

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أحمد بوقرة بومرداس

Université M'Hamed Bougara Boumerdes



Faculté des sciences

Département de biologie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du **Diplôme de Master en Biologie**

**Spécialité** : Biologie des Populations et des Organismes

**Thème**

**Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques du bigaradier (*Citrus aurantium L.*)**

**Présentée par**

M<sup>elle</sup> Merzougui Soumia

M<sup>elle</sup> Brahimi Zineb

Soutenu publiquement le 15/7/2019, devant le jury composé de :

Mme BOUCHENAK-ARAB. OUAHIDA	MCA	UMBB	Président
Mme YAHIAOUI. KARIMA	MCA	UMBB	Promotrice
Mme AIT KAKI. SABRINA	MCA	UMBB	Examinatrice

Année universitaire 2018-2019

## **Remerciement**

*Nous remercions **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.*

*Au terme de ce travail, toute notre reconnaissance et remerciements vont à madame **Yahiaoui. K**, maitre de conférence a l'UMBB, pour ses orientations et ses précieux conseils.*

*Nos vifs remerciements vont également à **Mme Arab-Bouchnak**. Od'avoir accepté de présider ce jury et aussi **Mme Ait kaki.S** pour l'intérêt qu'elle porte à notre travail en acceptant de l'examiner.*

*Nous exprimons toutes nos reconnaissances et gratitude à l'ensemble du corps enseignant de l'Université de M'Hamed Bougara, tout particulièrement les enseignants de notre spécialité Biologie des Populations et des Organismes, pour leurs efforts à nous garantir la continuité et l'aboutissement de ce programme de Master.*

*Nous tenons à remercier **Mme Maaloum. N**, et **Mme khíari. O** attachés aux laboratoires universitaires qui nous ont orientés durant la partie pratique de notre travail.*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réussite de ce travail.*

**Soumia & Zineb**

## *DIDECACE*

*A celui qui veillée jour et nuit sur mon éducation et ma réussite et de lui dire que tu as été pour moi ma meilleur école et mon meilleur professeur, et qui est présente à chaque instant pour moi, pour tout cela je dédie ce modeste travail à ma très chère et tendre mère a qui je dis aujourd'hui merci et mille fois merci Mama pour toutes les valeurs que tu m'as inculquées.*

*A celui qui sacrifie toute sa jeunesse pour moi, qui m'a toujours encouragé, et qui m'a donné une bonne éducation, qui m'a soutenue durant toute la longue durée de mes études, à qui je dis aujourd'hui merci et mille fois merci papa.*

*A mes chers frères : Hamid et Rabeh.*

*Ames chers seurs : Ouardia Houria Zahra Hakima Fatima Ratiba Messouda*

*A tous qui m'ont aidé de loin ou de prêt.*

*Atous les membres de ma famille, petits et grands veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère surtout la famille : Merzougui*

*Amon binôme de ce travail Zineb que je la souhaite le bon courage, et une belle vie.*

*A notre promotion de master en biologie des populations et des organismes.*

*Ames meilleurs amis : Khaoula, Noura, Nassira, Fatma, Ouahiba, Ouarda, Fatima, Ibtissem, Zahoi, Hiba, Sarah,*

*Soumia*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui veille à ma réussite et mon bonheur pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité*

*A mon cher père qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études*

*A mes chers frères : Younes et Abderraouf*

*A mes chers sœurs : Nesserine et Douaa*

*A ma sœur Soumia et son mari Bouelem et ces enfants Iyad et Maria*

*A ma grand-mère et grand-père*

*A toute la famille Brahimî et Khoudja*

*A mon binôme Soumia et sa famille que je leur souhaite le bon courage, et une belle vie nchli.*

*A mes amies : Khaoula, Noura, Faïza, Nassira, Fatma, Amira, Yasmine, Salma, Asma, Aïcha, Assia, Sarah, Amina, Hadjer, Houda, Ikram, Siham, Meriem*

*Zineb*

### *Liste des figures*

Figure	Titre	Page
1	Cycle de vie des agrumes	4
2	Feuilles, fruits et fleurs de bigaradier	6
3	Coupe équatoriale d'une orange amère	8
4	Structure de base des flavonoïdes	14
5	Structure des différentes classes de flavonoïdes	15
6	Structure chimique des tannins hydrolysables(b) et des tannins condensés (a)	16
7	Les feuilles de bigaradier	21
8	Les pépins de bigaradier	21
9	Feuilles et fruits de bigaradier	22
10	Carte géographique de la région de Boumerdes	22
11	Schéma général des différentes étapes du travail	25
12	Feuilles de bigarade après séchage	26
13	Pépins de bigarade après séchage	26
14	Poudre végétale des feuilles	26
15	Poudre végétale des pépins	26
16	Protocole de l'extraction des polyphénols	34
17	Teneur en polyphénols des extraits du <i>Citrus aurantium L.</i>	46
18	Teneur en Flavonoïdes des extraits du <i>citrus aurantium L.</i>	48

### *Liste des tableaux*

Tableau	Titre	Page
1	Classification botanique de bigaradier.	7
2	Composition et valeur nutritive de quelques espèces d'agrumes	10
3	Les principales classes des composés phénoliques	11
4	Principaux acides hydroxycinnamiques	12
5	Principaux acides hydroxybenzoïques	13
6	Principaux types de coumarines	17
7	Souches microbiennes utilisées dans l'évaluation de l'activité antimicrobiennes du Bigaradier <i>Citrus aurantium L.</i>	23
8	Souches fongiques utilisées pour l'activité antifongique du Bigaradier <i>Citrus aurantium L.</i>	24
9	Méthode de screening phytochimique	28
10	Estimation de l'activité antimicrobienne et de la sensibilité des souches	38
11	Résultats du test phytochimique	40
12	Propriétés physico-chimique du jus	44
13	Rendement des l'extraits méthanolique en polyphénols totaux	45
14	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles du <i>citrus aurantium L.</i>	50
15	Diamètre des zones d'inhibition en (mm) de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins du <i>citrus aurantium L.</i>	51
16	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de la solution brute et de la dilution de jus du <i>citrus aurantium L.</i>	52
17	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues par l'extrait des feuilles de dix souches champignon.	55
18	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues par l'extrait des pépins de dix souches de champignon.	56
19	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues par l'extrait des jus de dix souches champignon	57

### *Liste des abréviations*

MT : Million Tonne.

LDL : Lipoprotéine de basse Densité.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

RL : Radicaux Libres.

UV : Ultra Violé.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

BPO : Biologie des Populations et des Organismes.

UMBB : Université de M'Hamed Bougara Bumerdes.

GN : Gélose Nutritive.

Tr : Tour par Munit.

FC: Folin-Ciocalteau.

MH: Muller-Hinton.

PDA: Potato Dextrose Agar.

EFA : Extraits Aqueux des Feuilles

EFM : Extraits Méthanolique des Feuilles

EPA : Extraits Aqueux des Pépins

EPM : Extraits Méthanolique des Pépins

MS : Matière Sèches.

EAG : Équivalent Acide Gallique

EQ : Equivalent Quercitaine.

MF : Matière Fraiche.

TM : Témoin.

SM : Solution Mère.

## Sommaire

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités et répartition des agrumes dans le monde ..... 3

I.1.1. Production des agrumes ..... 3

I.1.1.1. Dans le monde..... 3

I.1.1.2. En Algérie ..... 3

I.1.3. Cycle de vie des agrumes ..... 4

I.2. Généralités sur le bigaradier. .... 5

I.2.1. Description de la plante ..... 5

I.2.1.1. Système racinaire ..... 5

I.2.1.2. Système aérien ..... 5

I.2.2. Classification botanique..... 7

I.2.3. Morphologie..... 8

I.2.4. Composition chimique et biochimique de la bigarade et d'autres Agrumes. .... 9

I-3. Composés phénoliques ..... 10

I-3.1-Définition ..... 10

I-3.2. Classification des polyphénols ..... 11

I-3.2.1 Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3 ..... 12

I-3.2.2. Flavonoïdes (C6-C3-C6 ..... 13

I-3.2.3. Tannins..... 16

I-3.2.4. Stilbènes (C6-C2-C6) ..... 16

I-3.2.5. Quinones ..... 17

I-3.2.6. Lignines ..... 17

I-3.2.7. Coumarines ..... 17

I-3.3. Biosynthèse des composés phénoliques ..... 18

I.6. Propriétés biologiques des polyphénols ..... 18

I.6.1. Activité antioxydant des polyphénols ..... 18

I.6.2. Activité antimicrobienne des polyphénols..... 19

I.6.3. Activité antivirale.....	19
I.6.4. Activité anti-inflammatoire.....	19
I.6.5. Activité antiallergique.....	20
I.6.6. Activité anti-cancer .....	20

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1. Matériel.....	21
II.1.1. Matériel biologique.....	21
II.1.1.1. Matériel végétal .....	21
II.1.1.2. Matériel microbiologique .....	23
II.1.2. Matériel non biologique .....	24
II.2. Méthodes d'étude .....	24
II.2.1. Séchage des feuilles et pépins.....	26
II.2.2. Broyage des feuilles et des pépins séchés .....	26
II.3. Test phytochimique (Screening phytochimique).....	27
II.4. Propriétés physico-chimiques du jus de bigarade.....	32
II.4.1. Densité du jus .....	32
II.4.2. pH du jus .....	32
II.4.3. Acidité du jus .....	32
II.5. Extraction des polyphénols .....	33
II.5.1. Calcul du rendement.....	35
II.5.2. Dosage des composés phénoliques.....	35
II.6. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	36
II.6.1. Principe.....	36
II.6.2. Protocole expérimental.....	37
II.7. Activité antifongique .....	39

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

1. Propriétés physico-chimiques .....	40
2. Propriétés physico-chimique .....	44
2.1. pH de jus.....	44
2.2. Acidité de jus.....	44
3. Rendement et caractérisation des extraits phénoliques .....	45
4. Dosage des polyphénols .....	46

5. Dosage des flavonoïdes .....	48
6. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	49
6.1. Lecture des résultats .....	49
7. Evaluation de l'activité antifongique .....	54
Conclusion .....	59
Références bibliographiques .....	61
Annexes	

## Résumé

Les travaux menés dans notre étude ont permis d'évaluer l'activité antibactérienne, des feuille, pépins et jus de l'orange amère ainsi les propriétés physicochimiques du jus. L'extraction de ces principes actifs est faite par le méthanol pur et l'eau distillé.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des saponozides, mucilages, coumarines sucres réducteurs flavonoïdes et polyphénols.

Cette plante est soumise à une macération par la méthode de macération par les solvants méthanol (70%) et l'eau distillée, l'extrait méthanolique des pépins enregistre le rendement le plus élevé qui est de 17.5 %.

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteau, la teneur la plus élevée est de 0.887mg EAG/20g MS, enregistrée par l'extrait méthanolique de pépins.). Alors que le meilleur taux en flavonoïdes est noté chez l'extrait méthanolique des pépins (3.56mg EQ /20 g MS).

Les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits de l'orange amère montrent que ce fruit peut inhiber la croissance de : *Streptococcus pyogenese groupe A*, *Proteus mirabilis*, *Enterobactere cloacea* et *Acinetobacter baumanni*. L'activité antifongique révèle que l'orange amer peut inhiber la croissance de : *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* et *Malassezia sp.*

### Mots clés :

*Citrus aurantium*, screening phytochimique, polyphénols, flavonoides, activité antibactérienne, activité, antifongique.



*Introduction*

## Introduction

---

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gens apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (**Iserin, 2001**).

Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique.

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré que la consommation régulière de fruits et légumes permettait la réduction du risque des cancers et des maladies cardiovasculaires (**Khan, 2010 ; Rapisarda et al, 2008**).

La Bigarade *Citrus aurantium L* est l'une des espèces des agrumes qui sont considérés comme les fruits les plus importants dans le monde ; ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus. La consommation des agrumes est associée à la réduction de l'apparition de plusieurs maladies. Les effets bénéfiques de ces fruits sont souvent attribués à la présence des composés bioactifs (la vitamine C, les composés phénoliques,...) (**Abeyasinghe et al., 2007**).

Les polyphénols constituent une famille de composés chimiques largement répandue dans la nature : on en trouve en quantités notables dans le thé (**Naghma and Mukhtar, 2007**), le cacao (**Rimbach et al., 2009**) ; (**Fayeulle et al., 2018**), la myrtille (**Avram et al., 2017**), le raisin (**Antonioli, et al., 2015**) et dans des produits fermentés comme le vin (**Saucier, 2010**), le chocolat (**Allgrove and Davison, 2014**) et la bière (**Quifer-Rada et al., 2015**). Ils possèdent des structures chimiques diversifiées et peuvent avoir des propriétés biologiques intéressantes (**Quideau et al., 2011**). Les composés polyphénolique améliorent le système immunitaire de certains animaux en prévenant les risques de ballonnement chez les ruminants (**Lees, 1992**). Chez l'Homme, des études ont montré l'importance bénéfique de la consommation de polyphénols sur la santé grâce à leurs propriétés antioxydant et anti inflammatoire. Ils jouent, entre autres, un rôle protecteur contre des maladies cardiovasculaires (**Corder et al., 2006 ; Quiñones et al., 2013**).

# Introduction

---

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la phytothérapie.

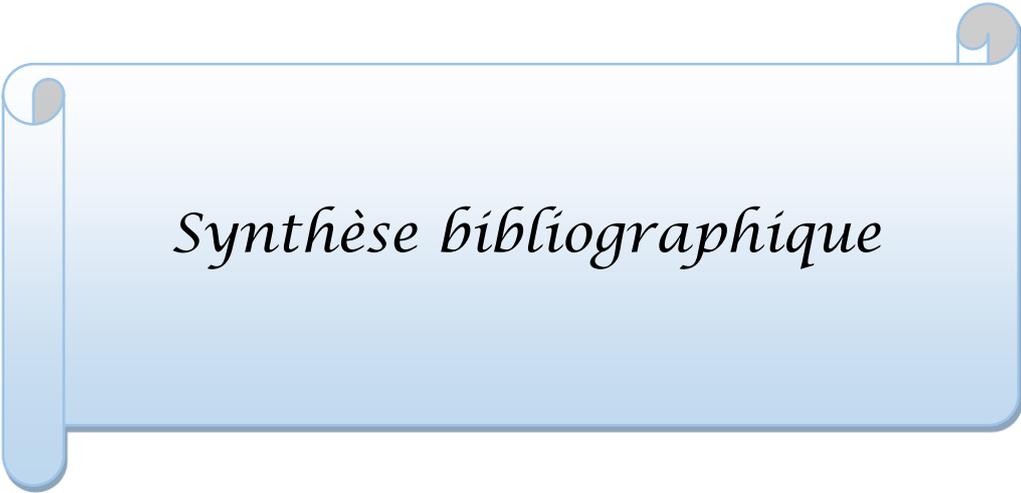
Pour cela un grand nombre de recherches ont démontré que les polyphénols des agrumes disposent de plusieurs applications thérapeutiques, les études épidémiologiques prouvent que la consommation de l'orange et des produits à base d'orange peuvent protéger la santé contre différentes maladies à cause de sa richesse en diverses molécules antioxydants dont l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les polyphénols (**Kim et al, 2002**).

Cette étude est une tentative d'explorer les différentes parties de l'orange amère (feuilles, pépins et jus) comme une source naturelle d'antioxydants, ainsi, les objectifs de cette étude sont de déterminer ses teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes et d'estimer également leur activité antimicrobienne vis-à-vis certains germes pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* groupe a, et *Candida albicans*.

Dans notre travail, on s'est intéressé à étudier l'activité antimicrobienne du *Citrus* (feuilles, pépins et jus), nous avons choisi cette plante car il y a peu d'étude sur elle, surtout dans le monde arabe.

Les principales parties de notre travail sont :

- ✓ Premièrement, une synthèse bibliographique sur les agrumes en général et la bigarade en particulier et son utilisation dans le domaine de la phytothérapie a été énoncée ; accompagnée de généralités sur l'activité antioxydant et l'activité antibactérienne des polyphénols.
- ✓ Deuxièmement, dans la partie matérielle et méthodes, les méthodes de screening phytochimique, d'extraction des extraits de *citrus aurantium L*, le dosage et évaluation de l'activité antimicrobienne sont exposés
- ✓ Troisièmement, une partie est consacrée à la présentation des résultats et de leur discussion. Une conclusion générale viendra à la fin de ce présent travail dans laquelle différentes perspectives de recherche seront évoquées.



*Synthèse bibliographique*

## I.1. Généralités et répartition des agrumes dans le monde

Le terme agrume provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides ; les agrumes regroupent plusieurs variétés (Ladaniya, 2008 ; Khan *et al.*, 2010). Dans cette catégorie d'arbres appartiennent les mandariniers, les oranges, les pamplemoussiers, les cédratiers et citronniers (Loussert, 1989).

Aujourd'hui les agrumes se rencontrent sur les cinq continents, leur distribution naturelle était à l'origine du Sud-Est asiatique au nord de la Birmanie et celle du sud de l'île de Hainan (Ollitrault *et al.*, 1997). Ces derniers ne sont pas comestibles. Mais ils occupent une place importante en agrumiculture car ils sont utilisés comme porte-greffe du fait de leurs capacités d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes (Bénédicte et Bachés, 2011). C'est ainsi, les agrumes à l'exception du mandarinier, s'étaient répandus dans presque toutes les régions tropicales et subtropicales grâce aux échanges commerciaux (Parfonry, 2001).

### I.1.1. Production des agrumes

#### I.1.1.1. Dans le monde

Les agrumes sont les fruits dont la production est la deuxième plus importante au monde avec plus de 115 millions de tonnes par an, 517 millions de tonnes ont été produites en Algérie occupant ainsi la 18<sup>ème</sup> place mondiale (FAO, 2013).

La production des agrumes est très diversifiée avec 68 Mt d'oranges; 29 Mt des petits agrumes; 14 Mt de citrons et de limes et 5 Mt de pomelos en 2009 (Loillet, 2010).

#### I.1.1.2. En Algérie

D'après Guenouni et Kacemi (2013), et selon leurs exigences en eau et qualité des sols, les agrumes sont localisés essentiellement dans les plaines irrigables :

- La plaine de la Mitidja (44%).
- La plaine de Habra et Mascara (25%).
- Le périmètre de Bouna Moussa et la plaine de Safsaf (16%).
- Le périmètre de la Mina et le Bas Chélif (14%).

### I.1.3. Phénologie

Le cycle de vie de ces arbres débute par une phase de dormance suivi par une phase de débourrement où il y a le gonflement des bourgeons et le développement des feuilles suivis par une phase de floraison (début, pleine et fin). La figure N°1 récapitule les différents stades phénologiques selon l'échelle BBCH.

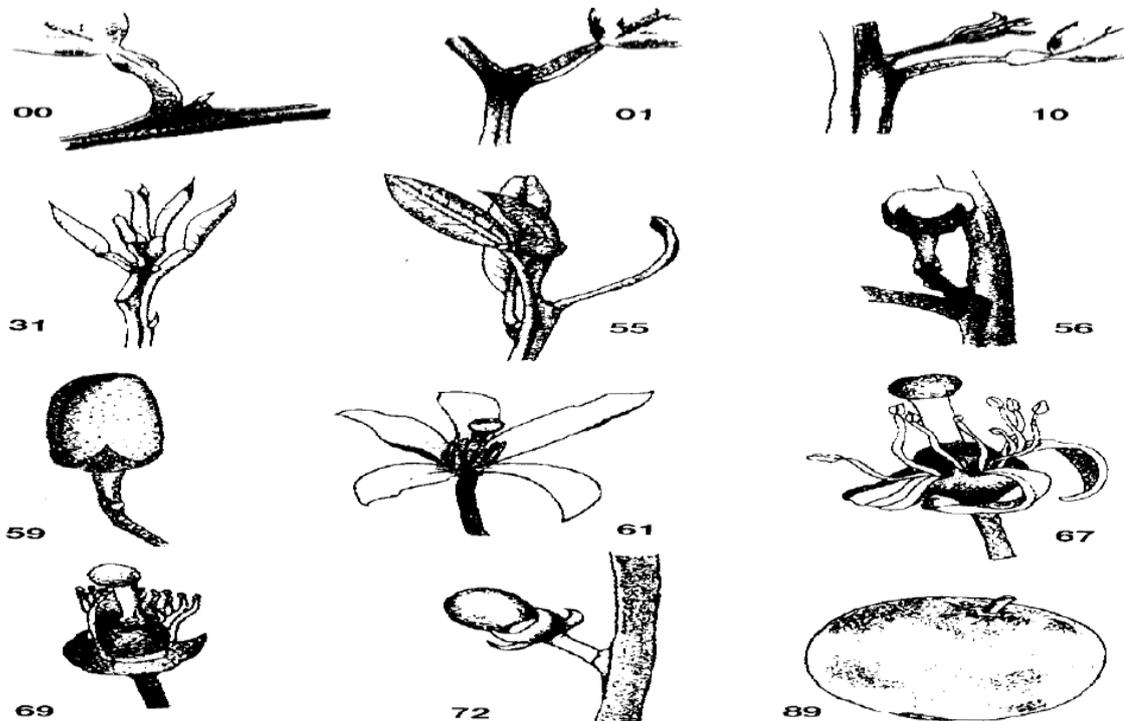


Figure 1: cycle de vie des agrumes (Agusti et al., 1995).

#### Les légendes :

**00** : Début de dormance : stade de dormance.

**01** : Début du gonflement des bourgeons : stade de développement des bourgeons.

**10** : Séparation des premières feuilles : stade de développement des feuilles.

**31** : Début de la croissance des pousses : stade de développement des pousses.

**55** : Les fleurs sont visibles mais encore fermées : stade d'apparition de l'inflorescence.

**56** : Les pétales s'allongent les sépales entourent la moitié de la corolle (stade bouton blanc) : stade de développement de l'inflorescence.

**59** : La plupart des fleurs avec des pétales formant une boule creuse : stade d'apparition de l'inflorescence.

**61** : début floraison (environ 10% des fleurs sont ouvertes) : stade de floraison.

**67** : les fleurs sont flétries (la majorité des pétales sont tombés) : stade de floraison.

**69** : Fin floraison (tous les pétales sont tombés) : stade de floraison.

**72** : le fruit vert est entouré par les sépales en forme d'une couronne : stade de développement du fruit.

**89** : Le fruit a atteint la maturité demandé pour la consommation avec son gout et sa consistance caractéristique : maturation du fruit et d la graine.

## I.2.Généralités sur le bigaradier

La bigarade *Citrus aurantium* Appelée aussi l'orange amère ou l'orange de Séville, est l'un des agrumes appartenant à la famille Rutaceae, est connue pour son goût extrêmement amer et aigre (**Boccoet al., 1998**). Le bigaradier est classé parmi les plantes aromatiques et médicinales (calmants, somnifères....) (**Ait Mohamed, 2006**).

Les oranges amères ne sont pas employées comme fruits comestibles, elles sont utilisées pour la fabrication de jus et des marmelades (confitures d'orange) (**Ersus et Cam, 2007**).

### I.2.1. Description de la plante

Le bigaradier est un arbre plus ou moins épineux selon les variétés, peut avoir un port érigé ou compact. Plus grand que l'oranger doux. Le fruit, les feuilles, les fleurs et les rameaux ont de nombreuses applications alimentaires et cosmétologiques (**Ververidis et al., 2007**).

#### I.2.1.1. Système racinaire

Chez les agrumes, le système racinaire occupe plus de 70% de la taille de l'arbre. Les racines ont un pivot qui peut dépasser 2m au-dessous de la surface. Ces racines fibreuses se prolongent généralement bien au-delà de la canopée (**Walter et Sam, 2002**).

#### I.2.1.2. Système aérien

##### ❖ Fruits

Le bigaradier porte un fruit ovoïde appelés "orange amères", plus petites que ceux d'un orange doux (**Gatier et al., 2007**). Sa chair est acide Peu juteuse très amère et contient beaucoup de pépins (**Bénédicte et al., 2011**).

### ❖ Feuilles

Les feuilles du bigaradier sont ovales, vertes brillantes ont une odeur faible et une saveur amère, possèdent un pétiole articulé et plus ou moins ailée, luisantes et persistantes avec une épine à l'aisselle des feuilles inférieures. Elles mesurent environ 8cm de longueur et 4cm de largeur (Figure 2).

### ❖ Fleurs

Les fleurs sont blanches et très odorantes, pouvant atteindre 25mm (**Escartin, 2011**). Elles fleurissent au début du printemps, possèdent de 4 à 5pétales imbriqués, et sont souvent recourbés vers l'arrière (**Polese, 2008**).



**Figure 2** : feuilles, fruits et fleurs de bigaradier.

### ❖ Rameaux

Les rameaux, parfois épineux, connaissent plusieurs vagues de croissance, la plus importante étant celle du printemps (**Virbei-Alonso, 2011**).

### I.2.2. Classification botanique

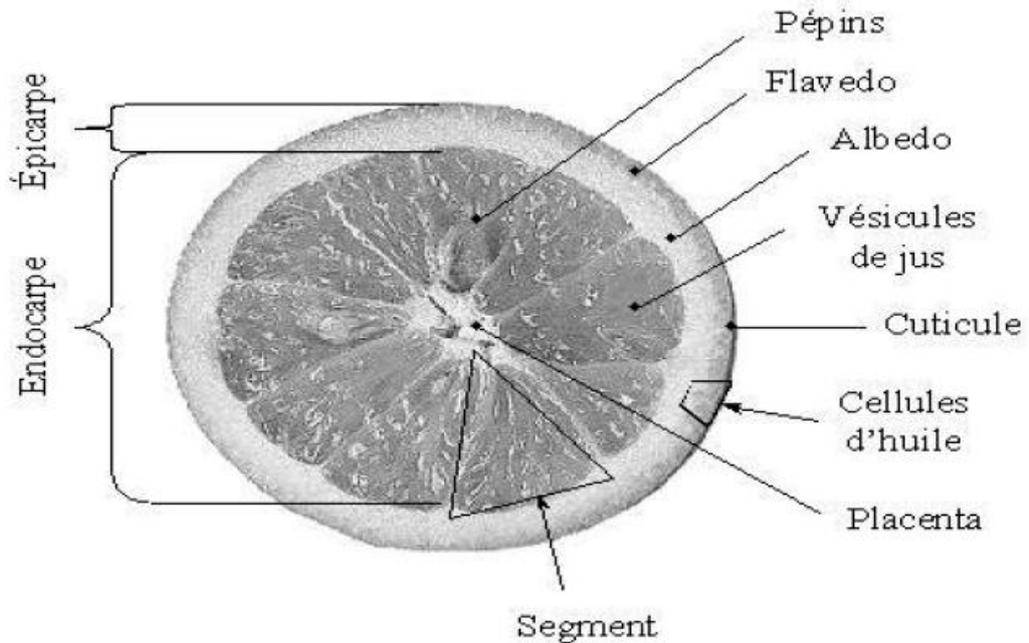
La classification botanique de bigaradier Selon **Kimball (1999);Manneret al., 2006)**estreprésenté dans le tableau N°1

**Tableau 1** : classification botanique de bigaradier.

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Division</b>	Embryophyta
<b>Sous-division</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotyledoneae
<b>Sous-classe</b>	Archychalmydeae
<b>Ordre</b>	Géraniale
<b>Sous- ordre</b>	Géraniineae
<b>Famille</b>	Rutaceae
<b>Sous-famille</b>	Aurantiodeae
<b>Tribus</b>	Citreae
<b>Sous-tribus</b>	Citrinae
<b>Genre</b>	Citrus
<b>Espèce</b>	<i>Citrus aurantium</i> L

### I.2.3.Morphologie

L'orange amère est constituée de plusieurs parties (Figure 3)



**Figure3** : coupe équatoriale d'une orange amère (Sousser, 1997).

#### ❖ Epicarpe ou flavédo

Est la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jaune orangé (vive). Elle comprend de nombreuses poches sécrétrices d'huile essentielles (Tenscher *et al.*, 2005).

#### ❖ Mésocarpe ou albédo

Est la couche intérieure blanche et spongieuse et riche en pectines (Bouroukaa, 2012).

#### ❖ Endocarpe ou pulpe

C'est la partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de

vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (**Hendrix et Reed, 1995 ; Guimaraes et al., 2010**).

#### **I.2.4. Composition chimique et biochimique de la bigarade et d'autres Agrumes**

Les agrumes présentent une composition diversifiée. Ils contiennent très peu de fibres, de protéines et de lipides. Ils présentent une excellente source de vitamine C et renferment également : la vitamine A (rétinol), B3 (nicotinamide), B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine) et E (tocophérol) (Tableau 2) (**Souci et al., 1994**).

L'écorce d'orange (Bigarade) est composée essentiellement de la cellulose, l'hémicellulose, substances pectiques, des pigments (flavonoïdes, anthocyanines et caroténoïdes) et des huiles essentielles. Elle contient également d'autres composés tels que, les glucides, les minéraux, des protéines et peu de lipides (**Lu et al., 2009**).

Les feuilles sont principalement composées de grandes molécules chimiques emprisonnant de nombreux éléments minéraux tels que calcium, potassium, sodium, magnésium, soufre et phosphore. Elles contiennent également de la chlorophylle, des nutriments (glucides, lipides et protéines), des acides aminés et des composés aromatiques complexes. Les acides gras, les alcools primaires, les esters et les carbohydrates ont été identifiés comme les principaux constituants des feuilles d'agrumes (**Anoop, 2012**).

**Tableau 2** : composition et valeur nutritive de quelques espèces d'agrumes (**Souci *et al.*, 1994**).

Composant (g)	Bigarade	Citron	Clémentine	Pamplemousse
Eau (%)	85,70	90	86,9	90
Glucides (g/100g)	8,25	2,5	10,4	7,55
Fibres alimentaires (g /100g)	1,6	2,1	1,4	0,1
Acides organiques (g/100g)	1,13	3,5 – 7,2	0,6 – 1,00	1,76
Protides (g/100g)	1,00	1,00	0,7	0,4
Lipides (g/100g)	0,2	0,2	0,2	0,1

### I-3. Composés phénoliques

#### I-3.1-Définition

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénoliques considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des 1groupes les plus importants présents dans le règne végétal (**Dangles *et al.*, 1992**).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniquesportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliquesnaturels varie de simples molécules (acides phénoliques simples) vers les molécules les plushautement polymérisées (tanins condensés), avec plus de 8000 structures phénoliquesidentifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

Les phénols sont formés à partir de certains acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine et les sous-produits de leur métabolisme (**Ladaniya, 2008**).

## I-3.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols habituellement subdivisés en phénols simples, acides phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), en coumarines, en quinones, en flavonoïdes et en formes polymérisées : lignines, tannins.

**Tableau 3** : les principales classes des composés phénoliques (Crozier *et al.*, 2008).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simples	Catéchol	
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques  Coumarines	Acides caféique, acides férulique  Scopolétine, esulétine	Pomme de terre, pomme citrus
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes Flavonols Anthocyanes Flavanols Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol Cyanidine Catéchine Naringénine Daidzénine	Fruits, légumes Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C15) <sub>n</sub>	Tannins		Raisin rouge, kaki

### I-3.2.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

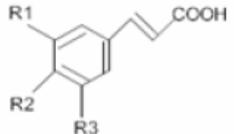
Un acide phénolique est un composé organique qui possède au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les acides phénoliques sont divisés en deux classes : les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques (**Richter, 1993**).

#### ❖ Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3)

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dans la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides féruliques ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Tableau 4) (**Macheix et al., 2005**).

Ces acides sont retrouvés dans tous les fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr. Les laitues, les carottes, les myrtilles, les patates douces (entières, cuites, et crues), les pommes de terre, les pêches, le jus d'orange, les pommes, les tomates et le raisin sont les sources les plus riches en acides hydroxycinnamiques (**De la Rosa et al., 2009**).

**Tableau 4 :** principaux acides hydroxycinnamiques (**Sarni-Manchado et cheynier, 2006**).

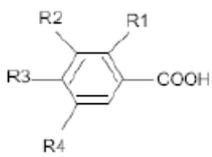
Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

#### ❖ Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1)

Les acides hydroxybenzoïques (*p-hydroxybenzoïque*, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, un particulier de la lignine et de certains tannins (**Macheix et al., 2005**).

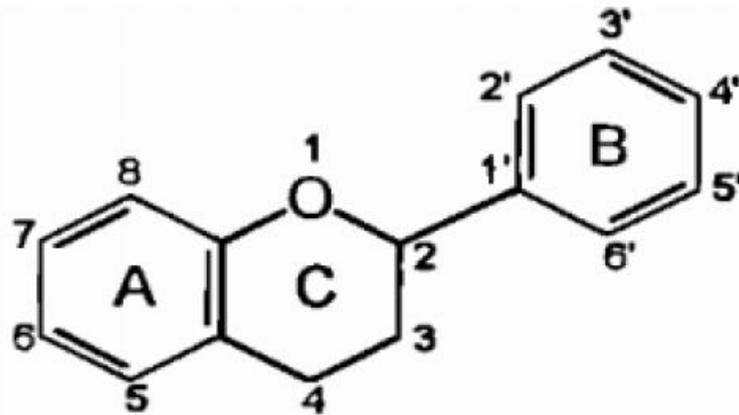
Certains fruits, le thé, les pommes de terre sont des sources importantes des acides hydroxybenzoïques, ainsi que certains condiments (herbes et épices) peuvent également contenir des acides hydroxybenzoïques(Chanforan, 2010).

Tableau 5 : principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

I.3.2.2. Flavonoïdes (C6-C3-C6)

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or (Figure 4). Ils sont stockés sous une forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique (Lilou *et al.*, 2008).

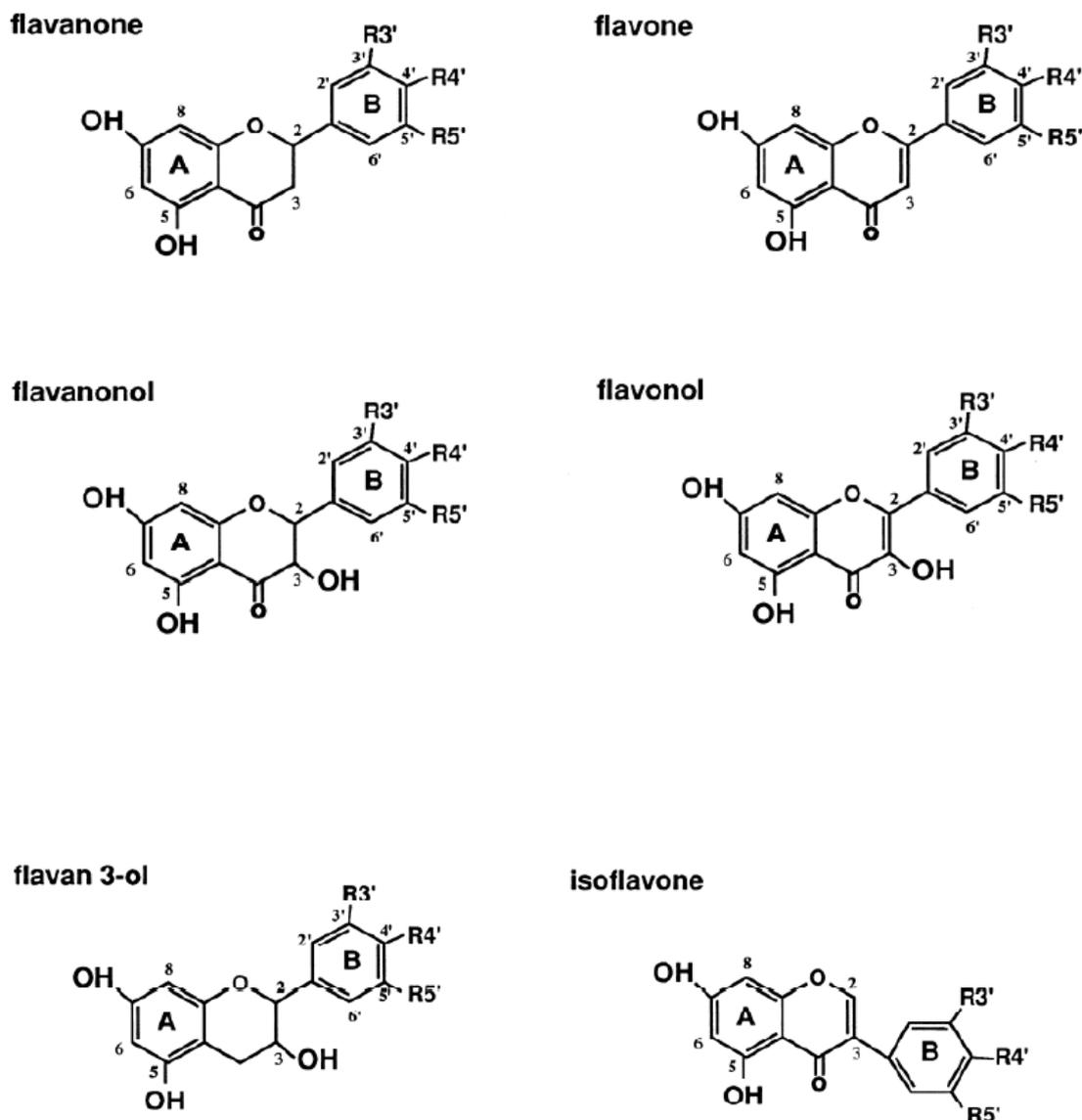


**Figure 4** : structure de base des flavonoïdes (Krishna *et al.*, 2001).

Selon leurs structures moléculaires, les flavonoïdes sont répartis en différentes classes: flavanones, flavones, flavonols, flavanes, isoflavones et anthocyanines (Figure 5) (Benbrook, 2005).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2,3.

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane.
- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, la flavane est appelé Flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée, le composé est nommé Flavone.
- Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de Flavonol.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane (Bouakaz, 2006).



**Figure 5** : structure des différentes classes de flavonoïdes (Gamet-Payrastreetal., 1999).

### ➤ Anthocyanes

Ce sont des substances solubles dans l'eau et responsables de la couleur rouge, bleu et violet de la majorité des plantes en particulier des fleurs et des fruits (Mazza et Miniati, 1994). Les anthocyanes ont une structure en C6-C3-C6 et comptent plus de 200 composés différents dans le règne végétal (Ribereau, 1968 ; Macheix *et al.*, 1990).

La couleur de chaque pigment dépend du model d'hydroxylation et de methoxylation du cation flavylium (Wang et Mazza, 2002).

### I.3.2.3. Tannins

Les tannins sont des molécules à poids moléculaire élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques. Ce sont des polyphénols solubles dans l'eau et sont présents dans les écorces des fruits de quelques plantes (**Gulçin *et al.*, 2010**).

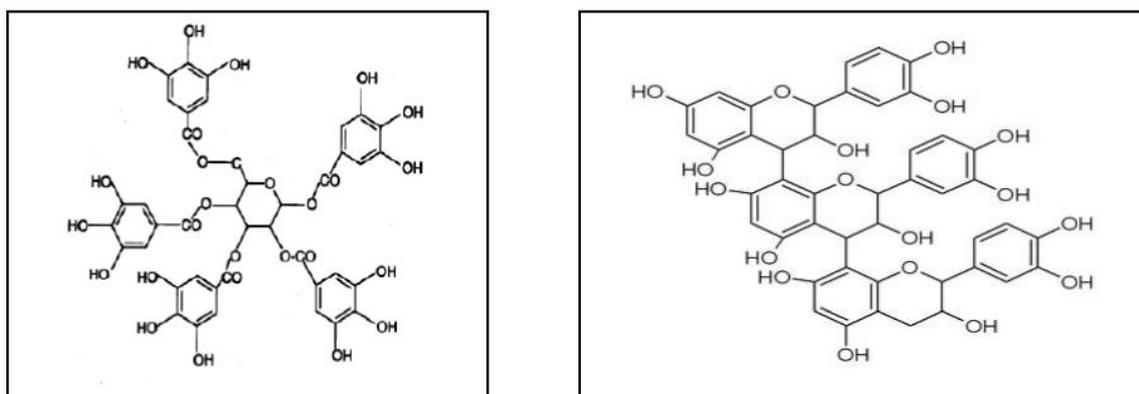
Sur le plan structural, les tannins sont divisés en tannins hydrolysables et tannins condensés ou pro anthocyanidines(**Al-zoreky, 2009**).

#### ➤ Tannins condensés

Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol dérivés de la catéchine ou de son nombreux isomère. Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (**Cowan, 1999**).

#### ➤ Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide-l'acide ellagique (Figure 6) (**Cowan, 1999**).



(b)

(a)

**Figure 6** : structure chimique des tannins hydrolysables (b) et des tannins condensés (a).

### I.3.2.4. Stilbènes (C6-C2-C6)

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par un double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants sont le trans-déhydrodimère et l' $\epsilon$ -viniférine (**Waterhouse *et al.*, 1994** ; **Langcake *et al.*, 1981**).

Les Stilbènes sont connus pour leurs propriétés anti oxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL)(Frankel *et al.*, 1993).

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes. Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier *et al.*, 2006).

**I.3.2.5. Quinones**

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-Diéniq (ortho-quinones) (Bruneton, 1993). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Cowan, 1999).

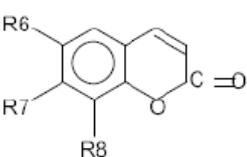
**I.3.2.6. Lignines**

La lignine représente une biomasse considérable produite annuellement par les végétaux, la deuxième après la cellulose (Baucher *et al.*, 1998).

**I.3.2.7. Coumarines**

Substance issues du métabolisme de la phénylalanine, les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques, les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Ce sont des substances antivirales, vasodilatatrices, tranquillisantes, anticoagulantes (au niveau de cœur), hypotensives et également bénéfique en cas d'affection cutanées (Tableau 6)(Kansole, 2009).

**Tableaux 6 :** principaux types de coumarine (Marchiex et coll, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnéto

**I.3.3. Biosynthèse des composés phénoliques**

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies métaboliques. Celle de polyacétates et celle de l'acide shikimique. Au cours de la voie de l'acide Shikimique, il se forme des acides cinnamiques et des dérivés (phénols, coumarines, lignanes...).

➤ **La voie de shikimate**

C'est une voie de biosynthèse des composés aromatiques. Elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Kening *et al.*, 1995**).

➤ **La voie de polyacétates**

Cette voie de biosynthèse, permet de produire des composés aromatiques notamment les chromones, les iso coumarines, et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques, due à cette origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbénes et les xanthones (**Bouharoum, 2007**).

**I.6. Propriétés biologiques des polyphénols**

Les recherches sur les composés phénoliques en générale sont poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-athérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouriet *et al.*, 2007**).

**I.6.1. Activité antioxydant des polyphénols**

Les polyphénols jouent un rôle important comme système de défense contre les radicaux libres (RL), leur activité antioxydante se produit par plusieurs mécanismes:

Absorption des rayons UV: la naringénine et la rutine ont un effet protecteur contre les UV, en empêchant ainsi la surproduction des RL (**Tripolietal., 2007**).

Neutralisation des radicaux libres et chélation des métaux : des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité des polyphénols d'agrumes à neutraliser les radicaux libres et à chélater les métaux principalement le fer (**Del-Rio *et al.*, 2004**).

**I.6.2. Activité antimicrobienne des polyphénols**

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes.

Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention dû à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011).

**I.6.3. Activité antivirale**

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes des agrumes ont une activité antimicrobienne très importante.

La quercétine et l'héspéridine inhibent l'infectiosité et la réplication de l'herpe simplex, le poliovirus, le virus parainfluenza et le virus syncytial (Tripoli *et al.*, 2007).

**I.6.4. Activité anti-inflammatoire**

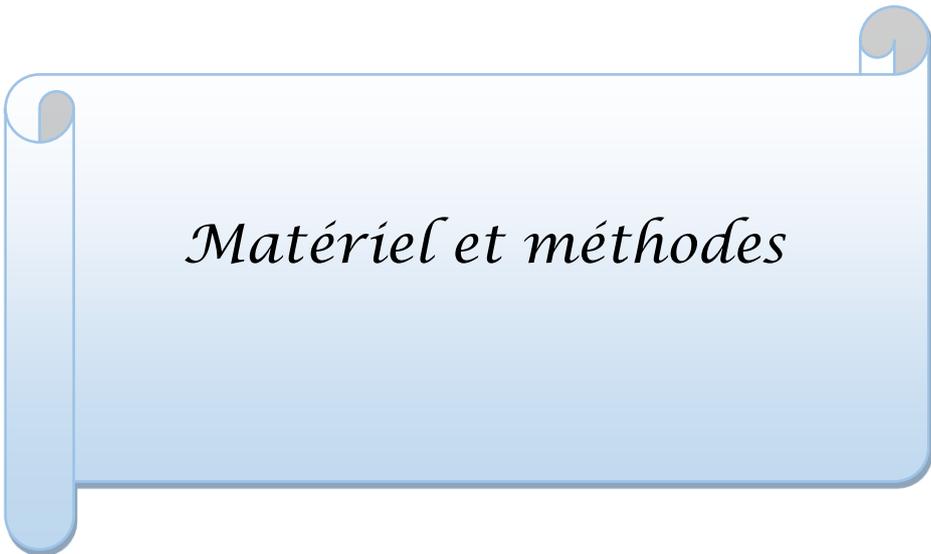
Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiesterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur l'activation de certains nombres de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B (Manthey *et al.*, 2001).

### **I.6.5. Activité antiallergique**

Les citrus sont également des propriétés antiallergiques qui sont dues à sa richesse en quercetine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur impliqué dans les réactions allergiques et l'inflammation (**Gonzalez Molina *et al.*, 2010**).

### **I.6.6. Activité anti-cancer**

De nombreuses études ont montré que les polyphénols parviennent à exercer des effets anti-prolifératifs des cellules cancéreuses. Ils arrivent à bloquer la réplication de l'ADN en piégeant l'hydroxyle OH de l'amorce (brin court de l'ADN qui comporte une extrémité 3OH libre et sert comme point de départ à la synthèse de l'ADN). Ils sont actifs contre de nombreux cancers du colon, estom, foie, sein, prostate, poumon, peau et vessie, à tous les stades de la cancérogenèse (**percival *et al.*, 2004**).



*Matériel et méthodes*

Notre travail consiste en une étude phytochimique, suivi d'une évaluation de l'activité antimicrobienne des substances bioactives (Polyphénols totaux) de Bigaradier *Citrus aurantium L.*

Ce présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Biologie des populations et des organismes (BPO) de l'université de M'Hamed Bougara Boumerdes(UMBB).

### II.1.Matériel

#### II.1.1.Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est représenté par :

- La plante *Citrus aurantium L.*
- Les souches microbiennes.

##### II.1.1.1.Matériel végétal

Les parties utilisées pour cette étude sont les feuilles et les pépins.



**Figure8** : les feuilles de bigaradier.



**Figure 9** : les pépins de bigaradier.

➤ **Echantillonnage**

La récolte de la bigarade et ses feuilles est réalisée dans la région de Boumerdes durant le mois de janvier (2019). Les fruits étaient bien murs et ne présentent aucun signe de blessure ou d'infection. La récolte s'est faite manuellement, au hasard, sur le même arbre.



**Figure 10** : feuilles et fruits de bigaradier.

➤ **Présentation de la zone de récolte**

Boumerdes est une ville côtière du centre d'Algérie, anciennement Rocher Noir pendant la colonisation française, est une commune de la wilaya de Boumerdes, dans la daïra de Boumerdes.



**Figure 11** : carte géographique de la région de Boumerdes ([www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)).

## II.1.1.2. Matériel microbiologique

Le support microbien utilisé est composé de dix souches bactériennes qui sont fournies dans des milieux de conservation gélose nutritive (GN), représenté au tableau 7 :

**Tableau 7** : souches microbiennes utilisées dans l'évaluation de l'activité antimicrobiennes du Bigaradier *Citrus aurantium L.*

Souches	Type de Gram	Provenance	Familles
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Hôpital (Thenia )	<i>Enterococcaceae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 10348	-	Hôpital(Rouiba )	<i>Moraxellaceae</i>
<i>Bacillus sp</i> ATCC 6633	+	Hôpital (Thenia )	<i>Bacillaceae</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	Hôpital (Rouiba )	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Pseudomonace aeruginosa</i> ATCC27853	-	Hôpital (Zmirli)	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Streptococcus pyogenese</i> groupe A	+	Hôpital (Rouiba )	<i>Streptococcaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+	Hôpital(Thenia )	<i>Micrococcaceae</i>
<i>Klebseilla pneumoniae</i> ATCC 4352	-	Hôpital (Rouiba )	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	-	Hôpital (Thenia )	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Enterobactere cloacea</i> ATCC 655	-	Hôpital (Zmirli)	<i>Enterobacteriaceae</i>

**Tableau 8** :souches fongiques utilisées pour l'activité antifongique du Bigaradier *Citrus aurantium L.*

Dermatophyte (champignons filamenteux)	Levure	Moisissures
<i>Microsporum canis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Trichophyton glabrum</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Levure de Malassezia</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Trichosporon spp</i>	

### II.1.2. Matériel non biologique

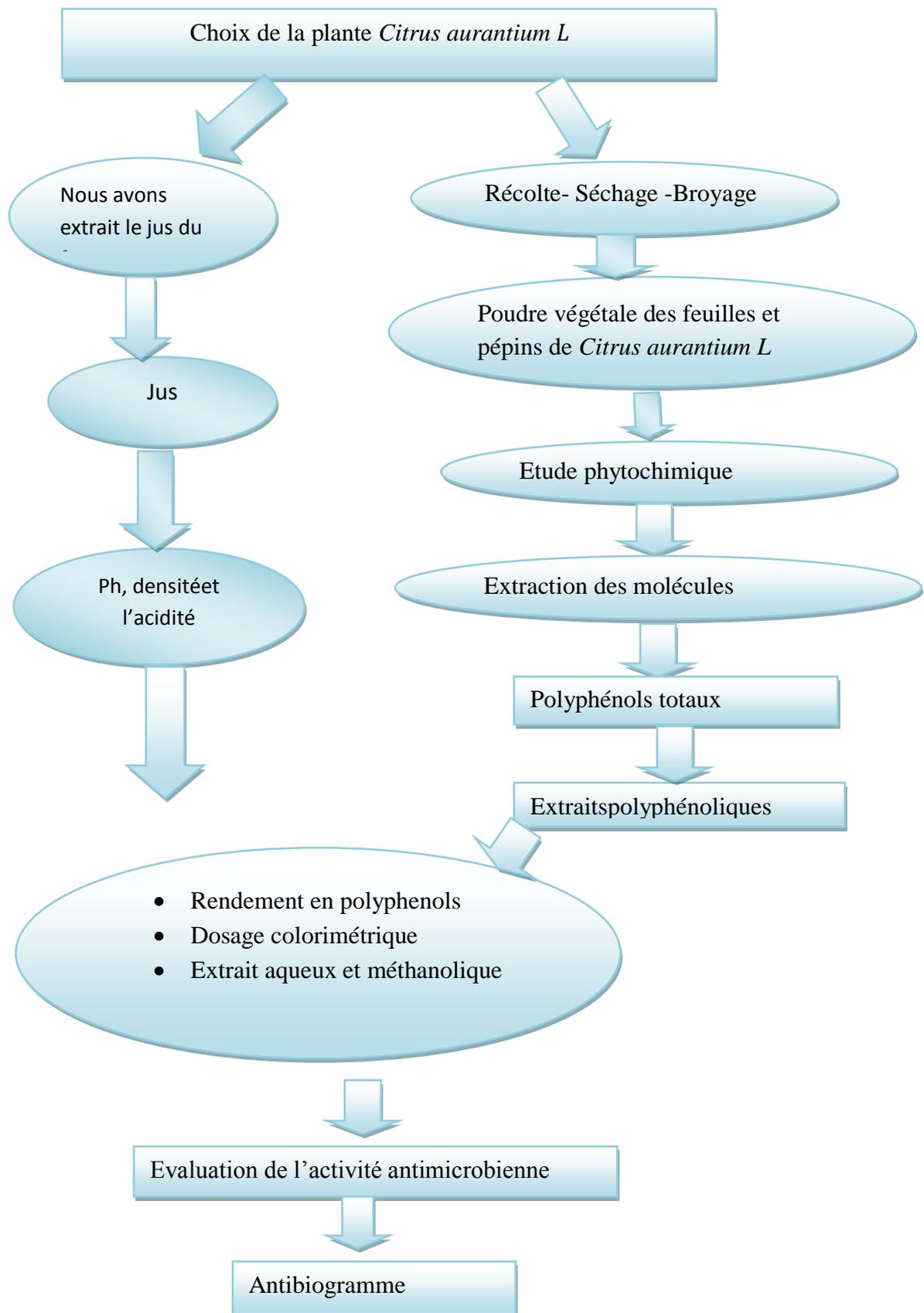
Afin de réaliser cette étude, un ensemble de matériel classique composé d'appareils, de réactifs, de produits chimiques et de verreries nous a permis de réaliser cette étude .

### II.2. Méthodes d'étude

Notre travail est réalisé par trois étapes

- Un screening phytochimique de la poudre végétale de bigaradier.
- Une extraction et une caractérisation des polyphénols totaux
- Une évaluation de l'activité microbiologique des substances bioactives extraites

L'ensemble des étapes de ce travail est illustré dans le diagramme ci-dessous, (**Figure 12**) :



**Figure 12 :** schéma général des différentes étapes du travail.

### II.2.1. Séchage des feuilles et pépins

Cette étape est réalisée dans le but d'abaisser la teneur en eau des feuilles récoltées, et d'empêcher ainsi les réactions qui peuvent se produire. Ceci va permettre de limiter la prolifération des microorganismes. Les parties récoltées sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant deux semaines (**Figure 13 et 14**)



**Figure 13:**feuilles de bigarade après séchage.      **Figure14:**pépins de bigarade après séchage.

### II.2.2. Broyage des feuilles et des pépins séchés

Les feuilles séchées sont réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (**Figure 15 et 16**). La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'air et de l'humidité, dans des bocaux en verre hermétiquement fermés. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction des polyphénols totaux.



**Figure 15:** poudre végétale des feuilles.

**Figure 16:**poudre végétale des pépins.

### II.3. Test phytochimique (Screening phytochimique)

Les tests phytochimique réalisés sur la plante ont pour objectif de rechercher les substances bioactives, en utilisant une série de méthodes colorimétriques décrites par (**Vijayalakshmi *et al.*, 2012; Bagre *et al.*, 2007; Khaldi *et al.*, 2012.**) Ils sont effectués soit sur la poudre de la plante, soit sur son infusé à 20 %.

- **Préparation de l'infusé à 20%**

L'infusé à 20% des feuilles et des pépins du bigaradier est préparé par l'addition de 20g de poudre végétal à 100ml d'eau distillée chaude. Après 15 minutes, le mélange est filtré. Le filtrat obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

La méthode de screening phytochimique de *Citrus aurantium*L est présentée dans le tableau 9ci-dessous.

**Tableau 9:** méthode de screening phytochimique.

Type d'échantillon	Composé mis en évidence	Réactifs ajoutés	Résultat positif
<b>Infusé</b>	Anthocyanes	5 ml d'infusé + quelques gouttes d'HCL	Une coloration rouge
	Iridoïdes	2 ml d'infusé + quelques gouttes d'HCL puis chauffer le mélange sur une plaque chauffants.	Une coloration bleue
	Mucilage	1 ml d'infusé dans un tube à essai +5 ml d'alcool absolu pendant 10 ml	Apparition d'un précipité floconneux
	Flavonoïdes	5 ml d'infusé + 5 ml d'HCL et un coupeau de MG et 1 ml d'alcool isoamilique	Coloration rouge orangée
	Tannins Totaux	5 ml d'infusé + quelques gouttes d'une solution de Fe CL <sub>3</sub> à 5%	Coloration bleue noir
	Tannins Catéchiques	15 ml d'infusé +7 ml de réactif de Stiansy.	Une coloration rouge
	Tannins Galliques	5 ml d'infusé sont mélangés avec 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCL <sub>3</sub> .	Une coloration bleu foncé
	Saponozides	2 ml d'infusé + quelque gouttes	La formation d'un précipité blanc

		d'acétate de plomb.	
	Sucres Réducteurs	5 ml d'infusé +5ml de réactif de Fehling pendant 3 min aubain-marie.	La formation d'un précipité rouge brique.
	Caroténoïdes	10 ml d'infusé +3 ml d'HCL et 3 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	Une coloration vert-bleu.
	Polyphénols	2 ml d'infusé + une goutte de chlorure férique (FeCl <sub>3</sub> )à 2%	Une coloration bleue-noirâtre ou vert foncé.
<b>Poudre végétal</b>	Leuco-Anthocyanes	Rajouté 2g de la poudre végétal dans 20 ml d'un mélange de propanol/acide chlorhydrique (v/v), le mélange est porté en bain marie bouillant pendant quelques minutes.	Une coloration rouge
	Alcaloïdes	Macérer 5g de la poudre végétal humecté avec l'Ammoniaque 1/2 pendant 24 heures dans 50 ml d'un mélange éther chloroforme (3v/v). Le filtrat est épuisé par l'acide	Des réactions de la précipitation sont réalisées sur la solution chlorhydrique.

		chlorhydrique 2N.	
	Coumarines	2g de poudre végétale sont bouillés à reflux dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 minutes, puis filtrés. Le filtrat obtenu est mélangé avec 5 gouttes d'Hydroxydes de potassium (KOH) à 10% et quelques gouttes d'HCL à 10%.	La formation d'un trouble.
	Quinones	2 g de poudre végétale sont humectés avec 2 ml d'HCL, puis on ajoute 20 ml de chloroforme. Après 3 heures, le filtrat récupéré est agité avec 5 ml d'ammoniaque ½.	La formation d'une coloration rouge.
	Protéines	1 g de poudre végétale est dissout dans 2 ml d'hydroxyle de sodium (NaOH) à 20%. Rajouté quelques gouttes de CuSO4.	Une coloration violette avec une teinte rougeâtre.
	Lipoides	Macérer 5 g de	

		<p>poudre végétale dans 30 ml d'éther de pétrole pendant 30 min, puis on filtre. On évapore le filtrat sur la plaque chauffante. Ajouté aux résidus gras 3 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.</p>	<p>Une coloration violette.</p>
	Stérols et poly terpènes	<p>Un mélange d'un 1 g de poudre végétale avec 1 ml d'anhydride acétique dans une capsule est à chaude .Puis reprise dans un tube à essai dans lequel est coulé 0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.</p>	<p>Une coloration violette qui vire au bleu puis au vert.</p>
	Glucosides	<p>2g de poudre végétale + quelques gouttes d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).</p>	<p>La formation d'une coloration rouge brique.</p>
	Amidon	<p>2 g de poudre végétale + quelques gouttes d'iode.</p>	<p>La formation d'une coloration violette.</p>

## II.4. Propriétés physico-chimiques du jus de bigarade

### II.4.1. Densité du jus

La densité du jus mesurée avec un pycnomètre, qui est généralement composé de deux éléments : une fiole et un bouchon.

La capacité du pycnomètre propre étant connue avec précision (10ml) (il suffit de peser au moyen d'une balance de précision le pycnomètre avant et après remplissage pour déterminer par calcul la masse volumique d'un produit liquide).

La densité est calculée selon la formule suivante :

$$D = \left[ \frac{M_1 - M_0}{V} \right] / \left[ \frac{M_2 - M_0}{V} \right]$$

$M_0$  : la masse du pycnomètre vide.

$M_1$  : la masse du pycnomètre rempli de jus.

$M_2$  : la masse du pycnomètre rempli d'eau distillée.

$V$  : volume du pycnomètre.

### II.4.2. pH du jus

Le pH du jus est mesuré à l'aide d'un PH-mètre.

Le pH-mètre est calibré grâce à des solutions tampons à des pH standards et connus, puis la sonde du PH-mètre est immergée dans l'échantillon et la valeur du pH est affichée directement sur le pH-mètre.

### II.4.3. Acidité du jus

L'acidité est la somme des acides organiques et minéraux exprimée en fonction de l'acide dominant (Acide citrique pour le jus d'oranges), elle est déterminée par titrage avec l'hydroxyde de sodium (NaOH, 0,1 M), en présence de la phénolphthaléine comme indicateur coloré, jusqu'au point d'équivalence de la courbe de neutralisation (**Bouroukaa, 2012**). Cinq ml de jus dilué (2/5) sont versés dans un bécher muni d'un agitateur. Ajouter quelques gouttes de phénolphthaléine et tout en agitant, on titre avec une solution d'hydroxyde de sodium (0,1M), dans une burette, jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistant pendant 30s.

L'acidité du jus est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité} = \text{Nb} \times \text{Vb} \times \text{Mr} / \text{Va} \times \text{P}$$

Nb : la normalité de la solution d'hydroxyde de sodium (0,1 N).

Va : volume du jus en ml (5ml).

Mr : masse molaire de l'acide citrique (192,13g /mol).

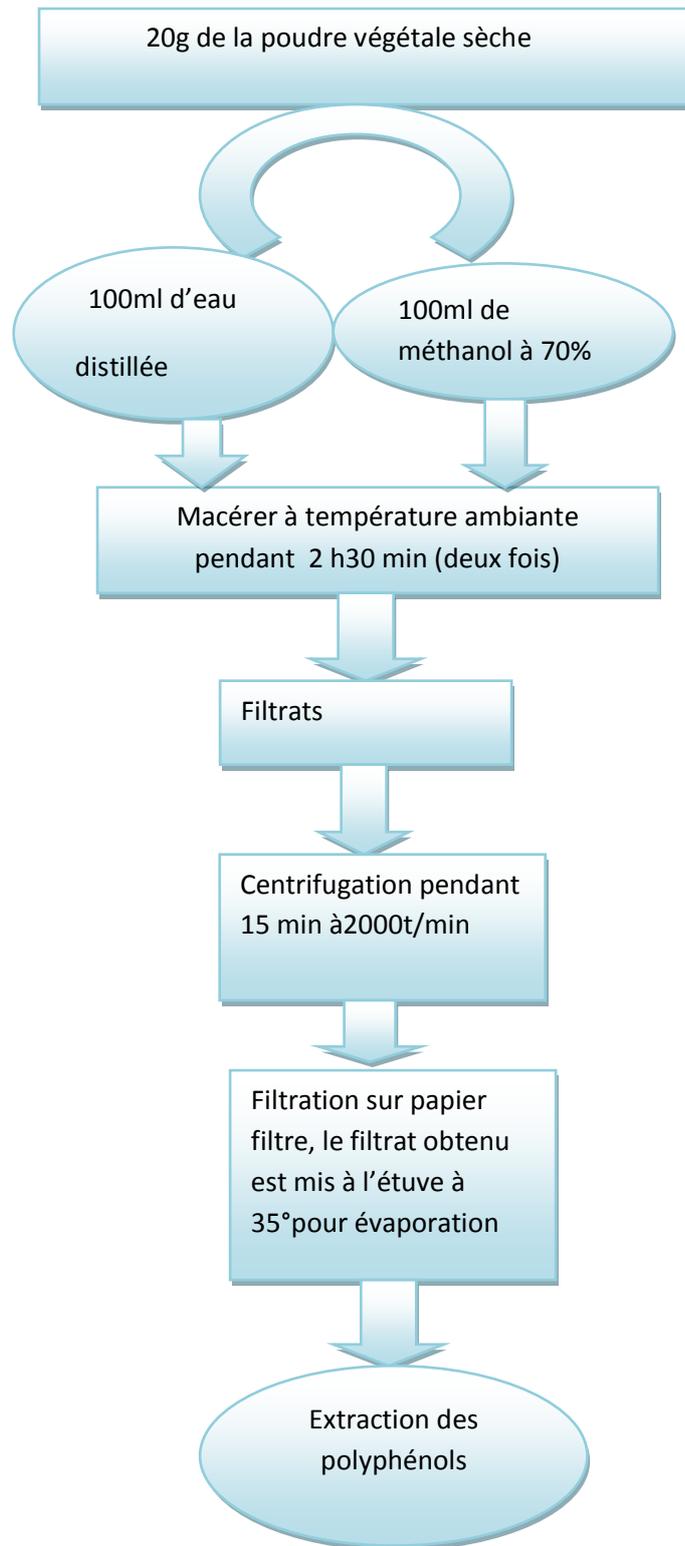
Vb : volume d'hydroxyde de sodium (ml).

P : nombre de protons portés par l'acide citrique.

### II.5. Extraction des polyphénols

Pour extraire les polyphénols totaux, 20g de la poudre végétale de *Citrus aurantium*L (soit des feuilles ou des pépins) sont macérés à température ambiante pendant 2,5 heures avec 100ml de solution aqueuse à un solvant (méthanol) à 70% et eau distillée. Après filtration sur tissu mousseline, les filtrats sont centrifugés pendant 15 min à 2000tr / min à température ambiante, filtrés sur papier filtre puis placé l'extrait obtenu à l'étuve pour faire évaporer le solvant à 45°C. Après évaporation, on le conserve à 4° C jusqu'à utilisation(**figure17**).

Concernant le jus, l'extraction des polyphénols n'a pas été utilisée, on l'a utilisé frais.



**Figure 17:** protocole de l'extraction des polyphénols.

### II.5.1. Calcul du rendement

Le résultat de pourcentage du rapport de la masse de l'extrait obtenu sur la masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction (20g), nous donne le rendement, en appliquant la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{m-m_0}{mt} \times 100$$

m : la masse du ballon après évaporation.

m<sub>0</sub> : la masse de l'extrait brut.

mt : la masse totale de poudre végétale utilisée dans l'extraction (**Clémence et Dangmo 2009**).

### II.5.2. Dosage des composés phénoliques

#### ❖ Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par (**Zhishen et al., 1999**).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

La teneur en flavonoïdes est déterminée selon la méthode rapportée par **Ordonnez et al., (2006)**. Zéro et demi ml de jus ou extraits de chaque échantillon sont additionnés à 2 ml de chlorure d'aluminium (2%). Après 20 min d'incubation, l'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 390 nm.

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage et elle est exprimée en mg équivalent de quercétine par 100 g de matière sèche ou par 100 ml de jus frais.

### ❖ Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué par l'utilisation par de Folin-Ciocalteu (FC) :500µl de l'extrait de chaque échantillon ou de jus de *Citrus aurantium L* sont mélangés avec 500µl d'eau distillée. On rajoute ensuite 500µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min de repos, on ajoute 500µl de carbonate de sodium à 20%.Un blanc est préparé dans les mêmes conditions sauf qu'on n'ajoute pas l'échantillon. Le mélange est laissé incubé pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance de l'extrait est mesurée à 760 nm contre le blanc par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer) (**Lapornik et al., 2005**).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique /g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Kafkas et al., 2009**).

Le réactif de folin-ciocalteu voit ses propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules, il réagit avec la fonction OH des phénols, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée, permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues (**Khatabi et al., 2011**).

## II.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé citée par **Sacchetti et al. (2005)** ; **Celiktas et al. (2007)**. Cette dernière permet d'évaluer l'effet des extraits des feuilles, des pépins et des jus du *citrus aurantium L* vis-à-vis des différentes souches bactériennes.

### II.6.1. Principe

L'aromatogramme est une méthode qui se réalise in vitro, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion en milieu gélosé. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactérienne , et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (**Fauchère et Avril, 2012**).

### II.6.2. Protocol expérimental

On a utilisé la méthode de (Mazari *et al.*, 2010).

- **Revivification et repiquage des germes**

La Revivification des souches est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité biologique est nulle à l'état conservé. Elle se fait en réalisant un repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance (Muller-Hinton pour les bactéries).

Pour cela les souches à tester sont ensemencées par stries dans des boîtes de pétries et incubées à 37°C pendant 24 heures.

- **Préparation de l'inoculum**

Préparer des tubes stériles contenant 10 ml d'eau physiologique à 0.9%, prélever quelques colonies de bactéries ou de levures et les additionner à cette eau. Réaliser une suspension microbienne. Agiter les tubes pendant quelques secondes et réaliser une lecture de la densité de chacune des suspensions préparées, à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm.

L'absorbance doit être comprise entre (0.2 et 0.3), qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes /ml (la concentration minimale qui assure la croissance microbienne).

- **Préparation des disques**

Après stérilisation par l'autoclave, les disques Wattman de 6 mm de diamètres ont été imprégnés avec notre extrait brut de composés phénoliques à raison de 20µl par disque. Par ailleurs, des disques témoins renfermant le solvant d'extraction (Méthanol) sont préparés. Des dilutions en séries de 1/2 à 1/6 sont préparées à partir de la solution mère

- **Préparation des milieux de culture**

Cette étape consiste à liquéfier les milieux gélosés MH dans un bain Marie à 95°C. On coule aseptiquement les milieux dans des boîtes de pétri. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être solidifiées quelques minutes à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

- **Ensemencement**

Des boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sontensemencées par étalage à l' aide d' un râteau stérile, l' ensemencement s' effectue de telle à sorte à assurer une distribution homogène.

- **Incubation**

Selon **Duval et Soussy (1990)**, les boîtes sont mises à 4<sup>0</sup>C pendant 2 à 4 heures pour assurer la diffusion des extraits testés dans le milieuensemencé. Puis on incube les souches bactériennes à l' étuve à 37<sup>0</sup>C pendant 24 heures.

- **Lecture des résultats**

La lecture des résultats se fait après le temps d' incubation par la mesure du diamètre de la zone d' inhibition autour de chaque disque à l' aide d' une règle en (mm).

L' effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d' une zone d' inhibition, et en fonction du diamètre d' inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. La lecture se fait comme suit :

**Tableau 10** : estimation de l' activité antimicrobienne et de la sensibilité des souches

<b>Moreira <i>et al.</i>, (2005)</b>	
Diamètre (mm)	Interprétation
$\emptyset < 7$	Non sensible /résistante (-)
$7 < \emptyset < 14$	Sensible (+)
$15 < \emptyset < 19$	Très sensible (++)
$\emptyset < 20$	Extrêmement sensible(+++)

### II.7. Activité antifongique

Cette activité a porté sur l'effet de l'extrait des feuilles, pépins et jus de bigaradier sur la croissance des dix champignons *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Levure de Malassezia*, *Trichosporon spp*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton glabrum* et *Microsporum canis* sur milieu PDA (potato Dextrose Agar).

- **Préparation des milieux de culture**

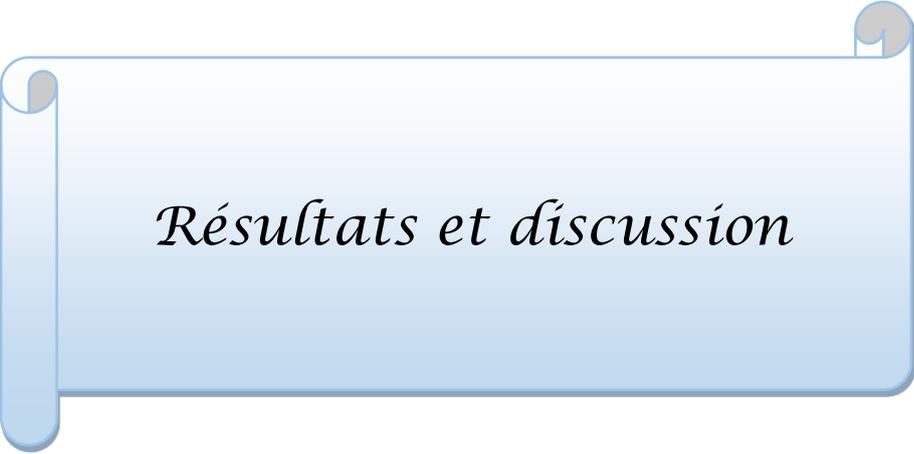
Le milieu PDA a été coulé dans des boîtes de Pétri stériles répartie uniformément dans les boîtes. Laisser solidifier les boîtes coulées à côté du bec bunsen avant leur emploi.

- **Préparation de l'inoculum mycélium**

L'inoculum est préparé à partir de la culture pure de 24 heures, obtenue sur milieu d'isolement des champignons dans l'eau physiologie.

- **Ensemencement**

Des boîtes de Pétri stériles préalablement préparées, sontensemencées par étalonnage à l'aide d'une pipette de pasteur stérile. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assuré une distribution homogène des champignons. Incuber les boîtes à 25C<sup>0</sup> pendant 24h. À l'aide d'une pince stérile, les disques contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose. Les boîtes au incubées à 35C<sup>0</sup> pendant 5 jours.



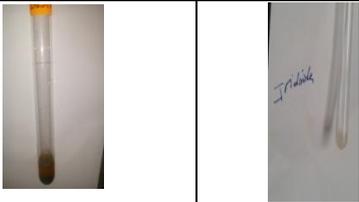
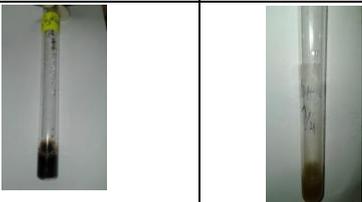
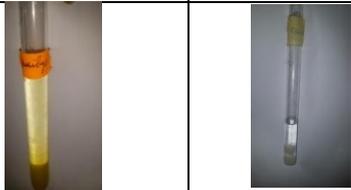
*Résultats et discussion*

**1. Propriétés physico-chimiques**

Le screening phytochimique a été effectué sur les extrais méthanolique et extrait aqueuse de *Citrus aurantium L.* Le choix du test est en fonction du métabolite secondaire à détecter.

Plusieurs groupes de métabolites secondaires ont été mis en évidence dans les extraits. Il s'agit de polyphénols, flavonoïdes, tanins et quinones dans les deux extraits avec absence des saponosides et des quinones (Tableau 11).

**Tableau 11** : résultats du test phytochimique.

Caractérisation phytochimique		Les feuilles du bigaradier	Les pépins du bigaradier
Composés Testés	Les résultats obtenus		
Anthocyanes		-	-
Iridoïdes		-	-
Polyphénols		+++	++
Mucilage		+++	+++

Flavonoïdes			+++	-
Tannins totaux			-	-
Tannins Catéchiques			-	-
Tannins Galliques			-	-
Saponosides			+++	+++
Sucres Réducteurs			+++	-
Caroténoïdes			-	-
Leuco-Anthocyanes			-	-

Alcaloïdes			-	-
Coumarines			+++	+++
Quinones			-	-
Protéines			-	-
Lipoïdes			-	-
Stérols et Polyphénols			-	-
Glucosides			+	+++

Amidon			-	-
--------	---	---	---	---

Avec :

(-) : absence de substance active.(++) : Moyennement positif.

(+) : présence de substance active.(+++) : Fortement positif.

Selon les résultats obtenus du test phytochimique effectué sur *Citrus aurantium L* il se révèle que les feuilles du bigaradier présentes une forte proportion de flavonoïdes, polyphénols, saponosides, mucilages, coumarines et sucres réducteurs. Ils sont modérément riches en glucosides et lipoïdes.

D'après les résultats, on note une absence totale des tannins totaux, galliques et catéchiques, anthocyanes, leuco anthocyanes, amidon, quinones, Iridoïdes, caroténoïdes, protéines et des stérols.

En ce qui concerne les pépins de cette plante, ces tests ont montré leurs richesses en glucosides, saponosides, mucilages, polyphénols et coumarines.

En plus, les tests de recherche des tannins totaux, galliques, catéchiques et amidon, anthocyanes, Iridoïdes, sucres réducteurs, caroténoïdes, lipoïdes, leuco anthocyanes, flavonoïdes, protéines et des stérols ont été négatif sur cet échantillon.

Nos résultats sont accord avec ceux obtenus par **Baki(2018) et Meziane et Saidoune(2017)**.

L'étude phytochimique des extraits de *Citrus aurantium L* a montré que les différentes parties de cette plante (feuilles et pépins) présente de nombreux composés chimiques, En effet, l'étude d'**Atrous et Menzri (2015)** révèle la présence des flavonoïdes des anthocyanes et des leuco-anthocyane dans la plante *Citrus limon*.

## 2. Propriétés physico-chimique du jus

**Tableaux 12** : les résultats des tests physico-chimiques du jus

pH	Acidité	Densité
2.39	7.3	1.03

D'après le tableau 12 on a remarqués que :

### 2.1.pH de jus

D'après les résultats obtenus, on a constaté que le pH de la bigarade est de 2.39, il est plus faible que celui des oranges qui varie entre 3.0 et 3.5 (**Rangana et al. 1983**) et celle de limes avec un pH de 2,7.

**Kardeniz (2004)** a rapporté des valeurs de pH de 2.31 pour le jus de la variété Bigarade, les variétés Washington (3,48) et Tardive (3,34).

### 2.2. Acidité de jus

Il est connu que l'acidité est très élevée de la pulpe des agrumes. Elle est liée à la composition de la pulpe en acides organiques et plus particulièrement en acide citrique (**Pierre et Queiroz, 1979 ; Scheible et al., 2008 ; Sinclair, 1984 ; Vandercook, 1977**).

Les valeurs de l'acidité des jus étudiée (bigaradier) est de 7.3 g de l'acide citrique/l de jus. Une autre étude a rapporté une valeur de 6.66 g d'acide citrique/l de jus de bigarade de la région de Boumerdes (**Baki, 2018**).

Les oranges sont classées comme fruits acides, car leur matière soluble est essentiellement constituée d'acides organiques et de sucres (**Kardeniz, 2004**).

### 2.3. La densité

La densité du jus de notre échantillon est 1.03. Les travaux de certains auteurs ont rapporté les mêmes résultats (**Khaled Khodja, (2008) ; Baki, 2018**).

La **FAO (2005)** a rapporté des valeurs de densité de 1,05 pour le jus d'orange.

### 3. Rendement des extraits phénoliques

Après extraction des composés phénoliques, à partir de la poudre de *Citrus aurantium L* (feuilles et pépins) par la méthode de macération dans le méthanol (70%), le rendement de l'extrait polyphénolique brut est calculé à partir de la masse de l'extrait avant et après évaporation par rapport à 20g de poudre végétale.

#### Calcul du rendement

Le tableau (13) montre les rendements d'extraction obtenus pour les différents extraits méthanolique des feuilles et des pépins du bigradier.

Paramètres	Feuille méthanol	Pépins méthanol
La masse du ballon +extrait(g)	11,45	8,20
La masse du ballon vide (g)	10,20	6,45
La masse totale de poudre utilisée (g)	10	10
Le rendement (%)	12,5	17,5

D'après le tableau 13 on remarque que le rendement en composés phénoliques obtenu pour 20g de poudre végétale des pépins de *Citrus aurantium L* macérées dans le méthanol est de 17.5%.

Le rendement obtenu à la même quantité de la poudre végétale des feuilles macérées dans le méthanol est de 12.5%.

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, que l'extrait méthanolique des pépins donne le meilleur rendement d'extraction comparé à celui des feuilles.

Ces résultats obtenus au cours de cette étude sont compatibles que ceux notés par **Meziani et Saidoune (2017)** (un rendement de 36.6% pour l'extrait méthanolique des pépins et 30.3% pour l'extrait méthanolique des feuilles).

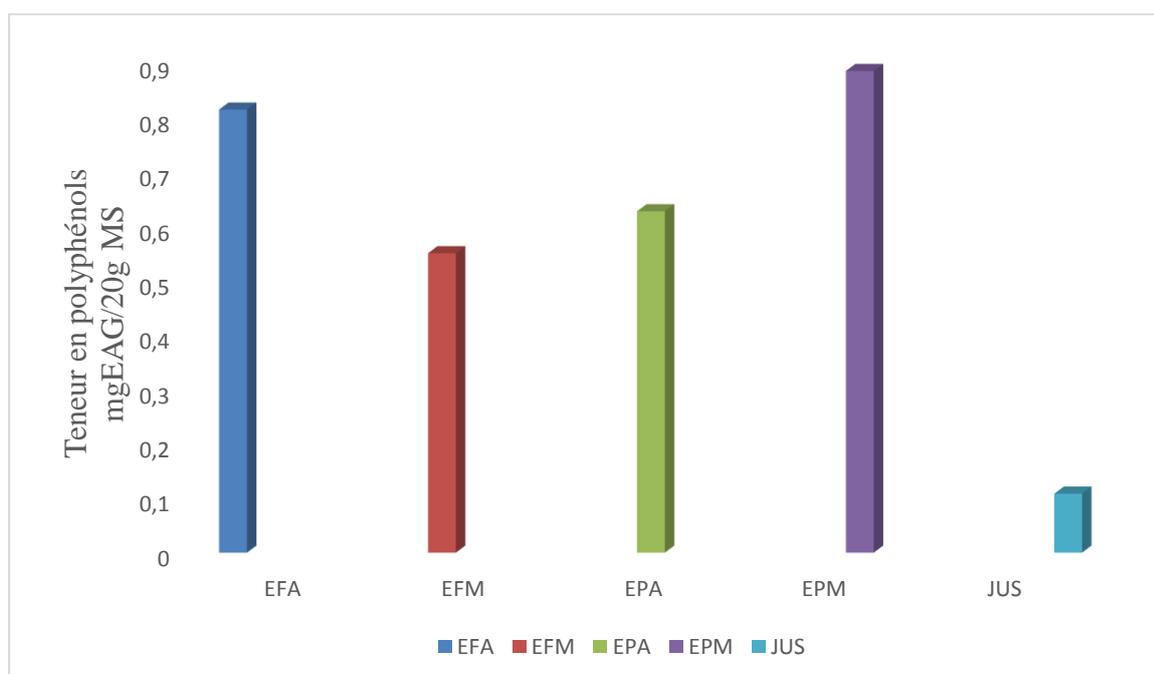
De même **Muthiah(2012)** signalé un taux d'extraction pour les feuilles du *Citrus aurantium L* de 17.5% en utilisant l'éthanol par rapport à 120g de matière sèche ;ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par notre étude.

Cette différence des rendements en polyphénols est en relation directe avec la nature de sol, le climat, l'âge de la plante, la période de récolte et la nature de solvant de l'extraction. Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la recherche bibliographique car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (Escribano-bailon et Santos-buelga, 2003).

### 3. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols des différents extraits a été réalisée selon une méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à une longueur d'onde de 760 nm (Huang *et al.* 2005).

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche et déterminé par l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ( $y = 0.0011x, R^2 = 0.997$ ). Les différents résultats obtenus sont illustrés dans la figure 18.



**Figure 18** : Teneurs en polyphénols des extraits du *Citrus aurantium L.*

EFA : extrait aqueux des feuilles

EFM : extrait méthanolique des feuilles

EPA : extrait aqueux des pépins

EPM : extrait méthanolique des pépins

Les résultats montrent que la meilleure teneur est celle de l'extrait méthanolique des pépins (0.887mg EAG /20g de MS) suivi par l'extrait aqueux des feuilles (0.816mg EAG /20g de MS) puis celle de l'extrait aqueux des pépins (0.629mg EAG /20g de MS). En revanche, l'extrait méthanolique des feuilles et de jus frais sont caractérisés par la plus faible teneur avec 0.552mg EAG /20g de MS et 0.109mg EAG /ml de MF respectivement.

Alors que **Bejer *et al.* (2012)**, en étudiant les feuilles d'orange, ont trouvé une teneur en composés phénoliques totaux de 584 mg équivalent d'acide caféique/ 100g MS.

**Tounsi *et al.*, (2011)** pour le jus des différentes agrumes (784.67 orange amer ; citron 333 ; sanguine 255 ; et celle de mandarine 106.22 mg EAG/ml MF.

**Karoui et Marzouk. (2013)** ont rapporté des teneurs de  $136.91 \pm 0.17$  mg/ml pour le jus de la bigarade.

Des résultats similaires ont été obtenus par **Kamran *et al.* (2009)** (13,22 à 22,320mgEAG/100g MS), et **Ghasemi *et al.* (2009)** pour les écorces des oranges douces (Washington, Sanguinelle et Valencia) a des valeurs qui varient de 13,290 à 16 mg EAG/100g MS et pour les fruits amère (Bigarade et Khosheii) des teneurs sont de 16 ,470 à 22,320 mg EAG/100gMS.

Nos données obtenus pour la pulpe des différentes variétés sont largement supérieures à celle de **Tsai *et al.* 2007** pour les jus de pamplemousse (rouge) et (blanc) est de  $8,26 \pm 1,2$  et  $5,62 \pm 0,5$  mg EAG/ml respectivement.

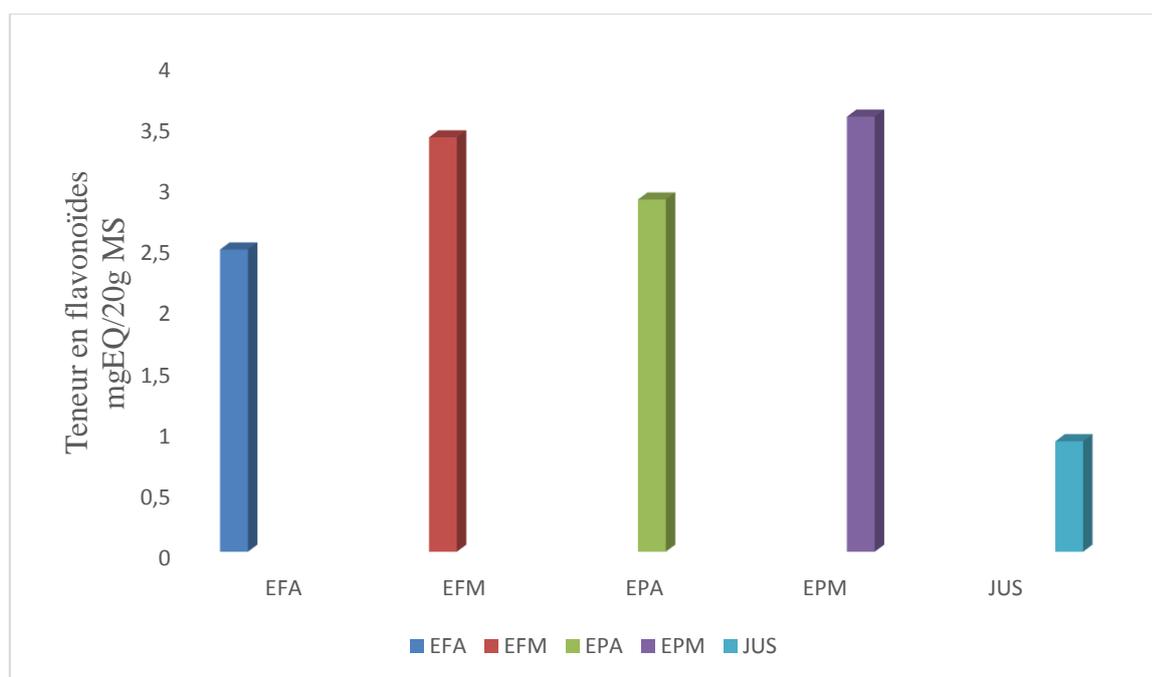
**Xu *et al.*, (2008)**, ont montré des teneurs dans le jus de la variété himline et citron qui sont de  $1499.71 \pm 16.53$  et  $751.82 \pm 13.34$  mg/ml

**Guimarães *et al.* (2010)** ont rapportés des teneurs en polyphénols pour le jus des différentes variétés d'agrumes pamplemousse 946 mg EAG/ml; citron jaune 11.17mg EAG/ml; citron vert 9.01mg EAG/ml; orange 12.41mgGAE/ml.

### 5. Dosage des flavonoïdes

Les analyses quantitatives des flavonoïdes sont déterminées à partir de l'équation de droite d'étalonnage ( $y = 0.0025 + 0.0122x$ ,  $R^2 = 0.9975$ ) tracée en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de la quercétine / g de la matière végétale sèche.

Les résultats de la concentration des cinq extraits de la plante *Citrus aurantium L.*, obtenus à partir de 20 g de poudre végétale, sont représentés dans la figure 19.



**Figure 19:** Teneurs en Flavonoïdes des extraits du *Citrus aurantium L.*

EFA : extrait aqueux des feuilles

EFM : extrait méthanolique des feuilles

EPA : extrait aqueux des pépins

EPM : extrait méthanolique des pépins

D'après les résultats, l'extrait méthanolique des pépins est le plus riche en flavonoïdes (3.56mg EQ /20 g MS). Suivi par l'extrait méthanolique des feuilles, de l'extrait aqueux des pépins et l'extrait aqueux des feuilles ont des teneurs moins riches dont les valeurs sont respectivement égales à 3.39mg EQ /20 g MS et 2.88mg EQ/20g et 2.47mg EQ/ 20g MS. Cependant, la plus faible teneur a été trouvée dans le jus frais (0,90mg EQ/ml MF).

Les teneurs de la présente étude sont largement inférieures à celle rapporté par **Oboh et Ademosun. (2012)** pour les écorces d'orange et pamplemousse (130 et 93 mg EQ/100g).

Selon **Tsai et al., 2007** la teneur en flavonoïdes de jus de pamplemousse (rouge) et (blanc) est de  $1,240 \pm 0,2$  et  $1,29 \pm 0,2$   $\mu\text{g EQ/ml MF}$ , respectivement.

**Guimarães et al. (2010)** ont indiqué des teneurs pour le jus d'agrumes des différentes variétés 0.32 pamplemousse ; 0.22 citron jaune ; 0.43 citron vert ; 0.62 orange mg EQ/ml MF..

**Karoui et Marzouk. (2013)** ont rapporté des teneurs de  $136.91 \pm 0.17$  mg EQ/ml MF pour le jus de la bigarade.

## 6. Evaluation de l'activité antibactérienne

Lors des tests antibactériens, on a noté que les différents extraits obtenus à partir des feuilles et des pépins de *Citrus aurantium L* agissent différemment vis-à-vis de dix (10) souches bactériennes testées.

### 6.1. Lecture des résultats

Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés à l'aide d'une règle graduée.

Les tableaux (14, 15 et 16) suivants résument les résultats de test d'activité antibactérienne exprimés par des diamètres d'inhibition de la multiplication des germes en mm, ainsi que les figures, photographiées qui présentent les résultats obtenus au laboratoire après incubation (voir l'annexe 3).

Le tableau 14 représente les résultats du test antibactérien de l' extrait aqueux et méthanolique des feuilles.

**Tableau14** : diamètres des zones d'inhibition en (mm) de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles du *citrus aurantium L.*

Bactérie	Extraits des feuilles du <i>citrus aurantium L</i>											
	Extrait méthanolique des feuille						Extrait aqueux des feuille					
Concentration	1/2	1/4	1/6	1/8	T M	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	S M
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	7	0	0	0	10	10	8	11	10	0	12
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus sp</i>	11	10	10	8	0	10	0	0	8	7	0	11
<i>Escherichia coli</i>	9	8	9	8	0	10	7	0	8	8	0	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	9	0	0	8	9	0	12
<i>Streptococcus pyogenese groupe A</i>	0	0	0	0	0	0	0	8	9	9	0	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	8	7	8	0	0	10
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobactere cloacea</i>	8	7	9	10	0	11	7	7	9	8	0	9
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	7	7	0	9	7	8	8	7	0	13

TM : témoin.

SM : solution mère

Le tableau 15 représente les résultats du test antibactérien de l'extrait aqueux et méthanolique des pépins.

**Tableau15** : diamètre des zones d'inhibition en (mm) de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins du *citrus aurantium L.*

Bactérie	Extraits des pépins du <i>citrus aurantium L</i>											
	Extrait méthanolique des pépins						Extrait aqueux des pépins					
Concentration	1 /2	1/4	1/6	1/8	TM	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8	0	7
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7	8	8	7	0	10	0	10	0	10	0	9
<i>Bacillus sp</i>	7	8	8	9	0	8	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	9	8	8	0	0	11	0	10	9	7	0	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	7	10	8	0	8	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus pyogenese groupe A</i>	7	8	0	8	0	9	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	0	0	7	8	0	10	7	0	0	0	0	8
<i>Proteus mirabilis</i>	8	0	8	7	0	11	7	8	0	0	0	12
<i>Enterobactere cloacea</i>	7	10	8	10	0	10	9	9	11	12	0	10

TM : témoin.

SM : solution mère

Dans le tableau 16, est montrée l'activité antibactérienne du jus.

**Tableau 16:** diamètres des zones d'inhibition en (mm) de la solution brute et de la dilution de jus du *citrus aurantium L.*

Bactérie	Jus du <i>citrus aurantium L.</i>					
	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	8	0	0	0	12
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus sp</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	10	9	8	0	0	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	10	7	0	0	16
<i>Streptococcus pyogenese</i> groupe A	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	10	8	0	0	0	14
<i>Enterobactere cloacea</i>	0	0	0	0	0	10

TM : témoin.

SM : solution mère

D'après les tableaux 14,15 et 16, on remarque que les extraits utilisés réagissent d'une manière différente vis-à-vis les souches bactériennes utilisés, on outre les germes testés ne présentent aucune sensibilité vers les témoins.

La souche *Enterococcus faecalis* est sensible aux extraits aqueux des feuilles et au jus dont le diamètre d'inhibition est de 12 mm, et moins sensible aux extrait méthanolique des pépins dont le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 7 et 8 mm, et résistante à l'extraits méthanolique des feuilles et aqueux des pépins.

Les souches *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes aux différents extraits de *Citrus aurantium L.*

La souche *Bacillus sp* est sensible à l'extrait aqueux des feuilles et méthanolique des feuilles et des pépins dont le diamètre d'inhibition est compris entre 7 et 11 mm, et résistante à l'extrait aqueux des pépins et au jus.

La souche *Escherichia coli* est sensible à tous les extraits aqueux, méthanolique et jus de *Citrus aurantium L* dont des diamètres d'inhibition compris entre 7 et 12 mm.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* est très sensible au jus avec une zone d'inhibition de 16 mm de diamètre, et moins sensible à l'extrait des feuilles aqueux et des pépins méthanolique dont le diamètre d'inhibition compris entre 7 et 12 mm, et résistante à l'extrait méthanolique des feuilles et aqueux des pépins.

La souche *Streptococcus pyogenese groupe A* est sensible à l'extrait aqueux des feuilles et à l'extrait méthanolique des pépins dont un diamètre de zone d'inhibition compris entre 7 et 12 mm, et elle est résistante à l'extrait méthanolique des feuilles, aqueux des pépins et au jus de *Citrus aurantium L.*

La souche *Staphylococcus aureus* est sensible à l'extrait aqueux des feuilles dont le diamètre d'inhibition compris entre 7 et 10 mm, et résistante à l'extrait méthanolique des feuilles et des pépins, à l'extrait aqueux des pépins et au jus.

La souche *Proteus mirabilis* est très sensible au jus dont le diamètre d'inhibition de 14 mm, et moins sensible aux extraits aqueux et méthanolique des feuilles et des pépins dont le diamètre d'inhibition compris entre 7 et 13 mm.

La souche *Enterobactere cloacea* est sensible à l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles et des pépins dont des diamètres des zones d'inhibition compris entre 7 et 12 mm, et elle est résistante au jus de *Citrus aurantium L.*

**Melendez et Capriles (2006)**, ont mis en évidence un effet antibactérien des extraits appartenant aux genres *Citrus* à l'égard de *S. aureus*, *Bacillus subtilis* et *E. coli*. Cette dernière espèce s'est montrée sensible à *Citrus aurantium* et *Citrus aurantifolia* avec des zones d'inhibition respectivement de 12 mm et 20 mm, quand à *S. aureus*, les zones observées sont respectivement de 27 et 30 mm Pour *Bacillus subtilis* les zones sont de 17 et 20 mm respectivement.

La paroi cellulaire des bactéries Gram positif est constituée par une couche contenant 35 à 60% de polysaccharides et moins de 2% de lipides alors que la paroi cellulaire de bactéries Gram négatif a une structure multicouche liée par une membrane externe contenant 15 à 20% de polysaccharides et 10 à 20% de lipides. Les parois des levures quant à elles sont composées en majeure partie de polysaccharides et lipides affecte significativement la perméabilité des différentes molécules antimicrobiennes et la réponse des microorganismes vis-à-vis de celles-ci (**Egbobor Eja et al., 2007 ; Djemai 2009**).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Jungkind, 1995**).

### **7. Evaluation de l'activité antifongique**

L'évaluation in vitro des propriétés antifongiques sur dix souches de champignons des polyphénols des extraits aqueux et méthanolique du *Citrus aurantium* sont présentés dans les tableaux suivants (17, 18 et 19), les figures, photographiées qui présentent les résultats obtenus au laboratoire après incubation (voir l'annexe 4).

Les résultats du test antifongique de l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles est présentés dans le tableau suivant.

**Tableau17:** valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues par l'extrait des feuilles de dix souches champignon.

Champignon	Diamètre moyen de la zone d'inhibition											
	Extrait méthanolique des feuilles						Extrait aqueux des feuilles					
Concentration	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM
<i>Candida albicans</i>	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	7	8	8	7	0	0	10	8	7	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	7	7	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9	12	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microsporium canis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton glabrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon spp</i>	0	0	0	0	0	0	11	8	8	0	0	0
<i>Levure de Malassezia</i>	0	0	0	0	0	0	7	11	8	0	0	0

TM : témoin.

SM : solution mère

Pour l'extrait méthanolique et aqueux on obtient les résultats représentés dans le tableau 18.

**Tableau 18:** valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues par l'extrait des pépins de dix souches de champignon.

Champignon	Diamètre moyen de la zone d'inhibition											
	Extrait méthanolique des pépins						Extrait aqueux des pépins					
Concentration	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	7	7	8	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	7	7	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	14	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microsporum canis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton glabrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon spp</i>	0	0	0	0	0	0	11	8	8	0	0	0
<i>Levure de Malassezia</i>	0	0	0	0	0	0	12	12	11	0	0	0

TM : témoin.

SM : solution mère

En fin, les résultats de cette activité par l'utilisation de jus sont présentés dans le tableau 19.

**Tableau 19:** valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues par l'extrait des jus de dix souches champignon.

Champignon	Jus du <i>citrus aurantium L</i>					
	1/2	1/4	1/6	1/8	TM	SM
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	7	0	0	0	12
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Microsporium canis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton glabrum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon spp</i>	9	8	0	0	0	14
<i>Levure de Malassezia</i>	10	9	9	9	0	10

TM : témoin.

SM : solution mère

D'après les tableaux (17, 18 et 19) qui représentent les résultats de l'activité antifongique des extraits aqueux et méthanolique des feuilles, des pépins et de jus de *Citrus aurantium L.* on montre que :

En remarque que les extraits utilisés réagissent d'une manière différente vis-à-vis des souches des champignons utilisés, on outre les champignons testés ne présente aucune sensibilité vers les témoins.

La souche *Candida albicans* est moins sensible à l'extrait méthanolique des feuilles et aqueux des pépins dont le diamètre d'inhibition compris entre 7 et 8 mm, et résistante à l'extrait aqueux des feuille, méthanolique des pépins et au jus.

La souche *Aspergillus flavus* est sensible à l'extrait Aqueux et méthanolique des feuilles dont le diamètre d'inhibition compris entre 7 et 10 mm, et résistante à l'extrait aqueux et méthanolique des pépins et au jus de *Citrus aurantium L.*

Les souches *Aspergillus niger*, *Microsporium canis*, *Trichophyton glabrum* et *Trichophyton rubrum* sont résistantes à tous les extraits aqueux et méthanolique (feuilles et pépins) et de jus de *Citrus aurantium L.*

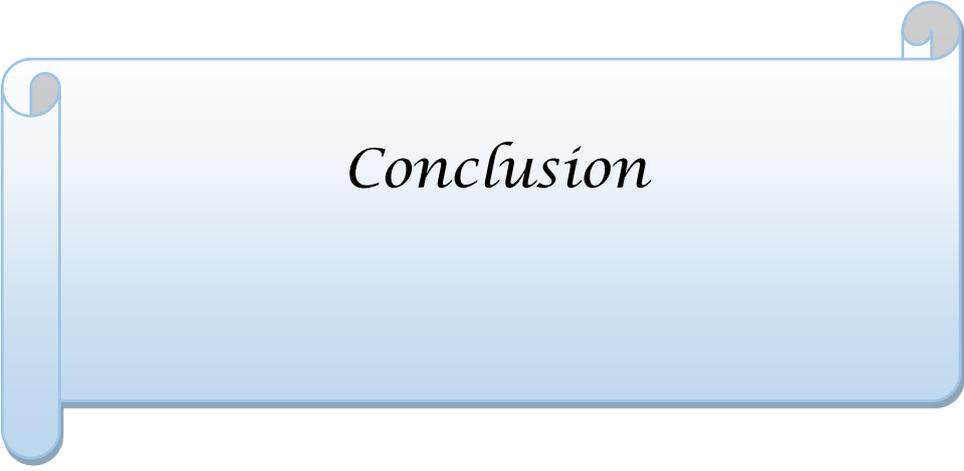
La souche *Candida parapsilosis* est sensible à l'extrait aqueux des feuilles et méthanolique des pépins, et résistante à l'extrait méthanolique des feuilles et aqueux des pépins et au jus.

La souche *Aspergillus fumigatus* est sensible à l'extrait aqueux des feuilles, méthanolique des pépins et au jus dont le diamètre d'inhibition compris entre 7 et 14 mm, et résistante à l'extrait méthanolique des feuilles et aqueux des pépins.

*Trichosporon spp* et Levure de *Malassezia* sont sensible à l'extrait aqueux des feuilles et des pépins et au jus dont les zones d'inhibition compris entre 7 et 14 mm, et résistantes à l'extrait méthanolique des feuilles et des pépins.

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (**Essawi et Srour, 2000**).

**Yin et Taso (1999)** ont rapporté que l'action inhibitrice sur les champignons peut être due à la formation de liaisons d'hydrogène entre le groupe hydroxyle des composés et les sites actifs des enzymes. En outre, la diversité structurale des polyphénols (molécules les plus répandues chez les végétaux) leur confère leurs propriétés antimicrobiennes.



*Conclusion*

## Conclusion

---

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine et pharmacie.

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits méthanolique et aqueux obtenu par macération des composés phénoliques des parties aériennes (feuilles et pépins) de *Citrus aurantium L.* Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence : des polyphénols, des flavonoïdes, des saponosides, des mucilages, des sucres réducteurs, des coumarines et des glucosides, dans les extraits aqueux de la plante, et absence des tanins totaux, des galliques catéchiques, des anthocyanes, des leuco anthocyanes, des Iridoïdes, amidons, des quinones, des caroténoïdes, des protéines des stérols.

Il ressort de l'analyse physico-chimique que le jus de *Citrus aurantium L* présente un pH égale à 2.39 et une acidité égale 7.3g d'acide citrique /l de jus. Ainsi qu'une densité de 1.03.

Le calcul de rendement d'extraction révèle que les extraits méthanolique des pépins présentent les meilleurs rendements (17.5%), suivi par les extraits méthanolique des feuilles (12.5%).

Par ailleurs, différentes teneurs en composés phénoliques sont observées. Le meilleur taux en polyphénols est noté avec l'extrait méthanolique des pépins (0.887mg/g MS) suivi par l'extrait aqueux des feuilles (0.816mg /g MS). Alors que le meilleur taux en flavonoïdes est noté avec l'extrait méthanolique des pépins (3.56mg/g).

L'activité antimicrobienne des extraits étudiés a montré qu'il y a des souches (bactéries et champignons) résistantes aux extraits des feuilles (aqueux et méthanolique) comme *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Microsporium canis*, *Trichophyton glabrum*, *Trichophyton rubrum*, et des souches sensibles à ces extraits, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacea*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*. Les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 7 et 13 mm.

Pour les extraits aqueux et méthanolique des pépins, *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton glabrum* et *Aspergillus niger* sont résistants aux extraits. Par contre les souches, *Enterobacter cloacea*, *Proteus mirabilis*, *Aspergillus fumigatus* et *Candida parapsilosis* marquent une sensibilité vers les deux extraits.

## Conclusion

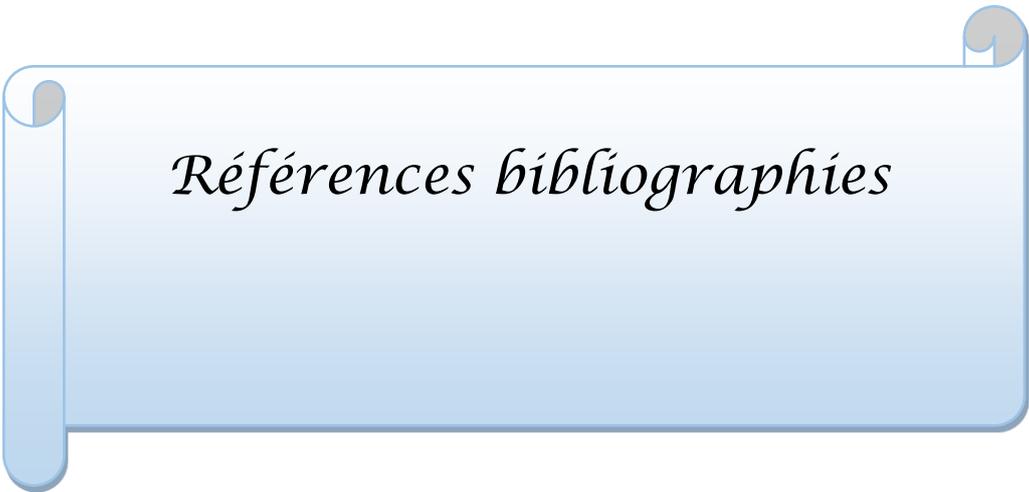
---

La plus part des souches (bactéries et champignons) sont résistantes au jus de *Citrus aurantium L.* Sauf *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, Leveur de *Malassezia*, *Aspergillus fumigatus*.

Sachant que la meilleure activité est présentée par les extraits (aqueux et méthanolique) des feuilles et des pépins envers *Proteus mirabilis*, *Enterobactere cloacea* et *Pseudomonas aeruginosa* et le jus envers *Pseudomonas aeruginosa*,

En perspectives, il est intéressant de compléter cette étude par :

- Etudier l'influence d'autres méthodes d'extraction des polyphénols et d'autre type de solvant.
- D'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de cette plante.
- D'identifier les principes actifs de cette espèce avec des méthodes chromatographiques.
- Mener d'autres études intéressées à étudier les pépins et le jus.



*Références bibliographies*

## Références bibliographies

---

<<A>>

**Abeyasinghe D.C., Li X., Sun Ch.D. Zhang W.S., Zhou Ch. H. et Chen K.S. 2007.** Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4): 1338-1344.

**Abdelkader Djemaï** - Un moment d'oubli, Éd. du Seuil, **2009**, 86 pages, 13 euros. Journals.

**Agusti M; Zaragoza S. S; Bleiholder H. H; Buhr L; Hack H; Klose R et satauss. R(199)** Echelle BBCH des stades phénologiques des agrumes.

**Aït Mohamed, (2006).** Etude physico-chimique de la Qualité et de la Conservation Avant et Après Séchage Convectif solaire du *Gelidium sesquipedale* (Algue Rouge) et du *Citrus aurantium* (orange Amer) ; Thèse de Doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc.

**Ali S.S., Kasoju N, Luthra A., Singh A, Sharanabasava G., Sahu Ad Bora U, 2008-** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int.*, 41:1-15.

**Allgrove J, and Davison G. (2014).** Chapter 19 - Dark Chocolate/Cocoa Polyphenols and Oxidative, Stress, *Polyphenols in Human Health and Disease*, R. R. Watson, V. R. Preedy and S. Zibadi, San Diego, Academic Press, Vol. 1, p. 241-251.

**Al-zoreky N.S. (2009).** Antimicrobial activity of *pomegranate (punica grantum L.)* fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 244-248.

**Anoop K.S. 2012.** Advances in citrus nutrition. Soil science. National research center for citrus. India

**Antolovich M. Prenzler P., RobardsK., RayanD., 2000-**sample préparation the determination of phenolic compounds in fruits. *The analyst*. 125:989-1009.

**Arianna T, Amanda D, Neil A. R, Matin C and Frank C. 2005.** *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp.nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III, p. 284-292.

**Avram A. M., Morin P., Brownmiller C., Howard L. R., Sengupta A. and Wickramasinghe S. R. (2017),** "Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration", *Food and Bioproducts Processing*, Vol.106 p. 91-101.

## Références bibliographies

---

« B »

**Bagre I., Bahi C., Gnahoue G., Djaman A. J and Guede G F. (2007).** Composition phytochimique et evaluation in vitro de l'activite antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morindoides* baker (milne-redhead(Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. *J. sci. Pharm. Biol*8(1): 15-23.

**Baki N. (2018).** Evaluation de l'effet antioxydant et antibactérien du bigaradier (*Citrus aurantium L*). UMBB.

**Boucher Manuel, Rap, expression des lascars.** Significations et enjeux du Rap dans la société française.1998.492 p., 166 FF

**Bejar A.K., Mihoubi N. B., et Kechaou N (2012).** Moisture sorption isotherms– Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Food Chemistry*, 132(4): 1728-1735.

**Benbrook C. M(2005).** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *The organic center*, 6-8.

**Bénédicte et Michel Bachés 2011,** les agrumes “comment les choisir et le cultiver facilement.

**Bénédicte, 2011.**Agrumes .Ed.Ugen Ulmer, PARIS, n<sup>o</sup> 132,96p.

**Bocco A. Cuvelier H., Richard H., Berset C., 1998** Antioxydant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of agricultural and Food Chemistry.*, 46 :2123-2129.

**Bouakaz I., 2006.** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.

**Bouharoum M., 2007.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherim adpressum* et *Ononis anfastissima*. These de Doctorat en Biotechnologie végétal, Univ Mentouri, Constantine.116p.

**Bourget E.et Auge C., 2008-** Les techniques de laboratoire .Ed .Ellipses, paris, 151p.

**Bouroukaa A. 2012.** Etude biochimique de l'adultération du jus de fruits.Université de Carthage.

**Bousbia N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydant à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires.

## Références bibliographies

---

**Buffo J., Herman M. A. and Soll D. R., A.** Characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1984. **85**: 21-30.

**Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2 ème edition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

**Budic-Letoc I., Lovric T., Pezo I., Klujuzuric J.G., 2005-**study of dynamics of polyphenol extracion during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *FoodTechnology and Biotechnology*.**43:47-53**.

**Burgot G.et Burgot J.L., 2006-**Méthodes instrumentales d'analyses chimiques et application.Ed.Lavoisier, Paris, 320p.

**Burgot L., 2002-** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications (Méthodes chromatographiques, électrophorèse et méthodes spectrales).Ed.Tec et Doc, paris, 645p  
capacity of Citrus varieties cultivated in China. *Food Chem* 106:545–551

. << C >>

**Caquet R., 1994-** Guide pratique des examens de laboratoire. Ed. Massonelcie, Paris, 1455p.

**Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.F., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T. et Baser K.H.C. (2007).**Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinu sofficialis* depending on location and seasonal variation.Ed.*Food Chem*.100:533 559.

**Chanforan C. (2010).**Stabilité de micro constituants de la tomate (composes phénoliques, caroténoides, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: etudes en systems modèles, mise au poins d'un modèle strechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate0Thèse de Doctorat: Université D'AVI et des PAYS de VAUCLUSE

**Corder R., Mullen W., Khan N. Q., Marks S. C., Wood E. G., Carrier M. J. and Crozier A. (2006),**"Oenology: Red wine procyanidins and vascular health", *Nature*, Vol.444 p. 566.

**Cotty J.P.1989.**Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79:808-814.

**Courtot D.et Jaussaud P., 1990-** Le contrôle antidopage chez le cheval.Ed. INRA, Paris, 154p.

**Cowan M. M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

## Références bibliographies

---

**Craig R. 2006.** *Citrus (citrus) Fortunella (kumquat). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, 2: 1-35.

**Crozier A, Clifford M.N., Ashihara H. (2006).** *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Ed Blackwell Publishing Ltd.

### << D >>

**Daglia M., 2011.** Polyphenols as antimicrobial agents .*Current Opinion in Biotechnology*.23:18.

**Dangles O; stoeckel C; wigand M.C; brouillard R. 1992.** Two very distinct types of anthocyanin complexation: copigmentation and inclusion. *Tetrahedron lett*, 33: 5227-30.

**David M., Gabriel M., Kopeck Á M.** Unusual ultra structural characteristics of the yeast *Malassezia Pachydermatis*. *Scriptamedica(BRNO)*-76(3): 173-186, J une 2003.

**De la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E.et Gonzalez-Aguilar G.A. (2009).** Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, Nutritional value and stability .Edition John Wiley and Sons, p73.

**Del Caro A., Piga A., Vacca V. et Agabbio M. 2004.** Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food*

**Dorman H.J.D .et Deans S .G., 2000-** Antimicrobial agents from plants, Antibacterial activity of plant valatile oils .*Journal of Applied Microbiology*, 88 308-316.

**Duraffourd C H, Valnet J., Durffour P., Cilapraz J., 1978** l'aromatogramme. Nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas clinique.*Plant MedPhytther*.

**Duval J.et Soussy C.J., (1990).** Antibiothérapie, base bactériologiques pour l'utilisation. Ed. Masson, Paris, 188 p.

**DJEMAI S.** Étude de l'activité biologique des extraits du fruit de zizyplus lotus L. Mémoire de magister. Université-El hadj la khater-Batna. 91p, 2009, p. 865-873

## Références bibliographies

---

### << E >>

**Ersus S. et Cam M. 2007.** Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxydant capacity of sour *Citrus au antium* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*. 43 (5): 607-609.

**Escarpa A., Morales M.D.et Gonzalez M.C., 2002-**Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compound using real samples by high-performance liquid chromatography-diode-array detection.*Analytica chimica Acta*.460:61 72.

**Escartin I. (2011).** Guide des agrumes. Fondation d'entreprise pour la protection et la valorisation du patrimoine végétal. L'Institut Klorane. (Consulté le 20 mars 2017).

**Escribano-Bailon et Santos-Buelga., 2003-**Polyphénols extraction from foods.Methodsinpolyphenolanalysis.Royal Society of Chemistry.Thomas Graham House, Science Park, Milton road, cambridge, 1-16p.

**Essawi T. et Srour M. 2000.** Screening of some Plesinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacol*, 70 (3) : 343-349.

**Egbobor, ASIKONG, Bassey E., ABRIBA, Clement, et al.** A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 2007, vol. 38, no 2, p. 343.

### << F >>

**FAO. 2013.** Food and Agricultural Organisation.

**Fauchère J.L.et Avril J.L. (2002).**Bactériologie générale et médicale .Ed. Ellipses, paris, 365p.

**Frankel E.N. (1993).**Studies on physicochemical Characteristics of Anthocyanin from Super Dark Maize. *Journal of Food and Nutrition Research*.

### << G >>

**Gamet –Payrastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H., Payrastre B. (1999).** Flavonoides and the inhibition of PKC and PI 3-Kinase. *General Pharmacology*.32:279-286.

**Gatier O., Rou D ., 2007.** Botanique pharmacognosie, phytothérapie, 3eme editions, Wolters

## Références bibliographies

---

**Ghasemi K., Ghasemi Y. et Ebrahimzadeh M.A. 2009.** Antioxydant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci*, 22 (3): 277-281.

**Giovanni Di Bonaventura, Arianna Pompilio, Carla Picciani, Manuela Iezzi, Domenico D'Antonio, and Raffaele Piccolomini.** Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon* Development, Architecture, and Antifungal Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct.2006, p. 3269-3276.

**Goni I. et Serrano J., 2005-**The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum. *Journal of the science of food and Agriculture* .85:1877-1881.

**Gonzalez M., Dominguez P, Moreno DA, Garcia C (2010).** Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J Pharm Biomes Anal*

**Guenouni et kacemi, 2013.** Créations d'un verger agrumicole (cas du citronnier) dans la région de mostagan.

**Grasser Y., Volovse k, M., Arrington J., Schonian G., Presber W., Mitchell T. G. and Vilgalys R.,** Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**. **93**: 12473-12477.

**Giovanni D B, Arianna P, Carla P, Manuela I, Domenico D, and Raffaele P. 2006.**Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii* :development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p.3269-3276.

**Guimarães R., Barros L., Barreira J. C., Sousa M. J., Carvalho A. M., et 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.

**Gulçin I., Huyut Z.B., Elmastas M., Hassan Y. ET Aboul-Eein D. (2010).** Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*. 3: 43-53.

<<H>>

**Hendrix C. M., Redd J. B. ET Ashurst P. R. 1995.** Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In « Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages ». Ed. Blackie Academic & Professional. pp. 53-87.

**Huang D., Ou B. and Prior R.L. (2005).**The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Huillin Su, Ann Packeu, Sarah A. Abdullah M. S. Al-Hatmi, Oliver Blechert, Macitfikit, Ferry Hagen, Yvonne Graser, Weidalii, Shuwendeng, Marijike Hendrickx, Jinhua Xu,**

## Références bibliographies

---

**Min Zhu, Sybren de Hoog.** Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex. Journal of Clinical Microbiology 2019.

<< I >>

**Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, so ins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Lenders

<<J>>

**Jungkind D. L.1995.** Antimicrobial resistance: a crisis in health care; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a crisis in health care—Clinical laboratory and epidemiologic considerations.

<< K >>

**Kafkas E., Ercisli S., Kemal K. N., Baydar K., et Yilmaz H. 2009.** Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: A comparative study. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20): 329.

**Kamran, G., Youcef, G., Ebrahimzadeh, M.A., 2009.** Antioxydant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22 (3), 277-281

**Kansole M. (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leu cas martinicansis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Ortho siphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

**Karadeniz F. 2004.** Main organic acide distribution of authentic citrus juice in Turkish. *Journal of agriculture and forsty*, 28: 267-271.

**Karoui I. J. and Marzouk. B. (2013).** Characterization of Bioactive Compounds in Tunisian Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Peel and Juice and Determination of Their Antioxidant Activities

**Khatabi O., Hanine H., Elothmani D., Hasib A., (2011).** Extaction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*) *Arabian Journal of Chemistry*.

**Kening Y., Vincenzo D.L.et Normand B, .1995-**Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to phytophthora festans. *The plant cell*.7:1787-1799.

## Références bibliographies

---

**Khalidi A., Meddah B., Moussaoui A., Benmehdi H. (2012).** Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement *in vitro* des moisissures. *European Journal of Scientific Research* **80(3)**: 311-321.

**Khaled Khodja Y., 2008.** Etude de l'activité antioxydant des jus et pulpes de quelques variétés d'orange de la région de Bejaïa. Université A. MIRA-Bejaia.

**Khan I., Shan Z.A., Saeed M. et Shan H.U. 2010.** Physicochemical analysis of *citrus sinensis*, *citrus Reticulate* and *citrus paradise*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **32(6)**: 774-780

**Kim E.K., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.

**Kimball D.A. 1999.** Citrus processing, a complete guide, second edition. Kimball D.A., Ed. Gaithersburg. An Aspen publication.

**Koehlin-Ramonotxo C. 2006.** Oxygène, stress oxidant et suppliment ationsantioxydantes ou un aspect different de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20 (4)** : 165-177.

**Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. et Sripal R. 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol*, **33 (1)**: 2-16.

**Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. PhysiolBioch*, **45**: 244-249.

<< L >>

**L Waterhouse, R.M.** Lamuela Raventos, the Occurrence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries, *Phytochem.* 1994, **37(2)**, 571-573.

**Ladaniya M. S. 2008.** Citrus fruit: biology, technology and evaluation San Diego: Academic, 198.

**Lapornik B., Prosek M. ET Wondra A.G. 2005.** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, **71 (2)**: 214-222.

**Langcake P. (1981).** Disease resistance of *Vitis* spp. And the production of the stress metabolites resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, **18(2)**, 213-226.

## Références bibliographies

---

**Lees G. L. (1992)**, "Condensed Tannins in Some Forage Legumes: Their Role in the Prevention of Ruminant Pasture Bloat", *Plant Polyphénols*, Vol.59 p. 915-934.

**Lillo C. Uunis and Peter (.2008)**.Nutrient depletion as key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31:787-601.

**Liming M, Liping Z, Hua Li, Wei C, Hongbin W, Shuxian W, Caiqin G, Ailing L, Guiwen Y, Liguó A, Paride A, Guangxun M.** Pathogenic fungus *Microsporium canis* activates the NLRP3 inflammasome. *Infection and immunity* p. 882-892 February **2014**.

**Loeillet(2010)** -la production mondiale des agrumes ''les marchés mondiaux''.

**Loussert., 1989**, les agrumes, production. Ed.scien.univ. Liban, vol.1, 80p, vol2, 280p.

**Lu D., Cao Q., Li X., Cao X., Luo F., et Shao W. 2009.** Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, 95(1): 145-152.

« M »

**Macheix J. J., Fleuriet A., et Jay-Allemand C. 2005.** *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR Presses polytechniques.84-86.

**Macheix JJ, et Fleuriet A and Billot J.** Fruit phenolic.CRC Press. Boca Raton, Fl.**1989**.

**Manner Harley L, Buker Richard S., Easton Smith V., Ward Deborah. Et Elevith. Craig R 2006.**Citrus (citrus) Fortunella (Kumquat).Species Profiles for Pacific Island Agroforestry, 2:1 35.

**Manthey J.A., Guthrie N., ET Grohmann K. (2001).** Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 135-153.

**Mazari K., Bendinerad N., Benkhechi Ch. ET Fernandez X., (2010).**Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian Juniperus phoenicea L and Cupressus sempervirens.Medicinal Plants Research.4 (10):959-964.

**Mazza G and Minitati E.** Anthocyanins in fruits. Vegetables and grains. CRC press, Boca Raton, Fl.1994.

**Melendez P.A., Capriles V.A. (2006).** Antibacterial properties of tropical Plants from Puerto Rico; *Phytomedicine*; 13:272-276.

## Références bibliographies

---

**Meziani L. et Saidoune S. (2017).** Activités antioxydantes et antimicrobiennes des différentes parties de la bigarade. Université A. MIRA-Bejaia.

**Méar J. B., Kipnis E., Faure E., Dessein R., Schurtz G., Faure K., & Guery B. (2013).** Candida albicans and Pseudomonas aeruginosa interactions: more than an opportunistic criminal association. *Medecine et maladies infectieuses*, 43(4), 146-151.

**Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839

**Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.F. et poura S.I., (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 38:565-570.

**Muthiah P.I. 2012.** In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, 2 (1): 13-20.

<< N >>

**Nacz M. ET Chahidi F. F.F., 2004-** extraction and analysis of phenolic in food. Department of Human Nutrition, St Francis Xavier University, Antigonish, NS, Canada.

**Naghma K. and Mukhtar H. (2007),** "Tea polyphenols for health promotion", *Life Sciences*, Vol.81 n°7, p. 519–533

<< O >>

**Oboh G., & Ademosun A. O. (2012).** Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. *Journal of food science and technology*, 49(6), 729-736.

**Ollitrault P., Dambier D., Froelicher Y., Luro F., Cottin R., 1979.** La diversité des agrumes : structuration et exploitation par hybridation somatique. *Compte rendu d'Académie d'Agriculture de France* 86 (8), 197-221.

**Ordóñez A.A.L., Gomez J.D., Vattuone M.A. et Isla M.I. (2006).** Antioxidant activities of sechium edule (Jacq). Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97(3):452-458.

**Oyaizu M., 1986-** Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Nutrition*, 44:307-315

## Références bibliographies

---

### << P >>

**P.Langcake.** Disease resistance of vits spp .v and production of stress metabolites resveratrol  $\epsilon$ -viniferin  $\alpha$ -vinifnn and pterostiblenephysio plant pathol.1981, 9, 77-86.

**parfonry R., 2001.** Plantes à fruits. In : raemaekers h. (éd), agriculture en afrique tropicale, direction générale de la coopération internationale, bruxelles, p. 555-588.

**Percival S.L. (2004).** Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston: 480.

**Pierre J.et Queiroz O. (1997).** Regulation of glycolysis and level of the Crassulacean acid metabolism. Planta 144,143-151.

**Polese J.M. (2008).** Culture d'agrume. Edition artémis.

### << Q >>

**Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. and Pouysegu L. (2011),** "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis", *A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker*, Vol.50 n°3, p. 586-621

**Quifer-Rada P., Vallverdú-Queralt A., Martínez-Huélamo M., Chiva-Blanch G., Jáuregui O., Estruch R. and Lamuela-Raventós R. (2015).** "A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS)", *Food Chemistry*, Vol.169 p.336 343.

**Quiñones M., Miguel M. and Aleixandre A. (2013).** "Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease", *Pharmacological Research*, Vol.68 n°1, p. 125-131.

### << R >>

**Rangana S; Govindrajan V. J. et Ramana K. V. R. 1983.** Citrus Fruits - Varieties. Chemistry, Technology, and Quality Evaluation. Part II: Chemistry, Technology and Quality Evaluation. A: Chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18 (4): 313-386

**Rapisarda P., Lo Bianco M., PannuzzoP .et Timpanaro N. 2008.** Effect of cold storage on vitamin C, phenolic and antioxydant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis L* Osbeck]. *Postharv est Biology and Technology*, 49 (3) : 348-354.

**Ribéreau-Gayou P. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques. In composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, PP. 105-133.

## Références bibliographies

---

**Richter R., 1993**-Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie.PPUR.Lausane Pp 319-322.

**Rimbach G., Melchin M., Moehring J. and Wagner A. E. (2009)**. Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review, *Int J Mol Sci*, Vol. 10, p. 4290-309.

**Rose R. C. ET Bode A.M. 1993**. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7 (12):1135-1142.

**Ryan C Maves, 2018**. Trichosporon Infections. E medicine.

<< S >>

**Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M .et Bruni R. (2005)**. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods .Ed.Food Chem, 91:621-632.

**Saïdani M. et Marzouk B. 2003**. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Photochemistry*. 62: 1283-1289.

**Sanchez –Moreno C., Larrauri J.A, Saura-Calixto F.1998**- A procedure to measure the Antiradical efficiency of polyphenols *J.Sci Food.Agric*, 76:270-276.

**Sarni-Manchado P., Cheynier V.2006**. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier Tec et Doc (ed).Sciences et techniques agro-al .61-377.

**Saucier C. (2010)**. "How do wine polyphenols evolve during wine ageing". *Cerevisia*, Vol.35 n°1, p. 11-15.

**Scalbert A., 1991**.Antimicrobial properties of tannins.*Phytochemistry*.30:3875-3883.

**Scheible WR. Krapp A. et Stitt M. (2008)**. Reciprocal diurnal changes of phosphoenol pyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate de hydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant &Environment* 23, 1155-1167.

**Scherer R., Godoy H.T., 2009**- Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazylmethod.*FoodChem*, 112:654-658.

**Souci S.W., Fachmann W. et Kraut H. 1994**. Fruits. In : « la composition des aliments »5ème édition. Ed. CRC Press, 801-980.

**Sousser A. 1997**. The Great Citrus Book: A Guide with Recipes. Ed. Ten Speed Press, 1-160.

## Références bibliographies

---

**Sinclair T. R., Tanner C. B., & Bennett J. M. (1984).** Water-use efficiency in crop production. *Bioscience*, 34(1), 36-40.

**Spigno G, De Faverind M., 2007-**Antioxydants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield; purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*.78:793-801.

### << T >>

**Tanguy M. et Begué-Simon A.M. 2009.** Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation .*Médecine*, 5 (6):256-260.

**Tenscher E., Anton R. et Lobstein A. 2005.** Agrumes. In : Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, 77.

**Tounsi M.S W. A. Wannas. I. Ouerghemmi et al. (2011).** “Juices components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, no. 1, pp. 142–151, 2011.

**Tranchant J., 1996-**Chromatographie en phase gazeuse. *Techniques de l'ingénieur*, France, pp : 2-7.

**Tripoli E., La Gardia M., Giammanco S., Di Majo D. et Giammanco M. 2007.** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional proprieties. A review. *Food Chemistry*, 104 (2): 466-479.

**Tsai H.L., San K.C., Ch Ag S.J. 2007.** Antioxidant content and free radical scavenging Ability of fresh Red pummelo (citrus grandis (L) Osbeck) juice and freeze-dried products, 55(8): 2867-2872.

### << U >>

**Urquiaga I. N. E. S. et Leighton F. E. D. E. 2000.** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*, 33 (2): 55-64.

### << V >>

**Vandercook C. (1977).** Organic acids. *Citrus Fruit Technology*. Avi Publishing, Westport, CT, 209-227.

**Ververidis filippos F. F; Trantas Emmanouil, Douglas Carl, Vollmer Guenter, Vijayalakshmi R. and Ravindhran R. (2012).** Preliminary comparative phytochemical screening of root extracts of *Diospyrus ferrea* (Wild.) Bakh and *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schultes. *Asian Journal of Plant Science and Research* 2(5): 581-587.

## Références bibliographies

---

**Virbei-Alonso C., (2011).** Citron et autre agrumes ; un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé, votre beauté. Groupe Eyrolles, paris, 220p.

<< W >>

**Walter A et Sam, C. (2002).** Fruits of Oceanina. [Trans, P. Ferrar from Fruits d'Océantique] ACLAR Menograph 85. Australian Centre for international Agricultural Research. Canberr, Australia.

**Wang J.et Mazza G., 2002-**Effect of Anthcyanins and other phenolic compounds on the production of Tumor Necrosis Factors  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW.264.7.Macrophages.J.Agric.Food Chem.2002; 50:850-857.

**Wichtl M.et Robert A., 2003-**Plantes thérapeutiques. Ed.TEC et DOC, paris, 689p.

**Wyatt GM. Lud B.M.2007:**L'effet des produits antibactériens sur la porriture de pomme de terre de références24 :315-329.

<< X >>

**Xu G, Liu D, Chen J, Ye X, Ma Y and Shi J. (2008).** Juice components and antioxidant

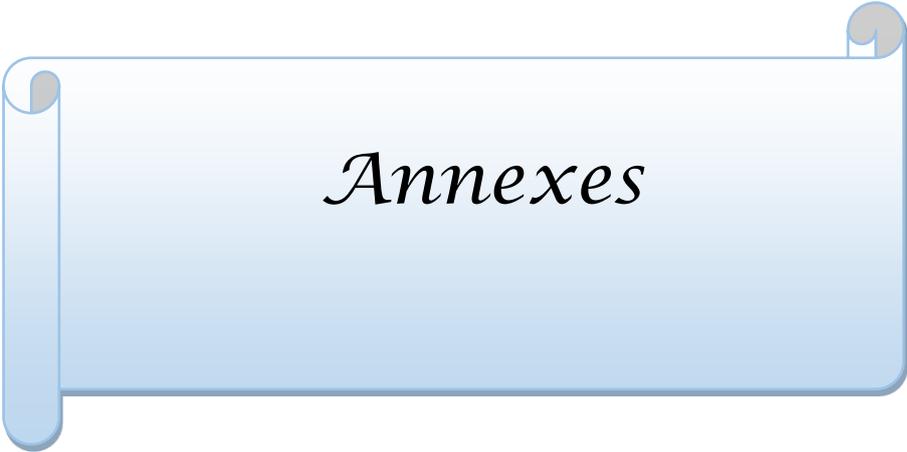
<<Y>>

**Y. Graser A.F.A.Kuijpers W. Presber and G.S.de Hoog.** Molecular Taxonomy of the *Tricophyton rubrum* complex .Journal of clinical, microbiology, Sept, 2000, p.3329-3336.

**Yin MC. and Tsao SM.1999.**Inhibitory effect of seven Alliums plants upon there Aspergillus specis. International Journal of Food Microbiology.49:49:56.

<< Z >>

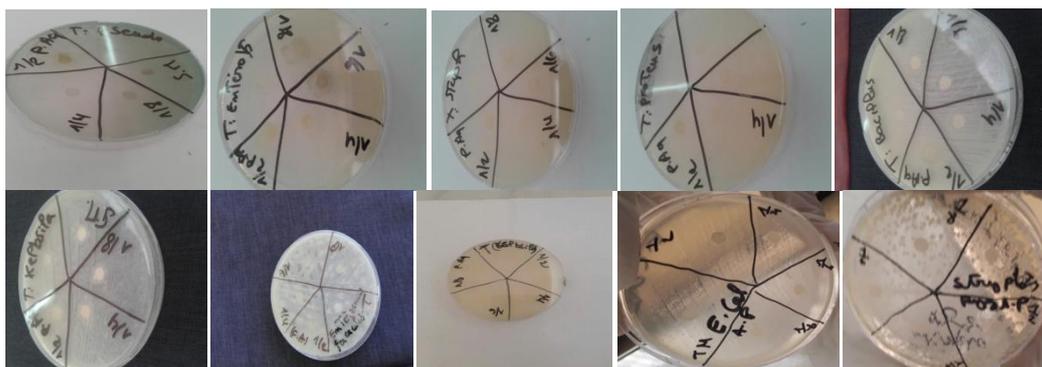
**Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4): 555– 559.



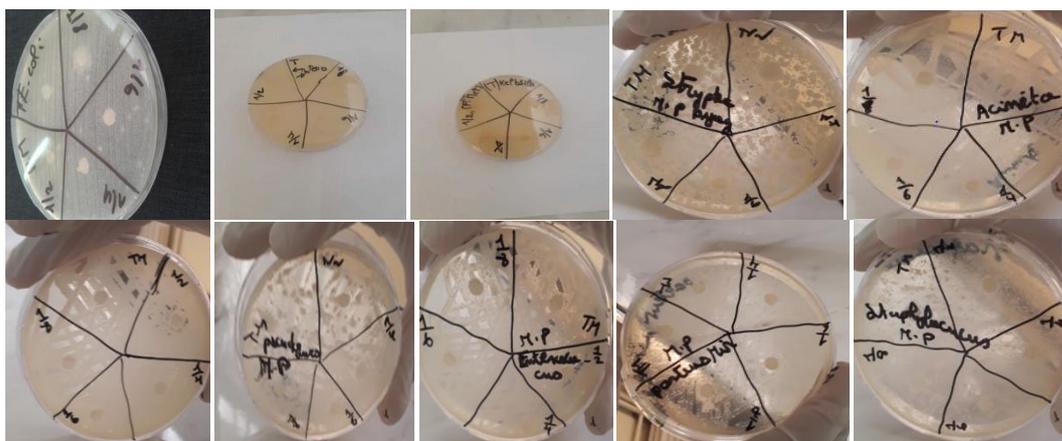
*Annexes*

## Annexes

### Annexe 1 : résultats de l'activité antibactérienne des extraits du *Citrus aurantium L*



**Figure 1 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins aqueux du *Citrus aurantium L*.

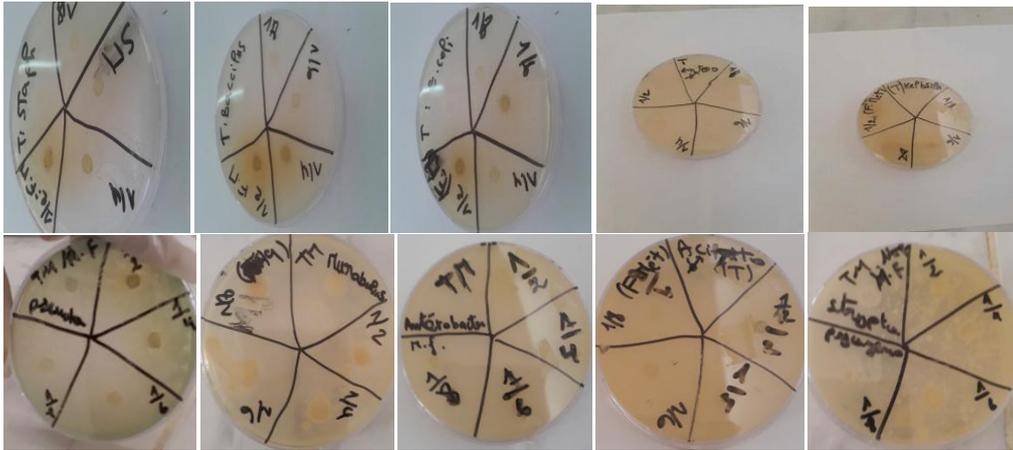


**Figure 2 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins méthanolique du *Citrus aurantium L*.



**Figure 3 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles aqueux du *Citrus aurantium L*.

## Annexes



**Figure 4** : résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles méthanoliques du *Citrus aurantium L.*



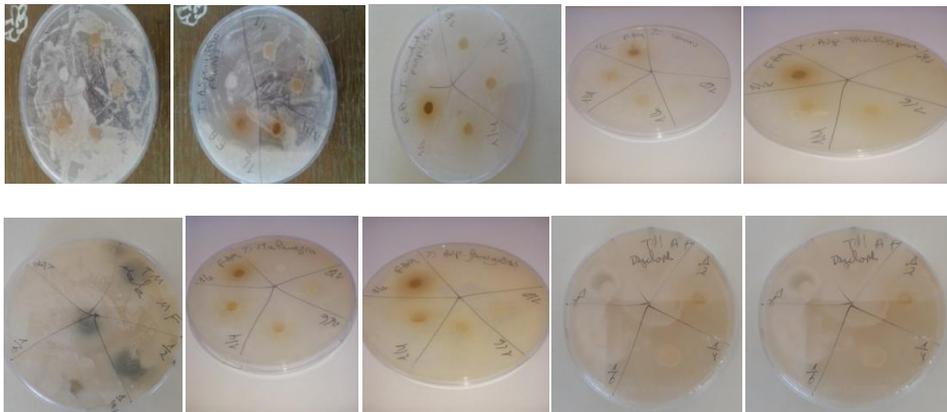
**Figure 5** : résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions de jus du *Citrus aurantium L.*

## Annexes

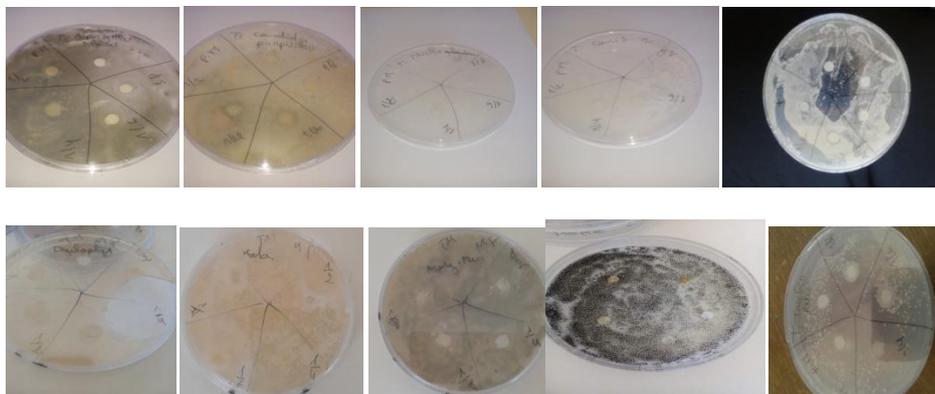
### Annexe 2 : résultats de l'activité antifongiques des extraits du *Citrus aurantium L.*



**Figure 6 :** résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins aqueux du *Citrus aurantium L.*

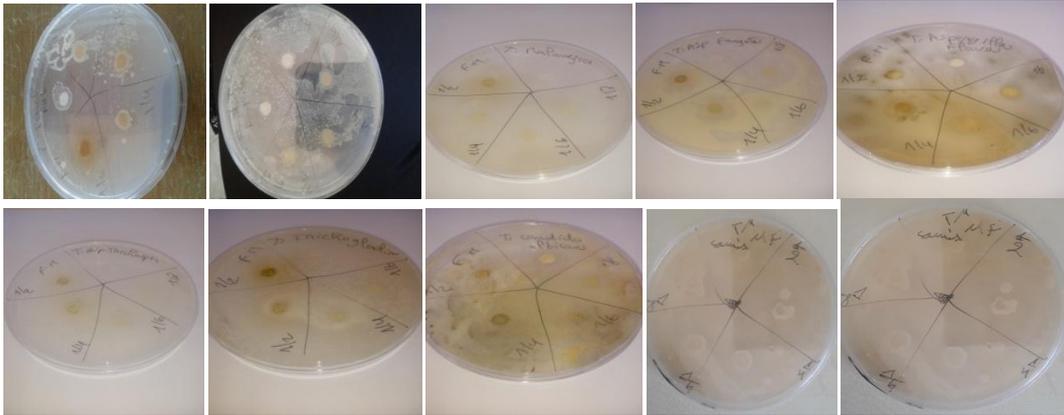


**Figure 7:** résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles aqueux du *Citrus aurantium L.*

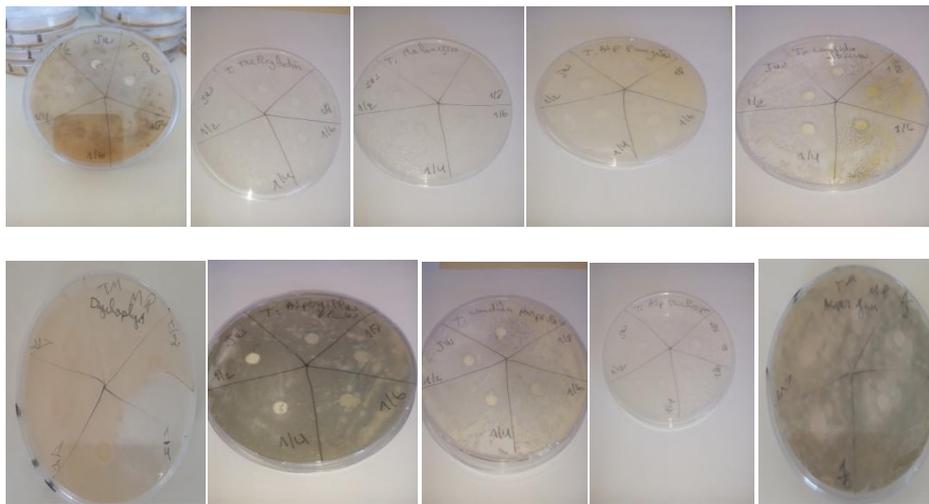


**Figure8 :** résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins méthanolique du *Citrus aurantium L.*

## Annexes



**Figure 9** : résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles méthanolique du *Citrus aurantium L.*



**Figure 10** : résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions de jus du *Citrus aurantium L.*

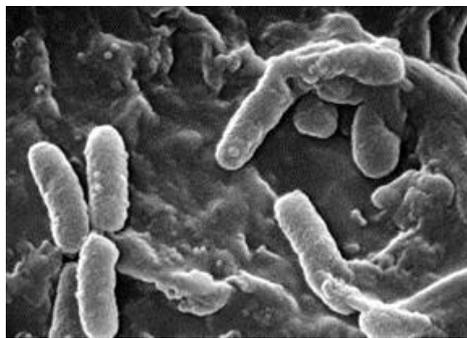
## Annexes

---

### Annexe 3 : souches bactériennes utilisé

#### *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est une bactérie mono-flagellée à Gram négative, présente dans divers environnements et souvent dans l'eau (Méar *et al.* 2013). Elle est responsable d'environ 10% à 20% des infections nosocomiales et possède de multiples mécanismes de résistance qui sont encodés dans les chromosomes intrinsèques, y compris, le développement des pompes multi-résistantes à la pénétration des médicaments, la production de  $\beta$ -lactamases et les enzymes de modification des aminosides, la faible perméabilité de l'enveloppe cellulaire et sa grande capacité d'adaptation, permettant la colonisation rapide aux différents environnements.



#### **Classification :**

**Règne :** Bacteria

**Division :** Proteobacteria

**Classe :** Gammaproteobacteria

**Ordre :** Pseudomonadales

**Famille :** Pseudomonadaceae

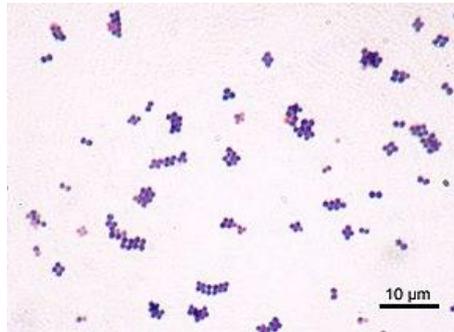
**Genre :** *Pseudomonas*

## Annexes

---

### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est l'un des agents pathogènes les plus importants pour l'homme. C'est une bactérie anaérobie, à Gram-positif, elle est découverte par le Dr Alexander Ogston en 1880. Elle peut causer de nombreuses maladies ; d'infections cutanées mineures à des maladies mortelles, telles que les abcès, la pneumonie, la méningite, l'endocardite, la septicémie, l'arthrite septique, l'ostéomyélite, infections intravasculaires .



### Classification

**Règne :** Bacteria

**Embranchement :** Firmicutes

**Classe :** Bacilli

**Famille :** Staphylococcaceae

**Genre :** Staphylococcus

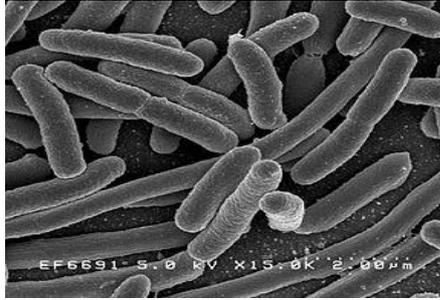
**Espèce :** *Staphylococcus aureus*

## Annexes

---

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ou colibacilles sont des bacilles à Gram négatif, est l'hôte normale de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud c'est un coliforme fécal, germe indicateur de contamination fécale dans les eaux et les aliments. Les souches d'*Escherichia coli* responsable d'infection chez l'homme.



### Classification

**Règne :** Bacteria

**Embranchement :** Proteobacteria

**Classe :** Gamma proteobacter

**Ordre :** Enterobacteriales

**Famille :** Enterobacteriaceae

**Genre :** *Escherichia*

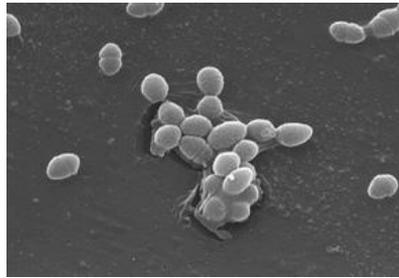
**Espèce :** *Escherichia coli*

## Annexes

---

### *Enterococcus faecalis*

*E.faecalis* est une bactérie commensale à Gram+, habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Se présente comme un microorganisme non-mobile, anaérobie facultatif. Elle peut causer des endocardites, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. Les infections du système nerveux sont plus rares.



#### **Classification**

**Règne :** Bacteria

**Embranchement :** Firmicutes

**Classe :** Bacilli

**Ordre :** Lactobacillales

**Famille :** Enterococcaceae

**Genre :** Enterococcus

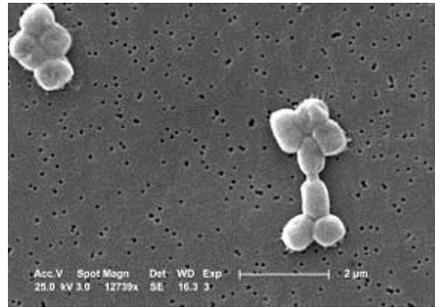
**Espèce :** *Enterococcus faecalis*

# Annexes

---

## *Acinetobacter baumannii*

*A.baumannii* est une bactérie à Gram- du genre Acinetobacter. Il s'agit d'un germe d'infection opportuniste chez l'homme, particulièrement chez les personnes immuno-déprimées et que l'on trouve aussi comme agent de maladies nosocomiales où sa transmission est manu portée.



### **Classification**

**Règne** : Bacteria

**Embranchement** : Proteobacteria

**Classe** : Gamma Proteobacteria

**Ordre** : Pseudomonadales

**Famille** : Moraxellaceae

**Genre** : *Acinetobacter*

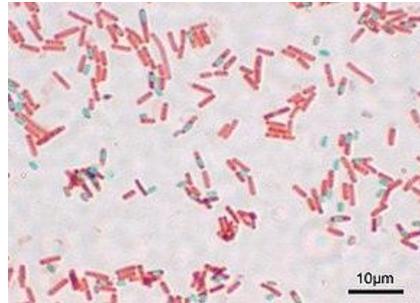
**Espèce** : *Acinetobacter baumannii*

# Annexes

---

## *Bacillus sp*

*B.subtilis* est un bacille Gram positif, mobile, aérobic stricte possédant une coque protectrice dure. Ubiquitaire et récupéré à partir de l'aire, du sol et de l'eau, peut contaminer les aliments et provoquer une intoxication.



## **Classification**

**Règne** : Bacteria

**Embranchement** : Firmicutes

**Classe** : Bacilli

**Ordre** : Bacillales

**Famille** : Bacillaceae

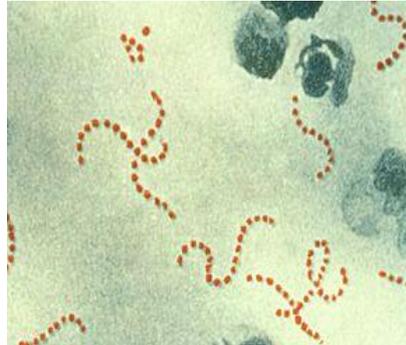
**Genre** : *Bacillus*

## Annexes

---

### *Streptococcus pyogenese groupe A*

*S.pyogenes* également appelée streptocoque du groupa A, il s'agit de cocci à Gram+ se présentant sous forme de chaînettes, sont anaérobies.



### **Classification**

**Règne** : Bacteria

**Division** : Firmicutes

**Classe** : Bacilli

**Ordre** : Lactobacillales

**Famille** : Streptococcaceae

**Genre** : *Streptococcus*

## Annexes

---

### *Klebsiella pneumoniae*

*K.pneumoniae* est un bacille Gram-, aéro-anaérobie, immobile et capsulée. Elle détermine des infections respiratoires (pneumonies, abcès pulmonaires, pleurésies), des infections intestinales et urinaires.

Elle a un effet cytotoxique sur les épithéliums des voies aériennes et peut être responsable d'infections nosocomiales.



### **Classification**

**Embranchement** : Proteobacteria

**Classe** : Gammaproteobacteria

**Ordre** : Pseudomonadales

**Famille** : Enterobacteriaceae

**Genre** : *Klebsiella*

**Espèce** : *Klebsiella pneumoniae*

## Annexes

---

### *Enterobacter cloacea*

*E.cloacea* est un bacille à coloration de Gram- est une bactérie commensale du tube digestif. Elle peut être responsable d'infections urinaires et d'infections nosocomiales.



### **Classification**

**Règne :** Bacteria

**Embranchement :** Proteobacteria

**Classe :** Gammaproteobacteria

**Ordre :** Enterobacteriales

**Famille :** *Enterobacteriaceae*

**Genre :** *Enterobacter*

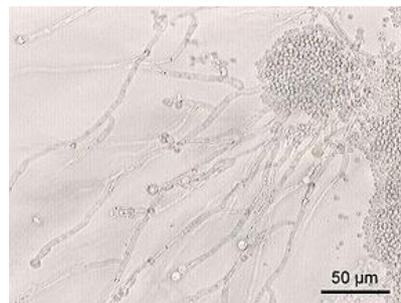
# Annexes

---

## Annexe 4 : souches fongicides

### *Candida albicans*

Est une levure la plus connue du genre *Candida*, unicellulaire ou filamenteuse, mesurant de 3 à 15 µm, se reproduit de façon asexuée. Souvent pathogène (Grasser Y et al, 1996). On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme. Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80% des infections connues sous le terme de candidose. (Buffo, J et al., 1984)



### Classification

**Règne :** Fungi

**Embranchement :** Ascomycota

**Classe :** Saccharomycètes

**Ordre :** Saccharomycetaceae

**Genre :** *Candida*

**Espèce :** *Candida albicans*

## Annexes

---

### *Aspergillus flavus*

*Aspergillus flavus*, comme environ un tiers des champignons ascomycètes, est considéré comme cosmopolite et clonal parce qu'il a une morphologie asexuelle uniforme. *A. flavus* produit de l'aflatoxine sur les noix, les grains et le coton, et des hypothèses sur son cycle de vie sont utilisées pour élaborer des stratégies de lutte biologique. *Aspergillus flavus* se différencie pour produire des spores dispersantes asexuées (conidies) ou des structures de survie hivernales appelées sclérotes.



### **Classification**

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Classe :** Eurotiomycetes

**Sous-classe :** Eurotiomycetidae

**Ordre :** Eurotiales

**Famille :** Trichocomaceae

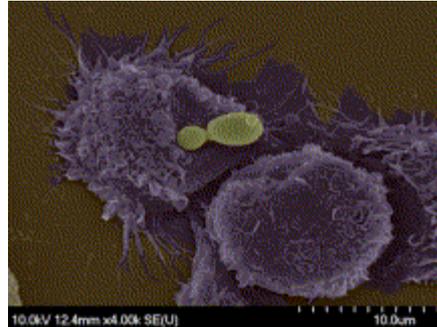
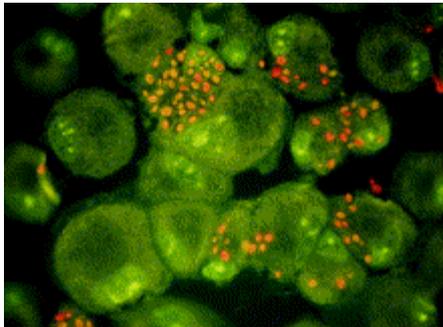
**Genre :** *Aspergillus*

## Annexes

---

### *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* est la deuxième espèce de levure la plus courante isolée du sang en latin Les pays américains et l'Asie, et il est également trouvé généralement dans les enquêtes européennes. L'espèce est particulièrement associée aux infections sanguines chez les nouveau-nés et également avec candidémie associée au cathéter et hyper alimentation intraveineuse (Arianna T et al., 2005).



### Classification

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Sous -division :** Saccharomycotina

**Classe :** Saccharomycetes

**Sous- Classe:** Saccharomycetidae

**Ordre :** Saccharomycetales

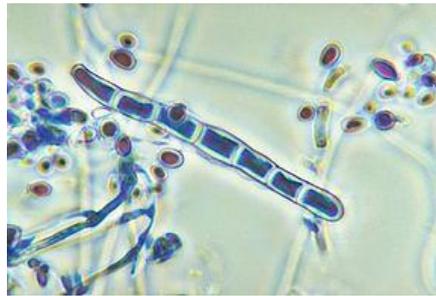
**Genre :** *Candida*

## Annexes

---

### **Trichophyton rubrum**

*Trichophyton rubrum* est un champignon filamenteux microscopique<sup>1</sup> rattaché aux *Ascomycota*. Il n'a pas de forme sexuée connue. Il a une affinité marquée pour la kératine (protéine de la couche cornée de l'épiderme, et qui constitue les ongles, poils et cheveux) (Y. Graser *et al.*, 2000). *Trichophyton rubrum* est un parasite obligatoire de l'homme, spécialisé dans la dégradation de la kératine, une protéine fibreuse, riche en acides aminés à base de soufre (comme la cystéine) (Huillin Su *et al.*, 2019).



### **Classification**

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Sous-emb :** Pezizomycotina

**Classe :** Eurotiomycetes

**Ordre :** Onygenales

**Famille :** Arthrodermataceae

**Genre :** *Trichophyton*

## Annexes

---

### *Microsporum canis*

Le genre *Dermatophyte Microsporum* a été comme principalement zoophile. Un certain nombre d'espèces se produisent symptomatiquement ou causent des lésions sur la fourrure et la peau de mammifères, p.ex. *Microsporum Canis* sur les chats et les chiens, *M. Equinum* sur les chevaux, *M. nanum* sur les porcs et *M. gallinae* sur la volaille.

*Microsporum Canis* est un champignon pathogène à distribution mondiale qui provoque la capite de tînée chez les animaux et les humains. *M. Canis* provoque également une infection invasive chez les patients immunodéprimés (*Liming Mao et al., 2014*).



### **Classification**

**Règne** : Fungi

**Division** : Ascomycota

**Sous-em** : Pezizomycotina

**Classe** : Eurotiomycetes

**Sous-classe** : Eurotiomycetidae

**Ordre** : Onygenales

**Famille** : Arthrodermataceae

**Genre** : *Microsporum*

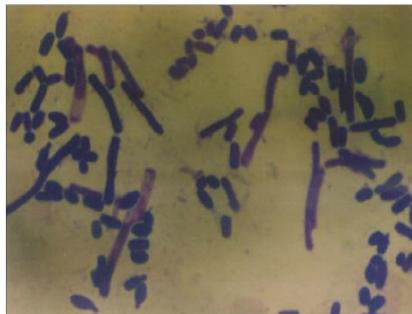
## Annexes

---

### *Trichophyton glabrum*

Les espèces de trichosporon sont des champignons qui peuplent couramment le sol. Elles colonisent la peau et le tractus gastro-intestinal des humains. Longtemps connue comme la cause des infections superficielles telles que la piédedra blanche, une infection distale de la tige des cheveux, le genre est maintenant la deuxième cause la plus souvent signalée d'infections disséminées de levure chez les humains.

- Le trichosporon est également un commensal dans les voies gastro-intestinales et respiratoires humaines (Ryan C Maves, 2018).



#### **Classification**

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Classe :** Ascomycètes

**Ordre :** Onygnales

**Famille :** Arthrodermataceae

**Genre :** *Trichophyton*

## Annexes

---

### *Trichosporon spp*

*Trichosporon spp.* Sont des champignons basidiomycésains de type levure que l'on trouve largement dans la nature. Les isolats cliniques sont généralement liés à des infections superficielles. Cependant, ce champignon a été reconnu comme un agent opportuniste des infections invasives, principalement chez les patients atteints de cancer et ceux exposés à des interventions médicales invasives. Il est possible que la capacité des souches de *Trichosporon* à former des biofilms sur les dispositifs implantés, la présence de glucuronoxylomannane dans leurs parois cellulaires, et la capacité de produire des protéases et des lipases sont tous des facteurs probablement liés à la virulence de ce genre et peuvent donc expliquer le progrès de la trichosporonose invasive (Giovanni *et al.*, 2006).



#### **Classification :**

**Règne :** Fungi

**Division :** Basidiomycota

**Classe :** Tremellomycetes

**Ordre :** Tremellales

**Famille :** Trichosporonaceae

**Genre :** *Trichosporon*

## Annexes

---

### *Levure de Malassezia*

Les cellules de *M. pachydermatis* étaient de petite taille, n'excédant pas 5,0µm, avec des parois cellulaires relativement épaisses. La base large pour l'émergence des bourgeons, une structure remplaçant le col des bourgeons dans d'autres levures bourgeonnantes, a été associée à la formation d'un collier caractéristique. Dans les répliques de la fracture par congélation, la surface interne de la paroi cellulaire (face de fracture exo plasmique de la membrane plasmique) montrait des crêtes en spirale de droite correspondant à des rainures en spirale de gauche sur la membrane plasmique (face de fracture protoplasmique de la membrane plasmique) dirigée vers le pôle croissant de la cellule fille.



### **Classification :**

**Règne :** Fungi

**Division :** Basidiomycota

**Sous-division :** Ustilaginomycotina

**Classe :** Incertae sedis

**Sous-classe :** Incertae sedis

**Ordre :** Malasseziales

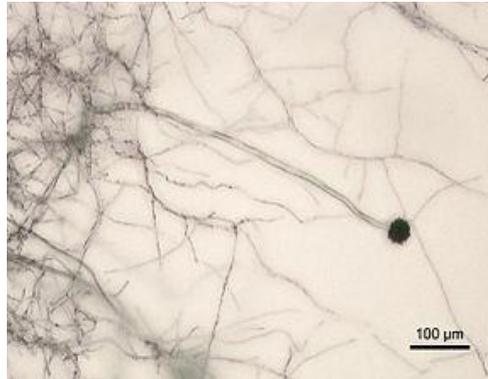
**Genre :** *Malassezia*

# Annexes

---

## ***Aspergillus niger***

Le patient a montré des signes d'érythème, d'otalgie, de démangeaisons, d'Otorrhée et de présence de masse grisâtre de couleur noire dans les deux canaux de l'oreille.



### **Classification :**

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Classe :** Eurotiomycetes

**Sous-classe :** Eurotiomycetidae

**Ordre :** Eurotiales

**Famille :** Trichocomaceae

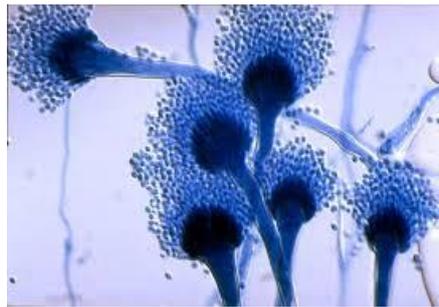
**Genre :** *Aspergillus*

## Annexes

---

### *Aspergillus fumigatus* :

*Aspergillus fumigatus* est un champignon microscopique saprophyte<sup>1</sup> qui joue un rôle essentiel dans le recyclage du carbone et du nitrogène environnemental. Sa niche écologique est le sol dans lequel il survit et pousse sur les débris organiques. Chez l'humain, il est responsable de maladies comme l'aspergillose broncho-pulmonaire.



### **Classification**

**Règne** : Fungi

**Division** : Ascomycota

**Sous-em** : Pezizomycotina

**Classe** : Eurotiomycetes

**Sous-classe** : Eurotiomycetidae

**Ordre** : Onygenales

**Famille** : Trichomaceae

**Genre** : *Aspergillus*

## Annexes

### Annexe 5 : produits chimiques utilisés

Produits chimiques	Formules chimiques
Acétate de plomb	$C_4H_6O_4Pb$
Acétate de sodium	$CH_3CO_2Na$
Acide ascorbique	$C_6H_8O_6$
Acide chlorhydrique	HCl
Acide gallique	$C_7H_6O_5$
Acide sulfurique	$H_2SO_4$
Acide trichloracétique	$C_2HCl_3O_2$
Alcool isoamylique	$C_5H_{12}O$
Ammoniaque	$NH_4OH$
Carbonate de sodium	$Na_2CO_3$
Copeaux de magnésium	Mg
Chloroforme	$CHCl_3$
Chlorure de fer	$FeCl_3$
Chlorure ferrique	$FeCl_3$
Dihydrogénophosphate de potassium	$KH_2PO_4$
Ethanol	$C_2H_5OH$
Ether de pétrole	$CH_3-(CH_2)_n-CH_3$
Ferricyanure de potassium	$K_3[Fe(CN)_6]$
Formol	$CH_2O$
Gélose Muller-Hinton	/
Hydrogénophosphate de sodium	$Na_2HPO_4$
Hydroxyde de potassium	KOH
Iode sublimé pur	$I_2$

## Annexes

---

Méthanol	CH <sub>4</sub> O
Propanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O
Milieu PDA	/
Gélose Muller- Hinton	/
Gélose nutritive	/
Milieu du Sabouraud	/

## Annexes

---

### Annexe 8 : appareillage et matériel utilisé au laboratoire.

Équipement et appareils	Verreries et petits matériels
Agitateur magnétique	Béchers de 50ml, 100 ml
Balance de précision	Boîtes de pétri
Broyeur	Entonnoirs
Autoclave	Erlenmeyer
Bec bunsen	Flacon en verre
Plaque chauffante	Eprouvettes graduées
Micropipette	Cuvette de spectrophotomètre
Vortex	Papier filtre
Etuve	Papier aluminium
Spectrophotomètre	Spatule
Réfrigérateur	Tubes à essais
Centrifugeuse	Pipette pastor
Bain-marie	Disques d'antibiogramme vierges (6mm)
Autoclave	Ecouvillons
	Emporte pièce
	Tissu mousseline
	Seraing
	L' eau de javel
	Pince
	Micropipette

## Annexes

**Annexe 9** :composition des différences milieu utilisé.

Milieu de culture	Composition
Gélose nutritive	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 15g de glucose</li><li>➤ 10g de yeast peptone</li><li>➤ 7g d' agar</li><li>➤ 1l d' eau distillé</li></ul>
Gélose Muller Hinton	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 2g d' Extrait de viande de bœuf</li><li>➤ 17.5g de peptone de caséine</li><li>➤ 1.5g d' amidon de maïs</li><li>➤ 17g d' agar</li><li>➤ PH : 7.4</li></ul>
Gélose PDA	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 200g pomme de terre</li><li>➤ 20g glucose</li><li>➤ 20g agar-agar</li><li>➤ 1 litre d' eau distillée stérile</li></ul>
Milieux du Sabouraud (pour les levures)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 10g de peptone</li><li>➤ 20g de glucose</li><li>➤ 15g d' agar-agar</li><li>➤ 1 litre d' eau distillé</li></ul>

## Annexes

**Annexe10** :fiche techniques des réactifs et solutions utilisés.

Fiche technique1 :	Chlorure de fer anhydre à 5%
Fe Cl <sub>3</sub> .....5g	
Eau distillée.....100ml	
Fiche technique 2 :	chlorure de fer anhydre à 2%
Fe	
Cl <sub>3</sub> .....2g	
Eau distillée.....100ml	
Fiche technique3 :	Formol à 40%
Formol.....40ml	
Eau distillée.....60ml	
Fiche technique4 :	Réactif de stiansy
2 volumes de formol à 40%....	.....10ml
1 volume d'HCL concentré....	5ml
Fiche technique5 :	à 2%
Cu SO <sub>4</sub> .....2g	
Eau distillée.....100ml	
Fiche technique6 :	à 20%
NaOH.....20g	
Eau distillée.....100ml	
Fiche technique7 :	à 10%
KOH.....10g	
Eau distillée.....100ml	
Fiche technique 8 :	Acide chlorhydrique à 10%
HCL.....10ml	
Eau distillée.....90ml	
Fiche technique 9 :	méthanol à 70%
Méthanol.....100ml	
Eau distillée.....47,75m	
Fiche technique 10 :	réactif de drangendroff
<p>Solution a : 0.85g de nitrate de bismuth+40ml d'eau distillée+10ml d'acide acétique            Solution b : 8g d'iode de potassium + 2ml d'eau distillée.            On mélange a+b.            15ml de mélange +20ml d'acide acétique puis compléter à 100ml de l'eau distillée.</p>	
Fiche technique 11 :	réactif de Folin
Tungstate de sodium.....41.24g	
Acide physiologique.....8.25g	
Acide phosphorique.....20ml	

## Annexes

---

Eau distillée.....300ml

Le tout est mise en ébullition pendant 2h puis ajusté avec 1000ml par d'eau distillée.  
(Solim Igor, 2002)

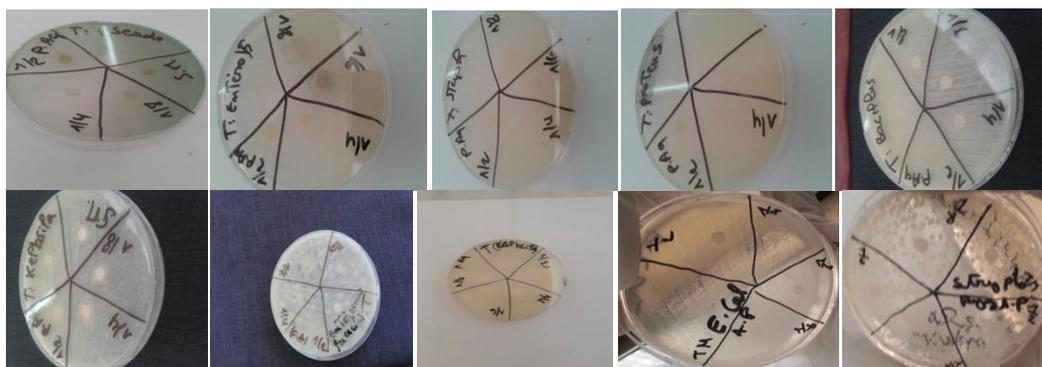
Fiche technique 12 : Eau physiologique

Na Cl.....9g

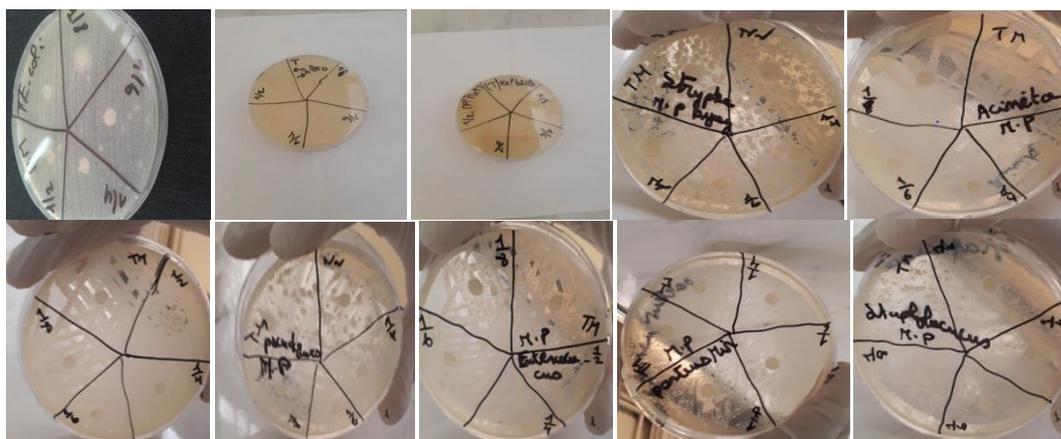
L'eau distillée.....100ml

## Annexes

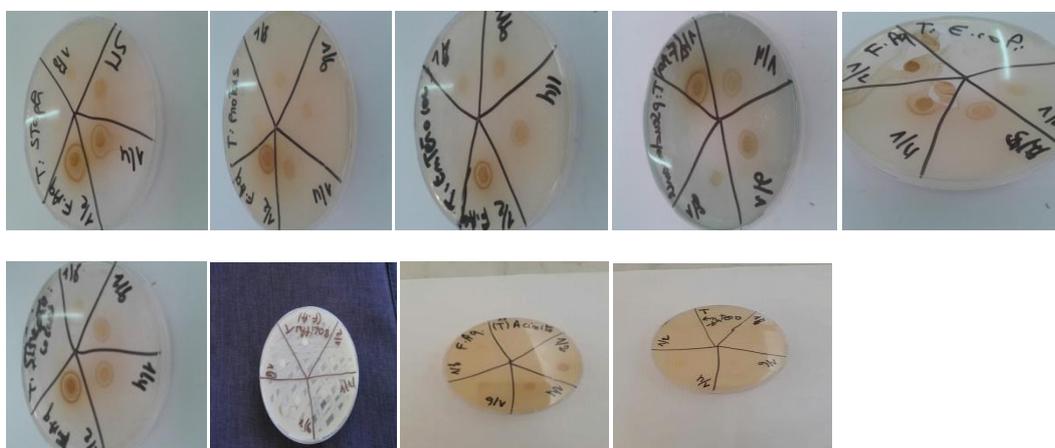
### Annexe 1 : résultats de l'activité antibactérienne des extraits du *Citrus aurantium* L



**Figure 1 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins aqueux du *Citrus aurantium* L.

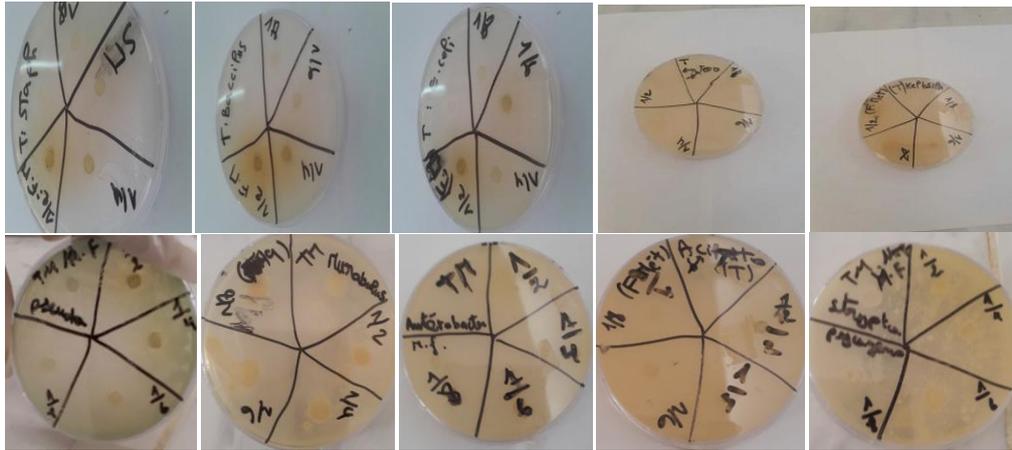


**Figure 2 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins méthanolique du *Citrus aurantium* L.



**Figure 3 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles aqueux du *Citrus aurantium* L.

## Annexes



**Figure 4 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles méthanoliques du *Citrus aurantium L.*



**Figure 5 :** résultats de l'activité antibactérienne de la solution brute et des dilutions de jus du *Citrus aurantium L.*

## Annexes

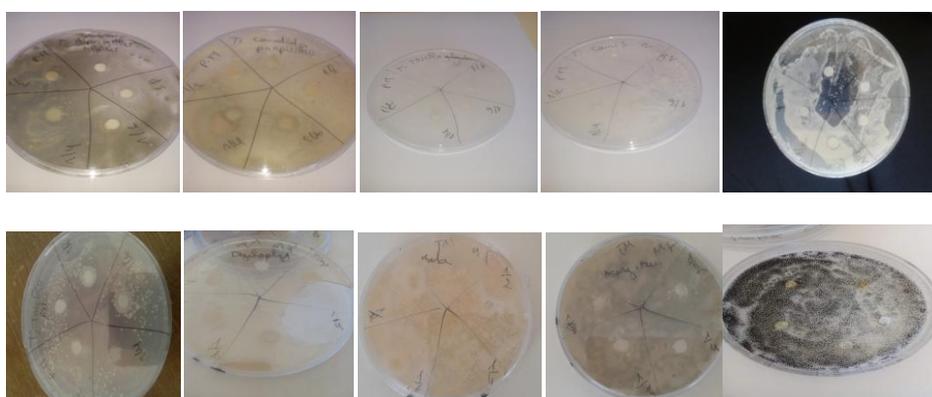
### Annexe 2 : résultats de l'activité antifongiques des extraits du *Citrus aurantium L.*



**Figure 6 :** résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins aqueux du *Citrus aurantium L.*

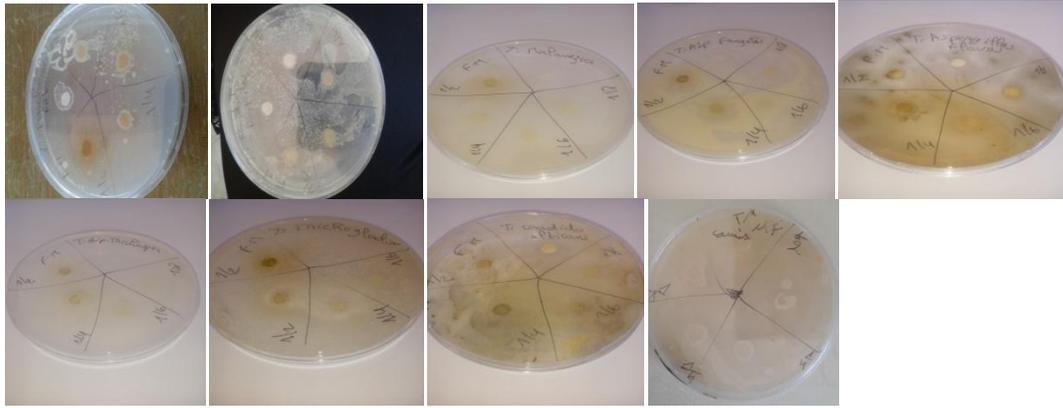


**Figure 7 :** résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles aqueux du *Citrus aurantium L.*



**Figure 8 :** résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des pépins méthanolique du *Citrus aurantium L.*

## Annexes



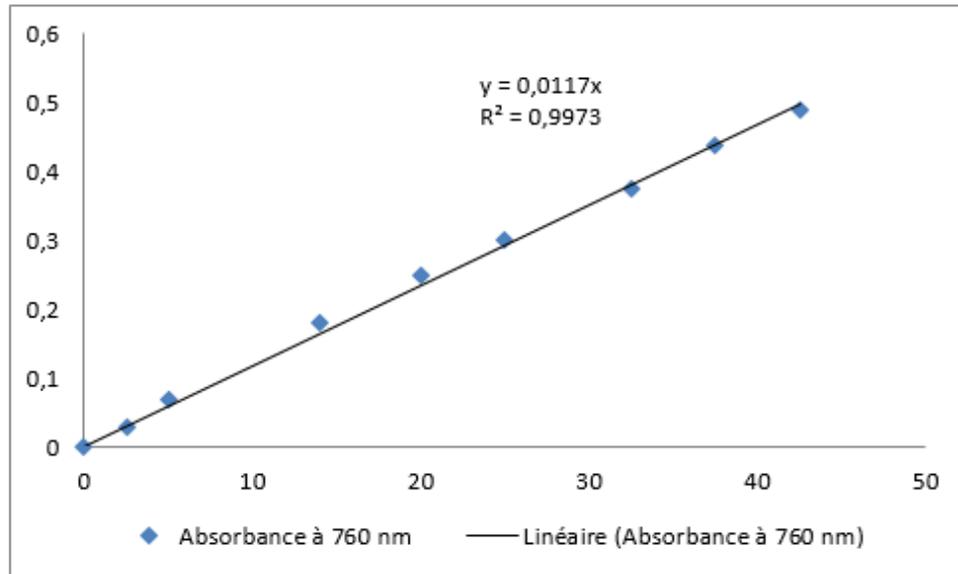
**Figure 9** : résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions des extraits des feuilles méthanolique du *Citrus aurantium L.*



**Figure 10** : résultats de l'activité antifongique de la solution brute et des dilutions de jus du *Citrus aurantium L.*

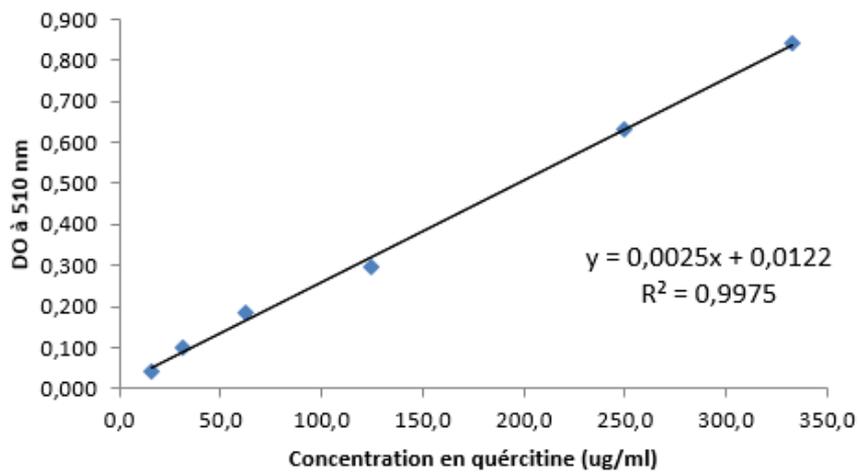
# Annexes

**Annexe 6** : courbe de l'acide gallique.



Concentration finale acide gallique (µg/ml)

**Annexe 7** : courbe de quercétine.



## Abstract

This work focuses on the phytochemical study, the antimicrobial activities of *Citrus aurantium* L. Harvested in the Boumerdes region of northern Algeria. Phytochemical screening revealed the presence of saponozides, mucilages, coumarin sugars flavonoid reducers and polyphenols. This plant is macerated by the method of maceration by methanol solvents (70%) and distilled water, the methanolic extract of the seeds has the highest yield which is 17.5%. The best polyphenol content is methanolic seed extract (0.887mg/g dry plant powder) While the best flavonoides content is noted in the extract methanolic seeds (3.56mg/ g MS).

The antibacterial activity was studied against ten strains, using the agar diffusion method. This activity indicates that bitter orange can inhibit the growth of *Streptococcus pyogenese* Group A, *Proteus Mirabilis*, *Enterobactere cloacea* and *Acinetobacter baumannii*. The antifungal activity was compared to ten strains, using the PDA diffusion method. This activity reveals that bitter orange can inhibit the growth of *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* and *Malassezia* sp.

**Key words :** *Citrus aurantium*, phytochemical screening, polyphenols, flavonoids, antibacterial activity, Antifungal activity.

## الملخص

العمل المنجز في دراستنا يهدف الى تقييم نشاط مضادات الميكروبات للأوراق البذور و عصير برتقال المريرة بالإضافة إلى المميزات الفيزيوكيميائية للعصير.

Polyphenols السكريات Flavonoid ، ، يقلل من Saponosides الفحص الفيتو كيميائي سلط الضوء على وجود إلى تمزق بواسطة طريقة تكتيل المذيبات الميثانول (70%) والماء المقطر، (SUBMITTED) يخضع هذا المصنع %أعلى عائد(كفاءة) وهو 17.5 مستخلص الميثانوليكي من سجلات من مسحوق الخضروات الجاف) في g / ملغ (0.887)أفضل محتوى متعدد الفينول هو واحد من مستخلص الميثانوليكي من حين أن أفضل معدل هو ملحوظ (G ms / ملغ 3.56) الميثان

تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا نحو عشرة أصول (جذوع)، وذلك باستخدام طريقة التوزيع (البحث) في بيئة اللوسه (الوسط). يكشف هذا نشاط أن البرتقال مرة يستطيع منعت الحالة نمو من: مكور عقدي [بيوجنس] مجموعة [1] ، [بروتوس] [ميرابيليس] ، [إنتربكتري] يغلق و [بلسم] [أكينتوبكتري]. كان النشاط المضاد للفطريات نحو عشرة أصول هذا النشاط يكشف أن (PDA) (أجدال)، باستخدام طريقة التوزيع (البحث) في البيئة (الوسطى) المساعد الرقمي الشخصي وماساليا *Candida Albicans* ، *Flavflavus* *aspergillus*: أورانج المريرة يمكن أن تعوق نمو

## الكلمات المفتاحية

للـفطريات. النشاط المضاد للبكتيريا ا polyphénols, flavonoides, الفحص الكيميائي النباتي, *Citrus aurantium*, النشاط المضاد