurs le favorisant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006). Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme, ...). Soit par une diminution des capacités antioxydantes (comme chez les personnes souffrant d'obésité et les fumeurs) (Migdal and Serres, 2011). Comme le montre le tableau 2, les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines endogènes et exogènes (Haleng et al., 2007).

Tableau 2: Sources de stress oxydant endogènes et exogènes (Haleng et al., 2007).

Mode de vie	Environnement	Mécanismes biochimiques
- Tabagisme	- Pollution	- Xanthine oxydase
- Faible consommation en fruits et légumes	- Ozone	- Inflammation
- Alcool	- Amiante	- Altération de la fonction endothéliale
- Médicaments	- Radiations	- Surcharge en fer
- Exposition en soleil	- Contact avec des substances cancérogènes	- Oxydation de l'hémoglobine
- Exercice intense/mal géré		- biosynthèse des prostaglandines

5.3 Les défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des ROS, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Figure 5) (Pincemail et al., 2002).

Les "antioxydants" sont des substances qui présentent en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retardent significativement ou inhibent l'oxydation de ce substrat" (Grigoraş, 2012).

On distingue deux sources d'antioxydants (Haleng et al., 2007).

5.3.1 Source d'antioxydants exogènes (non enzymatique)

Apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque.

5.3.2 Source d'antioxydant endogène (enzymatique)

Se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion, peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes.

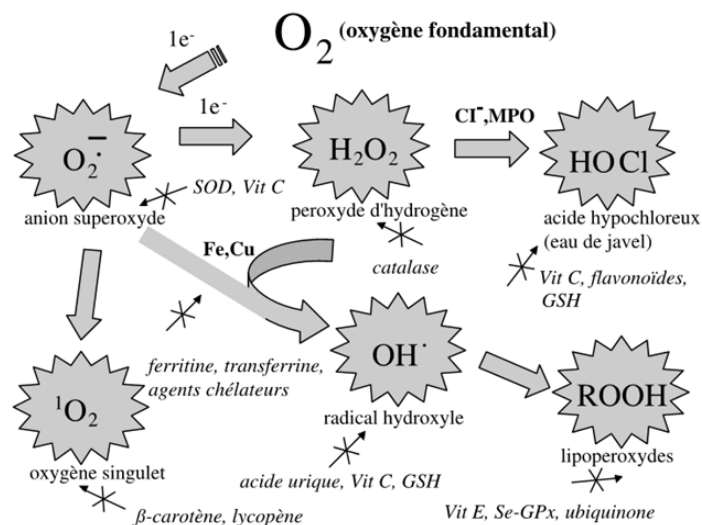


Figure 5 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes ([Pincemallet al., 2002](#)).

5.4 Mécanismes d'action des antioxydants :

Les mécanismes les plus fréquents des antioxydants sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxydedismutase, GSHPx), et la réparation des molécules de DNA (Zn, acide folique, niacine). Les antioxydants sont interdépendants. En donnant un électron, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent se rééquilibrer, autrement dit être réduits : ainsi le tocophéryl résultant de l'oxydation du tocophérol, dépend de l'ascorbate qui devient du déhydroascorbate, lui-même régénéré par le glutathion, qui dépend à son tour de la NADPH pour sa réduction, constituant une spirale antioxydante ([Halliwell et al., 2015](#)).

6. Activité antimicrobienne

La lutte contre les souches microbiennes est liée à leur pathogénicité et se fait principalement par l'usage d'antibiotiques. L'emploi de ces derniers est assez large et couvre aussi plusieurs domaines. Leur recours, a entraîné l'apparition de phénomènes d'antibiorésistance résultant de

l'exposition de certaines bactéries et champignons au stress qui peuvent échanger spontanément des gènes de résistance (Aouni *et al.*, 2013).

Beaucoup d'attention a été prêté aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (Yakhlef *et al.*, 2011).

6.1 Définitions

6.1.1 Antimicrobiens et antibiotiques

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien » (du grec *anti* : contre, *mikros*: petit et *bios* : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes. L'adjectif antibiotique (du grec *anti* : contre, *bioti-kos*: concernant la vie) une substance chimique synthétisée par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres microorganismes (Muylaer and Mainil, 2013).

6.1.2 Résistance aux antimicrobiens

La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques», qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques). Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (Muylaer and Mainil, 2013).

6.2 Mode d'action des agents antimicrobiens sur la cellule bactérienne

Les molécules bioactives des plantes médicinales aromatiques telles que les HE sont révélées efficaces dans le contrôle de la propagation de certains agents bactériens (Nazzaro *et al.*., 2013). Elles peuvent induire la coagulation, agir sur la paroi, induire la fuite des ions à travers la membrane, agir sur des protéines et les acides gras membranaires, et agir sur les médiateurs du quorum sensing. Ces mécanismes peuvent être appliqués en même temps, générant ainsi une action amplificatrice (Figure6) (Bouyahya *et al.*, 2017).

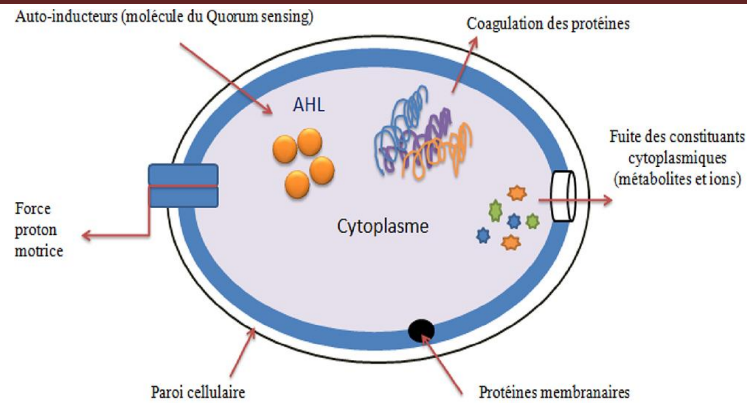


Figure 6: Mécanismes d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Bouyahya *et al.*, 2017).

6.3 Mode d'action des agents antifongiques sur les champignons

Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des HE, en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures. L'action antifongique de ces composés est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. En effet, les groupements fonctionnels des composés terpéniques des huiles essentielles tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures. Ainsi que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique (Goudjil, 2016).

6.4 Mécanisme de résistance aux antibiotiques :

Des espèces bactériennes développent des mécanismes de défense vis-à-vis de chaque antibiotique par plusieurs mécanismes (**Figure7**). Il s'agit de la production des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques, la modification dans la structure des cibles d'action des antibiotiques, la substitution de la cible, la modification de la perméabilité vis-à-vis des antibiotiques, la formation d'un biofilm et l'activation du processus de l'efflux actif (Lemaoui *et al.*, 2017; Duval and Cossart, 2019).

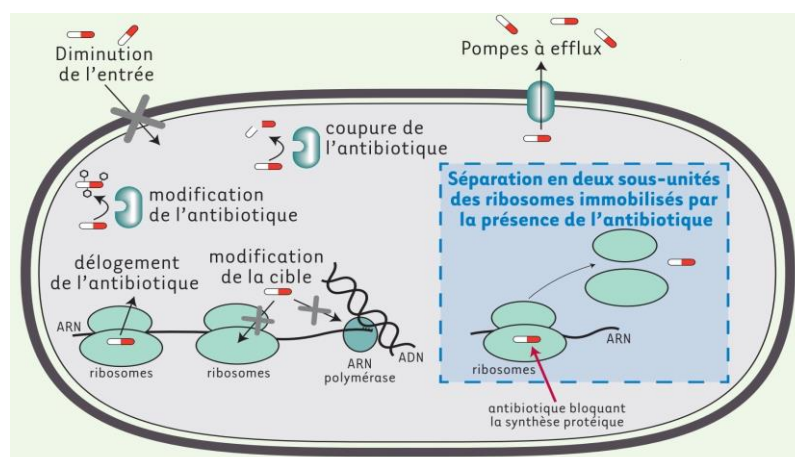


Figure 7: Différents types de résistance aux antibiotiques (Duval and Cossart, 2019).

6.5 Mécanisme de résistance aux antifongiques

Deux types de résistance sont généralement distingués. La résistance primaire, ou résistance naturelle, se rencontre chez certaines espèces fongiques qui sont insensibles à un antifongique donné, ou tout au moins pour lesquelles les concentrations minimales inhibitrices (CMI) d'antifongiques sont supérieures aux concentrations utilisables en thérapie. La résistance secondaire, ou résistance acquise, se développe chez des champignons qui appartiennent à une espèce *a priori* sensible. Cette résistance est la conséquence d'un événement qui a eu lieu préalablement ou pendant le traitement antifongique.

Elles résultent généralement d'événements mutationnels, ou de la dérégulation de l'expression de certains gènes, ce qui conduit le plus souvent à leur surexpression ([Accoceberry and Noël, 2006](#)).

La résistance peut provenir

- D'un défaut de transport ou de pénétration de l'antifongique à l'intérieur de la cellule fongique ;
- D'un défaut de transformation de l'antifongique en forme active toxique;
- D'une surproduction de la cible cellulaire de l'antifongique;
- D'une modification de la cible, qui conduit à la diminution de son affinité pour l'antifongique;
- D'une disparition de la cible et de son remplacement par le recrutement ou le détournement d'un autre métabolite;
- D'un efflux actif de l'antifongique.

7. Généralités sur les agrumes

7.1 Présentation et origine

Les agrumes sont les fruits les plus abondants cultivés tout au long du monde contenant des composés phytochimiques bénéfiques précieux ([Satari and Karimi, 2018](#); [Hou et al., 2019](#)). Le mot agrumes est d'origine Italienne, il dérive du latin **agrus** qui, autrefois, désignait les plantes dont les fruits ont une saveur aigre comme l'ail ou les oignons. Ils appartiennent à la famille des **Rutaceae** qui comprend 3 genres : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* ([Agana, 2016](#)), et sont considérés comme l'une des plus grandes espèces végétales (composée de 40 espèces) largement dispersées dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées de la terre ([Singh et al., 2020](#)).

L'aire d'origine supposée des agrumes et la diversité de ce genre être l'Asie du sud-est, en particulier l'Inde orientale, le nord de la Birmanie et le sud-ouest de la Chine, mais peut-être du nord-est de l'Inde, vers l'est à travers l'archipel malais, au nord de la Chine et du Japon, et vers le sud jusqu'en Australie ([Hosni et al., 2010](#)).

7.2 Le genre *Citrus*

Parmi les trois genres d'agrumes les plus cultivés à travers le monde. Le genre *Citrus* est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées: les oranges (*Citrus sinensis*); les mandarines (*Citrus reticulata*); les clémentines (*Citrus clementina*); les citronniers (*Citrus limon*); et les pomelos (*Citrus paradisi*) (M'hiri, 2015).

Parmi les espèces décrites au-dessus, on s'est intéressés aux *Citrus sinensis* et *Citrus eticulata*.

7.3 L'espèce *Citrus sinensis*

Citrus sinensis (orange douce) de la famille des Rutacées est largement cultivé dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales (**Figure 8**) (Bovili, 1996; Atolani *et al.*, 2012; Jorge *et al.*, 2016). Plus de 80 millions de tonnes de *C. sinensis* sont produits annuellement. L'orange douce est une majeure source de vitamines, en particulier de vitamine C, de folacine, de thiamine, de niacine, de calcium, potassium et magnésium (Atolani *et al.*, 2020).



Figure 8: *Citrus sinensis* (Saraoui, 2010).

7.4 L'espèce *Citrus reticulata*

Agrume de la famille des Rutacées ; c'est un petit arbre épineux avec sommet dense de branches élancées et communément connu comme narangi ou santra (orange) (sultana *et al.*, 2012), et surtout connu pour ses propriétés sédatives dans les pathologies nerveuses, notamment chez l'enfant. C'est parmi les variétés les plus utilisées pour obtenir l'HE (**Figure9**) (Laurain *et al.*, 2020).



Figure 9: *Citrus reticulata* (Laurain *et al.*, 2020).

8. Données botaniques

D'après Dupont and Guinard (2007), la systématique des agrumes est la suivante

Règne	Planta
Embranchement	Spermaphytes
S- Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotylédones
Sous –Classe	Rosidés
Ordre	Geniales (Rutales)
Famille	Rutaceae
Genre	<i>Citrus</i>

9. Description morphologique et physiologique

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur colorations, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité (Ramful et al, 2010). Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés ont presque la même structure (Figure 10) (Hendrix and Redd, 1995 ; Guimarães et al., 2010).

- **Une peau** : une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou *flavedo*), qui recouvre le fruit et le protège des dommages.
- **Un mésocarpe** : ou *albedo* blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.
- **La partie interne** : constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe).

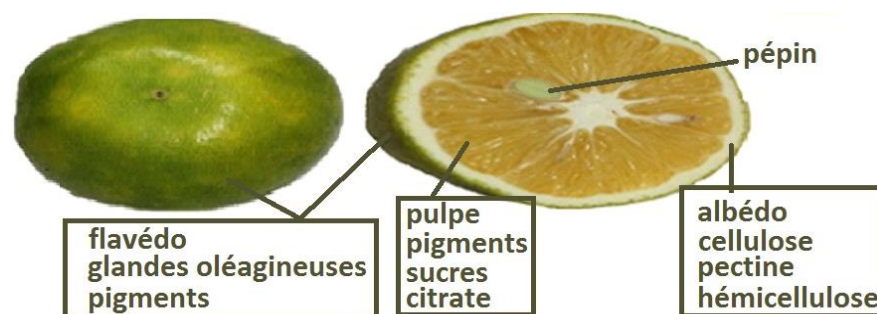


Figure 10: Anatomie des agrumes (Rafiq et al., 2018).

10. Parties de fruit étudiées

Après la transformation des agrumes (extraction du jus) une grande quantité de solide et des résidus liquides sont générés sous forme de pelures, écorces, graines, marc, et les eaux usées qui peuvent être considérées comme un substrat potentiel pour la production de nombreux autres produits de grande valeur qui nécessite de comprendre leurs compositions (tableau 3) (Panwar et al., 2021).

- **Les écorces d'orange** représentent la partie externe de fruit, en plus de leurs rôle protecteur, ils représentent une source de composés phénoliques (TEH et al., 2014),

contiennent des quantités appréciables de pectine, de flavonoïdes, acides phénoliques, huiles essentielles et des fibres alimentaires (Ademosun *et al.*, 2018). En plus de cela, ces produits contiennent 90% de terpènes, 0.4 à 1.6% d'huiles d'agrumes, 5% de mélanges oxygénés et certaines quantités de pigments (John *et al.*, 2017).

- **Les graines d'agrumes** sont la portion inutilisée réelle représentant environ 2% -7% du poids total des agrumes. Les graines d'agrumes sont connues pour être une source potentielle de protéines, de limonoïdes et composés phénoliques, sont aussi une source intéressante d'huile allant de 20 à 40% en poids qui ont des utilisation thérapeutique bien déterminées, les graines ont été utilisées commercialement pour la production d'huile et de farine qui sont en outre utilisées pour la préparation de savons, d'huiles comestibles et biodiesel (Rosa *et al.*, 2019).

Tableau 3: Composition (%poids sec) des sous- produits (Panwar *et al.*, 2021).

Sous-produits d'agrumes	Cendre	Protéine	Graisse	Sucre	Pectine	Lignine	Cellulose	Hémicellulose
Ecorce de <i>C. sinensis</i>	2.60	9.10	4.00	9.60	23.02	7.52	37.10	11.04
<i>C. limon</i> pulp	2.54	0.72	4.00	9.01	22.53	7.55	36.23	11.05
Les sous-produits de <i>C. reticulata</i> ^a	3.23	5.78	—	31.58	22.60	0.56	10.10	4.28
Les sous-produits d'agrumes ^b	3.73	6.07	3.78	22.9	25.00	2.19	22.00	11.09
Ecorce de <i>C. unshiu</i>								
Les sous-produits d'agrumes ^b	3.30	-	-	-	34.00	4.30	25.10	10.20
	4.00	-	-	33.10	15.30	1.95	8.82	7.96

^a: un mélange d'écorce et de pulpe. ^b: mélange de peaux, graines et feuilles de *C. sinensis* et *C. paradisi* après extraction du jus.

11. Utilisation thérapeutique

Citrus est l'une des plus populaires cultures fruitières mondiales, contient des composés phytochimiques actifs qui peuvent protéger la santé. En plus de cela, il fournit une quantité suffisante de vitamine C, acide folique, potassium et pectine, de minéraux, de fibres alimentaires, teneur en huiles essentielles et en caroténoïdes et aussi les flavonoïdes qui présentent une large gamme de propriétés dues à leur profil phénolique et leurs propriétés antioxydantes. Parmi les utilisations des agrumes comme remèdes thérapeutiques peuvent être citées: oranges pour guérir le scorbut orange, jus de citron vert et de citron comme remèdes pour la prévention des reins, flavonoïdes d'agrumes aussi efficaces *in vivo* agents capables de moduler le métabolisme lipidique hépatique et plusieurs autres (Rafiq *et al.*, 2009).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1 Matériels

1.1 Matériel non biologique

Le matériel utilisé au laboratoire «appareillage, verrerie et réactifs » est énuméré en Annexe I.

1.2 Matériel biologique

1.2.1 Matériel végétal

Les deux espèces choisies pour notre étude sont *Citrus sinensis* (orange) et *Citrus reticulata* (mandarine). La récolte a été faite d'une manière aléatoire en fonction de la période de maturation de chaque variété au niveau de la wilaya de M'sila, durant la période allant du mois de Novembre au mois de Mars 2021. Chaque échantillon, a été choisi sur la base de critères établi; les fruits sélectionnés sont mûrs et sains. Les parties végétales choisies pour réaliser cette étude sont :

- Les graines de *Citrus reticulata* (figure 11a), qui ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré puis stockées à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à leur utilisation.
- Les écorces de *Citrus sinensis* (figure 11b) à l'état frais.



Figure 11: graines de *Citrus reticulata* (a) ; écorce de *Citrus sinensis* (b)

1.3 Matériel microbiologique

Les souches microbiennes (Tableau 4) ayant fait l'objet de cette étude ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie au sein duquel nous avons réalisé cette partie de notre travail, à savoir le test antibactérien. Les souches bactériennes et une levure sont des souches de références, alors que les moisissures sont identifiées et stockées par Dr HENDEL, et sont connues par leur pathogénicité et leur fréquence élevée de responsabilité dans la contamination des denrées alimentaires.

Tableau 4: Bactéries, levures et moisissures utilisées pour l'activité antimicrobienne

	Microorganismes	Référence	Gram
Bactéries	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC35659	–
	<i>Salmonella enterica</i>	ATCC13311	–
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603	–
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	–
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC2592	–
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC9372	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	+
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	
Moisissures	<i>Penicillium expansum</i>		
	<i>Aspergillus flavus</i>		
	<i>Aspergillus niger</i>		
	<i>Alternaria alternata</i>		

ATCC: American type culture collection

2 Méthodes

2.1 Objectif et méthodologie

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'évaluer *in vitro* deux activités biologiques dont la capacité antioxydante et antimicrobienne des graines de mandarine (*Citrus reticulata*) ainsi que l'activité antimicrobienne d'huile essentielle extraite d'écorce d'orange (*Citrus sinensis*) et par la contribution à une meilleure connaissance de la composition chimique de quelques substances bioactives des parties étudiées.

Notre démarche expérimentale est résumée par le schéma suivant (Figure 12):

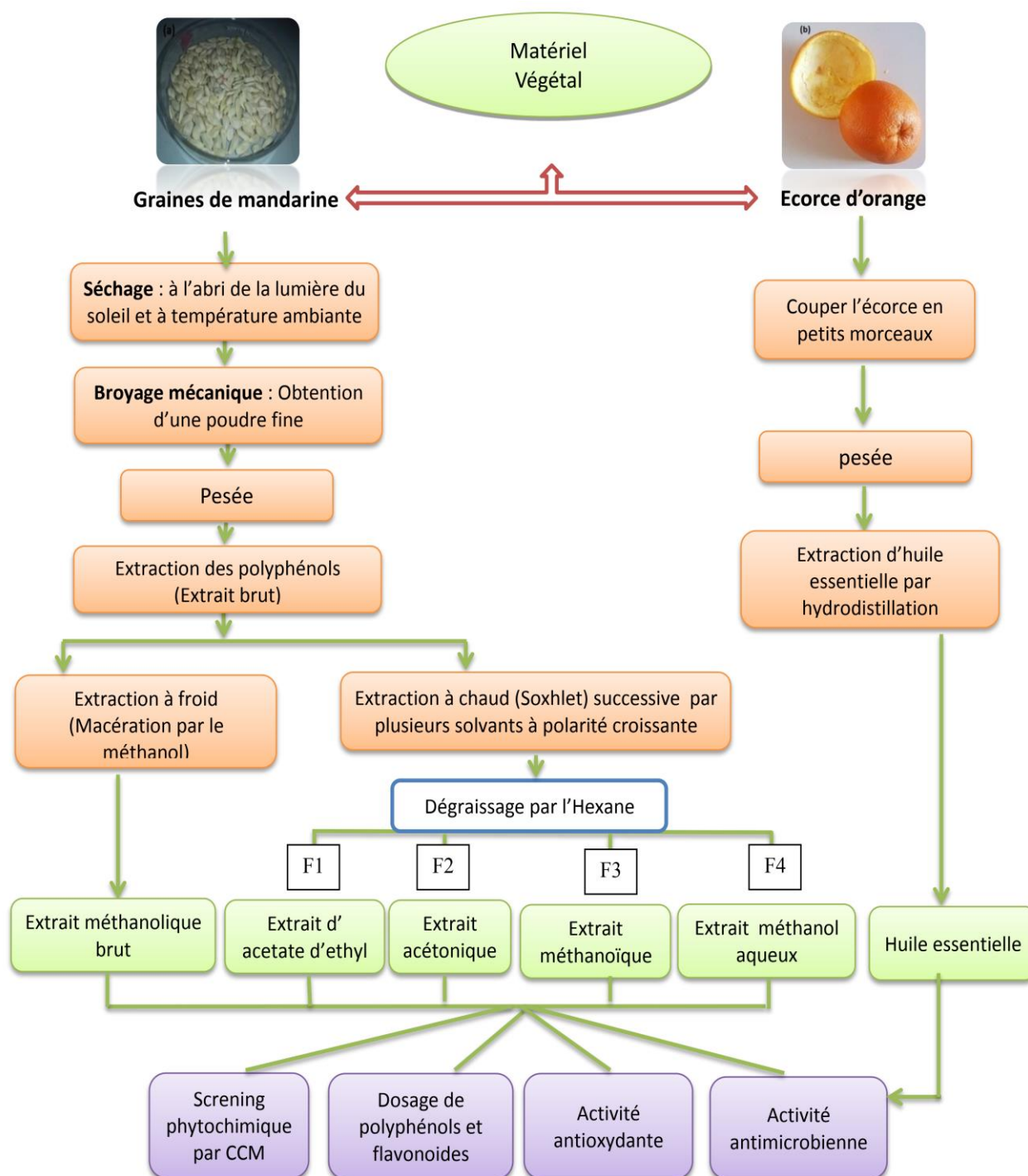


Figure 12: Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie dans cette étude ; F : fraction

3 Extraction de polyphénols des graines de mandarine

3.1 Extraction au Soxhlet (Extraction à chaud)

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Les extractions au Soxhlet ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité croissante. Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale.

Cent g (100g) de graines de mandarines sont broyées puis ont été successivement extraites à l'aide d'un extracteur de type Soxhlet (Figure13a) avec respectivement 1000 ml d'hexane, d'acétate d'éthyle (AcOEt), d'acétone, de méthanol (MeOH) et de MeOH: eau (80:20) pendant 8h chacun séparément.

L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté. Chaque solvant est évaporé dans un évaporateur rotatif sous pression réduite à 45°C. Tous les extraits ont été séchés séparément à 40°C dans une étuve. Enfin les quatre extraits secs ont été récupérés, pesés et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation (Jayaprakasha *et al.*, 2008).

Les rendements d'extraits sont exprimés en pourcentage par rapport au poids sec de la plante et est calculé par la formule (01) (Muniyandi *et al.*, 2019) ;

$$\text{Rendement Ext\%} = \text{MExt} / \text{MEch} \times 100 \dots \dots \dots (01)$$

Où

MExt: Masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

MEch: Masse de l'échantillon végétal en g.

NB : l'hexane est un solvant apolaire, utilisé pour délipider (dégraisser) les graines, une étape préliminaire pour l'élimination des lipides et des pigments.

3.2 Extraction méthanolique par macération (extraction à froid)

L'extrait méthanolique brut de notre échantillon est obtenu par macération (figure13b). Ce type d'extraction est un simple contact entre le support solide et le solvant. Nous avons opté pour le protocole décrit par Atere *et al.*(2018), en y apportant quelques modifications:

Cent g (100g) de graines broyées sont ajoutés dans un erlenmeyer contenant 1000 ml de méthanol et le mélange a été maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante. Le mélange a été filtré à travers du papier Whatman n°3 et concentré sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis séché à 40°C dans une étuve. Enfin l'extrait sec a été récupéré, pesé et

conservé à 4°C jusqu'à son utilisation. Le rendement en extrait est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante et est calculé par la formule n° (01).

4 Extraction des huiles essentielles à partir de l'écorce d'orange

L'extraction des HE a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (figure12c) : 100 g de la partie externe de *Citrus sinensis* est immergée directement dans un ballon rempli avec 1l d'eau distillée, placé sur une source de chaleur. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3h. L'HE se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité et récupérée puis stockée à 4°C à l'obscurité jusqu'à son utilisation.

Le rendement en HE est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante est calculé par la formule (02) (Himed *et al.*, 2020);

$$\text{Rendement HE\%} = M'/M \times 100 \dots \dots \dots (02)$$

Où

M': Masse de l'HE obtenue en g.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en g.

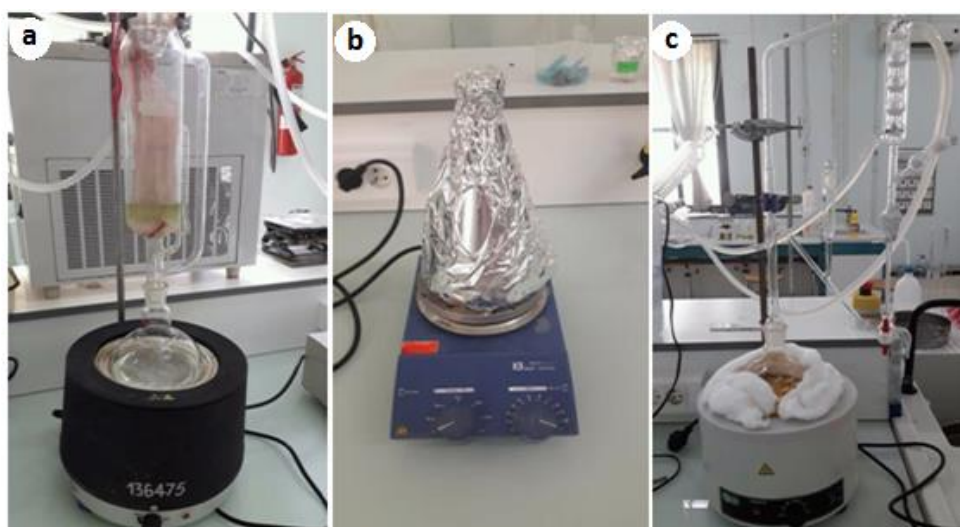


Figure 13: Dispositifs d'extraction : a) Soxhlet ,b) Macération ,c) Hydrodistillation.

5 Étude phytochimique de composés polyphénoliques

Cette étude permet une révélation ainsi qu'une mise en évidence (analyse qualitative) de quelques groupes phénoliques dans nos extraits et la détermination de leurs teneurs en polyphénols totaux (analyse quantitative) par spectrophotométrie.

5.1 Analyse qualitative

5.1.1 Screening phytochimique par réactions colorées

Les différentes analyses chimiques ont été effectuées par un criblage phytochimique. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Afin de mettre en évidence quelques substances bioactives des graines de *Citrus reticulata*, les tests sont effectués sur un infusé en mettant 10 g de poudre sèche des grains dans 100 ml d'eau bouillante pendant 15 min. Le filtrat est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

- **Mise en évidence de polyphénol**

Quelques gouttes d'HCl, sont ajoutées à 5 ml d'infusé, la réaction donne une coloration bleu en présence de polyphénols ([Rizk, 1982](#)).

- **Mise en évidence de flavonoïdes**

Cinquante mg (50 mg) de la poudre de graines ont été mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir le filtrat. Cinq ml (5 ml) de solution diluée d'ammoniaque a été ajoutée à 10 ml de filtrat suivi de quelques gouttes de H₂SO₄ concentré. La présence de flavonoïdes a été confirmée par une coloration jaune ([Saeed et al., 2012](#)).

- **Mise en évidence des tanins**

Quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ à 5% sont ajoutées à 5 ml d'infusé. La réaction donne une coloration bleue noire en présence de tanins ([Rizk, 1982](#)).

- **Mise en évidence des coumarines**

Un g (1g) de poudre végétale est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé du NaOH dilué, et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après l'examen sous UV ([Rizk, 1982](#)).

- **Mise en évidence des saponosides**

Quinze ml (15 ml) de l'infusé est ajouté à 2 ml d'eau distillée, après agitation pendant 2min, laissé reposer pendant 15 min. La formation d'une mousse persistante indique la présence des saponosides ([Rizk, 1982](#)).

5.1.2 Screening phytochimique par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les cinq extraits ont été analysés en utilisant la CCM.

- **Principe de la CCM**

Il repose sur la séparation des substances chimiques par migration et adsorption sur un support ou phase stationnaire polaire, dans une phase mobile ou éluant, en fonction de leur nature, du pouvoir éluant de la phase mobile, du pouvoir adsorbant du support ([Jazy et al., 2018](#)).

- **Technique**

La phase stationnaire est une couche de gel de silice 60F 254 fixée sur une plaque en aluminium 20x20 cm. L'éluant ou système de migration est un mélange de solvants. Nous avons utilisé 6 systèmes de solvants pour les extraits organiques de nos échantillons à concentration 4mg/ml où se retrouvent les constituants apolaires, peu polaires et polaires (Tableau 5) afin de choisir le meilleur système de solvant pour la séparation des molécules en comparaison avec des étalons (quercétine, l'acide gallique).

La CCM a été observée sous UV à 254-366 nm et par après révélation par le réactif : la vanilline sulfurique (la préparation du réactif est décrite en Annexe III. Les valeurs des rapports frontaux (RF) des taches résultant de la séparation ont été calculées et comparées à celles des témoins, permettant ainsi l'identification des divers composés des extraits.

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Tableau 5: Systèmes solvants utilisés en CCM

Système solvant	Abréviation	Proportion (v/v)
hexane- acétate d'éthyle	Hex/ AcOEt	(5 : 1)
metanol- acétate d'éthyl	MeOH /AcOEt	(8 : 2), (6 : 4), (4 : 6), (2 : 8)
chloroforme- méthanol	CHCl ₃ /MeOH	(10 : 2)

5.1.3 Identification des composées phénoliques

L'examen des polyphénols sous UV est le plus utilisé pour l'identification et la détermination des différents types de polyphénols. Tous les polyphénols apparaissent en UV sous forme de spots colorés, cela permet de donner des renseignements pour déterminer la structure de l'échantillon (Shahidi and Wanasundara, 1992). Le tableau 6 résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau 6: composés phénoliques identifiés par CCM (Markham, 1982).

Couleur sous UV	Composé probable
Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
Rose	Anthocyanidine 3,5 di glucoside
Orange	Anthocyanidine3 glucoside
Orange pale	Anthocyanidine3glucoside
Jaune	Flavonols
Jaune pale	Flavonols
Vert	Rutine
Bleu sombre	Flavonols,flavonone,aurones
Bleu vif	Hydroquinones
Bleu pale	Acide phénols
Mauve	Flavonols,flavonone,isoflavonesflavanone,
Violet	Flavonols,flavonone,isoflavones
Pourpre sombre	Flavones,chalcones

5.2 Analyse quantitative

5.2.1 Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée spectrophotométriquement par la méthode de Folin-Ciocalteu (Yakhlaoui *et al.*, 2011). Ce dosage est fondé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides d'où la formation d'un complexe bleu (Yakhlaoui *et al.*, 2011).

Selon le protocole décrit par (Bougandoura *et al.*, 2013). Une quantité de 200µl de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0.8ml de carbonate de sodium à 7.5% (Na_2CO_3). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les concentrations des polyphénols ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage linéaire établie avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g ES)

5.2.2 Dosage des flavonoïdes

Le contenu total en flavonoïdes a été déterminé en utilisant la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium décrite par (Bouyahya *et al.*, 2017) avec quelques modifications. En bref, 1 ml d'extrait (1 mg/ml dans le méthanol) ou la solution standard de quercétine (20, 40, 60, 80 et 100 mg/l) sont mélangés avec 0.6 ml d' AlCl_3 (2%) dans le méthanol. Après 40 minutes d'incubation à température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), l'absorbance est mesurée à 430nm. Les concentrations en flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g ES).

6 Evaluation de l'activité antioxydante

6.1 Le test de piégeage du radical DPPH

La capacité de piégeage des radicaux de l'extrait a été déterminée en utilisant le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Le test de DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire des différents extraits, en fonction du temps, du radical DPPH par spectrophotométrie à 517 nm. Le DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violette qui se réduit en 2,2 diphényle-1-picryl hydrazine (DPPH), faiblement coloré en jaune par captation d'un hydrogène de l'antioxydant (Figure 13). Le changement de la coloration est proportionnel à

l'activité antioxydante ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (Moon and Shibamoto, 2009).

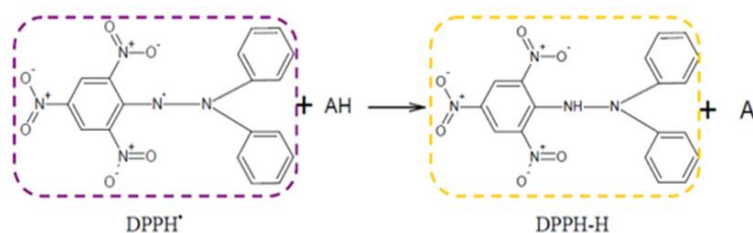


Figure 14: Réduction du radical DPPH.

Selon Atere *et al.* (2018), en y apportant quelques modifications. À 0.5 ml de différentes concentrations de l'extrait dans un tube à essai a été ajouté 1.45 ml de DPPH 0,004% préparé dans du méthanol. Le mélange a été mélangé et incubé dans l'obscurité pendant 30 min, puis l'absorbance a été lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un contrôle et un blanc contenant de méthanol pure. Un standard de référence, Butylhydroxytoluène (BHT), est également été analysé en respectant la même procédure. Le pourcentage d'inhibition a été calculé par la formule (03) comme suit:

$$I(\%) = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100 \dots \dots \dots (03)$$

Où **I(%)** est le pourcentage d'inhibition; **A_c** est l'absorbance du contrôle; et **A_t** est l'absorbance de l'échantillon. La concentration de l'échantillon provoquant 50% d'inhibition (IC₅₀) est calculée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait.

7 Evaluation de l'activité antimicrobienne

La recherche de l'activité antimicrobienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis aux extraits de graines de mandarine et à l'HE de l'écorce d'orange. Dans ce test, une seule méthode a été effectuée : Méthode des puits de diffusion. Cette technique est utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien ; elle est aussi appelée la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs. Des boîtes de Pétri contenant du milieu Sabouraud (pour les levures) ou de Mueller-Hinton Agar (MHA) (pour les bactéries) sont ensemencées aseptiquement par une suspension approximativement de l'ordre de 10⁷ cellules/ml qui provient d'une culture jeune de levures ou de bactéries. L'ensemencement se fait par écouvillonnage.

7.1 Préparation de l'inoculum

7.1.1 Bactéries

Les bactéries à tester sont des souches déjà identifiées et référencées (Tableau4). Elles ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures, puis ensemencées en strie sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) favorable à leur croissance pendant 24 h à 37°C, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et de colonies isolées. A partir de ces boîtes et à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 9 ml d'eau physiologique stérile (Mohammedi, 2006). Après agitation, l'inoculum a été ajusté à une turbidité standard de 0.5 McFarland. La concentration finale de l'inoculum est approximativement de l'ordre de 10^7 - 10^8 UFC/ml. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum (Khibch *et al.*, 2018).

7.1.2 Moisissures

Les souches (tableau4) conservées dans le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) incliné à 4°C, sont ensemencées sur le milieu PDA coulé en boîtes de Pétri et incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 7 jours.

7.2 Activités antibactérienne

La gélose MHA coulée et solidifiée dans les boîtes de Pétri a été creusée à l'aide d'un emporte-pièce pour faire des puits de 7 mm (à trois points équidistants du centre et des bords de la boîte). Les puits ainsi formés sont remplis d'une part avec 30 μl de la solution préparée de chaque extrait dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'autre part de 30 μl d'HE pure, pour réaliser des concentrations finales de 300, 600 et 900 mg/ml. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque extrait (03 puits remplis du même extrait et de la même concentration par boîte). Les puits du contrôle négatif sont remplis de 30 μl de solvant DMSO. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 30°C pendant 48 h pour les levures, et à 37°C pendant 24 h pour les bactéries. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (Aboul and Coll, 1996).

NB : une pré-incubation de 2 heures à 4°C de toutes les boîtes contenant les extraits à tester afin que ces derniers puissent diffuser dans le milieu.

7.3 Activités antifongique

Par la même méthode utilisée lors de l'activité antibactérienne (la méthode de diffusion de puits), on a testé les effets de différents extraits sur les moisissures ; avec un emporte-pièce des puits de 7 mm sont creusés dans la gélose PDA coulée dans les boîtes de Pétri (à trois points

équidistants du centre et des bords de la boîte), ces puits ainsi formés sont remplis de 30µl de la solution préparée de chaque extrait dissous dans du DMSO, pour réaliser une concentration finale de 300mg/ml. Un disque de culture fongique (âgée de 07 jours) a été découpé aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce de 7mm puis déposé au centre des boîtes. L'extrait a été remplacé par le DMSO dans les témoins. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 7 jours.

La lecture des résultats a été faite après 5 à 7 jours d'incubation à 25 °C par mesure des diamètres de la colonie en croissance et le taux d'inhibition est mesuré selon la formule suivante (04) (Mohana *et al.*, 2020) ;

$$I\% = [(Dc-Dt)/Dc] \times 100 \dots\dots\dots(04)$$

Où

I% : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

Dc : Diamètre de la colonie fongique du témoin (mm)

Dt : Diamètre de la colonie fongique traitée par l'extrait (mm)

8 Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triple et sont exprimées en tant que moyenne $\pm$ d'écart-type de trois analyses (moyenne $\pm$ écart-type). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant la variance à sens unique (ANOVA). Lorsque $p < 0,05$, on considère que la variance est statistiquement significative.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement en extraits

La couleur, l'aspect et le rendement de chaque extrait de *C. reticulata* par rapport au poids de la matière sèche ainsi que les résultats de rendement d'HE de *C. sinensis* sont représentés dans le Tableau 7 ci-dessous et la Figure 17.

Tableau 7: rendements en % des extraits phénoliques et d'HE de citruses.

	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Macération	MeOH brut	Pâteux	Vert foncé	5.3
Soxhlet	AcOEt	Pâteux	Brun noirâtre	1.77
	Acétone	Pâteux	Marron claire	1.17
	MeOH	Pâteux	Marron claire	4.61
	MeOHaq	Poudreux	Marron claire	2
	HE	Liquide, mobile, Limpide	Jaune pâle	0.6

AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; MeOHaq : méthanol aqueux ; MeOH brute : méthanol brute ; HE : huile essentielle.

D'après les résultats obtenus (Tableau 7), l'extrait méthanolique brut représente le rendement le plus élevé de 5.3%, suivi par le méthanol de 4.61% et le méthanol aqueux de 2% puis par l'acétate d'éthyle et l'acétone soit des moyennes proches de 1.77% et 1.17% respectivement.

Les variations du rendement en composés phénoliques entre les extraits peuvent être associées avec la polarité, la solubilité, ainsi que certains paramètres d'extraction comme la nature et la concentration du solvant, la température et la durée d'extraction (Safdar *et al.*, 2017). Aussi, la période de récolte à une influence sur le rendement d'extraction (Telli *et al.*, 2010); (Kelen and Tepe, 2008), et selon Lahlou (2004), le climat, la géographie, la partie de la plante utilisée, la génétique et l'âge de la plante, le degré de fraîcheur etc., peuvent aussi influencer l'efficacité ainsi que le rendement d'extraction des polyphénols.

Dans la littérature, le solvant AcOEt responsable pour l'extraction de limonoïdes polaires et des aglycones et glucosides flavonoïdes. L'acétone, MeOH et MeOH:eau (80:20) pour l'extraction de composés polaires et polaires moyens comme les aglycones et les glucosides, flavonoïdes, les limonoïdes, acide ascorbique et sucres en fonction de leur polarité (Jayaprakasha *et al.*, 2008).

Le rendement moyen en HE a été exprimé en millilitre par rapport à 100g de la partie externe (écorce) de *C. sinensis*. Ce taux d'environ 0.6% est proche à celui trouvé par Djenane (2015), qui a rapporté un rendement allant de 0.58%, et supérieur à celui de Kamal *et al.* (2013) avec 0.24%. Alors que Akono *et al.* (2016), ont trouvé une valeur de 0.72%. Hosni *et al.* (2010) ont rapporté un rendement varié de 1.49% à 4.62% pour les écorces séchées de différentes variétés (cultivars) de *Citrus sinensis*. D'après leurs résultats, on peut expliquer que la procédure de séchage des

déchets d'agrumes (principalement les pelures) évite non seulement le développement de l'altération microbienne et fongique, et par conséquent, il permet l'allongement de la durée de conservation du déchet, mais aussi améliore la teneur en huile.

En général, la teneur en huile des écorces d'agrumes semble quelque peu influencée par le génotype, l'origine, la saison, les facteurs environnementaux et la méthode d'analyse (Hosni *et al.*, 2010 ; Laurain and Marinier, 2020).

2. Etude phytochimique qualitative

2.1 Screening phytochimique par réactions colorées

L'infusé de grain de *C. reticulata* est soumis à une analyse phytochimique qui permet de déterminer qualitativement les composés biologiquement actifs (métabolites secondaires) qui confèrent la saveur, la couleur, et d'autres caractéristiques à la plante «polyphénols, flavonoïdes, tannins, coumarines, saponosides». La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués, et selon la disponibilité de réaliser ces tests. Les résultats des tests phytochimiques de l'extrait méthanolique brut sont repris dans le tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8: Les résultats des tests phytochimiques pour l'extrait méthanolique brut.

Métabolites	Extrait méthanolique brut				
	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins	Coumarines	Saponosides
Résultat	++	+	+	+	+

(+) présence de métabolite secondaire testé

Le test de mise en évidence des polyphénols a présenté une coloration bleu noirâtre intense montrant la richesse des graines de mandarine en polyphénols. De sa part, l'apparition de la coloration rouge du test des flavonoïdes indique leur présence. Le test des tanins s'est révélé positif par l'apparition d'une coloration bleu noirâtre alors que la formation de mousse après l'agitation et sa persistance après 15 min de repos avec une hauteur supérieure à 3 cm montre la richesse relative des graines en saponines. Finalement, la présence de coumarine est indiquée par l'apparition des taches jaunes fluorescentes sous UV à 366 nm.

Ces tests confirment la richesse de la plante *C. reticulata* en métabolites secondaires. Ces résultats sont comparables avec d'autres qui indiquent que ces composés sont connus pour être biologiquement actifs «polyphénols, flavonoïdes, tannins, coumarines, saponosides » (Panwar *et al.*, 2021).

2.2 Screening phytochimique par CCM

La CCM est une méthode de séparation rapide et efficace (Jazy *et al.*, 2018). Les extraits ont été séparés en utilisant plusieurs systèmes de solvants spécifiques. Les chromatogrammes résultants ont comporté une série de spots. L'identification des composés a été basée sur Markham par l'observation des couleurs sous UV à 366 nm d'une part, et par la comparaison des R_F des échantillons à ceux des étalons utilisés d'autre part (Annexe III). L'ensemble des résultats de cette analyse sont rapportés dans le Tableau 9.

Après avoir testé 6 systèmes de solvants afin de trouver la phase assurant la meilleure séparation des composants, on est arrivé à choisir le système chloroforme-méthanol (10 : 2), dont une solubilité différentielle des composés phénoliques dans ce système. Les résultats des distances parcourues par les différents composés sont présentés dans le Tableau 9 ci-dessus.

Tableau 9: Résultat de la CCM des cinq extraits étudiés dans le système Chloroforme/méthanol (10 : 2).

Extrait	Acétate d'éthyle	Acétone	Méthanol	Méthanol aqueux	Méthanol macération		
Nombre de taches	7	8	6	4	8	Ac gallique	Quercétine
R_f	0.06	0.06	0.06	0.5	0.06	0.4	0.2
	0.15	0.09	0.09	0.12	0.09		
	0.21	0.12	0.21	0.15	0.15		
	0.31	0.21	0.34	0.4	0.21		
	0.4	0.34	0.4		0.34		
	0.46	0.4	0.59		0.4		
	0.59	0.46			0.5		
		0.59			0.59		

- **Observation sous UV à 254 nm**

Le système chloroforme-méthanol (10 : 2), a permis de séparer 33 taches (14 sombres et 19 moins claires) de taille moyenne et de forme plus ou moins circulaire

- **Observation sous UV à 366 nm**

Le système choisi a montré la présence de différentes classes de composés phénoliques dans les extraits testés ce qui explique l'apparition des taches de différentes couleurs ; des taches bleue, verte, rose, violette et rouge qui ont le même R_f dans les cinq extraits et d'autres qui se diffèrent par leurs R_f . Ce qui explique que les cinq extraits regroupent certains composés qui sont similaires alors que d'autres sont différents .

Le système de solvants a séparé principalement des acides phénoliques, flavonols, flavones, aurones, isoflavanones, rutine et des anthocyanidines 3 glycosides qui apparaissent selon le tableau de Markham respectivement en bleu, mauve, vert et rouge (Figure 18a) en plus de la couleur rose et marron après révélation par la vanilline sulfurique (Figure 18d) qui explique la présence d'anthocyanidines 3,5 glycoside et de pigments ce qui confirme que le méthanol et l'acétate d'éthyle sont les responsables de leurs éluions. Le système a montré la présence de l'acide gallique dans tous les extraits avec un R_f de 0.4.

Ce système a séparé les composés de l'extrait aqueux avec une intensité de couleur beaucoup moins faible que les autres extraits, cela montre que ce dernier est moins riche en composés phénoliques en raison d'épuisement de ces composés lors de fractionnement par les différents solvants.

A travers ces résultats on peut constater que nos extraits contiennent différentes classes phénoliques plus ou moins élevées d'un extrait à l'autre (selon l'ordre de fractionnement), mais ça reste insuffisant sur le plan quantitatif, ce qui nous a conduit à utiliser des méthodes de dosage qui permettent d'éclairer d'avantage l'image sur la composition de nos extraits.

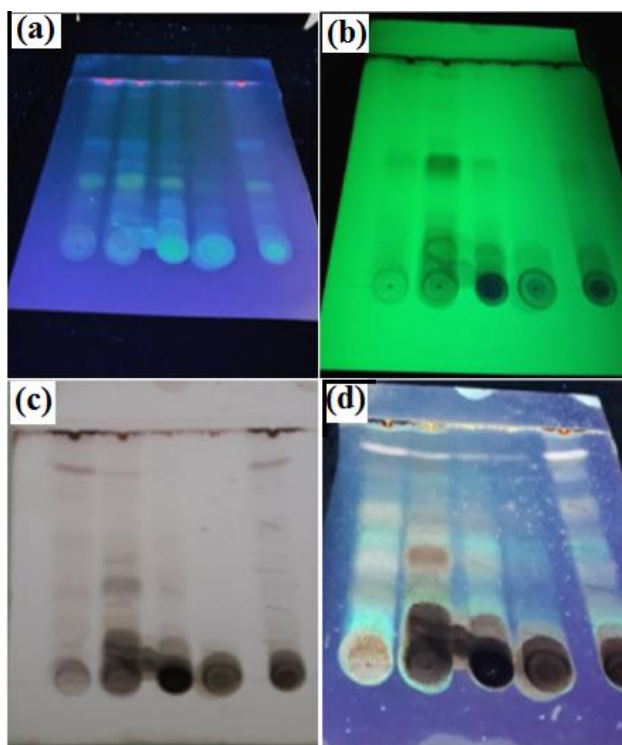


Figure 15: Observation sous des CCM (sys solvant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; (10 : 2)); UV λ 366 nm (a) ; UV λ 254nm (b); visible (c) ; et UV λ 366 nm après révélation par la vanilline sulfurique (d).

3. Contenus en polyphénols totaux et en flavonoïdes

Les composés phénoliques sont les produits du métabolisme secondaire des végétaux. Ils prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018). C'est la raison pour laquelle, le dosage des phénols totaux et de flavonoïdes des graines de *C. reticulata* a été effectué dans cette étude.

Tout le contenu phénolique dans les extraits examinés de fruit utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est exprimé en termes d'équivalent d'acide gallique (l'équation standard de courbe : $\text{Abs} = 0.0047x_{[\text{AG}]} + 0.0160$; $R^2 = 0.999$) (Annexe IV). Les valeurs obtenues pour la concentration des phénols totaux sont exprimées en mg EAG/g d'extrait (Tableau10). Tout le contenu phénolique dans les extraits examinés s'est étendu de 177.660 ± 3.62 à 91.702 ± 1.37 mg EAG/g d'extrait. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait

d'AcOEt et d'acétone avec des valeurs respectivement de 177.660 ± 3.62 et 175.106 ± 5.20 mg EAG/g d'extrait. Tout le contenu phénolique dans les extraits dépend du type d'extrait, c'est-à-dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction (Stankovic *et al.*, 2011). Moulhi *et al.*(2012) ont trouvé des teneurs en phénols totaux de l'extrait méthanolique de 2.11 et 1.35 mg EAG/g de matière sèche pour les graines de *C. reticulata* Blanco (mandarine) et *C. aurantium* L (orange) respectivement. Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux que nous avons trouvés. Dans une autre étude portant sur les écorces de *C. paradise* Macf (Rio red) et avec le même protocole d'extraction que nous avons adopté, les auteurs rapportent les teneurs de 2.91; 0.2; 0.54 et 0.86mg EAC (catéchine)/g de matière sèche pour respectivement les extrait d'acétate d'éthyle, d'acétone, de méthanol, méthanol aqueux ; et les teneurs de 2.02; 1,62; 1.24 et 1.64mg EAC (catéchine)/g de matière sèche pour *C. aurantium* L (orange aigre). Ces valeurs sont inférieures aux nôtres ce qui est dû peut-être aux facteurs génétiques, conditions environnementales et les stades de croissance ou de maturation ainsi que le standard utilisé peut faire la différence entre les résultats (Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018).

La concentration en flavonoïdes dans divers extraits de *C. reticulata* est déterminée suivant la méthode spectrophotométrique avec du trichlorure d'aluminium. Le contenu en flavonoïdes a été exprimé en termes de mg EQ/g d'extrait ; l'équation standard de courbe : ($\text{Abs} = 0.0226x_{[\text{Q}]} - 0.0102$; $R^2 = 0.999$) (Annexe 4). La concentration des flavonoïdes dans les extraits s'est échelonnée de 64.687 ± 2.16 à 35.220 ± 0.657 mg EQ/g d'extrait (Tableau10). Les résultats montrent que l'extrait d'AcOEt et d'acétone obtenus par Soxhlet et celui de MeOH brut obtenu

par macération, sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de 64.687 ± 2.16 ; 45.574 ± 1.12 et 35.220 ± 0.657 mg EQ/g d'extrait respectivement. Par la suite vient l'extrait méthanolique (19.777 ± 0.15 mg EQ/mg d'extrait), suivi par l'extrait MeOHaq (18.848 ± 0.051 mg EQ/mg d'extrait).

Tableau 10: Contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits organiques de *C. reticulata*.

Extrait	Polyphénol totaux (mg EAG/g d'extrait)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait)
AcOEt	177.660 ± 3.62	64.687 ± 2.16
Acétone	175.106 ± 5.20	45.574 ± 1.12
MeOH	104.752 ± 4.37	19.777 ± 0.15
MeOHaq	45.248 ± 3.72	18.848 ± 0.051
MeOH brute	91.702 ± 1.37	35.220 ± 0.657

La concentration en flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation d'extrait (Stankovic *et al.*, 2011). Le type de standard utilisé peut également changer les résultats.

4. Activité antioxydante

4.1 Test au DPPH

L'activité antioxydante de nos extraits de *C. reticulata* a été évaluée par la méthode de DPPH qui repose sur la décoloration; mesurable par spectrophotométrie; indiquant la transformation de DPPH stable de couleur violette en sa forme réduite de DPPH-H de couleur jaune (Kamal *et al.*, 2013). L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC_{50} et les résultats sont illustrés dans la Figure 17. Selon Kadri *et al.* (2011), plus la valeur de l' IC_{50} est faible et plus l'activité antioxydante est élevée.

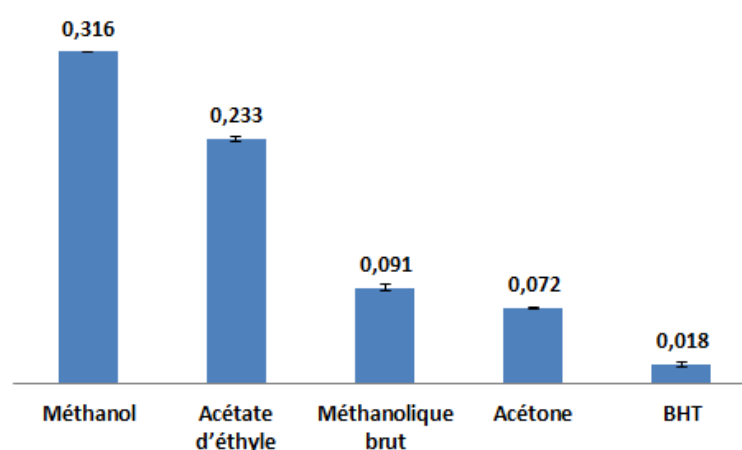


Figure 16: Valeurs IC_{50} des différents extraits de *C. reticulata* en mg/ml.

D'après les résultats de de la Figure 18, l'ordre des extraits et du standard ayant une activité de piégeage du radical DPPH du plus faible au plus fort est le suivant BHT>Acétone>Méthanolique brut>Acétate d'éthyle>Méthanol. La richesse en phénols totaux notamment les tanins et les flavonoïdes peut expliquer la forte activité antioxydante de certains de nos extraits (Maidi, 2014). Par rapport au BHT, les extraits des graines de *C. reticulata* sont moyennement efficaces alors qu'ils ont donnés de meilleures concentrations inhibitrices par rapport à celles de rapportées par Moulehi *et al.* (2012) ($210 \pm 37 \mu\text{g/ml}$) et à celles de Ghasmi *et al.* (2009) de l'écorce de *C. reticulata* ($600 \mu\text{g/ml}$). Cette différence pourrait s'expliquée par la différence entre les méthodes d'extractions et de la différence entre l'origine de la plante et de la partie utilisée.

A partir de ces résultats et d'après la première partie de notre travail (étude phytochimique: CCM, dosage) on peut déduire qu'il y a une corrélation significative entre la présence de polyphénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits. Le pouvoir antioxydant enregistré par des substances composant nos différents extraits de graines de mandarine, permet de déduire que ces substances peuvent être considérées comme des agents antioxydants qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits organiques des graines de *C. reticulata* et celle d'HE de l'écorce de *C. sinensis* a été évaluée contre huit souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif), une levure et quatre moisissures de contamination alimentaire par la méthode de puits de diffusion. La sensibilité des microorganismes aux extraits est déterminée selon le diamètre de la zone d'inhibition sur le milieu gélosé. Selon Bouyahya *et al.* (2017), l'activité antimicrobienne peut être divisée en trois niveaux : faible activité (zone d'inhibition $\leq 12 \text{ mm}$) ; activité moyenne ($12 \text{ mm} < \text{zone d'inhibition} < 20 \text{ mm}$) ; et forte activité (zone d'inhibition $\geq 20 \text{ mm}$)

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits organiques des graines de *C. reticulata* obtenus par soxlhet ainsi que l'HE de *C. sinensis* sont groupés dans le Tableau 12. Aucun extrait à 300, 600 et 900mg/ml n'a eu d'effet contre les bactéries, la levure et les champignons examinés, sauf que l'extrait méthanolique brut des graines de *C. reticulata* obtenus par macération est moyennement actif à 900mg/ml vis-à-vis *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* avec des zones d'inhibition respectivement de 15.33 mm et 14.00mm (Figure 19). Alors qu'il est faiblement actif a la même concentration vis-à-vis *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* avec des zones d'inhibition de 10.66 mm et 9.33 mm respectivement (Figure 19). Cette différence entre les extraits peut être expliquée par le pourcentage élevé de

flavonoïdes (flavones polyméthoxylées) dans l'extrait méthanolique brut qui présente selon Tawfik *et al.* (2010) ; Cheikna *et al.* (2011), une puissante activité antibactérienne ce qui est probablement dû à leur capacité de faire un complexe avec les parois cellulaires bactériennes et la rupture de leurs membranes. Cependant, il a été indiqué que l'interaction de plusieurs composés pourrait inhiber la croissance des microorganismes (Jayaprakasha *et al.*, 2000).

Tableau 11: Zones d'inhibition des extraits organiques et de HE d'agrumes vis-à-vis des souches microbiennes.

Microorganismes	Extraits <i>C. reticulata</i> (mg/ml)						HE <i>C. sinensis</i> (µl)
	AcOEt ; Acétone MeOH ;MeOHaq			MeOH brut			
	300	600	900	300	600	900	30
<i>P. mirabilis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	15.33 ± 1.05	NA
<i>S. enterica</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>K. pneumoniae</i>	NA	NA	NA	NA	NA	14 ± 2.00	NA
<i>B. subtilis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. aureus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>E.coli</i>	NA	NA	NA	NA	NA	10.66 ± 1.51	NA
<i>S. epidermidis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	9.33 ± 1.33	NA
<i>Penicillium expansum</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Aspergillus flavus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Aspergillus niger</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Altarnaria alternata</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA : non actif

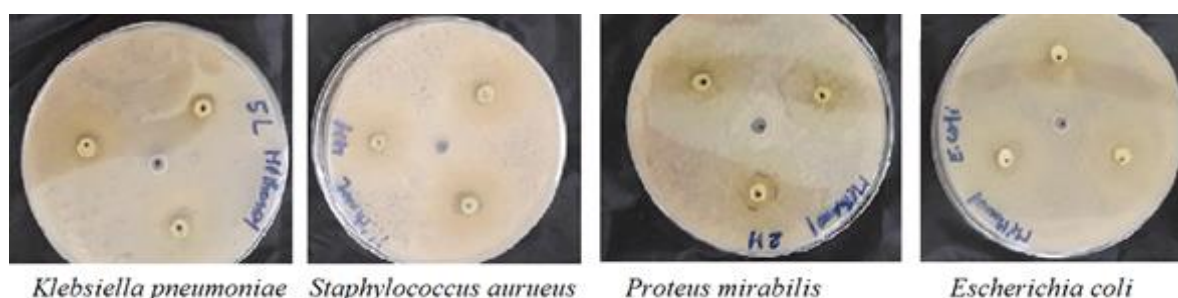


Figure 17: Activité antimicrobienne de l'extrait MeOH brut par la méthode des puits de diffusion.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Egbunu and Osuji (2016), qui ont rapporté que l'extrait aqueux des écorces d'orange et des graines, respectivement, a montré une activité contre *E. coli* avec une faible zone d'inhibition de (11.33 ± 1.52 ; 9.67 ± 1.15mm) et *S. aureus* (14.00 ± 1.00 ; 8.67 ± 1.15 mm). Alors que, l'activité de l'extrait éthanolique d'écorces d'orange contre *E. coli* est de (20.00 ± 1.73 mm) et pour *S. aureus* (19.00 ± 1.73mm) était respectivement plus élevée que celle des graines (12.33 ± 0.38 ; 13.33 ± 1.16mm). Les résultats ont indiqué que plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne comme: le type de microorganisme ciblé, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la

concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires (Ghedadba *et al.*, 2014).

Les fractions testées dans notre étude semblent avoir une activité antimicrobienne moins importante que celle démontré par Jayaprakasha *et al.* (2000). L'activité antimicrobienne de différentes fractions d'écorces de *C. reticulata* inhibe la croissance des bactéries gram-positives à des concentrations inférieures (pour *B. cereus* et *S. aureus* était observé à un taux de 300 mg/ml) à celles requises pour les bactéries gram-négatives. La fraction soluble d'éthanol était la plus active contre toutes les souches bactériennes alors que l'acétone est l'extrait le moins efficace de tous ses fractions. Dans la littérature, la résistance des bactéries gram-négatives est attribuée au caractère hydrophile de leur membrane qui bloque la pénétration des molécules hydrophobes telles que les polyphénols. La paroi bactérienne d'*E. coli* par exemple est très riche en lipopolysaccharides (LPS) qui empêchent les molécules hydrophobes de traverser la membrane (Bouyahya *et al.*, 2017).

Des travaux réalisés par Madhur *et al.* (2014) ont évalué l'activité antifongique de l'extrait d'écorce de *Citrus aurantium* et *C. sinensis*. Les extraits de peau ont inhibé la croissance mycélienne du champignon jusqu'à > 50%. En plus, des résultats obtenus par Okwu *et al.* (2007), ont constaté que l'extrait de peau de *C. sinensis* inhibait significativement la croissance de *Fusarium oxysporum* dans une plus grande mesure par rapport à l'extrait de feuille.

Dans une autre étude, Hernández-Cánovas *et al.* (2020) montre que l'extrait d'écorce de *Citrus* sp. présente des propriétés antifongiques pour *Candida metapsilose* à la sauce ranch sans modifier significativement les caractéristiques sensorielles ou physico-chimiques du produit. Leurs résultats ont suggéré que le mélange antimicrobien étudié, contenait des flavonoïdes dont les principaux étaient la naringénine, l'hespérétine, la tangeritine, la lutéoline, l'apigénine et le kaempférol à des concentrations comprises entre 0.7 et 3.2%.

Notre HE a montré une faible activité antimicrobienne ; cela est en désaccord avec les travaux de Kirbaşlar *et al.* (2009), qui ont évalué l'activité antibactérienne et antifongique de l'HE d'agrumes obtenu par pressage à froid. Il a été observé que l'HE de peau de *C. sinensis*, *C. aurantium* et *C. reticulata* présentait une inhibition plus ou moins similaire des bactéries gram-positives et gram-négatives et d'éventuel moisissures. Des travaux ont été réalisés par Thamer and Muhsen (2019) pour l'étude de l'effet des huiles essentielles extraites de la peau de *Citrus paradisi* et *C. sinensis* sur deux espèces de champignons: *Penicillium oxalicum* et *Fusarium oxysporum*. Leurs résultats ont montré que l'HE de *Citrus paradisi* inhibait la croissance radiale de *Penicillium oxalicum* et *Fusarium oxysporum* à une concentration de 4%. Néanmoins, l'HE de *Citrus sinensis* inhibe la croissance à une concentration de 5 et 4%, respectivement. Par conséquent, il existe une relation positive entre l'évaluation de la concentration et le pourcentage

d'inhibition de croissance radiale chez les champignons. [Conner and Beuchat. \(1984\)](#), ont suggéré que l'activité antimicrobienne est produite par les interactions provoquées par les HE dans les systèmes enzymatiques liés à la production d'énergie et à la synthèse de composants structuraux des cellules microbiennes, produisant ainsi un flux de protons vers l'extérieur de la cellule qui induit des changements dans les cellules et, finalement, leur mort.

Il convient de noter qu'il existe des variations considérables entre les activités antimicrobiennes de plusieurs espèces de plantes. Cependant, une comparaison de l'efficacité des HE à travers différentes publications est difficile. La composition chimique des HE varie en fonction des conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce. Cela signifie que les propriétés antimicrobiennes des HE peuvent changer car leur composition chimique et les proportions relatives des divers constituants sont influencées par le génotype, chimotype et la méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de disque de diffusion sur gélose ou par méthode de dilution); les résultats obtenus par chacune de ces méthodes peuvent être différents, en fonction du choix de l'organisme, de la croissance des microorganismes, de la période d'exposition du microorganisme à l'HE, et le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les HE. Ce sont tous des facteurs pouvant expliquer les résultats contradictoires de différentes études ([Djenane, 2015](#)).

Nos sous-produits d'agrumes étudiés, graines et écorce, respectivement de mandarine (*Citrus reticulata*), et d'orange douce (*Citrus sinensis*), semblent avoir une activité antimicrobienne faible en comparaison avec d'autres travaux. Ceci peut être expliqué par une différence liée à plusieurs paramètres soient géographiques, physicochimiques ou biologiques tels que : la différence du site de récolte y compris l'environnement de la plante, la lumière, les précipitations, la topographie, la saison, type de sols, période de récolte, le patrimoine génétique, la procédure d'extraction utilisée, la partie de la plante étudiée ou leurs produits phytochimiques. Selon [Casquete et al. \(2015\)](#), une explication biologique/physiologique plus détaillée pour la sensibilité ou la résistance aux extraits d'agrumes, ne peut pas être avancée pour le moment en raison du manque des analyses compositionnelles des différents extraits et des informations sur les interactions des membranes de cellules des différentes bactéries avec les composés dans des extraits d'agrumes.

CONCLUSION
ET
PRESCRIPTIVES



Conclusion

Actuellement, les populations s'orientent vers la médecine traditionnelle qui est basée sur l'utilisation des plantes médicinales. Ces plantes restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques ; pour cela elles deviennent le sujet de plusieurs recherches.

Dans le but de la valorisation d'une des plantes aromatiques médicinales de la famille des Rutacées, en l'occurrence *Citrus reticulata* et *Citrus sinensis*, qui est l'une des familles d'agrumes les plus importantes en Algérie. Nous avons effectué un travail permettant de contribuer à la mise en évidence de quelques activités biologiques de ce fruit à savoir, l'activité antioxydante et antimicrobienne des graines de mandarine (*Citrus reticulata*) avec un dosage de leurs composés polyphénoliques, ainsi que l'activité antimicrobienne d'HE d'écorce d'orange (*Citrus sinensis*).

L'extraction de différents composés bioactifs des graines est réalisée d'une part, par l'extracteur Soxhlet avec des solvants de polarité croissante et d'autre part par macération au méthanol. L'extraction de l'HE d'écorce d'orange a été effectuée par hydrodistillation.

Un criblage phytochimique qualitatif par réactions colorées, suivi d'une confirmation par CCM a été élaboré pour l'ensemble des extraits organiques qui ont montré la présence de différents composés phénoliques.

Quantitativement deux méthodes ont été utilisées pour la détermination des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux respectivement ; la première de Folin Ciocalteu a montré des quantités importantes de polyphénols, la deuxième d' AlCl_3 a montré que les graines contiennent des quantités moyennement importantes de flavonoïdes. Le pouvoir antioxydant des polyphénols et des flavonoïdes dans les différents extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats ont montré que tous les extraits sont efficaces et leurs efficacités sont dans l'ordre suivant Acétone > MeOH brut > AcOEt > MeOH > MeOHaq.

Les résultats du test antimicrobien *in vitro*; en utilisant la méthode des puits de diffusion vis-à-vis de huit bactéries à Gram⁻ et Gram⁺, une levure et quatre champignons; ont montré une grande résistance des souches testées aux extraits de graines de mandarine et à l'HE d'écorce d'orange, même testées à des concentrations élevées. L'MeOH brut exerce plus ou moins une activité antibactérienne à 900 mg/ml vis-à-vis de *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis*.

En fin, ces résultats ne représentent qu'une première étape dans la recherche sur les principes actifs des métabolites secondaires de parties de la plante étudiée. De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par une étude plus approfondie sur les graines de *Citrus reticulata*, et

l'essence d'écorce de *Citrus sinensis* afin d'isoler, de purifier et d'identifier précisément les principes actifs de ce fruit, en utilisant des méthodes plus précises telles que l'HPLC et RMN. Il serait également intéressant d'une part d'élargir le panel des tests d'activités antioxydantes (FRAP, ABTS, test β -carotène, etc.), et d'autre part de l'activité antimicrobienne en testant ces extraits sur d'autres souches bactériennes et fongiques et de définir le mécanisme d'action de ces substances végétales sur les microorganismes afin d'envisager leur application industrielle naturelle dans de nombreux secteurs comme l'agroalimentaire, la pharmacie, la cosmétique et les parfums.

REERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Aboul Ela, M. A., El-Shaer, N. S., &Ghanem, N. B. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 51(12), 993-994.
2. Accoceberry, I., & Noël, T. (2006). Antifungals cellular targets and mechanisms of resistance. *Thérapie*, 61(3), 195-199.
3. Ademosun, A. O., Oboh, G., Olasehinde, T. A., &Adeoyo, O. O. (2018). From folk medicine to functional food: a review on the bioactive components and pharmacological properties of citrus peels. *Oriental Pharmacy and ExperimentalMedicine*, 18(1), 9-20.
4. AGAGNA, Y. (2016). *Rôle d'Aphytismelinus (Hymenoptera, Aphelinidae) dans la régulation des niveaux d'infestation du Pou de Californie Aonidiellaaurantii (Homoptera, Diaspididae) sur citronnier à Rouiba* (Doctoral dissertation, ENSA).
5. Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valero, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227-249.
6. Akono, P. N., Mbida, J. A. M., Dongmo, P. M. J., Tonga, C., Tchamga, L. A. D., Mounbain, F., ... &Kekeunou, S. (2016). Chemical composition and insecticidal activity of essential oils of *Cinnamomumzeylanicum*, *Citrus grandis*, *Citrus medica* and *Citrus sinensis* leaves from Cameroon on *Anopheles gambiae* Giles, 1902. *J. Entomol. Zool. Stud*, 4(6), 17-23
7. Aouni, M., Pelen, F., &Soulimani, R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11(4), 225-236.
8. Atere, T. G., Akinloye, O. A., Ugbaja, R. N., Ojo, D. A., &Dealtry, G. (2018). In vitro antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costusafer* leaf. *Food Science and Human Wellness*, 7(4), 266-272.
9. Atolani, O., Adamu, N., Oguntoye, O. S., Zubair, M. F., Fabiyi, O. A., Oyegoke, R. A., ... &Olatunji, G. A. (2020). Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial potentials of the *Citrus sinensis* seed oil for sustainable cosmeceutical production. *Heliyon*, 6(2), e03399.
10. Atolani, O., Omere, J., Otuechere, C. A., &Adewuyi, A. (2012). Antioxidant and cytotoxicity effects of seed oils from edible fruits. *Journal of Acute Disease*, 1(2), 130-134.
11. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ...& Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
12. Bamba, B., Benie, C. K. D., Ouattara, A., Doukourou, D. N., Kamou, R. K., & Ouattara, K. (2021). Teneurs en phenols totaux, activités antioxydantes des macérés et décocté des feuilles de *Uvariachamae* P. Beauv.(Annonaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), 54-67.
13. Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
14. Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., &Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 3-44). WoodheadPublishing.
15. Bilal, G. M. (2016). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. *Faculte des sciences appliquees*.Lemaoui, C. E., Layaida, H., Badi, A., &Foudi, N. (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*, 19(1), 12-19
16. Bougandoura, N., &Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Saturejacalaminthassp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.
17. Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., &Dakka, N. (2018). Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*, 16(5), 254-267.
18. Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... &Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
19. Bovili, H. (1996). Orange: source of natural compounds. *Aromes Ingred. Addit*, 7, 41-42.
20. Casquete, R., Castro, S. M., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Saraiva, J. A., Córdoba, M. G., &Teixeira, P. (2015). Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science &Emerging Technologies*, 31, 37-44.

21. Chabrier, J. Y. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
22. Cheikna, Z., Savadogo, A., Somda, M. K., Koudou, J., & Traore, A. S. (2011). In vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* HB & K. and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. *International Journal of phytomedicine*, 3(2), 182.
23. Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissède, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
24. Conner, D. E., & Beuchat, L. R. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of food science*, 49(2), 429-434.
25. Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in Sardinia pilchardus. *Foods*, 4(2), 208-228.
26. Dupont, F., & Guignard, J. L. (2007). *Botanique: systématique moléculaire*. Elsevier masson.
27. Duval, M., & Cossart, P. (2019). Un nouveau mécanisme de résistance aux antibiotiques-Le recyclage des ribosomes. *médecine/sciences*, 35(8-9), 613-615.
28. Egbunu, A. C. C., & Osuji, C. A. (2016). Proximate compositions and antibacterial activity of Citrus sinensis (sweet orange) peel and seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, 1-7.
29. FAO, F. (2017). Citrus fruit-fresh and processed. statistical bulletin 2016.
30. Ghasemi, K., Ghasemi, Y., & Ebrahimzadeh, M. A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J PharmSci*, 22(3), 277-281.
31. Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15-24.
32. Grigoraş, C. G. (2012). *Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
33. Gueye, F. (2019). *Drépanocytose et polymorphismes génétiques: épidémiologie, prédiction de gravité et stress-oxydant* (Doctoral dissertation, Lyon).
34. Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C., Sousa, M. J., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 99-106.
35. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
36. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
37. Hendrix, C. M., & Redd, J. B. (1995). Chemistry and technology of citrus juices and by-products. In *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages* (pp. 53-87). Springer, Boston, MA.
38. Telli, A., Mahboub, N., Boudjeneh, S., Siboukeur, O. E. K., & Moulti-Mati, F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des sciences et technologie*, 2(2), 107-114.
39. Hennebel, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
40. Hernández-Cánovas, J. D. D., Guillén-López, I., Vizcaíno-Milla, P., Andreo-López, M. I., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., & Marín-Iniesta, F. (2020). Antimicrobial activity of Citrus spp. and *Anethum graveolens* components against *Candida metapsilosis* in ranch sauce. *Journal of food science and technology*, 57(7), 2713-2721.
41. Himed, L., Merniz, S., Benbraham, M., Boudjouada, E., & Barkat, M. (2020). PRESERVATION DU CONCENTRE DE TOMATE PAR UN AGENT ANTIFONGIQUE (HUILE ESSENTIELLE DU CITRON). *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition & Development*, 20(2).
42. Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., ...& Sebei, H. (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.
43. Hou, H. S., Bonku, E. M., Zhai, R., Zeng, R., Hou, Y. L., Yang, Z. H., & Quan, C. (2019). Extraction of essential oil from Citrus reticulata Blanco peel and its antibacterial activity against *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*). *Heliyon*, 5(12), e02947..
44. Jayaprakasha, G. K., Girenavar, B., & Patil, B. S. (2008). Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource technology*, 99(10), 4484-4494.

44. Jayaprakasha, G. K., Negi, P. S., Sikder, S., Mohanrao, L. J., & Sakariah, K. K. (2000). Antibacterial activity of Citrus reticulata peel extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(11-12), 1030-1034.
45. Jazy, M. A., Haïdara, M., & Sanogo, R. (2018). Chromatographie sur couche mince et activité antiradicalaire d'extraits de *Pupalia Lappacea* (L.) Juss. *Amaranthaceae*. *European Scientific Journal, ESJ*, 14(3), 140.
46. John, I., Muthukumar, K., & Arunagiri, A. (2017). A review on the potential of citrus waste for D-Limonene, pectin, and bioethanol production. *International Journal of Green Energy*, 14(7), 599-612.
47. Jorge, N., Silva, A. C. D., & Aranha, C. P. (2016). Antioxidant activity of oils extracted from orange (*Citrus sinensis*) seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 951-958.
48. Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*, 10(19), 3908-3914.
49. Kamal, G. M., Ashraf, M. Y., Hussain, A. I., Shahzadi, A., & Chughtai, M. I. (2013). Antioxidant potential of peel essential oils of three Pakistani citrus species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi*. *Pak. J. Bot*, 45(4), 1449-1454.
50. Kelen, M., & Tepe, B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresourcetechnology*, 99(10), 4096-4104.
51. Khan, M. K., & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104.
52. KHRIBCH, J., NASSIK, S., EL HOUADFI, M., ZRIRA, S., & OUKESSOU, M. (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(3), 300-307.
53. Kirbaşlar, F. G., Tavman, A., Dülger, B., & Türker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils. *Pak. J. Bot*, 41(6), 3207-3212.
54. Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
55. Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
56. Laurain-Mattar, D., & Couic-Marinier, F. (2020). Huile essentielle de Mandarine verte. *Actualités Pharmaceutiques*, 59(598), 57-59.
57. Lemaoui, C. E., Layaida, H., Badi, A., & Foudi, N. (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*, 19(1), 12-19.
58. Madhuri, S., Hegde, A. U., Srilakshmi, N. S., & PrashithKekuda, T. R. (2014). Antimicrobial activity of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* peel extracts. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation (JPSI)*, 3(4), 366-368.
59. MAIDI, L. (2014). *Mise en évidence des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des extraits de Ocimum basilicum L. (Lamiaceae) de la région d'El Assafia (W. de Laghouat) Algérie* (Doctoral dissertation, جامعة الجلفة).
60. Markham K.R. (1982): techniques of flavonoid identification. Academic press, london, 133.
61. Merck, F. (2017). *La biodiversité végétale au service des ingrédients naturels: étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes d'extraits végétaux et développement d'un conservateur naturel pour l'industrie cosmétique* (Doctoral dissertation, COMUE Université Côte d'Azur (2015-2019)).
62. M'Hiri, N. (2015). *Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
63. Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
64. Mohammedi, Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen*. 105p.
65. MOHAMMEDI, Z. (2013). *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie* (Doctoral dissertation).
66. Mohana, B., Kameshwari, S., & Kumar, M. P. (2020). Antifungal Activity in *Urginea indica* Kunth. (Asparagaceae). *European Journal of Medicinal Plants*, 18-23..

67. Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
68. Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
69. Muhsen, T. A. EFFECT OF ESSENTIAL OIL EXTRACTED FROM THE PEELS OF CITRUS PARADISI AND CITRUS SINENSIS ON SOME FUNGI.
70. Muniyandi, K., George, E., Sathyanarayanan, S., George, B. P., Abrahamse, H., Thamburaj, S., & Thangaraj, P. (2019). Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of Rubus fruits from Western Ghats, India. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 73-81.
71. Mutahar S, S., Mutlag M, A. O., & Najeib S, A. Z. (2012). Antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, 2012.
72. Muylaert, A., & Mainil, J. (2013). Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur "contagiosité". In *Annales de Médecine vétérinaire* (Vol. 156, pp. 109-123). ULg-Université de Liège.
73. NEFFATI M. et SGHAIER M., 2014 – Développement et valorisation des plantes aromatiques et médicinales (pam) au niveau des zones désertiques de la région mena (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie). *Projet MENA-DELP*, 155p.
74. Okwu, D. E., Awurum, A. N., & Okoronkwo, J. I. (2007). Phytochemical composition and in vitro antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). *Summa Phytopathol*, 30, 145-148.
75. Panwar, D., Saini, A., Panesar, P. S., & Chopra, H. K. (2021). Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: Progress towards circular economy. *Trends in Food Science & Technology*.
76. Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.
77. Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: a review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
78. Rizk, A. M., AM, R., Al Nagdy, S. A., & El Missiry, M. M. (1982). Constituents of plant growing in Qatar.
79. Rosa, A., Era, B., Masala, C., Nieddu, M., Scano, P., Fais, A., ... & Piras, A. (2019). Supercritical CO₂ extraction of waste citrus seeds: Chemical composition, nutritional and biological properties of edible fixed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(7), 1800502.
80. Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-12.
81. Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.
82. Saraoui, N. (2010). Filière agrumicole en Algérie: développement et Encadrement. *Green Algérie, Agriculture et Environnement: Destin commun*, (31), 20-23.
83. Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129, 153-167.
84. Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, 109114.
85. Stankovic, M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci*, 33(2011), 63-72.
86. Sukhdev Swami Handa Suman Preet Singh Khanuja Gennaro Longo Dev Dutt Rakes. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants Scientific INTERNATIONAL CENTRE FOR SCIENCE AND HIGH TECHNOLOGY Trieste*.
87. Sultana, H. S., Ali, M., & Panda, B. P. (2012). Influence of volatile constituents of fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco on clinically isolated pathogenic microorganisms under In-vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1299-S1302.
88. Tawfik, N. O., Al-Haliem, S. M., & Al-Ani, W. N. (2010). Evaluation of the antibacterial activity of citrus juices: an in vitro study. *Al-Rafidain Dental Journal*, 10(2), 376-382.
89. Teh, S. S., Bekhit, A. E. D., & Birch, J. (2014). Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: effect of solvents. *Antioxidants*, 3(1), 67-80.
90. Wichtl M., Anton R. *Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, 2ème édition, Ed. TEC & DOC, 2003.,

91. Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurusnobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218.

ANNEXES

Annexe I

Matériels et produit chimiques

Appareillage	Verrerie	Solutions et réactifs
- Dispositif d'extraction (soxhlet ,clevenger) - Agitateur - Autoclave - Bainmarie - Balancedeprécision - Becbunsen - Etuve - HotteàfluxlaminaireaveclampeUV - Incubateurbactériologique(25°C,37°C) - Réfrigérateur - SpectrophotomètreUV - Lampe UV - Vortex	- Anse de platine - Tubes à essai - Béchers - Boites en verre - Boites de pétri stériles de 90mm de diamètre - Ecouvillons stériles - Eprouvettes - Erlenmeyer - Fioles - Flacon avec bouchon	- 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH) - Réactif de folin-ciocalteu (FCR) - Carbonate de sodium (Na₂CO₃) - Trichlorure d'aluminium (AlCl₃) - Hexane - Acétate d'éthyle - Acétone - Méthanol - Chloroforme - Diméthylsulfoxyde (DMSO) - chlorure ferrique(FeCl₃) - Acide chlorhydrique(HCl) - Acide sulfurique (H₂SO₄) - Ammonia - Hydroxyde de sodium(NAOH) - PDA - Muller Hinter - Sabauroud - Mac farlanc - Eau distillée - Eau physiologie Standards utilisés - BHT - Acide gallique - Quercitine

-

Annexe II

Préparation des milieux de culture et solutions

▪ Bouillon nutritif (BN)(g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000ml
pH	7.3

▪ Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	18 g
Eau distillée	1000ml
pH	7.3

▪ Mueller Hinton gélosé (M-H)(g/l)

Extrait de viande	3 g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon	1.5 g
Agar	16 g
Eau distillée	1000ml
pH	7.3

▪ Potato Dextrose Agar (PDA)(g/l)

Filtrat de pomme de terre	200g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000ml
pH	5.6

▪ Eau physiologique

Eau distillée	1000ml
NaCl	09 g

▪ 0,5 Mac Farland

BaCl ₂ , 2H ₂ O à 1,175%	0,05 ml
H ₂ SO ₄ à 1%	9,95 ml

• Vanilline sulfurique

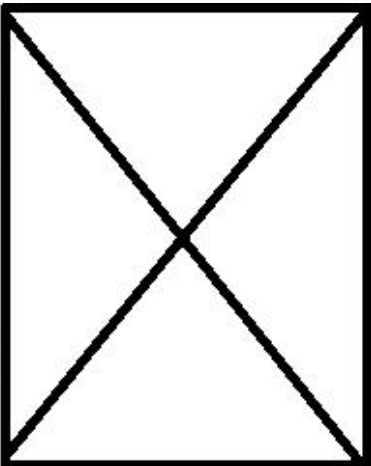
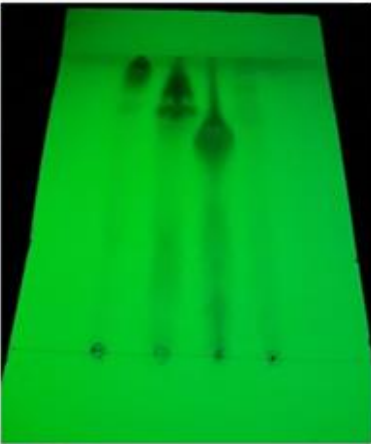
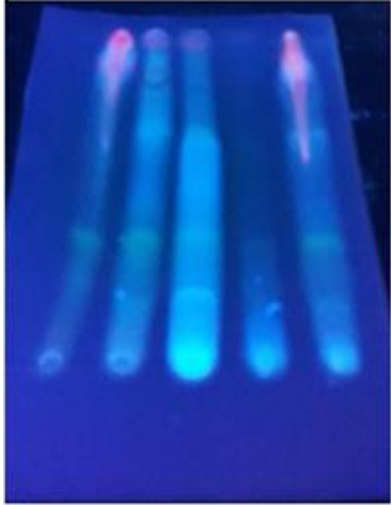
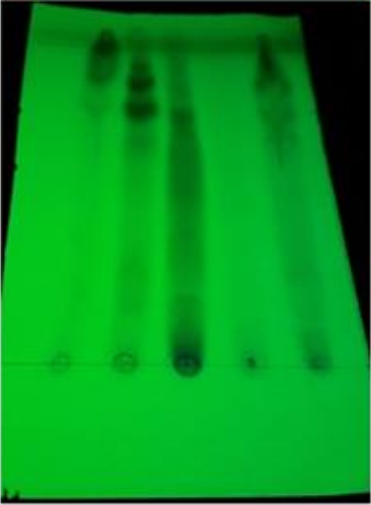
Solution A= vanilline à 1% dans l'éthanol à 95%

Solution B= acide sulfurique 5% dans l'éthanol à 95% qsp

- Après pulvérisation des plaques de silice successivement avec la solution (A) puis, avec la solution (B), elles sont chauffées à 100°C pendant 5min.
-

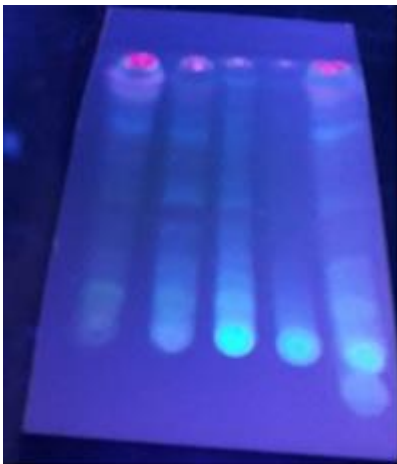
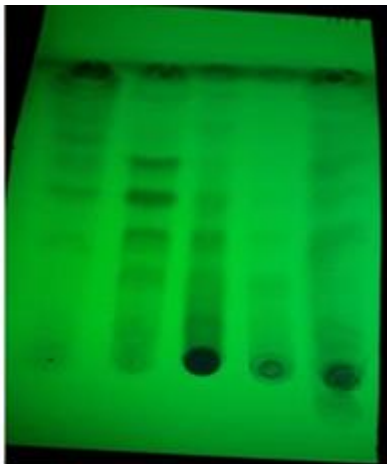
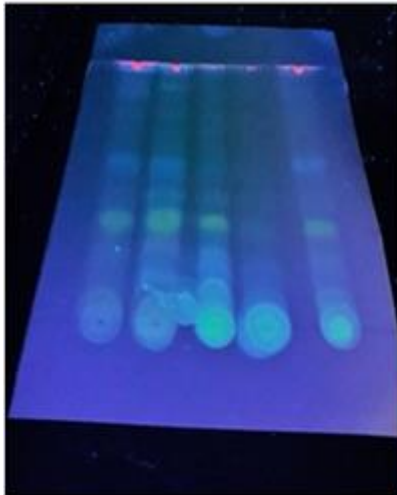
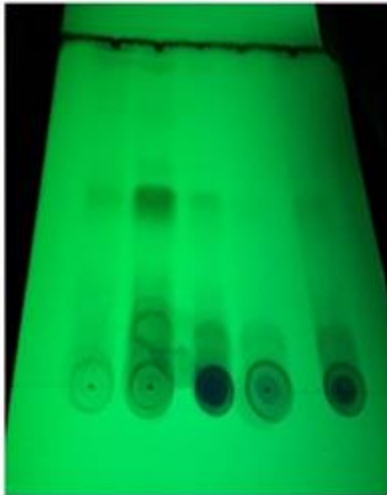
Annexe III

Les différents systèmes solvant utilisés

Le système utilisé	Profil sous UV _{366 nm}	Profil sous UV _{254 nm}
MeOH /AcOEt (6 : 4)		
Hexane /AcOEt (5 : 2)		
MeOH /AcOEt (8 : 2)		
MeOH / AcOEt (4 : 6)		

Annexe III

Les différents systèmes solvant utilisés

Le système utilisé	Profil sous UV ₃₆₆ nm	Profil sous UV ₂₅₄ nm
MeOH /AcOEt (2 : 8)		
CHCl3/MeOH (10 : 2)		

Annexe IV

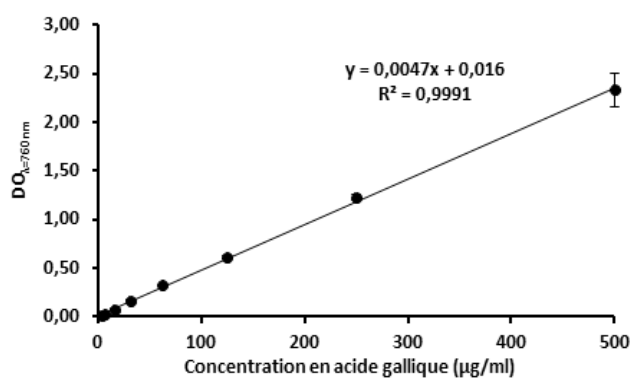


Figure 1 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

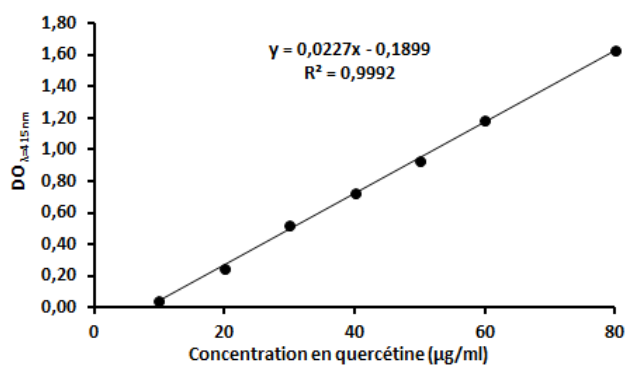


Figure 2 Courbe d'étalonnage de Quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

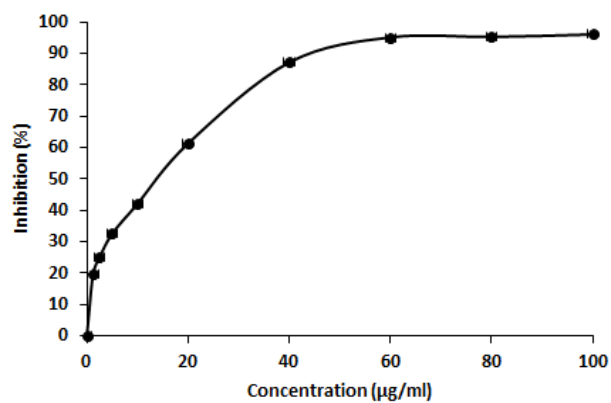


Figure 3 Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de BHT

Annexe IV

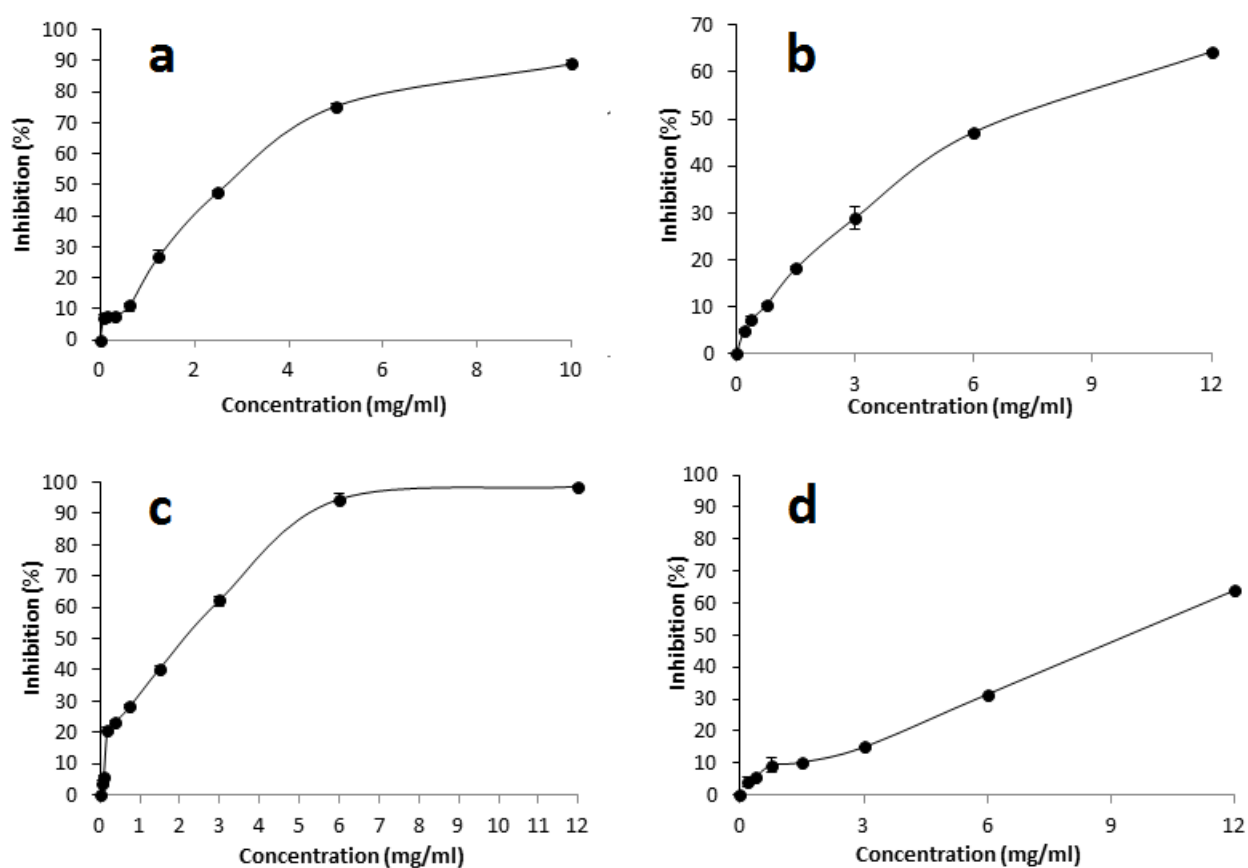


Figure 4 Courbe du pourcentage d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations des extraits étudiés : **a)** MeOH brut ; **b)** AcOEt ; **c)** Acétone ; **d)** MeOH

هذا العمل مبني على تثمين الحمضيات الموجودة في الجزائر و معرفة خصائصها العلاجية. اهتمنا بدراسة جزأين لنوعين من الحمضيات *Citrus sinensis* و *Citrus reticulata* وهما: البذور والقشور. قمنا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للميكروبات من مستخلص بذور اليوسفي « *Citrus reticulata* » وتحديد محتواها من المركبات الفينولية ، أي إجمالي البوليفينولات والفلافونيدات، وكذلك النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية لقشور *citrus sensensis* ضد بعض الجراثيم المسببة للأمراض. تتعرض بذور *Citrus reticulata* للاستخلاص عن طريق جهاز السوكسلي (Soxhlet) من جهة، باستعمال خمسة مذيبات ذات قطبية متزايدة (الاستراتالايثيلي-الاسيتون – الميثانول الميثانول-ماء بمعدل 20-80 ومن ناحية اخرى، باستخدام النقع بالميثانول ، وهذا الأخير سجل أعلى مردود بمعدل 5.3٪. بينما تم استخلاص الزيوت الأساسية من *Citrus sinensis* عن طريق التقطير المائي الذي أعطى مردودا بـ 0.6 ٪. في بداية العمل تم تحضير فحص نوعي كيميائي عن طريق التفاعلات اللونية ، متبوعا بتأكيد كروماتوغرافي (CCM) لجميع المستخلصات العضوية التي أظهرت أن مستخلصات الاسيتات الايثيلي الاسيتون والميثانول الخام غنية بالمركبات الفينولية ، وذلك ما اكنته نتائج معايرة البوليفينولات و الفلافونيدات بطريقة Folin-Ciocalteu و $AlCl_3$ على التوالي حيث احتوت المستخلصات المذكورة اعلاه على 177.660 ± 3.62 ، 175.106 ± 5.20 و 91.702 ± 1.37 مغ/ EAG من المستخلص 2.16 ± 64.687 ، 45.574 ± 1.12 و 35.220 ± 0.657 EQ/ غ من المستخلص. لقد اظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستعمال طريقة DPPH ان افضل التركيزات المثبطة المعبر عنها بـ IC_{50} ظهرت في مستخلص الاسيتون متبوعا بمستخلص الميثانول الخام على التوالي في حين اظهر الـ BHT المستعمل كشاهد نشاطا مكافئا (مغ/مل $IC_{50} = 0.018$) و تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على 08 سلالات بكتيرية وعلى 04 فطريات بطريقة بئر الانتشار . أظهرت جميع السلالات مقاومتها لجميع المستخلصات وحتى للزيوت الأساسية لقشرة *C. sinensis*. باستثناء مستخلص الميثانول الخام الذي اظهر نشاط معتدل بتركيز 900 مغ/مل ضد اربع سلالات *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis*.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات ، *Citrus reticulata* ، *Citrus sinensis*

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des agrumes en Algérie et de la connaissance de leurs propriétés thérapeutiques. Nous sommes intéressés à étudier deux parties de deux variétés d'agrumes (*Citrus reticulata* et *Citrus sinensis*) qui sont : les graines et les écorces. Nous avons évalué le pouvoir antioxydant et antimicrobien de l'extrait de graines de mandarine *Citrus reticulata* et de déterminer leurs teneurs en composés phénoliques à savoir, les polyphénols totaux les flavonoïdes, ainsi que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'écorce d'orange *Citrus sensensis*, vis-à-vis de certains germes pathogènes. Les graines de *Citrus reticulata* sont soumises d'une part à une extraction par Soxhlet en utilisant cinq solvants à polarité croissante (AcOEt-Acétone-MeOH- MeOH-eau 80:20) et d'autre part à une macération par le méthanol, cette dernière enregistre le rendement le plus élevé qui est de 5.3%, alors que l'extraction des HE de *Citrus sinensis* par hydrodistillation a donné un rendement de 0.6%. Un criblage phytochimique qualitatif par réactions colorées, suivi d'une confirmation par chromatographie sur couche mince a été élaboré pour l'ensemble des extraits organiques qui ont montré que les extraits AcOET, Acétone, MeOH brut se sont révélés riches en composés phénoliques, ce qui confirme les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes par la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode d' $AlCl_3$, ou les teneurs sont respectivement 177.660 ± 3.62 ; 175.106 ± 5.20 et de 91.702 ± 1.37 mg EAG/g MS et de 64.687 ± 2.16 ; 45.574 ± 1.12 et de 35.220 ± 0.657 mg EQ/ g MS. L'évaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH a montré que les meilleures concentrations inhibitrices exprimées en IC_{50} a été obtenues par l'extrait acétonique suivi par l'extrait MeOH brut respectivement 0.072 ± 0.002 ; 0.091 ± 0.001 . Cependant, le BHT (utilisé comme témoin) a montré une activité approximativement équivalente ($IC_{50} = 0.018 \mu g/ml$). L'activité antimicrobienne a été déterminée sur 08 souches bactériennes (Gram⁺ et Gram⁻) selon la méthode des puits de diffusion. Tous les souches ont manifestées une résistance vis-à-vis tous les extraits et même à l'HE d'écorce de *C. sinensis* , sauf à l'extrait MeOH brut qui a montré une activité moyennement efficace à 900mg/ml vis-à-vis des quatre souches *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* , composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne

Abstract

This work is part of the promotion of *Citrus* fruits in Algeria and the knowledge of their therapeutic properties. We are interested to study two parts of two varieties of *Citrus* (*Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) which are: seeds and peels. We evaluated the antioxidant, antimicrobial activities of mandarin seeds "citrus reticulata" extracts and to determine their content of phenolic compounds, namely, the total polyphenols and flavonoids, as well as the antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus sinensis* peel, against certain pathogenic germs. The seeds of *Citrus reticulata* are subjected to an extraction by Soxhlet using five solvents with increasing polarity (AcOEt-Acetone-MeOH-MeOH-water 80:20), on the other hand to maceration with methanol, this latter records the highest yield, which is 5.3%. While extraction of EO from *Citrus sinensis* by hydrodistillation gave yielded in 0.6%. A qualitative phytochemical screening by color reactions, followed by confirmation by thin-layer chromatography was prepared for all the organic extracts ; showed that the AcOET, Acetone, crude MeOH extracts revealed to be rich in phenolic compounds, which confirms the results of the determination of polyphenols and flavonoids by the Folin-Ciocalteu method and the $AlCl_3$ method, where the contents were respectively 177.660 ± 3.62 ; 175.106 ± 5.20 and 91.702 ± 1.37 mg EAG / g DM and 64.687 ± 2.16 ; 45.574 ± 1.12 and 35.220 ± 0.657 mg EQ / g DM. The evaluation of the anti-free radical activity by the DPPH method showed that the best inhibitory concentrations expressed as IC_{50} were obtained by the acetone extract followed by the crude MeOH extract respectively 0.072 ± 0.002 ; 0.091 ± 0.001 mg/ml. However, BHT (used as a control) showed approximately equivalent activity ($IC_{50} = 0.018$ mg / ml). The antimicrobial activity was determined on 08 bacterial strains (Gram⁺ and Gram⁻) by the well diffusion method. All the strains showed resistance to all the extracts and even to the EO of *C. sinensis* peel, except for the crude MeOH extract which showed antioxidant activity, antimicrobial activity.

Key words: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.