

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

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA – BOUMERDES



Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de  
MASTER

**Domaine :** Science de la nature et de la vie

**Filière :** Biotechnologie

**Spécialité :** Biotechnologie Microbienne

## THÈME

---

Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits d'écorces, feuilles et grains  
de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* Blanco sur des bactéries isolées  
d'un sol rhizosphérique

---

**Présenté par :**

*MESLEM Ryma*  
*HEZILI Asmaa*

*Devant le Jury :*

*M<sup>me</sup> Foudia Soumia*

*Présidente*

*MAA*

*UMBB*

*M<sup>me</sup> Akmoussi Sihem*

*Examinatrice*

*MCB*

*UMBB*

*M<sup>me</sup> Ait Kaki Sabrina*

*Promotrice*

*Pr.*

*UMBB*

*2022/2023*

# Remerciements

## Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions notre DIEU le tout puissant qui nous a donné la santé, la volonté, la force, le courage et la patience pour pouvoir mener à bien ce modeste travail et de nous avoir guider dans les moments les plus difficiles.*

*Nos remerciements vont*

*A Mme. AIT SLIMANE-AIT KAKI Sabrina, Professeure au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, d'avoir accepté de diriger ce travail avec compétence et dévouement, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*A Mme FOUZIA Soumia, Maitre Assistante A. au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. Nous la remercions vivement.*

*A Mme AKOUSSI Sihem, Maitre de Conférence 'B' au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, de nous avoir fait l'honneur d'être membre de ce jury et d'examiner ce travail, son expérience sera bénéfique pour la valorisation de ce travail. Nous la remercions très sincèrement.*

*Nos remerciements sont aussi adressés, à toute personne ayant contribué de près ou de loin pour la réalisation de cette étude.*

## Dédicace

Merci dieu le tout miséricordieux, ton amour et tes grâces à mon égard m'ont donné la persévérance et le courage pour accomplir ce travail

### Je dédie ce modeste travail

A mon très cher papa **Rabah**

je dédie mon diplôme à celui dont je porte le nom avec fierté , tu à toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, vous êtes mon bonheur et mon roi de la vie, grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité , je voudrais te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi , je suis fière d'être votre fille et de pouvoir en fin réalisée ce que vous avez tant espérer et attend de moi .Je t'aime papa

Ma Chère Maman **Ouhiba**

Si Dieu a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien.

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je t'aime mama

Ma chérie, sœur **samah**

A ma moitié ma jumelle, Je suis la personne la plus chanceuse de l'univers de t'avoir dans ma vie sœurlette, Merci pour ton soutien et ton amour pour moi merci d'être à mes cotes. Je t'aime .

Mes cher frères **Mohamed amine et Yakoub**

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous, vous êtes mes fidèles accompagnants dans les moments les plus délicats je t'aime

Mon adorable **mon neveu Dido** qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A mon oncle **nono ( noureddine boudli)** Pour son soutien moral et ces conseils précieux tout au long de ma vie je t'aime .

Sans oublier mon binôme **Asmaâ** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet je t'aime

A toutes mes amies avec qui j'ai passé des moments agréables et inoubliables **Samra ( meriem ) , amani , douaa , radia ,fella et marwa**

**Meslem ryma**

## Dédicace

J'ai le grand plaisir de Didier ce modeste travail :

A mon très cher père **Djamel** ,pour ses encouragements son soutien , surtout pour son amour et son sacrifice a fin que rien n'entrave le déroulement de mes études .

A ma très chère mère **Djamila** ,qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a Jamais cessé de prier pour moi.

A mes sœurs : **Chaima,Rahma, mariem ,Naimat ,Safa** ,qui m'avez toujours soutien et encouragements durent ces années d'études.

A ma chère binôme "**ryma**" pour sa présence tout au long de mon parcours, sa patience, sa compréhension, son aide et ses conseils

Et mes meilleurs amies :**Amel, Samra, fella** ,qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Hezili asmaa

## Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des photos	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
<b>CHAPITRE I: SYNTHES BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I.1 Généralités sur les agrumes.....	3
I.1.1 Historique.....	3
I.1.2 Le genre Citrus.....	4
I.1.3 Origine génétique des espèces cultivée.....	4
I.1.4 Description morphologique.....	5
I.1.5 Production des agrumes en Algérie.....	6
I.2 Espèces étudiées.....	7
I.2.1 Les Mandarines <i>Citrus reticulata blanc</i> .....	7
I.2.2 Le bigaradier <i>Citrus aurantium</i> .....	12
I.3 Maladies des agrumes.....	17
I.4 Propriétés biologiques des polyphénols d'agrumes.....	19
<b>CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES</b>	
II.1 Matériel.....	22
II.1.1. Matériels non biologiques.....	22
II.1.2. Matériel biologique.....	22
II.1.2.1 Matériel végétal.....	22
II.1.2.2 Le sol.....	23
II.1.2.2 Microorganismes.....	23
II.1.2.2 Méthodes.....	24
II.2.1 Isolement.....	24
II.2.1.1 Prélèvement des échantillons.....	24

II.2.1.2 Isolement et purification.....	24
II.2.1.3 Caractérisation phénotypique des isolats.....	26
III.2.1.3.2 Étude microscopique.....	26
I.2.1.3.1 Étude macroscopique.....	26
II.2.1.3.3 Étude biochimique.....	26
II.2.1 Étude phytochimique.....	28
II.2.1.1 Préparation du matériel végétal.....	28
II.2.1.1 Screening phytochimique.....	29
II.2.1.2 Extractions des composés phénoliques.....	31
II.2.1.3 Dosage des composés phénoliques.....	35
II.2.2 Activités biologiques .....	36
II.2.2.1 Activité antioxydant.....	36
II.2.2.2 Activités antimicrobiennes.....	37

### **CHAPITRE III : RESULTAT ET DISSCUTION**

III.1 Résultat de l'isolement.....	40
III.1.1 Résultats de la caractérisation phénotypique des souches bactériennes isolées.....	40
III.1.1.1 Étude macroscopique.....	40
III.1.1.2 Étude microscopique.....	41
III.1.1.3 Étude biochimique.....	42
III.2 Études phytochimiques.....	45
III.2.1 Screening phytochimique.....	45
III.2.2 Extractions des composés phénoliques.....	49
III.2.2.1 Extrait des polyphénols totaux.....	49
III.2.2.2 Extrait aqueux.....	50
III.2.2.3 Extraction des flavonoïdes.....	51
III.2.3 Dosage des composés phénoliques .....	52
III.3 Résultats des activités biologiques.....	54

III.3.1 Activité antioxydante.....	54
III.3.2Activité antimicrobienne.....	57
Conclusion .....	64
Références bibliographiques .....	66
Annexe	

## Introduction

Les agrumes sont le principal genre dans la famille des Rutaceae (Turner, 2013). Et l'agrumiculture constitue le plus grand secteur de production de fruits dans le monde, avec plus de 90 millions de tonnes pour la campagne 2016/2017, où l'Algérie occupe la 4<sup>ème</sup> position dans la région Méditerranéenne (FAO,2016). Cette production se décline essentiellement en 4 catégories : citron, mandarine, pamplemousse et orange (FAO,2016).

L'Algérie détient aussi une collection variable composée de 256 variétés d'agrumes, ce qui représente un patrimoine génétique inestimable (Larbi *et al.*, 2007). Ce secteur en Algérie joue un rôle clé en termes économiques (Schimmenti *et al.*, 2013).

Les agrumes sont principalement consommés frais ou sous forme de jus en raison de leur valeur nutritionnelle et de leur saveur particulière (Ghafar *et al.*, 2010). Cependant, de grandes quantités de sous produits sont produites (55% du poids des produits). Ils sont constitués d'écorces, des pépins restant après l'extraction du jus et constituent un sérieux problème environnemental pour leur élimination (Moulehiet *al.*, 2012).

Parmi les agrumes les plus recherchés par le consommateur, citant le genre *Citrus* (*Citrus aurantium*) très souvent utilisée à des fins médicinales en raison des divers composés bioactifs qu'il contient. Les parties les plus utilisées sont l'écorce du fruit, les fleurs et les feuilles (Sarrou, 2013). En outre, Les fruits immatures sont parfois marinés ou utilisés comme condiment, tandis que la peau du *Citrus aurantium* contient du limonène, principal constituant de l'huile essentielle, des polyphénols tels que des flavonoïdes, des hespéridines et des néohespéridines (Sarrou, 2013). A cet égard, les polyphénols sont des agents réducteurs associés à d'autres agents réducteurs alimentaires tels que la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes, ils protègent les tissus de l'organisme contre le stress oxydatif, ils sont communément appelés antioxydants (Scalbert *et al.* 2000).

Une deuxième espèce très prisée est très populaire ; la mandarine « *Citrus reticulata Blanco* » très largement utilisées comme médicament par les chinois pendant une longue période en raison de leur activité pharmacologique, une faible toxicité et des faibles couts (Mukharet *al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Les déchets de mandarine (*Citrus reticulata blanco*) sont une source riche de composés

bioactifs, tels que les composés phénoliques (les flavonoïdes et les acides phénoliques), l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les sucres réducteurs...etc (**Singamusong *et al.*, 2015**).

L'exploitation des constituants bioactifs des déchets de fruits tel que le citron ou la mandarine constitue une matrice incontournable de molécules à effets divers notamment antioxydant, antimicrobienne, anticancéreux, anti-inflammatoires et antidiabétiques (**Panwar *et al.*, 2021**).

Pour ce faire, notre travail est subdivisé en trois parties:

Une partie bibliographique, débutant sur une synthèse bibliographique dans laquelle sera exposé des généralités sur les agrumes, les deux espèces sujet de notre expérimentation et leurs différentes propriétés.

Une deuxième partie, consistant en une présentation détaillée du matériel et des méthodes expérimentales utilisés dans ces travaux relatifs aux extractions et dosage de molécules bioactives ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques.

La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats ainsi que leurs interprétations et discussion.

Enfin, nous terminons par une conclusion générale et quelques perspectives.

### I.1 Généralités sur les agrumes

#### I.1.1 Historique

Le mot « agrume » provient du latin « *acrumen* », qui désignait dans l'Antiquité des arbres à fruit acide. Les agrumes appartiennent à la famille des *Rutacées* sous famille *Aurantioideae* (Barboni,2006).

Les agrumes semblent originaires des régions situées au sud-est de l'Himalaya, ainsi que de la Chine du Sud et du Japon méridional. De ces régions, l'aire de culture s'est étendue vers le Sud-Est, dans l'archipel indonésien, et vers l'Ouest jusqu'au Moyen-Orient. Puis, les grands mouvements de colonisation ont ensuite largement étendu cette aire de culture le long de la côte orientale de l'Afrique, jusqu'en Amérique centrale. Les premiers agrumes furent ainsi plantés au Brésil dès 1540 et en Floride dès 1565, en californie en 1767 et en Australie en 1788. La plupart sont aujourd'hui cultivés dans un domaine climatique très différent de leur aire traditionnelle. C'est sous les moyennes latitudes de l'hémisphère Nord que sont produits les 4/5 des agrumes actuellement récoltés dans le monde : pour plus de 80 % des oranges et des mandarines et pour 10 % des citrons. 35 % des premières viennent du monde méditerranéen (notamment d'Espagne), 20 % des Etats-Unis, et 12 % du Brésil; 50 % des citrons sont récoltés autour de la Méditerranée et 20 % aux Etats-Unis (Praloran ,1971).

La répartition de cette culture est donc largement le fait des initiatives humaines. Tels sont les principaux enseignements géographiques d'un ouvrage qui, largement conçu à d'autres fins, offre par ailleurs de très longs développements sur la botanique, l'écologie et les techniques de culture des agrumes (Praloran ,1971)

Selon l'APG IV (AngiospermPhylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants) la classification des agrumes est comme suite:

**Règne :** Planta

**Phylum :** Tracheobionta

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** Sapindales

**Famille :** Rutaceae

**Genre :** *Fortunel*, *Poncirus*, *Citrus*

### I.1.2 Le genre *Citrus*

Selon **Barboni, (2006)**, les agrumes se répartissent en plusieurs genres dont *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* qui sont les trois genres les plus cultivés à travers le Monde.

Le genre *Poncirus* ne renferme qu'une seule espèce à savoir le *Poncirus trifoliata*. Cette espèce est essentiellement utilisée en agrumiculture comme porte greffe car ses fruits ne sont pas comestibles.

Le genre *Fortunella* comprend six espèces dont deux seulement font l'objet d'une culture dans le Monde. Il s'agit de *Fortunella japonica* et *Fortunella margarita*.

Le genre *Citrus* regroupe l'essentiel des espèces d'agrumes cultivés et est le plus diversifié des genres d'agrumes (oranges, citrons, cédrats, mandarines, pamplemousses, bergamotes, bigarades, limes, pomelos...). La morphologie des arbres varie d'une espèce à l'autre en forme, taille et port. La taille, la forme et la couleur des feuilles et des fruits sont variables d'une espèce à l'autre, le diamètre des fruits peut aller d'environ 3 cm, pour la mandarine *Nasranan* par exemple, à plus de 25 cm pour certains pamplemousses ou cédrats. La forme des fruits est également très variable : sphériques comme une orange, piriformes comme la poire du commandeur ou digitées comme le cédrat Main de Bouddha, avec ou sans mamelon, avec ou sans col.

Les principales espèces qui composent ce genre étant sexuellement compatibles entre elles et avec les genres précédents, il n'y a pas vraiment de consensus quant au nombre d'espèce de *Citrus* (**Franck,2014**).

### I.1.3 Origine génétique des espèces cultivée

Il existe quatre taxons de base : mandariniers, pamplemoussiers, cédratiers et papedas (Fig.1). Par différentes combinaisons sexuées, ces taxons de base auraient généré les hybrides initiaux fondateurs des espèces dites secondaires (*C.sinensis*, orangers ; *C. paradisi*, pomelos ; *C. limon*, citronniers ; *C. aurantium*, bigaradiers ; *C. clementina*, clémentiniers...). Les limettiers auraient des origines multiples, l'une d'entre elles implique une hybridation entre un cédratier (*C. medica*) et un représentant du sous-genre *Papeda*(*Citrus micrantha*) (**Franck, 2014**).

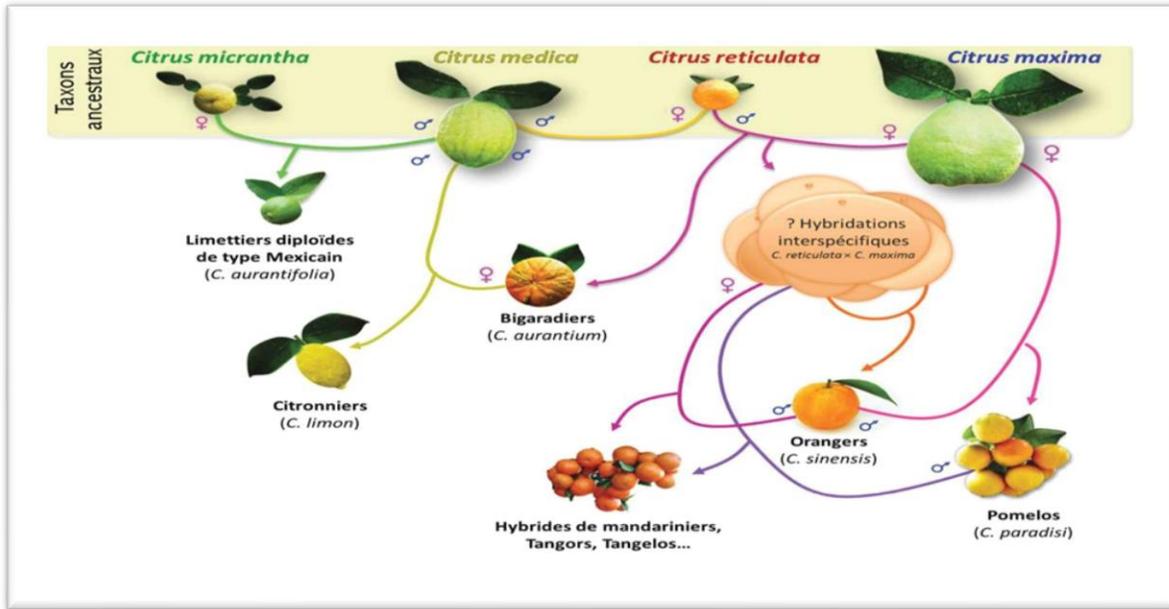


Figure 1. Origines phylogénétique supposées des cultivars modernes d'agrumes (photos et photo-montage : © F. Curk-Inra)

## I.1.4 Description morphologique

Selon **Barboni, (2006)** les plants d'agrumes cultivés sont généralement composés de deux fractions ; une partie aérienne, essentiellement constituée par la variété (ou cultivar) de l'espèce cultivée (oranger, mandarinier, etc...). C'est la partie productive de l'arbre, c'est-à-dire celle qui portera le fruit. Une partie souterraine, formée par la porte greffe (ou sujet) et c'est la partie qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol, son alimentation en eau et en sels minéraux.

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique.

On distingue différentes parties :

- L'écorce, généralement peu développée, constitue la partie non comestible du fruit. Elle est formée de l'épicarpe et du mésocarpe externe et interne. À maturité du fruit, c'est l'épicarpe qui se colore en orangé.
- La pulpe formée par l'endocarpe est la partie comestible du fruit. Elle est constituée par un ensemble de poils ou vésicules renfermant le jus.
- Les pépins proviennent de la fécondation. Chez le clémentinier, l'absence de pépins est fonction des conditions de la pollinisation, l'autofécondation est impossible (**Barboni, 2006**).

### I.1.5 Production des agrumes en Algérie

Comme pour de nombreux pays, en Algérie, les agrumes représentent une importance économique considérable, du moment qu'ils constituent une source d'emploi et d'activité aussi bien dans le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (conditionnement, emballage, transformation, etc.). Les terres utilisées pour la culture des agrumes sont parmi les plus riches du pays. Les zones de l'ouest sont rassemblées dans des périmètres irrigués. Au centre un bon pourcentage est concentré hors des périmètres irrigués, alors que pour l'Est une occupation appréciable dans les périmètres de Skikda, Annaba et Guelma (Tab.1) (Gougam,2016).

- Dans les années 70 les agrumes ne représentaient que 42.000 ha.
- En l'an 2000 la superficie agrumicole était de 46.000 ha.
- En 2006 une importante période de reprise des plantations 62.902 ha.
- En 2010 le verger agrumicole occupe 63.589 ha.

**Tableau 1. Répartition des vergers agrumicoles algériens (FAO,2016)**

Wilaya d'Algérie	Le pourcentage %
Autre	29%
Blida	27%
Chlef	9%
Alger	8%
Mascara	7%
Relizane	7%
Mostaganem	5%
Skikda	4%
El-taref	4%

### I.2 Espèces étudiées

#### I.2.1 Les Mandarines *Citrus reticulata blanco*

##### a. Généralités sur les Mandarines

*Citrus reticulata* Blanco ou mandarine est originaire de Chine et a été introduit en Afrique et en Europe via la route nord-africaine entre le XVe et le XIXe siècle grâce au commerce avec les colonies asiatiques portugaises et britanniques (Tahsin *et al.*, 2017).

Elle est l'une des trois agrumes originaux du genre *Citrus* et parmi les agrumes frais les plus commercialisés. C'est un petit arbre épineux au sommet dense de fines branches, qui aurait été introduit au cours du huitième siècle (Apraj et Pandita., 2014).

##### b. Classification

Selon la APGIV, la classification de l'espèce *C. reticulata blanco* est comme suite:

**Règne :** Plantae

**Phylum :** Tracheophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Ordre :** sapindales

**Famille :** Rutaceae

**Genre :** *Citrus* L.

**Espèces :** *reticulata*

**Nom scientifique du taxon :** *Citrus reticulata blanco*

##### c. Description botanique

Le mandarinier est un arbuste épineux, persistant et touffu qui pousse jusqu'à 2 à 8 m, la plupart des variétés mesurent en moyenne 7,5 à 13 mètres de hauteur (Photo.1. a) (Putnik *et al.*, 2017). L'arbre a des branches fines portant des feuilles vert foncé en forme de lance, avec une nervure centrale proéminente (Tab.2). Les pétioles sont étroitement étroits ou légèrement marginés et les fleurs blanches parfumées (Boughendjioua *et al.*, 2017). La description détaillée du mandarinier est illustrée dans le tableau qui suit :

Tableau n°2. Description botanique de l'arbre du mandarinier (Chapot, 1962 ; Anonyme, 2003)

Partie	Description
Fruit	Il est sphérique, légèrement aplati; la pulpe est juteuse et pleine de pépins, même si les sélectionneurs ont cherché à réduire leur nombre; l'écorce est fine, plutôt lisse et vivement colorée (Photo.1.b). Sa saveur est très parfumée.
Fleur	Les fleurs sont glabres, de couleur blanc pur, les boutons sont de forme sphérique, s'allongeant légèrement à l'ouverture de la fleur. Le pédoncule est court, 3 à 4 mm en moyenne (Photo.1.d).
Feuillet	Sont de taille et de formes particulières à la variété : elles sont de petite taille, 77 mm de longueur et 24 mm de largeur en moyenne (Photo.1.c). Le limbe est très caractéristique, il est de forme étroitement lancéolée. Le pétiole est court, de 7 à 8 mm, soit 1/10 de la longueur du limbe. Limbe et pétiole sont articulés entre eux. Les feuilles froissées dégagent une odeur très spécifique, très forte et très agréable.
Graine	Elles sont nombreuses et beaucoup, en moyenne 18 par fruit. Elle caractérise d'une petite taille, trapue forme sphérique avec bec court et recourbé. Surface lisse, couleur crème, laissant apparaître la trace des très nombreux cotylédons.
Rameaux	Sont très grêles et présentent de jeunes pousses de couleur vert clair pur, sans coloration pourpre.



a.



b.



c.



d.

Photo1. Parties de l'arbre du mandarinier (a.Arbre. b. Fruit. c. Feuillet. d. Fleur)  
Photos originales (2023)

#### d. Variétés de mandarines

Selon **Bousbia (2011)**, Il existe plusieurs variétés de mandarines :

- Mandarine (*Citrus reticulata* Blanco.).
- Mandarine commune (*Citrus reticulata* « Ponkan »).

- Clémentine.
- Tangerine.
- Satsumas (*Citrus unshin*) : mandarines précoces, déjà mûres quand la peau est encore verte.
- Mandarines Méditerranéennes Willowleaf (*Citrus deliciosa*): les fruits sont sphériques et aplatis aux pôles avec une peau fine, lisse, colorée en jaune orangée. La pulpe, orange clair, est juteuse, tendre, agréablement parfumée mais présentant de nombreux pépins.
- Mandarine king (*Citrus nobilis*).

### e. Compositions chimiques

La mandarine est une source riche en protéines, fibres alimentaires et minéraux essentiels comme le calcium, le potassium, phosphore et magnésium (Tab.4). De plus, ils contiennent des quantités importantes de vitamines C et A et infimes de vitamines B1, B2, B3, B5, B6, B9 et E8,13 (Tab.5). En moyenne, 100 g de mandarine se composent d'eau de glucides et de protéines (Tab.3) (Lui *et al.*, 2012, Putnik *et al.*, 2017).

Tableau 3. Composition nutritionnelle des mandarines (Collenet *et al.*, 2020)

Nutritif	Contenu en 100g
Energie	53 kcal/222KJ
Protéines	0,81 g
Glucides	13,34 g
Sucres	10,58 g
Cendre	0,38 g
Fibre alimentaires	1,8 g
Lipides totaux	0,31 g
Acides gras saturés totaux	0,039 g
Acides gras monosaturés totaux	0,060 g
Acides gras polysaturés totaux	0,065 g

Tableau 4. Composition des minéraux des mandarines (Collenet *et al.*, 2020)

Nutritif	Contenu en 100g
Calcium	37 mg
Fer	0,15 mg
Magnésium	12 mg
Phosphore	20 mg
Potassium	166 mg
Sodium	2 mg

<b>Zinc</b>	0,07 mg
<b>Cuivre</b>	0,042 mg
<b>Manganèse</b>	0,039 mg
<b>Sélénium</b>	0,1 pg

**Tableau 5. Compositions des vitamines (Collenet *al.*, 2020)**

Nutritive	Contenu en 100g
<b>Vitamine A</b>	34 µg /6811 U
<b>Vitamine E (alpha-tocophérol)</b>	0,20 mg
<b>Vitamine C</b>	26,7 mg
<b>Vitamine B1 (Thiamine)</b>	0,058 mg
<b>Vitamine B2 (riboflavine)</b>	0,036 mg
<b>Vitamine B3 (Vitamine PP, Niacine)</b>	0,376 mg
<b>Vitamine B6</b>	0,078 mg
<b>Choline</b>	10,2 mg
<b>Acide pantothénique (Vitamine B5)</b>	0,216 mg
<b>bêta-cryptoxanthine</b>	407µg
<b>alpha-carotène</b>	101µg
<b>bêta-carotène</b>	155 µg
<b>Bétaïne</b>	0,1 mg
<b>Cholesterol</b>	0 mg

### f. Composition phytochimique

Les constituants phytochimiques de l'écorce, le jus et les fruits du *Citrus reticulata blanco* sont illustrés dans le tableau n°6.

**Tableau 6. Composition phytochimique de *Citrus reticulata blanco***

Partie	Constituants	Référence
<b>Écorce</b>	Caroténoïdes, fibres alimentaires et polyphénols, flavonoïde	<b>Rincon <i>et al.</i>, 2005</b>
<b>Jus</b>	Esters de xanthophylle de bêta-cryptoxanthine (zéaxanthine et lutéine, caroténoïdes, tels que la bêta-cryptoxanthine.	<b>Wingerath <i>et al.</i>, 1995</b>
<b>Graine</b>	Limonoïdes, y compris l'obacunone 17 bêta-D-glucopyranoside, l'acide nomilinique 17 bêta-D-glucopyranoside, la limonine, la nomiline et un mélange de glucosides limonoïdes.	<b>Tian <i>et al.</i> , 2001</b>
<b>Fruit</b>	Alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, phénols et saponines.	<b>Okwu ,2008</b>

### **g. Utilisation des mandarines**

Les mandarines occupent une place importante dans le marché des agrumes frais, du fait que le marché mondial a considérablement changé durant les 20 dernières années avec une préférence accrue des consommateurs vers des mandarines sans pépins, savoureuses dotées d'une peau de belle couleur d'un épluchage facile. Par conséquent, les mandarines sont désormais le plus grand secteur de l'industrie des agrumes frais dans le monde. Le nombre de variété de mandarines commercialisées est presque égal au nombre de tous les types d'agrumes horticoles (**Bousbia, 2011**).

#### ➤ **Utilisations médicinales**

La partie comestible du fruit brut de la mandarine contient des antioxydants tels que la vitamine C, les caroténoïdes et les composés phénoliques. Le fruit est également une riche source d'acides aminés, d'acides organiques, de pectines, de minéraux et de composés organiques volatils (**Ye XQ, 2011; Chen, 2016**). Ces constituants sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme en le protégeant contre les maladies chroniques et en fournissant une alimentation de base. Les fibres alimentaires et les composés phénoliques des mandarines sont utiles dans la formulation d'aliments fonctionnels (**Rinconet *al.*, 2005**). La mandarine contient également des coumarines par exemple, le bergaptène qui sensibilise la peau à la lumière du soleil (**Bown, 1995**).

#### ➤ **Utilisations traditionnellement**

Le péricarpe et l'endocarpe sont analgésiques, antiseptiques, antiasthmatiques, anti-inflammatoires, antiscorbutiques, antitussifs, carminatifs, expectorants et stomachiques. Elles sont donc utilisées dans le traitement et la prise en charge de la dyspepsie, de l'asthme et de l'hypertension. De la dyspepsie, de la distension gastro-intestinale, toux avec mucosités abondantes, hoquet et vomissements. L'exocarpe vert non mûr est utilisé dans le traitement des douleurs thoraciques et de l'hypochondre, de la gastro-entérite et de l'asthme, la distension gastro-intestinale, le gonflement du foie (**Khan, 2010 ; Chopra, 1986**).

### I.2.2 Le bigaradier *Citrus aurantium*

#### a. Généralité sur le bigaradier

Le bigaradier est originaire du sud-est de l'Asie. Les arabes l'auraient introduit à l'IXe ou Xe siècle en Perse, en Irak, en Syrie, en Palestine, en Egypte, en Afrique du Nord, puis en Sicile, en Sardaigne et en Espagne (**Didier,1984**).

*Citrus aurantium* est l'un des agrumes appartenant à la famille *Rutaceae*, est connue pour son goût extrêmement amer et aigre.

Appeler également l'orange aigre, est une espèce unique avec des applications dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques. En raison de leur goût aigre et amer, les oranges amères ne sont pas employées comme fruits comestibles, elles sont plutôt utilisées pour la fabrication de jus et des marmelades (confitures d'orange) (**Ersus et Cam,2007**).

#### b. Classification

Selon la APG IV, la classification de l'espèce *Citrus aurantium* est comme suite:

**Règne** : Plantae

**Phylum** :Tracheophyta

**Classe** :Magnoliopsid

**Ordre** : Sapindales

**Famille** : Rutaceae

**Genre** : *Citrus*

**Espèce** : *aurantium*

**Nom scientifique du taxon** : *Citrus aurantium* L.

#### c. Description botanique

Les bigaradiers sont des arbres vigoureux à branches peu à moyennement épineuses pouvant atteindre 4 à 6 mètres de hauteur, on observe même des sujets atteignant 7 mètres. Les feuilles sont plus sombres que celles des orangers et possèdent un pétiole en forme de cœur(**Anne et al.,2022**).

## CHAPITRE I. Synthèse bibliographique

La feuille de bigaradier est vert brillant, coriace, persistante, simple, a disposition alterne (une feuille par nœud). Elle est constituée, d'une manière générale d'un limbe (de limbus = coin, rebord) et d'un pétiole (de petiolus = petit pied). Le limbe est entier, à bords droits, de forme ovale, a nervation pennée. Il peut atteindre 5 à 6 cm de long sur 3 à 4 cm (**Cerdagne, 2004**).

Les fleurs sont actinomorpes d'un blanc très pur, d'odeur agréable sont groupées par 2 à 3 à l'aisselle des feuilles et possèdent 5 à 8 pétales charnus ponctués de poches sécrétrices à huile essentielle.

La graine résulte de la transformation de l'ovule après fécondation. Dans chaque carpelle, on trouve une ou plusieurs graines fixées au placenta axile. Ce sont les « pépins » Ces graines sont entourées de téguments délimitant un ou plusieurs embryons contenant deux corvidons Ces graines sont exalbuminées (**Cerdagne, 2004**).

Le fruit de l'oranger amer est une baie globuleuse cloisonnée à peau chagrinée appelée hespéridé ou agrume. Elle peut également prendre le nom de bigaradier. Cette baie est rouge orangé à maturité, 7 à 8 cm de diamètre, fort aromatique de saveur amère et acide, ce qui la rend impropre à la consommation (**Cerdagne, 2004**).



a.

b.

c.

d.

**Photo2. Parties de l'arbre du Bigaradier (a.Arbre. b. Fruit. c. Graines. d. Feuilles)  
Photos originales**

### **d. Description morphologique du fruit**

Le fruit de bigaradier est formé de trois parties constituant le péricarpe (**Giraud,1993**) :

- Epicarpe = épiderme externe (flavedo). Il est coriace et comporte de nombreuses poches sécrétrices schizolysigènes contenant l'huile essentielle. Ces poches sont bien visibles à

l'œil nu, colorées en jaune par des caroténoïdes. D'une taille variant de 0,4 à 0,6 mm, elles sont réparties de manière irrégulière.

- **Mésocarpe** = tissu médian (albedo). Il forme une couche spongieuse, blanche, mucilagineuse. Il renferme de grandes schizolysigènes à essence. Il est constitué de cellules parenchymateuses polyédriques dans lesquelles sont présents des cristaux d'oxalate de calcium.
- **Endocarpe** = épiderme interne. Il est formé par les carpelles (« quartiers du fruit »). Il constitue la pulpe du fruit par émission, lorsque le fruit est encore jeune, de poils intra carpellaires renflés, charnus, vésiculeux.

### e. Variétés de bigarade

Selon **Anne et al., (2022)**, il existe plusieurs variétés :

- **Bigarade de Séville ou bigarade commune** : il s'agit de la variété la plus courante aussi appelée « de Séville ». Elle est à la fois plantée comme arbre d'ornement et cultivée pour la production de fruits destinés à la confiture ou la confection de spiritueux.
- **Bigarade bouquet de fleurs** : cette variété très ancienne, au port érigé, est la plus couramment cultivée pour sa fleur et sa quasi-absence d'épines facilitant la cueillette. Elle est aussi appelée « bouquetier de *Vallauris* » ou « de Grasse ».
- **Bigarade bouquetier de Nice** : cette variété a elle aussi les faveurs des parfumeurs compte tenu de sa double rangée de pétales. Mais elle possède d'autres qualités : certains fruits présentent des cornes, isolées ou en couronne à la base, offrant un intérêt pour l'ornement.
- **Bigarade striata (*Citrus aurantium striata*)** : le fruit de cette variété, plus petit, offre une multitude de rainures sur son écorce formant une cannelure sur toute sa surface.
- **Bigarade chinotto (*Citrus aurantium myrtifolia*)** : le bigaradier chinotto offre deux variétés, à petites feuilles et à grandes feuilles. Il possède moins d'épines que ses congénères. Une croissance lente et une bonne résistance à la culture en pot font de lui un bon candidat pour la culture sous forme de bonsaï.

### f. Compositions chimiques

Le bigaradier présente une composition diversifiée en éléments chimiques (Tab.7 et 8). Ils contiennent très peu de fibres, de protéines et de lipides et ils présentent une excellente source

de vitamine C et renferment également : la vitamine A, B3, B5, B6 et E. Parmi les composés essentiellement de *Citrus aurantium* 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 de lipides.

**Tableau 7. Composition nutritionnelle du bigarade (Abobatta,2019, Sidana et al.,2013)**

Nutritif	Contenu dans 100g
Energie	48 k cal
Protein	0,7 g
Glaucid	10,9 g
Cendre	0,5 g
Fiber alimentaire	0,3 g
L'eau %	87,6
Lipides	0,5 g
Acidesascorbique	45-90 mg
Acidesorganique	1,13 g

**Tableau 8. Composition en vitamines du bigarade (Abobatta,2019, Sidana et al.,2013)**

Vitamine	Contenu dans 100g
Vitamine A	290 mcg
Vitamine E (alpha-tocophérol)	320mg
Vitamine C	49,35mg
Vitamine B1 (Thiamine)	79 ug
Vitamine B2 (riboflavine)	40 ug
Vitamine B3 (Vitamine PP, Niacine)	0,3 mg
Vitamine B6	104 mg
Carotene	19,83ug
vitamine B5	240 mg
Vitamine B3	300ug
Vitamine B8	2,30ug
Vitamine B9	42ug

### e. Composition phytochimique de *Citrus aurantium*

La plante de *C. aurantium* regorge de composés phytochimiques. Les plus importants sont les flavonoïdes, les principaux composés bioactifs, sont regroupés en flavanones, flavones et

flavanols, les limonoïdes, tels que la limonine et la nomiline, et les alcaloïdes, sont également rencontrés (Tab.9).

**Tableau 9. Composition phytochimique de *Citrus aurantium***

Parties	Constituants	Référence
<b>Ecorse</b>	Mucilage, flavones, alcaloïdes, l'octopamine, synéphrine, caroténoïde, limonène	(Ersus <i>et al.</i> , 2007).
<b>Jus</b>	Flavonoïde, limonène volatil, acides phénolique	Tounsi <i>et al.</i> , 2011
<b>Graine</b>	Mucilage, flavonoïde, quercétine, résorcinol, catéchine, acide phénolique.	Abou Baker <i>et al.</i> , 2020
<b>Fruit</b>	Flavonoïde, mucilage.	Karimi <i>et al.</i> , 2012
<b>Feuillet</b>	Flavonoïdes, d'acide ascorbique et de constituants phénoliques, limonène, phytostérols, glucides, saponines, tanins, terpénoïdes	Labadie <i>et al.</i> , 2015

### f. Utilisation et effet thérapeutique

L'orange amère contient de nombreux composés bénéfiques pour la santé, notamment des polyphénols, de l'acide ascorbique, des caroténoïdes et des tocophérols (**Hadjiakhoondi et Baligh, 2005**).

#### ➤ Utilisation en médecine traditionnelle

Les *Citrus aurantium* ont été utilisés en médecine traditionnelle pour les soins de la peau, les effets sédatifs, gastriques, anti-inflammatoires et antirhumatismaux (**Fleming, 2001 ; Hadjiakhoondi et Baligh, 2005 ; El-akhal, 2014**).

Aussi la fleur d'oranger amer est utilisée pour traiter les troubles neurologiques tels que l'hystérie et la neurasthénie (**Akhlaghi et al., 2011**). En phytothérapie, ce fruit est utilisé pour faciliter la digestion et réduire les gaz (**Escardine, 2011**). Il possède également des propriétés antiallergiques en raison de sa richesse en quercétine, hespéridine et diosmine, qui sont des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur impliqué dans les réponses allergiques et inflammatoires (**Gonzalez et al., 2010**).

### ➤ Utilisation en industrie cosmétique

Les huiles essentielles des oranges (douces et amères), les extraits d'écorces d'orange (*Citrus aurantium*) ainsi que les graines sont employés pour la fabrication des savons, parfums, produits de soins et exfoliants (Escartin, 2011).

### I.3 Maladies des agrumes

Les agrumes, avec leur diversité, sont assujettis à plusieurs types de maladies physiologiques et parasitaires. A travers les régions agrumicoles mondiales, il a été rapporté plusieurs cas de ces maladies graves dont les dégâts ont pris un aspect désastreux (Agagna,2016).

On peut classer les maladies des plantes comme suit :

-**Maladies non infectieuses (abiotiques)** causées par un stress en température, le manque ou l'excès d'humidité ou de lumière, le manque d'oxygène, la pollution atmosphérique, les déficiences nutritionnelles, la toxicité minérale, l'acidité ou l'alcalinité du sol, la toxicité des pesticides et les mauvaises pratiques culturales (Salim, 2019).

-**Maladies infectieuses (biotiques)** causées par des champignons, des procaryotes, des plantes supérieures parasites, des virus et viroïdes, des nématodes, des protozoaires.

Les agrumes sont sujets à des maladies virales (tristeza), bactériennes (chancre citrique) ou cryptogamique (gommose). La certification sanitaire des plants et le choix de porte-greffes et de variétés résistantes garantissent l'implantation d'un verger sain vis-à-vis de certaines maladies (Salim,2019).

Les différents types de maladies sont synthétisés dans les tableaux n° 10,11 et 12 qui suivent :

**Tableau 10. Maladies bactériennes (Agagna,2016; Feriani, 2019)**

Maladies	Agent pathogène	Nature des dégâts	Méthodes de lutte
Bactériose	<i>Pseudomonas syringae</i>	Taches noirâtres sur le pétiole des feuilles, des nécroses sur les rameaux. Dessèchement du limbe de la feuille.	L'utilisation des produits cuprique pour limiter son extension.
Greening	<i>Condidatulusliberibater spp.</i>	Rabougrissement des arbres affectés, le feuillage devient épais et le système racinaire affaibli développement asymétrique des fruits et parfois absence de coloration des fruits a maturité, faible teneur en sucre.	Supprimer les vieux arbres malades. Planter de matériel végétal sain. Désinfecter le matériel de travail.

**Tableau 11. Maladies virales (Agagna,2016; Feriani, 2019)**

Maladies	Agent pathogène	Nature des dégâts	Méthode de lute
Tristeza	<i>Citrus tristeza virus (C.T.V)</i>	Dépérissement soudain, les feuilles prennent une coloration bronzée et se dessèchent Progressivement les fruits restent accrochés, se dessèchent et se momifient.	Désinfecteur les outils, traiteur les parasites, arbres greffés sur porte greffe, arracher et brûler désinfection les sols
Exocortis	<i>Citrus exocortis virus (C.E.V)</i>	L'écaillage de l'écorce. Mauvaise circulation de la sève, un affaiblissement de l'arbre (nanisme, jaunissement, réduction des productions).	Désinfecter les outils de taille. Utiliser des porte-greffes sains.

**Tableau 12. Maladies fongiques (Agagna,2016; Feriani, 2019)**

Maladies	Agent pathogène	Nature des dégâts	Méthode de lutte
Fumagine	Capnodiumcitri.	De nombreux ravageurs secrètent du miellat sur lequel la fumagine se développe. Taches	Luttercontre les insectes

		superficielles, veloutées et noirâtres. Baisse de l'activité photosynthétique	
Fumagine	-Capnodium citri.	De nombreux ravageurs secrètent du miellat sur lequel la fumagine se développe. Taches superficielles, veloutées et noirâtres. Baisse de l'activité photosynthétique	Lutter contre les insectes Piqueurs suceurs. Traitement aux huiles Blanches

### I.4 Propriétés biologiques des polyphénols d'agrumes

Les activités biologiques des polyphénols et leurs métabolites dépendent de leur structure chimique, qui peut varier avec la nature et la position des substituants, et le nombre de groupes hydroxyle (**Rahman, 2007**). Ces facteurs déterminent également si un polyphénol agit comme antioxydant ou comme modulateur de l'activité enzymatique (**Rahman, 2007**).

#### ➤ Activité anticancéreuse

Les flavonoïdes d'agrumes pourraient être des agents anticancéreux efficaces, en particulier contre le cancer de la peau, du colon, de la prostate, des poumons et du foie (**Rawson et al., 2014**). Les polyméthoxyflavones (PMF) ont démontré l'inhibition de la croissance des lignées de cellules leucémiques humaines. Les PMF dont la tangerétine ont joué un rôle inhibiteur important dans la phase de prolifération et de métastase des cellules cancéreuses, en inhibant l'adhésion et l'invasion cellulaire, et par l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1, par l'inhibition de la cycline kinase dépendante et le facteur IGF-1, réduisant ainsi le potentiel métastatique des tumeurs (**Rawson et al., 2014 ; Mojzer et al., 2016**). Les polyphénols peuvent également supprimer les effets secondaires de certaines thérapies, déjà utilisées dans le traitement du cancer comme la chimiothérapie et la radiothérapie, et améliorer leurs actions (**Mojzer et al., 2016**).

#### ➤ Activité antioxydant des polyphénols

Depuis longtemps, les produits naturels notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques (**Djamil, 2020**), en raison de leur forte activité antioxydante (**Barattoet et al., 2003; Katalinic et al., 2006**). Les fruits couramment consommés, tels que les *Citrus* (**Djamil, 2020**). Ces derniers composés de trois familles de molécules, l'acide

ascorbique (vitamine), la cryptoxanthine (caroténoïdes) et les flavanones (polyphénols) (**Rock et Fard et, 2014**) dont la plupart se trouvent au niveau de leurs feuilles et écorces (**Zhang et al., 2018**), qui jouent un rôle important dans le système de défense contre les radicaux libres leurs activité antioxydant se produit par plusieurs mécanismes (**Tripoli et al.,2007**):

- Inhibition de la lipopéroxydation : diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes de citrus limon et la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines de faible densité LDL dans le sang.
- Renforcement de l'activité des enzymes antioxydants : les citroflavonoïdes jouent un rôle important dans l'augmentation de l'activité antioxydante du superoxyde-dismutase et de la catalase et par la modulation de l'expression de gène de su-peroxyde dismutase, catalase et de glutathion peroxydase (**Tripoli et al., 2007**).

Chacun des composés possédant aussi des activités biologiques indépendantes de leur propriété antioxydante (**Rock et Fardet, 2014**).

### ➤ **Activité antimicrobienne**

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses. 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 carbohydrolases) 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 desupprimer 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 (**Aglia, 2011**).

### ➤ **Activité antivirale**

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes des agrumes ont une activité antimicrobienne très importante. La quercétine et l'hespéridine inhibent l'infectiosité et, le poliovirus, le virus para influenza et le virus syncytial (**Tripoli *et al.*, 2007**).

### ➤ **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 certain nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B (**Manthey *et al.*, 2001**).

### ➤ **Activité antiallergique**

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

## **Chapitre II. Matériel et Méthodes**

Les travaux ont été réalisés au niveau du laboratoire de **Biotechnologie Microbienne (Labo. 15)**, ainsi qu'au laboratoire de **Biotechnologie Végétale (Labo. 2.35)**, tous deux à la Faculté des Sciences de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes (**UMBB**).

Les expérimentations se sont étalées sur une période de quatre mois, soit du mois de Mars au mois du Juin de l'année universitaire **2022-2023**.

### **II.1 Matériel**

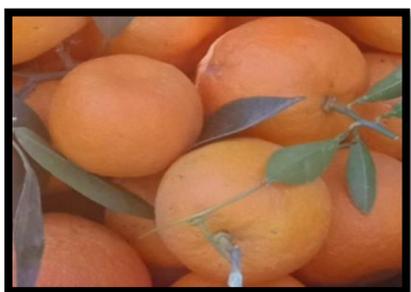
#### **II.1.1. Matériels non biologiques**

Le matériel non biologique utilisé pour réalisation de cette étude est composé de verrerie, d'équipements et d'appareils. Il comprend aussi un ensemble de réactifs et de produits chimiques tous représentés en annexe 1.

#### **II.1.2. Matériel biologique**

##### **II.1.2.1 Matériel végétal**

Deux espèces ont été utilisées dans cette étude à savoir: le bigarade (*Citrus aurantium*) et la mandarine (*Citrus reticulata* Blanco). Les parties utilisées : écorces, feuilles, et graines (pépins).



-a-



-b-

**Photo 3.** Fruit des espèces étudiées : a. Mandarine b. Bigaradier

**II.1.2.2 Le sol**

Le sol isolé provient d’une zone agricole dans la région de Hamadi la wilaya de Boumerdes.

**II.1.2.2 Microorganismes**

Les souches microbiennes utilisées pour le test de l’activité antimicrobienne proviennent pour les souches fongiques de la collection du laboratoire de recherche Valorisation et Conservation des **R**essources **B**iologiques de la Faculté des Sciences, UMBB.

Concernant les souches bactériennes se sont ceux qui seront isolés d’un sol Rhizosphérique et identifier dans ce travail en plus de deux souches bactériennes référencier..... (Tab.13)

Les souches sont entretenues par repiquage sur milieux nutritif favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C pour les bactéries et de 48h à 27°C pour les champignons.

**Tableau 13.** Souches microbienne utilisées lors de l’évaluation de l’activité antimicrobienne

Les souche		Famille	Gram	Référence
<b>Souches bactériennes</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Gram -	ATCC8739
	<i>Streptocoque sp.</i>	Streptococcaceae	Gram +	ATCC9027
	Souche 3	/	Gram +	Isolé (2023)
	Souche 5	/	Gram+	Isolé (2023)
<b>Souches fongiques</b>	<i>Aspargillus sp</i>	Trichocomaceae	/	/
	<i>Pinicilium sp</i>	Trichocomaceae	/	/

### II.2 Méthodes

#### II.2.1 Isolement

##### II.2.1.1 Prélèvement des échantillons

L'échantillonnage a été réalisé en mars 2023, dans la région de Hamadi (wilaya de Boumerdes). Cette dernière est située dans l'Est de l'Algérie. Son climat est chaud et sec en été, froid et pluvieux en hiver.

Les échantillons de sol ont été collectés stérilement à partir de la couche rhizosphérique de l'arbre de mandarine à une profondeur de 20 cm. Le matériel biologique recueilli a été placé dans des sachets en plastiques étiquetés (la date de l'échantillonnage, la localité) (photo 4). Ces derniers ont été gardés au frais et transportés stérilement au laboratoire pour réaliser les analyses microbiologiques nécessaires.



**Photo 4.** Prélèvement et conservation des échantillons de sol

##### II.2.1.2 Isolement et purification

###### a. Préparation des solutions mères

Au niveau du laboratoire le sol rhizosphérique a été tamisé à l'aide d'un tamiseur de diamètre de 2 mm.

10 g de sol ont été pesé puis introduit dans 90 ml d'eau physiologique stérile, la solution résultante a subi une agitation pendant 2 min à 200 rpm.

### b. Préparation des dilutions

La solution mère subit une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ), en effet 1 ml de la solution mère a été introduit dans 9 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir la première dilution et ainsi de suite jusqu'à la dilution  $10^{-7}$  (Photo 5).



**Photo 5. Préparation des dilutions**

### c. Ensemencement

À proximité d'un bec Bunsen, un volume de 0,1 ml de chaque dilution a été prélevé puis étalé épuisement à la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu nutritive (GN), dans le but d'isoler des souches microbiennes. Les cultures ont été incubées pendant 24 à 72 heures à  $30^{\circ}\text{C}$ .

### d. Purification d'isolats bactériens

L'ensemencement par des stries est la technique préférée pour la purification de la culture bactérienne, afin de disperser les bactéries à la surface du milieu de culture (GN) et obtenir des colonies bien isolées, après incubation de 24 à 72 h pendant  $30^{\circ}\text{C}$ .

Pour se faire, des repiquages successifs ont été réalisés jusqu'à l'obtention d'une culture pure (des colonies bien individualisées).

### e. Conservation des isolats

La méthode de conservation consiste à repiquer les souches dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile et du glycérol à 30% (annexe 2), puis incubé à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24h, ces dernières sont stockées par la suite à  $4^{\circ}\text{C}$  pour favoriser leurs viabilités et limiter les possibilités de variations.

### **II.2.1.3 Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **II.2.1.3.1 Étude macroscopique**

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué après la purification. L'aspect des colonies est visible à l'œil nu. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées. Cet examen est basé sur les éléments d'identification donnés par **Joffin et Leyral, (2006)** et qui sont : la forme, la taille, l'odeur, l'opacité, l'aspect, l'élévation, la couleur et la consistance des colonies.

#### **II.2.1.3.2 Étude microscopique**

##### **➤ Double Coloration de Gram**

- La préparation d'un frottis bactérien est la première étape, elle consiste à étaler un fragment bactérien jeune sur une lame propre puis séché et fixé à la flamme.
- La préparation est par la suite colorée par une solution de cristal violet pendant une minute.
- La coloration est ensuite rincée rapidement à l'eau distillée puis traité pendant 45 secondes par une solution de Lugol et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée ensuite,
- La préparation est soumise à une décoloration par l'éthanol à 85% pendant 30 secondes.

Après lavage à l'eau, le frottis est à nouveau coloré par la fuschine pendant 1 minute.

-Suivie d'un bref rinçage à l'eau distillée, il est séché à la flamme d'un bec Bunsen.

Enfin, on passe à l'observation microscopique.

Avec cette coloration double, les bactéries à « Gram positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries à « Gram négatif » sont colorées en rose (**Perry et al., 2004 ; Camille,2007**).

#### **II.2.1.3.3 Étude biochimique**

##### **➤ Test catalase**

La mise en évidence de cette enzyme consiste à mettre sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

La lecture du résultat s'effectue après 2 min ; le test catalase est positif par l'observation d'un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle et qui traduit la décomposition du dioxygène. S'il n'y a pas de bulles le test est négatif (**Singleton, 2005 ;Delarras, 2007**).

### ➤ Test de mannitol

L'ensemencement d'une colonie bactérienne issue d'une culture jeune âgée de 24 h est réalisé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur dans le milieu (mannitol mobilité) puis incubé à 30°C pendant 24 h.

#### Lecture

La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune (**Guiraud, 1998**).

### ➤ Test de type respiratoire

Le type respiratoire est mis en évidence sur milieu « Viande Foie » (VF) ayant un gradient de concentration en oxygène dissous élevé en surface et faible en profondeur (**Guiraud, 2003**).

L'ensemencement des souches bactériennes se fait dans des tubes à essais contenant le milieu VF à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube puis retirée en décrivant des tours de spires très serrés. Après incubation pendant 24h à 30°C, le résultat se traduit par une poussée bactérienne selon les quatre cas suivants:

*Une poussée en surface		Aérobies strictes
*Une poussée au fond du tube		Anaérobie strict
*Une poussée tout le long du tube		Aéro -anaérobies facultatif
*Une poussée à proximité de la surface		Micro-aérophiles

## **II.2.1 Étude phytochimique**

### **II.2.1.1 Préparation du matériel végétal**

#### ➤ **Échantillonnage**

La récolte de la bigarade s'est faite manuellement dans la région de Corso (Wilaya de Boumerdes) durant le mois janvier-février, tandis que les fruits du mandarinier ils ont été récolté dans la région de Ain El Hamra (Wilaya de Tipaza) durant le mois de mars. Les fruits étaient bien murs et ne présentaient aucun signe de blessure ou d'infection.

#### ➤ **Lavage**

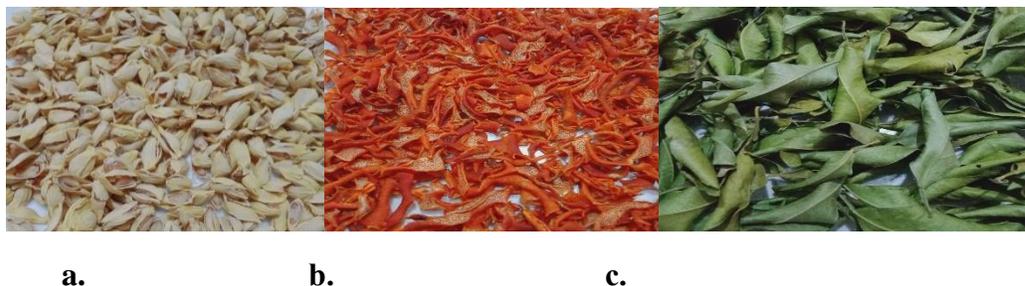
Dans un premier temps les parties utilisées du bigaradier et de la mandarine (feuilles, écores, graine), ont été lavées puis rincées plusieurs fois à l'eau du robinet jusqu'à ce que l'eau en contact avec ces parties devienne claire. Cette opération a permis d'éliminer les moisissures et une grande partie des impuretés.

#### ➤ **Séchage**

Le matériel végétale (feuilles, écores, graine), ont été mises à sécher à l'air libre, a température de 30 à 37 °C pendant deux semaines.



**Photo 6. Parties du mandarinier séchée (a. graine. b. écores. c. feuilles.)**



**Photo 7. Parties du bigaradier séchée (a. graine. b. écores. c. feuilles.)**

### ➤ Broyage

Le matériel végétal séché a été broyé par un broyeur électrique afin d'obtenir des poudres granulométriques fine pour permettre une bonne extraction des biomolécules. Les poudres ont été stockées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisations (Photo 8).



-a-

-b-

**Photo 8. Échantillons végétal broyé et conservés (a. mandarine. b. bigaradier)**

### II.2.1.1 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif permet de déterminer les différents composés chimiques présents dans un organe végétal.

Afin de déterminer la présence de divers substances bioactives (métabolites primaires et secondaires) tel que les tanins totaux, tanins galliques, tanins condensés, les anthocyanines, les saponines, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les mucilages; existant dans les feuilles et écorces des deux espèces du genre *Citrus*; un test phytochimique a été effectué en utilisant la poudre ou l'infusé selon la méthode décrite par **Harbone (1973)**. Tout changement de couleur ou formation d'un précipité ont été utilisé comme indicateur d'une réponse positive à ces tests (Tab.13).

#### a. Préparation de l'infusé

L'infusé à 20% de chaque échantillons (feuilles et écorces) est préparé par l'addition de 20 g de poudre végétale à 100 ml d'eau distillée chaude. Après 15mn de temps, le mélange est filtré et le filtrat obtenu est ajusté à 100 ml par l'eau distillée (Photo9) (**Harbone,1973; Paris et nothis,1978**).



a.

b.

**Photo 9.** Infusé à 20% des échantillons de feuilles et écorces de : a. le bigarade (*Citrus aurantium*) b. la mandarine (*Citrus reticulata* Blanco)

### b. Recherche de composés phénoliques

Les étapes des screening phytochimique sont présentées dans le tableau 14 ci-dessous. La méthode d'extraction est celle adoptée par le laboratoire des substances naturelles de CRD SAIDAL

**Tableau 14.** Molécule recherchée avec leurs réactions de caractérisation et les résultats attendus

Composé	Constituant		Réaction	Revelation
Composé Phénoliques	Tanins	Totaux	5 ml de l'infusé + quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> à 5%.	Coloration bleu noire
		Galliques	5 ml de l'infusé + 2g d'acétate de sodium + quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub>	Coloration bleu foncé
		Catéchique	15 ml d'infusé + 10 ml du formol à 40% + 5ml d'HCl concentré	Coloration rouge
	Flavonoïde	5 ml d'infusé + 5ml d'HCl + coupeau de Mg + 1 ml d'alcool iso amylique	Coloration rouge-orange	
	Anthocyanes	5 ml d'infusé + quelques gouttes d'HCl	Coloration rouge	
Composé réductifs	Mucilages	1 ml d'infusé + 5 ml d'alcool 100° (éthanol)	Un précipité floconneux	

Composés terpéniques	Saponosides	5ml d'infusé + quelques gouttes acétates de plomb	Formation de précipité blanc
	Amidon	2g poudre végétale + quelques gouttes d'iode	Coloration bleu violette
composés glucosides	Glucosides	2g poudre végétal + quelques gouttes H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Coloration rouge brique + violette
Composé Azotes	Alcaloïdes	2ml d'infusé + 2 ml de wagner (annexe 2)	Précipité rouge

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement Positif ; - : Négatif ; ND : Non déterminé.

### II.2.1.2 Extractions des composés phénoliques

#### a. Extrait des polyphénols totaux

L'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Citrus* utilisées dans notre étude passe par les étapes suivantes (**Revilla et al. 2001 et Ojeil et al. 2010**).

- **Étape 1:** 20 g de poudre végétale est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 3 jours.
- **Étape 2 :** séparation de solvant méthanol de la poudre par filtration.
- **Étape 3 :** le filtrat récupéré est mis dans un Rotavapeur à 70C pendant 20 mn afin d'éliminer le méthanol.

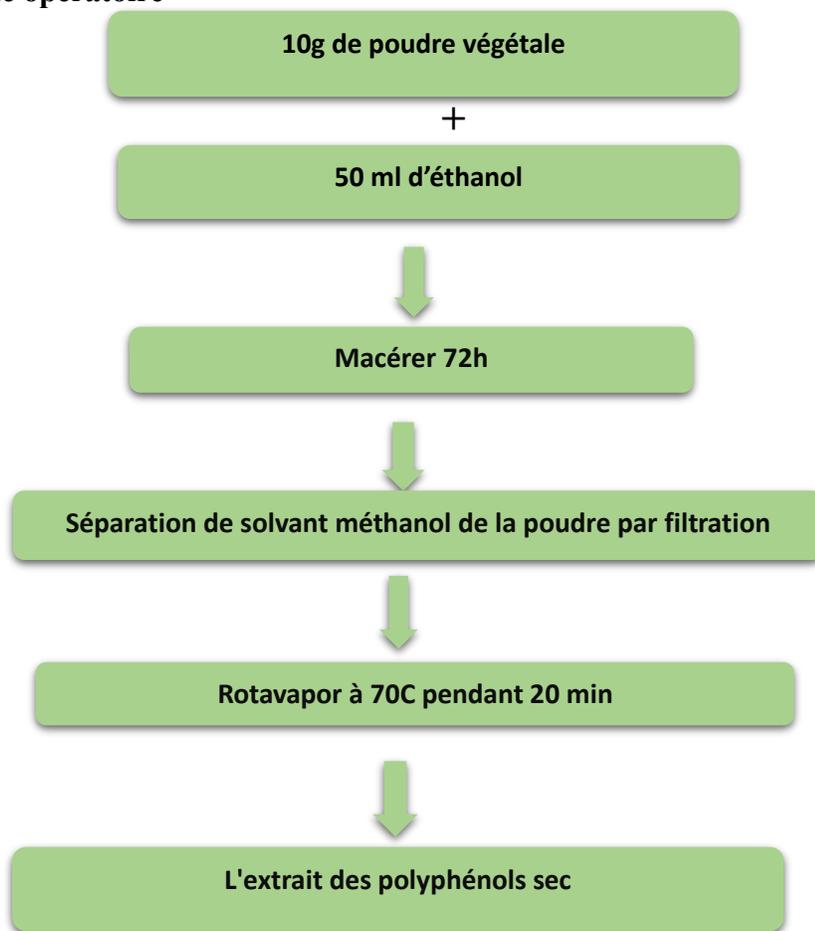
L'extrait des polyphénols est obtenu au fond du ballon sous forme d'extrait sec.

Le calcul de rendement en polyphénols dans l'extrait éthanolique est déduit par la formule suivante :

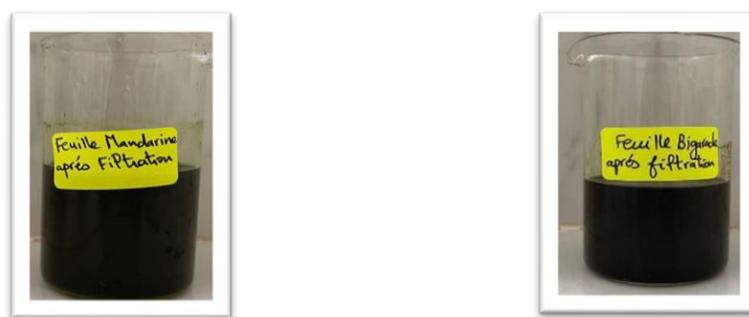
$$R\% = (M - M^* / Mr)$$

- **R%** : taux de la matière extraite.
- **M**: masse du ballon après l'extraction.
- **M\*** : masse de ballon vide (avant l'extraction).
- **Mr** : masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction.

➤ **Mode opératoire**



**Figure 2. Protocole expérimental d'extraction des polyphénols totaux**



a.

b.

**Photo10.** Infusées après filtration (a. bigaradier. b. mandarine)

### **b- Extrait aqueux**

Selon la méthode de **Bougandoura et Bendimerad (2012) modifiée**, 50g de la poudre végétale (graine de mandarine et bigaradier) a été mise à une extraction par macération avec 500ml d'eau distillée, pendant 24H à température ambiante (environ 20°C), l'ensemble est filtré sur du papier filtre afin de séparer le marc du filtrat .en utilise ce extrait dans l'activité antimicrobiennes

### **c- Extraction des flavonoïdes**

L'extraction des flavonoïdes est basée sur leur solubilité dans les alcools (éthanol, méthanol) selon qu'il s'agit de matériel frais ou sec.

30 g de poudre d'écorces de mandarine et de bigaradier sont placée dans des récipients en verre, additionné de 100 ml d'éthanol. La macération dure 72h.

Après filtration, la solution est évaporée sous par un Rotavapeur, puis l'extrait résultant est traité par 50 ml d'eau distillée chaude.

Après refroidissement, on procède une série d'extraction liquide/liquide, décantation, par des solvants non miscibles à l'eau.

L'extrait sec des flavonoïdes est obtenu par évaporation sous vide de l'extrait butanolique terminal à une température compris entre 50°C et 85°C. L'extrait sec des flavonoïdes est obtenu finalement au fond de ballon. Les démarches de protocole d'extraction des flavonoïdes sont résumées dans la figure suivante.

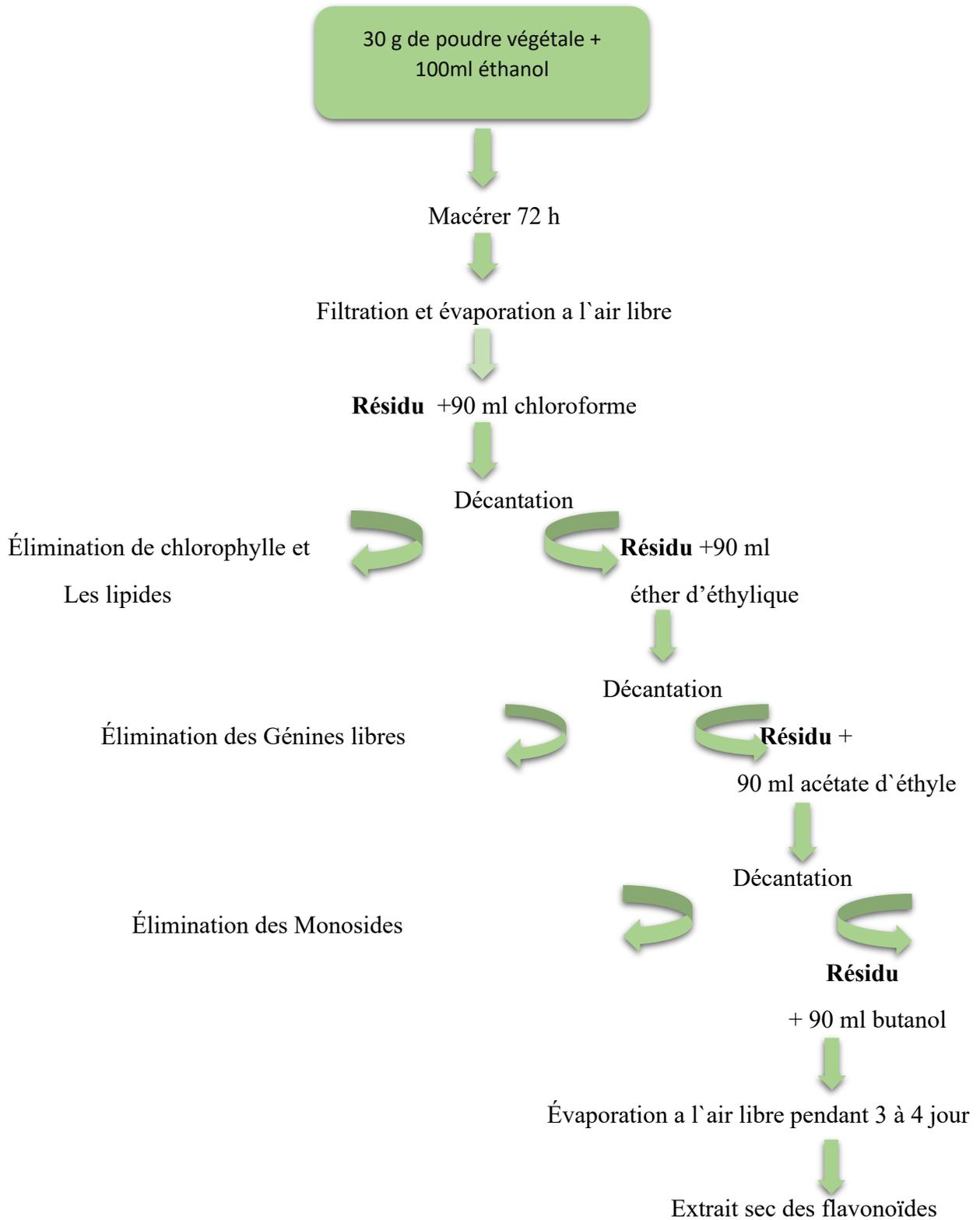


Figure 3. Protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes

Le rendement de l'extraction est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = \frac{\text{Masse de l'extraction sec}}{\text{Masse de la poudre végétale utilisée}} \times 100$$

Avec :

La masse de l'extrait sec = masse de ballon après l'extraction – masse du ballon vide.

### Méthode de récupération des extraits

Après la pesée des ballons contenant les extraits, ces derniers sont extraits à l'aide d'une spatule. Puis, ils sont transvasés dans des piluliers ombrés, en verre. Ils sont stockés dans un réfrigérateur à 4°C.

#### II.2.1.3 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Citrus reticulata blanco* et de *Citrus aurantium*.

##### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur les réactions d'oxydo-réduction. Le réactif de **Folin-Ciocalteu**, acide de couleur jaune, est utilisé comme oxydant, il est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ). Lors de l'oxydation des polyphénols, le Folin est réduit en un mélange bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène et ça en présence de carbonate de sodium. L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux des polyphénols présents dans les extraits (Ribereau-Gayon, 1968).

##### ➤ Mode opératoire

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par la méthode de Meyers *et al.* (2003).

100 µl d'extrait sont mélangés avec 750 µl de carbonate de sodium (7,5%) et 750 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10). Après 2 heures d'incubation (à la température ambiante et à l'obscurité) les absorbances sont mesurées à 750 nm.

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant l'acide gallique comme standard (annexe3, fig 1). La concentration moyenne de l'extrait en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme des feuilles (mg EAG/g).

### II.2.2 Activités biologiques

#### II.2.2.1 Activité antioxydant

##### ➤ Évaluation de l'activité antioxydant par le test DPPH

###### - *Principe*

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH\* (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le radical DPPH\* est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 515 m. Une faible absorbance indique une meilleure activité anti-radicalaire (Milardovic *et al.*, 2006).

###### - *Préparation de la solution DPPH*

On prépare 100ml d'une solution du DPPH dans le même type de solvant que celui utilisé pour préparer l'échantillon et ses dilutions (éthanol). Pour cela on prépare 100ml d'une solution; 2,5mg équivalent à 0,0025g du DPPH dans 100ml de solvant.

###### - *Mode opératoire*

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno (2002).

50 µl d'extrait de l'écorces de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco* mûrs à différentes concentrations sont ajoutés à 1950 µl de solution éthanolique de DPPH (0,0025g/ml). Après homogénéisation, le mélange est préservé à l'obscurité pendant 30 minutes et la densité optique lue à 515 nm.

Le témoin négatif ne contient que la solution de DPPH et le témoin positif est représenté par des solutions antioxydantes standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé(annexe 3 fig 2).

L'activité antioxydant est estimée en pourcentage d'inhibition ou en pourcentage de l'activité antioxydant, selon la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydant} = (\text{contrôle Abs} - \text{test Abs}) / (\text{contrôle Abs} \times 100)$$

Où, Abs est l'absorbance lue à 515 nm.

**Contrôle abs** : absorbance du blanc (DPPH dans l'éthanol)

**Test abs** : absorbance du composé d'essai.

La concentration en milligramme d'extrait sec par millilitre de solvant (mg/ml) qui inhibe la formation de 50 % de radicaux libres DPPH est définie par la valeur IC50.

### II.2.2.2 Activités antimicrobiennes

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne in vitro des extrait des composés phénoliques de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco*, nous avons utilisé la méthode de la diffusion sur milieu gélosé standardisée par NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standards) et qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance des agents microbiens par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque imprégné de l'extrait (Celiktas *et al.*,2017).

#### ➤ Principe

L'activité antimicrobienne est testée in vitro par la méthode de diffusion des disques en milieu solide. Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme (Duval et Soussy, 1990). C'est-à-dire, l'application de disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. La présence de l'activité antimicrobienne, se manifeste par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour du disque qui correspond à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible.

### *a. Revivification et repiquage*

La revivification des souches, est une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité biologique est nulle à l'état conservé, et qui à pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure. En premier, les souches testées sont revivifiées par la méthode des stries (milieu Muller Hinton pour les bactéries PDA pour les champignons), puis on les incubes à 37 C pendant 24h pour les bactéries et à 28 C pendant 48h pour les levures et champignons (**Bolou et al.,2011**).

### *b. Préparation de l'inoculum*

La préparation de l'inoculum est faite à partir culture jeune, pour cela on réalise des suspensions microbiennes en prélevant quelques colonies à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Et en introduisant dans 9ml d'eau physiologique stérile.

La lecture de la suspension bactérienne est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant l'absorbance à une longueur d'onde de 620nm (**Bolou et al.,2011**).

L'absorbance doit être comprise entre 0,2 à 0,3 pour les bactéries. Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de  $10^7$  -  $10^8$ germes/ml.

Concernant les souches fongiques une série de dilution a été préparé (10<sup>-3</sup>,10<sup>-2</sup>,10<sup>-3</sup>,10<sup>-4</sup>) la suspension 10<sup>-3</sup> a été utiliser.

### *c. Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)*

Les disques sont préparés à partir du papier wattman à 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 1 heure à 120 °C, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

A l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman sont déposés sur le milieu de culture, puis les imbibés par 25 ul des extrait des composés phénoliques de notre plante. Les boites de pétri sont ensuit fermées et laissées diffuser à température de 37 C° dans l'étuve pendant 24h pour les bactéries et 28 C° pendant 48h pour les champignons et levures (**Duval et Soussy, 1990**).

### **d. Lecture et expression des résultats**

L'absence de croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied coulisse ou avec une simple règle (**Basse et Buchbauer, 2010**).

**e. Estimation de l'activité antimicrobienne**

D'après **Ponce *et al.*, (2003)**, l'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesuré qui classe le pouvoir antimicrobien en fonction du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne en 05 classe (Tab.15)

**Tableau 15.**Échelle de mesure de l'activité antimicrobienne (**Ponce *et al.*, 2003**).

<b>Échelle de sensibilité des souches</b>	<b>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</b>
Extrêmement inhibitrice	$\varnothing \geq 20$
Fortement inhibitrice	$15 \geq \varnothing \geq 19$
Modérément inhibitrice	$9 \geq \varnothing \geq 14$
Légèrement inhibitrice	$8 \geq \varnothing$
Non inhibitrice	$6 \geq \varnothing$

## Chapitre III. Résultats et discussions

### III.1 Résultat de l'isolement

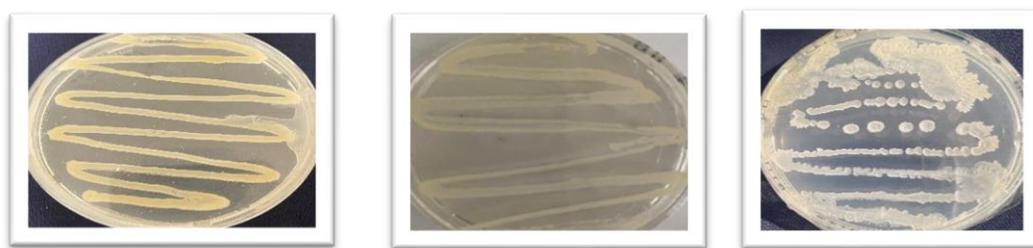
Le travail présenté dans notre étude porte sur l'identification des différents isolats bactériens dans la rhizosphère de mandarine, une caractérisation phénotypique basée sur les caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques a été faite.

#### III.1.1 Résultats de la caractérisation phénotypique des souches bactériennes isolées

Quatre souches bactériennes ont été isolées à partir de la couche rhizosphérique de mandarine.

##### III.1.1.1 Étude macroscopique

Après purification de l'ensemble des isolats bactérienne sur GN, nous avons obtenus des colonies bien isolées avec des aspects très variable.



**Photos 11.** Aspect de quelques colonies purifiées sur GN (original, 2023)

Les caractéristiques macroscopiques de ces isolats sont résumées dans le tableau qui suit ;

**Tableau16.** Caractéristiques macroscopiques des quatre souches isolées

Isolats sélectionnes	Forme	Consistance des colonies	Couleur	Opacité	Élévation	Aspect de surface
<b>Souche<sub>1</sub></b>	CBR	Crémeuse	Beige	Opaque	Plate	Lisse
<b>Souche<sub>2</sub></b>	CBI	Muqueuse	Transparent	Translucide	Convexe	Rugueux
<b>Souche<sub>3</sub></b>	CBI	Muqueuse	Blanchâtre	Opaque	Convexe	Lisse
<b>Souche<sub>4</sub></b>	CBR	Crémeuse	Jaune	Opaque	Plate	Lisse

CBI: Circulaire à bord irrégulier - CBR : Circulaire à bord régulier.

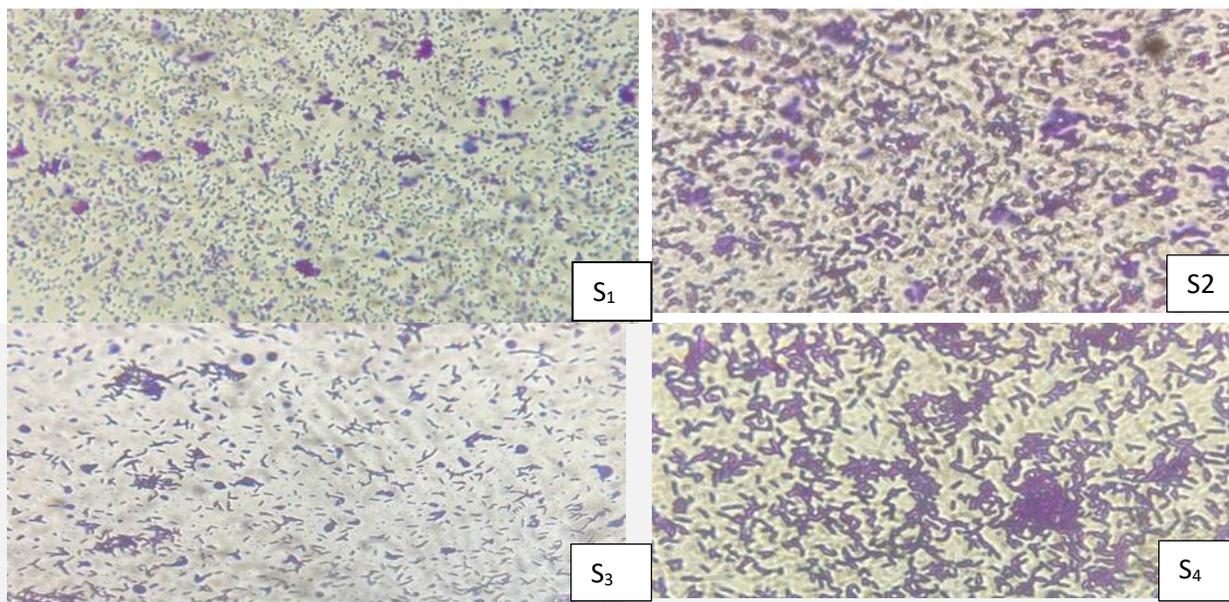
D'après nos résultats, les caractéristiques macroscopiques de la plupart des souches bactériennes sont les suivants : les taille de ces colonies sont très variables avec une forme circulaire (ronde), un contour régulier(S<sub>1</sub>,S<sub>4</sub>) ou irrégulier(S<sub>2</sub>,S<sub>3</sub>), une différence couleur beige (S<sub>1</sub>), blanchâtre(S<sub>3</sub>), jaune(S<sub>4</sub>) et transparent(S<sub>2</sub>), leur surface est lisse(S<sub>1</sub>,S<sub>3</sub>,S<sub>4</sub>)ourugueux(S<sub>2</sub>), ces colonies sont opaques(S<sub>1</sub>,S<sub>3</sub>,S<sub>4</sub>) ou translucide(S<sub>2</sub>) avec une élévation convexe(S<sub>2</sub>,S<sub>3</sub>) ou plate(S<sub>1</sub>,S<sub>4</sub>).

### III.1.1.2 Étude microscopique

La détermination du type de Gram et leurs positions sont des critères d'identification très importants qui ont été réalisé sur certaines souches isolées.

➤ **Double coloration de Gram**

L'observation au microscope photonique des cellules après coloration de Gram nous a montré que les souches isolées ont une forme bâtonnet long à extrémité arrondie ou carrée, elles apparaissent avec une couleur violette donc elles sont à Gram positif. D'autres ont une forme coccobacille ou bâtonnet avec une ciliature polaire.



**Photos12.**Résultat de la coloration de gram (Original, 2023)

Les caractéristiques microscopiques des isolats sont résumées dans le tableau qui suit ;

**Tableau17.**Caractéristiques microscopiques des souches isolées.

Isolat	Forme	Gram	Mode d'arrangement
S <sub>1</sub>	Coque	+	Isolées,
S <sub>2</sub>	Bâtonnet	+	Isolées, en chaînette
S <sub>3</sub>	Bacille	+	Isolées, en chaînette
S <sub>4</sub>	Bacille	+	Isolées, en chaînette

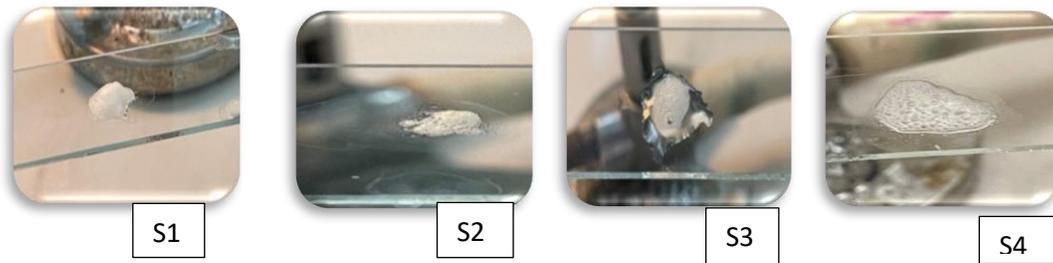
Les résultats du tableau montrent que les isolats (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>) sont des bactéries à Gram positive, de forme bacille, bâtonnet (S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>) et coque(S<sub>1</sub>), ces isolats possèdent des caractéristiques

comparables au genre *Bacillus* .assemblés en différents type d'arrangement soit isolées(S1),en chaînette(S2,S3 et S4)

### III.1.1.3 Étude biochimique

#### ➤ Test de catalase

L'ensemble des souches isolées ont une réponse positive pour ce test, cette réponse se traduit par un dégagement gazeux sous forme des bulles d'air, c'est la décomposition de peroxyde d'hydrogène avec libération d'oxygène (Guiraud, 1998).



Photos13.Résultat du teste catalase (Original, 2023)

#### ➤ Type respiratoire (TR)

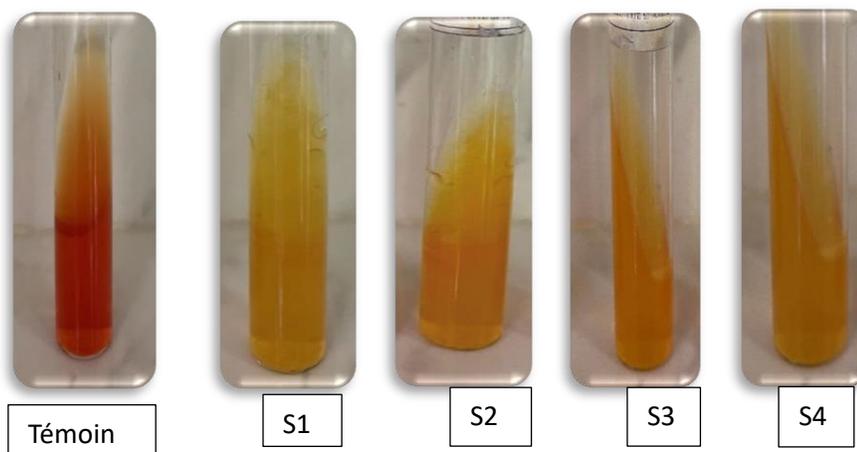
L'ensemble des souches testées pour leurs types respiratoires sur milieu VF sont des aéro-anaérobies facultatif, cela se traduit par leur croissance tout le long de la pique centrale.



Photos14.Résultats de type respiratoire S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>(Original, 2023)

➤ **Test de mannitol**

Les résultats obtenus nous montrent que les souches sont capables de fermenter le mannitol par le virage de l'indicateur coloré vers le jaune orangé et d'autres ne le fermente pas et la couleur reste rouge.



**Photos15.** Résultats du test mannitol (Original, 2023)

L'ensemble des résultats biochimiques et physiologiques réalisé sur les 04 souches isolées sont résumés dans le tableau qui suit :

**Tableau18.**Résultats des tests biochimiques et physiologiques de certains isolats

Teste Souches	Mannitol	Type respiratoire	Catalase
S <sub>1</sub>	+	AAF	+
S <sub>2</sub>	+	AAF	+
S <sub>3</sub>	+	AAF	+
S <sub>4</sub>	+	AAF	+

AAF :aéro-anaérobies facultatif

Après isolement et caractérisation phénotypique des rhizobactéries à partir d'un sol rhizosphérique de la culture de mandarine de la région de Boumerdes sur milieu GN, nous constatons que les souches appartiennent probablement au genre *Bacillus* sp.

Ce résultat est en accord avec celui de **Bouizgarne (2013)**, qui décrit le groupe de PGPR le plus représentatif et le plus important dans le sol appartient au genre *Bacillus* sp.

D'après nos résultats, les caractéristiques macroscopiques de la majorité des souches sont les suivantes: une taille variable avec une forme circulaire. Un contour régulier ou irrégulier et une

couleur beige à crème, une surface lisse ou rugueuse, aussi les colonies sont opaques ou translucides avec une élévation convexe ou plate.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Prescott *et al.*, (2010)**, qui ont décrit le genre *Bacillus* sp, par une forme punctiforme et ronde avec un diamètre compris entre 1 à 3 mm et une couleur beige ou crème. **Arahalet *al.*, (2002)**, les ont décrits par leur aspect lisse, opaque et leur élévation plat ou convexe.

L'étude microscopique de souches isolées montre qu'elles sont des bacilles à Gram positif, assemblés en différents type d'arrangement soit isolées, en chaînette. Selon les travaux de **Guiraud (2003)**, ces résultats caractérisent le groupe de bactérie appartient au genre *Bacillus* sp.

Les autres colonies bactériennes ont une couleur blanchâtre ou beige, plate ou convexe, opaque avec présence d'une odeur caractéristique. Ces résultats sont cités dans la littérature par **Botelho et Leda, (2006)**.

L'ensemble des isolats ont donné une réponse positive au test catalase par un dégagement gazeux sous formes des bulles d'air indiquant qu'il y a eu destruction de peroxyde d'hydrogène et libération d'oxygène (**Guiraud,2003**).

L'incubation de certaines souches dans le milieu Mannitol (**Martin-lapiere, 2011**) pendant 48 h à 28C° a permis d'observer chez les *Bacillus* S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> un changement de couleur rouge vers le jaune ce qui signifie la dégradation de ces bactéries le D-mannose en fructose.

L'étude du type respiratoire sur le milieu VF confirme que les souches *Bacillus*S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> sont des aéro-anacrobies facultatives, ce résultat est en accord avec ceux de **Logan *et al.*,(2009)**.

## III.2 Études phytochimiques

### III.2.1 Screening phytochimique

L'étude du screening phytochimique met en évidence la présence de certains groupements chimiques qui peuvent être responsables de l'activité biologique étudiée. Les résultats obtenus englobent les métabolites primaires et secondaires réalisé sur les feuilles et les écorces de *C. reticulata blanco* et *C. aurantium*, et consignés dans les tableaux 19 et 20 qui suivent.

**Tableau 19.** Résultats du screening phytochimique de *Citrus reticulata blanco*

Constituents	Feuilles	Photos	Ecorce	photos	Résultat attendu
<b>Tanins totaux</b>	+++		+++		Coloration blue noire
<b>Tanins galliques</b>	+++		+++		Coloration bleu foncé
<b>Tanins catéchiques</b>	+		+		Coloration rouge
<b>Flavonoïde</b>	+++		+		Coloration rouge-orange
<b>Anthocyanes</b>	+		+		Coloration rouge
<b>Mucilages</b>	+++		+		Précipité floconneux

<b>saponosides</b>	+++		+++		Précipité Blanc
<b>Amidon</b>	-		-		Formation de précipité Blanc
<b>Glucosides</b>	+++		+++		Coloration bleu violette
<b>Alcaloïdes</b>	+++		+		Coloration rouge brique + violette

Les réactions qui se produisent sont classées de : négative (-) jusqu'à franchement positive (++++). L'absence de la substance est représentée par: - Une réaction faiblement positive est représentée par: + Une réaction moyennement positive est représentée par: ++ Une réaction franchement positive est représentée par: +++ ou ++++

Les résultats du Screening phytochimiques de *Citrus reticulata blanco* (Tab.19) ont montré des niveaux élevés de tanins totaux, tanins galliques, flavonoïdes, saponines et glucosides dans les deux échantillons. Alors que les tanins catéchiques et les anthocyanes sont présent en quantité appréciable dans l'écorce et les feuilles de *Citrus reticulata blanco*. La quantité d'alcaloïdes, de mucilage et de flavonoïdes sont plus élevés dans les feuilles que dans l'écorce. Et l'amidon est totalement absence dans des deux échantillons (écorces et feuilles)

Tableau20. Résultats du screening phytochimique de *Citrus aurantium*

Constituant	Feuilles	Photos	Ecorce	Photos	Résultat attendu
<b>Tanins totaux</b>	+++		+++		Coloration blue noire
<b>Tanins galliques</b>	+++		+++		Coloration bleu foncé
<b>Tanins catéchiques</b>	+		-		Coloration rouge
<b>Flavonoïde</b>	+++		+++		Coloration rouge-orange
<b>Anthocyanes</b>	+		-		Coloration rouge
<b>Mucilages</b>	+++		++		Un précipité floconneux
<b>Saponosides</b>	+++		+++		Formation de précipité Blanc
<b>Amidon</b>	-		-		Formation de précipité Blanc

<b>Glucosides</b>	+++		+++		Coloration bleu violette
<b>Alcaloïdes</b>	+++		++		Coloration rouge brique + violette

Les réactions qui se produisent sont classées de : négative (-) jusqu'à franchement positive (++++). L'absence de la substance est représentée par: -. Une réaction faiblement positive est représentée par: +. Une réaction moyennement positive est représentée par: ++. Une réaction franchement positive est représentée par: +++ ou ++++

Les résultats des tests phytochimiques de *Citrus aurantium* (Tab.20) ont montré que l'écorce et les feuilles contiennent de grandes quantités de tanins totaux, tanins galliques, flavonoïdes, saponines et glycosides. Par contre, ces deux échantillons ne contiennent pas d'amidon. Les tanins catéchiques et les anthocyanes sont présents en très faible quantité dans les feuilles et totalement absents dans l'écorce, par contre les alcaloïdes et les mucilages sont présents en grande quantité dans les feuilles et modérément dans l'écorce.

En comparons entre les deux espèces *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco* sur le plant phytochimique, les résultats révèlent la présence des composés phénoliques (tanins totaux, tanins galliques, flavonoïdes), des composés réductifs (mucilage), des composés terpéniques (saponosides), composés glucosides (glucosides) en quantité très élevée chez les deux espèces. Les anthocyanes (composé phénoliques) sont présents en quantité faible et l'amidon est totalement absent dans tous les extraits (écores et feuilles) de *C. reticulata blanco* et *C. aurantium*. La majorité des composés phénoliques détectés dans les feuilles de *C. aurantium* et *C. reticulata blanco* sont identique.

Les résultats des tests phytochimiques sont préliminaires et qualitatifs, ils nous renseignent sur les phyto-constituants majoritaires présents dans les échantillons étudiés. Cette différence dans les résultats peut être due à plusieurs facteurs tels que la nature du solvant, la méthode d'extraction, la période de récolte ou aux facteurs génétiques, climatiques et édaphiques de la région de la récolte (Lagha-benamrouche *et al.*, 2017).

D'après **Arora et Kaur (2013)**, les alcaloïdes et les terpenoïdes sont présent dans l'écorce de l'orange amère (*C.aurantium*).Aussi, l'étude de **Oulebsir-Mohandkaci et al.,(2016)** a montré la présence des tanins, des saponosides, des flavonoïdes, des mucilages et l'absence de alcaloïdes dans les feuilles d'orange amère (*C.aurentium*)récolté dans la région d'Annaba (Est de l'Algérie). Selon **Gorinstein et al.,(2001)**; **Londono-londono et al.,(2010)**; **Moulehi et al.,(2012)**, et **Ballester et al.,(2013)**les écorces d'agrumes contiennent différents types de flavonoïdes et les anthocyanes faisons partie de la famille des flavonoïdes sont identifiés uniquement dans les variétés rouges.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ashok Kumar et al.,(2011)**travaillons sur les écorces des agrumes. Ces derniers ont révélé la présence des composés phénoliques (tanins et flavonoïdes), des terpénoïdes et des composés réducteurs dans les écorces, avec une différence qui est la présence des alcaloïdes et des saponosides.

**He et al.,(2011)**affirment également la présence des alcaloïdes dans les écorces de différents hybrides d'agrumes. Cette présence peut être expliquée par la différence des méthodes et des solvants d'extraction utilisés, par des facteurs climatiques de la région de la récolte.

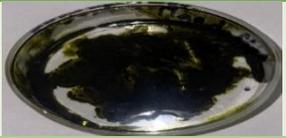
### III.2.2 Extractions des composés phénoliques

#### III.2.2.1Extrait des polyphénols totaux

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité: la méthode d'extraction, la durée d'extraction, la nature et le volume du solvant utilisé.

La couleur, l'aspect et le taux de l'extrait phénolique sont classes dans le tableau suivant

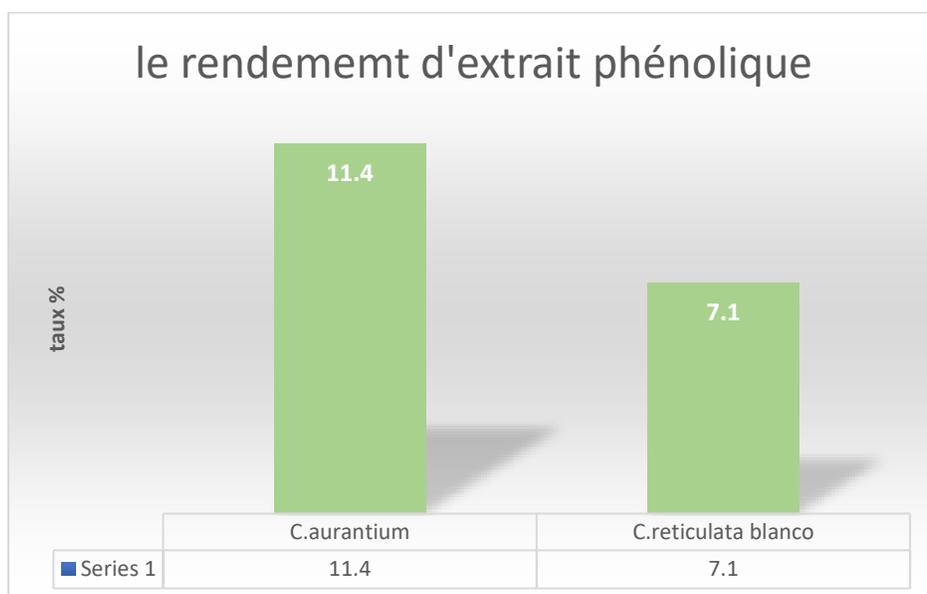
**Tableau21.** Couleur et aspect d'extrait phénolique totaux des feuilles de *C.aurantium* et *C.reticulata*

Extrait	Espèce	Couleur	Aspect	Taux (%)	Photo
<b>Polyphénols Totaux</b>	<i>Citrus reticulata blanco</i>	Vert Foncé	Compact visqueux	7,1%	
	<i>Citrus aurantium</i>	Vert Foncé	Compact visqueux	11,4%	

La méthode d'extraction par macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction nous offre une variabilité de rendement avec respectivement **11,4%** et **7,1%** pour les feuilles du bigaradier et les feuilles du mandarinier. Cette variabilité du rendement peut être due à la différence du type de matériel végétal utilisé.

D'autre part, indépendamment du solvant utilisé, il a été noté que l'espèce de *C. aurantium* présente les meilleurs taux d'extraction par rapport à l'espèce *C. reticulata blanco*

**Muthiah et al., (2012)** ont obtenus un rendement en polyphénols de 17,5% pour *C. aurantium* bien supérieurs aux notre.



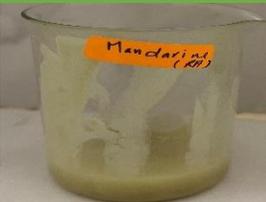
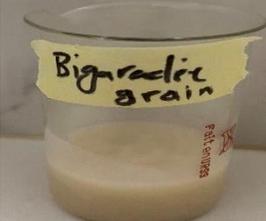
**Figure4.** Taux de l'extrait des polyphénols totaux de *C.aurantium* et *C.reticulata blanco*

Selon **Amartiet al., (2010)** la composition chimique des composés phénoliques, du point de vue qualitatif et quantitatif, peut varier. Ces variations sont en rapport avec certains facteurs écologiques, la partie de la plante utilisée et l'âge de la plante ou même les facteurs génétiques.

### III.2.2.2 Extrait aqueux

L'extrait aqueux a été réalisé sur la poudre des graines de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco*. Les résultats obtenus sont classés dans le tableau (22) suivant :

**Tableau22.**Aspect et couleurs de l'extrait aqueux des grains de *C.aurantium* et *C.reticulata blanco*

Espèce	Poudre de grain	Couleur	photos
<i>Citrus reticulata blanco</i>	3 g de poudre	Jaune foncé	
<i>Citrus aurantium</i>	5g de poudre	Jaune claire	

### III.2.2.3Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité: la méthode d'extraction, la nature et le volume du solvant utilisé.

Le rendement en flavonoïde des écorces des deux espèces nous donne des valeurs respectivement de **0,23%** pour *C.aurantium* et **0,20%**pour*C.reticulatablanco* (Tab 23).Ce sont des valeurs approximativement identiques.

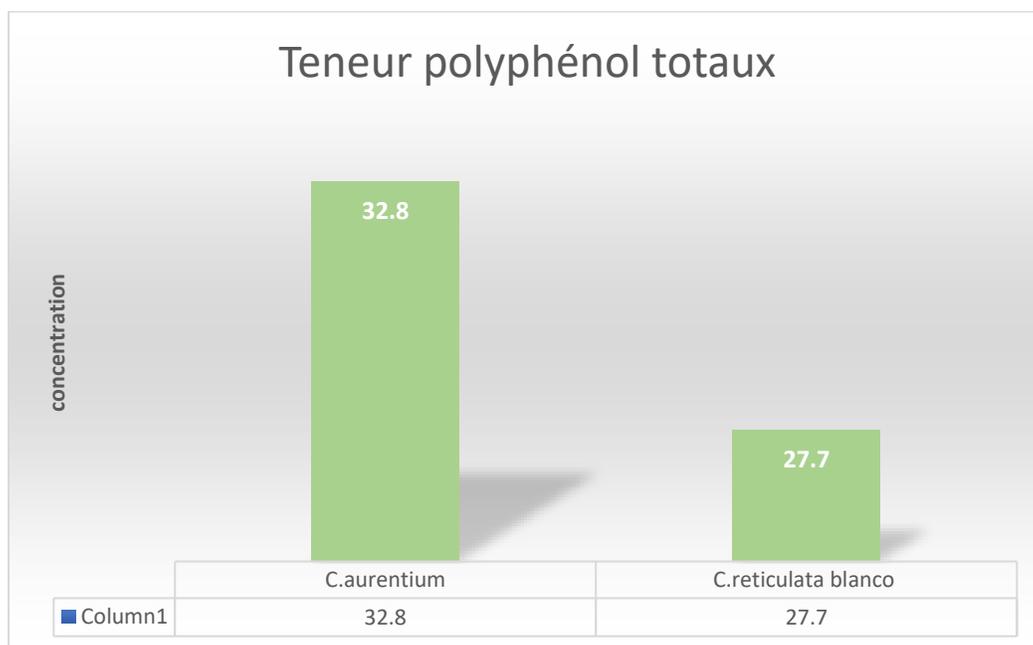
**Tableau23.** Couleur et le taux d'extrait flavonoïdes d'écorces de *C.aurantium* et *C.reticulata blanco*

Espèces	La couleur	Taux	Les photos
<i>Citrus reticulata blanco</i>	Orange foncé	0,20%	
<i>Citrus aurantium</i>	Orange	0,23%	

### III.2.3 Dosage des composés phénoliques

Après 2 h d'incubation la couleur bleue confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif de Folin-Ciocalteu. L'intensité de la couleur varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphénols. Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme étalonnage établie avec l'acide gallique ( $Y=0,01x + 0,002$ ).

Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons (voir annexe 3). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique/gamme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS). D'après les résultats obtenus avec les extraits de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco*, on remarque que l'extrait de *C.aurantium* représente la concentration la plus élevée en polyphénols estimée à  $32,8 \pm 0,05$  mg EAG/g MS suivi par les feuilles de *C.reticulata blanco* avec des concentrations de  $27,7 \pm 0,07$  mg EAG/g MS. Les concentrations des polyphénols totaux obtenue sont présentées dans la figure5 qui suit ;



**Figure5.** Teneur en polyphénols des extraits de *C.reticulata blanco* et *C.aurantium*

Une étude faite par **Menichini et al., (2011)** sur, les feuilles et les fruits de *Citrus medica* enregistre une teneur de  $4.016 \pm 0.5$  mg /g de matière sèche dans les feuilles, cette valeur est largement inférieure à celle obtenu dans les feuilles de *Citrus reticulata blanco*.

D'autres études réalisées sur les feuilles du *Citrus aurantium* ont donné des taux de polyphénols plus élevés, de l'ordre de  $69,97 \pm 1,67$  mg GAE/g MS (Khettal *et al.*, 2017) et de  $44,41 \pm 0,49$  mg GAE/g MS (Lagha-Benamrouche et Madani, 2013).

En effet, la solubilité des composés phénoliques est influencée par la polarité du solvant, le degré de polymérisation des composés phénoliques (Nacz et Shahidi, 2004). En plus, la présence de certains groupes chimiques (acide ascorbique, acides organiques, sucres, amines aromatiques) peuvent également réagir avec le réactif Folin–Ciocalteu (Ghafar *et al.*, 2010).

### III.3 Résultats des activités biologiques

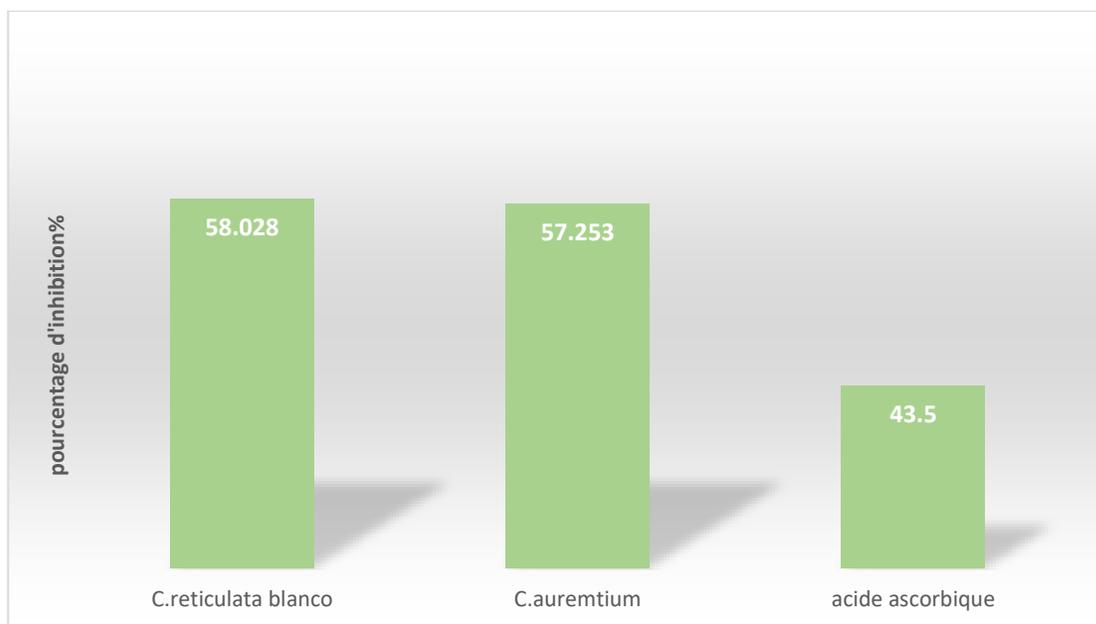
#### III.3.1 Activité antioxydante

Il existe un certain nombre d'essais d'activité antioxydante dans la littérature avec différentes méthodologies. Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picarylhydrazyl) est la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer le pouvoir antioxydant des matériaux naturels et synthétiques (**Akaret *al.*, 2017**).

Cette activité anti-radicalaire est basée sur la réduction du radical 2,2-diphényl-1- picarylhydrazyl suite à un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel se traduisant par le virage de la coloration violette vers la coloration jaune mesurable à 515 nm (**Hadbaoui, 2012**).

Nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits de flavonoïdes de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco*, par la méthode de DPPH on se référant à l'acide ascorbique comme molécule de référence.

La figure6 qui suit représente le pourcentage d'inhibition de l'extrait flavonoïdes ainsi que le standard (acides ascorbique).



**Figure6.** Pourcentage d'inhibition extraite de flavonoïdes de *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata blanco* et de l'acide ascorbique

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'extrait. En présence d'un radical libre DPPH°, l'atome H est transféré sur ce dernier pour le transformer en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de l'antioxydant donneur d'hydrogène (Khoudali *et al.*, 2014), se traduisant par une phase constante qui s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical (Bouyahya *et al.*, 2017).

Nous remarquons que l'extrait flavonoïde d'écorces de *C.reticulata blanco* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé estimé à **58,027%**, suivi par l'extrait flavonoïde d'écorces de *C.aurantium* avec un pourcentage d'inhibition de **57,253%**, alors que l'acide ascorbique a montré une capacité moindre à inhiber le radical DPPH égale à **43.5 %**.

L'étude réalisée par **Lagha-Benamrouche et Madani, (2013)** a montré que l'écorce de bigarade présente un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 88% supérieures à nos résultats.

Cet écart s'expliquerait par les différentes compositions chimiques des mêmes espèces d'agrumes dans différentes régions (Teneva *et al.*, 2019).

#### Détermination des IC50 :

Nous avons déterminé à partir des graphes la concentration correspondante à 50% d'inhibition (IC50, concentration inhibitrice à 50%) pour chaque extrait, c'est-à-dire la concentration requise pour piéger les radicaux DPPH à 50%, exprimées en déviation standard moyenne (Talukder *et al.*, 2013). Plus la valeur de l'IC50 est petite, plus l'activité anti-radicalaire de l'extrait est grande. Les valeurs d'IC50 obtenues (Tab. 24) permettent de classer la capacité de piégeage du radical DPPH par les extraits testés par rapport à l'acide ascorbique et entre elles.

**Tableau 24** : valeurs des IC50 des extraits flavonoïdes de *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata blanco* et de l'acide ascorbique

Extraits et le standard	IC50 (mg/ml)
<b>EFR</b>	<b>48.40</b>
<b>EFA</b>	<b>50.148</b>
<b>Acide ascorbique</b>	<b>0.0286</b>

EFR; extrait flavonoïde *C.reticulata blanco*- EFA; extrait flavonoïde *C.aurantium*

D'après les valeurs des IC50 obtenues dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que l'extrait de flavonoïde d'écorces de *C.reticulata blanco* présente l'IC50 la plus faible avec **48,40mg/ml**, suivi par l'extrait des écorces de *C.aurantium* avec **50,14 mg/ml**. Cependant, l'acide ascorbique ayant l'IC50 le plus faible, de **0,0286 mg/ml**, possède alors la plus grande activité anti-radicalaire comparativement aux autres extraits testés.

D'autres travaux réalisés sur l'écorce du *Citrus aurantium* ont montré des valeurs d'IC50 de 1,9 mg/ml(**Ghasemi et al., 2009**) et 0,19 mg / ml(**Marzouk,2013**) largement inférieures à celles dans notre analyse. Et **Ghasemi et al., 2009** sur le fruit des *Citrus reticulata Blanco* avec une valeur de 210µg/ml dans le cas de l'extrait méthanoïque seulement.

### III.3.2 Activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits des différentes parties écores, feuilles et grains de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco* par la méthode de diffusion sur milieu semi gélosé, Mueller-Hinton pour les bactéries et PDA pour les champignons en présence d'un témoin.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour les disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de quatre bactéries : *Escherichia coli*, *Streptocoque sp.* et les souches S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> isolée. et de deux champignons *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*

L'effet des témoins (eau distille et éthanol) sur l'ensemble des souches testées est résumé dans le tableau (tab 25) qui suit ;

**Tableau 25** : Résultats des zones d'inhibitions des témoins (eau distille et éthanol)

Germes \ Extrait		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
		TE	ED
<b>Souches Bacteriennes</b>	<i>Escherichia coli</i>	7	-
	<i>Streptocoque sp.</i>	-	-
	SoucheS <sub>3</sub>	-	-
	SoucheS <sub>4</sub>	6.5	-
<b>Souches Fongiques</b>	<i>Aspergillus sp.</i>	7	-
	<i>Penicillium sp.</i>	-	-

TE : témoinéthanol, EA : eau distillée

L'eau distille qui est un témoin neutre ne manifeste aucun effet par contre pour l'éthanol une faible sensibilité est obtenu avec *Escherichia coli*, Souche S<sub>4</sub> et *Aspergillus sp.* a des diamètres (7, 6.5 et 7) respectivement.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 26 et 27, qui suivent ;

**Tableau 26.** Résultats des zones d'inhibitions des extraits de *Citrus reticulata blanco*

Extrait Germes		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		M-EF	M-EPT	M-EAG
<b>Souches Bacteriennes</b>	<i>Escherichi coli</i>	30	20	-
	<i>Streptocoque sp.</i>	22	30	16
	Souche 3	12	10	-
	Souche 4	11	34	-
<b>Souches Fongiques</b>	<i>Aspergillus sp.</i>	20	18	28
	<i>Penicillium sp.</i>	24	12	-

- **M- EF**: Mandarine Extrait flavonoïde - **M-EPT** : Mandarine Extrait de polyphénols totaux.-**M-EAG** :Mandarine Extrait aqueux des graines.

### *Extrait flavonoïde*

L'extrait flavonoïde de *C. reticulata blanco*, montrent des zones d'inhibitions élevées avec des diamètres d'inhibition de 22 et 30 mm sur *Streptococcus sp.* et *Escherichia coli* respectivement. Suivi par des activités légèrement inférieure, obtenu avec les souches S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> de l'ordre de 12 et 11 mm .En ce qui concerne l'activité antifongique, les diamètres maximaux observés de la zone inhibitrice étaient compris entre 20 et 24 mm contre *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* respectivement.

### *Extrait phénolique*

L'action de l'extrait phénolique sur les souches testées révèle une extrême sensibilité de la souche S<sub>4</sub>, de *Streptococcus sp.* d'*Escherichia coli*. avec des valeurs de 30, 20 et 34 mm respectivement. Suivi par la souche S<sub>3</sub> présentant une faible activité et une zone d'inhibition de 10mm.En ce qui concerne l'activité antifongique nos résultats ont montré des diamètres d'inhibition compris entre 18 et 12 mm, observées pour *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*

### *Extrait aqueux*

Les bactéries *Escherichia coli*, souche S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> ne montre aucune sensibilité contre l'extrait aqueux des graines de *C. reticulata blanco*, par contre pour *Streptocoque sp.* nous obtenons un diamètre de 16 mm. Pour l'activité antifongique, des diamètres d'inhibition de 28 mm sont obtenus avec *Aspergillus sp.* Par contre *Penicillium sp.* ne manifestent aucune activité contre l'extrait aqueux des graines

**Tableau 26.** Résultats des zones d'inhibitions des extraits de *Citrus aurantium*

Extraits Germes		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		B-EF	B-EPT	B-EAG
<b>Souches Bacteriennes</b>	<i>Escherichia coli</i>	15	10	-
	<i>Streptocoque sp.</i>	24	22	17
	Souche S <sub>3</sub>	-	-	-
	Souche S <sub>4</sub>	30	30	-
<b>Souches Fongiques</b>	<i>Aspergillus sp.</i>	20	9	36
	<i>Penicillium sp.</i>	22	10	-

**B-EF** : bigaradier Extrait flavonoïde - **B-EPT** : bigaradier Extrait polyphénols totaux - **B-EAG** : bigaradier Extrait aqueux graine.

### *Extrait flavonoïde*

Le résultat de l'extrait flavonoïdes de l'écorce de *C. aurantium* révèle que le plus haut niveau d'activité a été enregistré par *Streptocoque sp.* et la souche S<sub>4</sub> avec un diamètre d'inhibition de l'ordre 24 et 30 mm respectivement, suivi par une activité légèrement moins importante de la bactérie *Escherichia coli* de l'ordre de 15 mm, par contre la souche S<sub>3</sub> n'induit aucune zone d'inhibition vis-à-vis de l'extrait flavonoïdes. En ce que concerne l'activité antifongique nos résultats ont montré des diamètres d'inhibition compris entre 20 et 22 mm observée pour *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* respectivement.

### ***Extrait phénolique***

L'action de l'extrait phénolique à enregistré une activité appréciable sur *Streptocoque sp.* Et la souche S<sub>4</sub> avec des valeurs de 22 et 30 mm respectivement, suivi par *Escherichia coli* avec une faible activité et une zone d'inhibition de 10 mm .La souche S<sub>3</sub>n'induit aucune activité contre l'extrait phénolique. En ce que concerne l'activité antifongique nos résultats ont montré des diamètres d'inhibition comprissent entre 9 et 10mm observées pour *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*

### ***Extrait aqueux***

*Escherichia coli*, la souche S<sub>3</sub> et la souche S<sub>4</sub> ne manifestent aucune sensibilité à l'encontre de l'extrait aqueux des graines de *C.aurantium*, alors que *Streptocoque sp.* Présente une zone d'inhibition de 17 mm. Pour l'activité antifongique, un diamètre d'inhibition de 36 mm pour *Aspergillus sp.* et aucune activité contre *Penicillium sp.*

### **Comparaison de l'activité des deux espèces *C.aurantium* et *C.reticulata blanco***

- D'après les résultats comparatives nous remarquant que l'extrait phénolique des feuilles de *C.reticulata blanco* présente une activité inhibitrice qui s'est avérée la plus élevé envers la souche S<sub>4</sub>,alors que la souche S<sub>3</sub>ne manifestent aucune activité contre les deux extraits phénolique.
- Pour l'activité antifongique, *Aspergillus sp.* Présente la plus importante zone d'inhibition avec l'extrait phénolique des feuilles de *C.reticulata blanco*, par contre pour *Penicillium sp.* une activité moyenne est obtenue avec l'extrait phénolique des feuilles de *C.aurantium*.
- Les extraits aqueux des graines de *C.aurantium* et *C.reticulata blanco* présentent une activité moyennement sensible avec *Streptocoque sp.*, alors que les autres germes testés ne manifestent aucune activité.
- L'activité antifongique des extraits aqueux des graines de *C.aurantium* a manifesté une activité inhibitrice très élevé envers *Aspergillus sp.*, alors que *Penicillium sp.* Ne présente aucune activité.
- L'extrait flavonoïde de *C.aurantium* et *C.reticulata blanco* donne un résultat extrêmement sensible avec *Escherichia coli* et la souche S<sub>4</sub>.

- L'activité antifongique, présentent une zone d'inhibition intéressante avec l'extrait flavonoïde de *C.reticulata blanco* envers *Penicillium sp.* Par contre l'extrait des deux espèces Manifeste une faible action sur *Aspergillus sp.*

D'après **Hindi et Chabuck (2013)**, les extraits aqueux d'écorce de *Citrus limon* et de *Citrus limetta*, testés sur *E.coli* ont révélé la résistance de cette bactérie à ces extraits. C'est résultats corroborent nos observation obtenus avec les extraits aqueux.

Par contre les résultats de **Santhosh et al.,(2015)** ont décelé une zone d'inhibition de 16,67 mm obtenus sur *E.coli* avec l'extrait aqueux de *C.aurantium*. Aussi les zones d'inhibition obtenue par **Egbonu et Osuji (2016)**, avec l'extrait aqueux des pépins de *C.sinensis* ont révélé une zone d'inhibition de 9,67 mm contre *E.coli*.

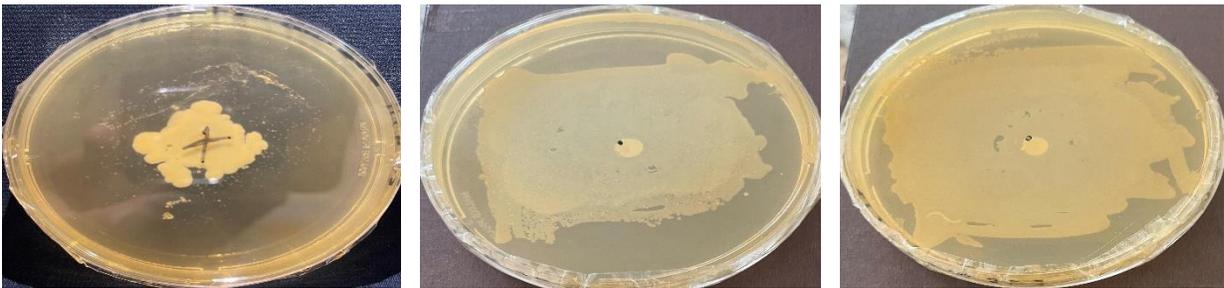
**Melendez et Capriles (2006)**, ont mis en évidence un effet antibactérien des extraits appartenant aux genres *Citrus* à l'égard de *S. aureus*, *Bacillus subtilis* et *E. coli*. Cette dernière s'est montrée sensible à *Citrus aurantium* et *Citrus aurantifolia* avec des zones d'inhibition respectivement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

Selon **Cowan (1999)**, les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes.

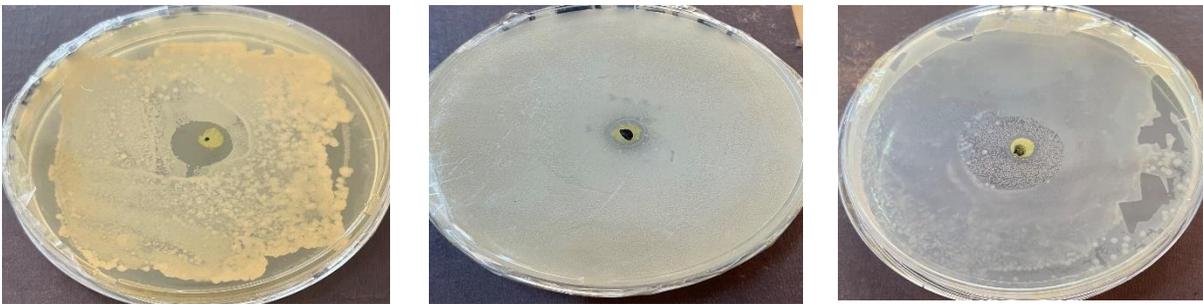
L'activité antimicrobienne des flavonoïdes serait liée à leurs groupements hydrosolubles et liposolubles qui se fixent sur la membrane lipidique de la bactérie en dénaturant sa structure, entraînant ainsi la perte de ses fonctions vitales et sa perméabilité (**Tsutoma et al., 2005**).



Photos 16. Quelques résultats positive pour l'activité antimicrobienne de *C. reticulata blanco*.



Photos 17. Quelques résultats négatif pour l'activité antimicrobiennes de *C. reticulata blanco*.



Photos 18. Quelques résultats positive pour l'activité antimicrobienne de *C. aurantium*.



Photos 19. Quelques résultats négatif pour l'activité antimicrobiennes de *C. aurantium* .

### Conclusion et perspectives

Les agrumes contiennent des niveaux élevés de composés présentant des avantages pour la santé, notamment des polyphénols, de l'acide ascorbique, des caroténoïdes et des flavonoïdes. Ils ont une valeur très importante dans la médecine traditionnelle et moderne et présentent plusieurs activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydant et anticancéreuse.

Notre étude expérimentale réalisée sur les écorces, feuilles et grains de deux espèces d'agrumes *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco*, avait comme objectif de tester l'activité antioxydant et antimicrobienne de certains composés biochimiques. Les conclusions de ce travail sont présentées selon un ordre chronologique d'achèvement ;

L'isolement et l'identification des bactéries du sol constituent la première étape de cette étude. Pour cela, nous avons choisi un sol d'agrumiculture de la région de Hamadi de la wilaya de Boumerdes.

Ces souches ont fait l'objet d'une étude macroscopique et microscopique, d'une coloration de gram et d'une évaluation biochimiques par les tests des enzymes respiratoires et catalase.

La majorité des souches étaient probablement du genre *Bacilles* à Gram positif, assemblés en différents type d'arrangement soit isolées ou associées en amas ou en chaînette. Un contour régulier ou irrégulier et une couleur beige à crème, une surface lisse ou rugueuse, aussi les colonies sont opaques ou translucides avec une élévation convexe ou plate. La plupart des souches sont aéro-anaérobie facultatif.

Le screening phytochimique a révélé la présence des composés phénoliques (tanins totaux, tanins galliques, flavonoïdes), des composés réductifs (mucilage), des composés terpéniques (saponosides), composés glucosides (glucosides) en quantité très élevée chez les deux espèces. Les anthocyanes (composé phénoliques) sont présents en quantité faible et l'amidon est totalement absent dans tous les extraits (écorces et feuilles) de *C. reticulata blanco* et *C. aurantium*.

La majorité des composés phénoliques détectés dans les feuilles de *C. aurantium* et *C. reticulata blanco* sont identiques. La méthode d'extraction par macération en utilisant l'éthanol comme solvant permet l'obtention de rendements intéressants avec 11,4% pour *C. aurantium* et 7,1% pour *C. reticulata blanco*.

La fraction flavonoïde des écorces obtenues par la méthode d'extraction liquide-solides par différents solvants a mis en évidence des rendements intéressants avec 0.23% pour *C. aurantium* et 0.2% pour *C. reticulata blanco*.

D'autre part, indépendamment du solvant utilisé, il a été noté que l'espèce de *C. aurantium* présente les meilleurs taux d'extraction de flavonoïdes et polyphénols par rapport à l'espèce *C. reticulata blanco*.

Les extraits aqueux obtenus par macération et réalisés uniquement sur les poudres des pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco* nous ont permis d'obtenir des macérâtes utilisables directement à l'état frais pour l'activité antimicrobienne.

À l'issue des résultats obtenus, le dosage des composés phénoliques contenus dans les deux extraits de feuilles de *C. aurantium* et *C. reticulata blanco* a révélé des concentrations moyennes en polyphénols et qui sont respectivement de  $32,8 \pm 0,05$  mg EAG/g de MS. et  $27,7 \pm 0,07$  mg EAG/g de MS.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits flavonoïdes de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata blanco* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Montre que l'extrait de flavonoïde d'écorce de *C. aurantium* a une activité moyenne comparée à celle de *C. reticulata blanco*.

Enfin les résultats du test antibactérien vis-à-vis de 4 bactéries à Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup> selon la méthode de diffusion utilisant des disques, indiquent que les extraits phénoliques et flavonoïdes (feuilles et écorce) des deux espèces possèdent une bonne activité antibactérienne. Sauf l'extrait aqueux (graines) qui ne présente aucune activité antibactérienne.

En ce qui concerne l'activité antifongique réalisée sur deux souches, les extraits testés sont actifs sur *Aspergillus sp.* Et ne donne aucun résultat avec *Penicillium sp.*

À l'issue de toutes ces données et en perspectives, il serait intéressant de poursuivre cette recherche en étudiant les points suivants ;

- ✓ Utilisation d'autres méthodes d'extraction en étudiant profondément les principaux paramètres modulant les rendements et les propriétés de ces extraits.
- ✓ Utilisation des moyens de caractérisation des polyphénols et flavonoïdes comme la chromatographie CG-MS.
- ✓ Tester d'autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante tel que le test FRAP.

- ✓ Evaluer l'activité antimicrobienne sur une large gamme de souches bactériennes et fongiques.

## Les références

- **Abobatta WF.(2019).**Nutritional Benefits of Citrus Fruits. Am J Biomed Sci & Res.2019 - 3(4). AJBSR.MS.ID.000681. DOI:10.34297/AJBSR.2019.03.00068.
- **Abou Baker D.H, Ibrahim B.M, Hassan N.S, Yousuf A.F.; Gengaihi S.(2020).** El Exploiting Citrus aurantium seeds and their secondary metabolites in the management of Alzheimer disease. Toxicol. Rep. 2020, 7, 723–729.
- **Agagnay .(2016).**Rôle d' Aphytismelinus (Hymenoptera, Aphelinidae) dans la régulation des niveaux d'infestation du Pou de Californie Aonidiellaaurantii (Homoptera, Diaspididae) sur citronnier à Rouiba. Thèse de magister. 2016.ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE – EL HARRACH- ALGER., pp [18-19-20].
- **Akar Z, KüçükM, & DoğanH. (2017).**A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs.Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 32(1), 640-647.
- **Akhlaghi M ,Shabani G, Rafieian-Kopaei M, Parvin N, Saadat M., & Akhlaghi M. (2011).** Citrus aurantium blossom and preoperative anxiety. Brazilian Journal of Anesthesiology, 61(6), 702-712.
- **Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Arab L, El Ajjouri M, Chaouch ,A. (2010).**Composition chimique et activité antimicrobienne de huiles essentielles de Tymus algeriensis Boiss, et Reut, et Tymus ciliatus (Desf.). Benh. Du Maroc ; biotechnol. Agron. Soc. Environ., 14 (1): 141-148.
- **Anonyme ,(2003).**Cultiver les agrumes, les guides mon jardin et ma maison édition glénat.
- **Apraj VD, Pandita NS.(2014).** Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of Citrus Reticulata blanco peel. In : School of Science, SVKM's NMIMS, Vile-Parle (W), Mumbai 400 056, India. 6(2); 328-33.
- **Arahal D.R, Castillo A.M, Ludwig W, Schleifer K H, et Ventosa1.(2002).** proposal of cobedia marina gen novcomb nov, within the Family Halomonadaceac, to include the spaces Halomonas marina Systematic and Applied Microbiologie .25:207-2011.

- **Arora M, & Kaur P. (2013).** Phytochemical screening of orange peel and pulp. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2(12), 517-520.
- **Ashok kumar K, Narayani M, Subanthini A, Jayakumar M.(2011).** Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels -Utilization of Fruit Waste, *Inter. J. Eng. Sci. Technol.*, 3 (2011) 5417-5421.
- **Ballester A. R, Lafuente M. T, Vos C. H, Bovy A. G.(2013)** González-Candela L., Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits, *Food Chem.*, 136 (2013) 178-185.
- **Baratto M. C, Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Romani A, Visioli F, & Pogni R. (2003).** Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free radical research*, 37(4), 405-412.
- **Barboni T. (2006).** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie ; Thèse doctorat ; Spécialité : Chimie théorique, physique et analytique ; Université de Corsica – Pasquale Paoli ; pp 287.
- **Baser K. H. C, et Buchbauer G. (2009).** Handbook of essential oils: science, technology, and applications (1 ed.). CRC press.
- **Benedicte B. (2011).** Agrumes (comment les choisir et les cultiver facilement), édition Eugen Ulmer, Paris; 6-11, 68-70.
- **Blaisot C. (2016).** Le marché des extraits de pépins de pamplemousse comparatif des produits existants et conseil à l'officine. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Rouen : 36 - 56.
- **Bolou G.E.K, Attioua B, Guessan A.C, Coulibaly A, Guessan J.D, Djaman A.J.(2011).** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*; *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*; 80 : 772-790.
- **Botelho G. R and Leda C. M. (2006).** Fluorescent Pseudomonad associated with the rhizosphere of Crops – an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 401-416.
- **Bougandoura N., et Bendimerad N. (2012).** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. (*Nepeta*) briq. *Revue des Bio Ressources*, 2 : 1-7.

- **Boughendjioua H, Boughendjioua .(2017)**. Chemical composition and biological activity of essential oil mandarin (*Citrus reticulata*) cultivated in Algeria. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2017; 44(1): 179–184
- **Bouizgarne B. (2013)**. Chapter 2 Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease.
- **Boustila N. (2011)**. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. 2011. Thèse de doctorat. Université d'Avignon; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie).
- **Bown D.(1995)**. Encyclopaedia of herbs and their uses. London: Dorling Kindersley; 1995.
- **Bruneton J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation. 3<sup>ème</sup> Ed, Paris. France. 1120p.
- **Camille D.(2007)**. Microbiologie Pratique pour les laboratoires d'analyse ou de controle sanitaire.
- **CASTRO-VASQUEZ L, ALANON M.E, RODRIGUEZ-ROBLEDOV., PEREZCOELLO M.S, HERMONSIN-GUTIERREZ I, DIAZ-MAROTO M.C, JORDAN J,GALINDO M.F. et ARROYO-JIMINEZ M.M. (2016)**. Bioactive flavonoids, Antioxidant behavior, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-12.
- **Celiktas OY, Bedir E, Vardar-Sukan F. (2007)**. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinusbinus* L. Seed oil : a potential solvent-free and high antioxydative edible oil. *Food chemistry*, 6 : 1291-1296.
- **CHAPOTH, Scnwob H. (1962)**.LA MANDARINB COMMUNE .A paraître prochainement dans *AL AWAMIA*.5. pp. 29-5.
- **Chen DL, Huang YR, Liang HL.(2016)**.Column chromatographic extraction forquickly separating the volatiles, flavonoids, and pectin from tangerine peel. *Sep Sci Technol*. 2016; 51(3): 485–93.
- **ChopraRN, Nayar SL, Chopra IC.(1986)**. Glossary of Indian medicinal plants (Including the Supplement). New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research; 1986.

- **Collen M, Elizabeth B A, Silas M, Mudyiwa. (2020).** Review of the nutritional composition, medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae) [version 1; peer review: awaiting peer review], 9:1387.
- **Cowan M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- **Daglia M. (2011).** polyphenols as antimicrobial agents .current opinion in biotechnology. 23:1 8.
- **Delarras C. (2007).** Microbiologie pratiques pour le laboratoire. Ed Lavoisier, 463 p.
- **DIDIER C. (1984).** La culture des agrumes en Irak. Edition IRFA Fruits, 39, 184
- **Djamil P. K. (2020).** Profil phénolique de quelques ressources végétales et pouvoir antioxydant (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem).
- **dorji k, yapwattanaphun C. (2011).** morphological identification of mandarin (*Citrus reticulata* blanco) in bhutan; *kasetsart j. (nat. sci.)*; 45: 793 - 802.
- **Duval J, Soussy CJ. (1990).** Antibiothérapie, bases bactériologiques pour l'utilisation. Ed. Piccin. 288- 436.
- **EGBUONU A.C.C. et OSUJI C.A. (2016).** Proximate compositions and antibacterial activity of *Citrus sinensis* (Sweet Orange) peel and seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*. 12(3): 1-7.
- **El-Akhal F, Guemmouh R, Greche H, & Lalami A. E. O. (2014).** Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco). *J. Mater. Environ. Sci*, 5(S1), 2319-2324.
- **Ersus, Wannas W.A, Ouerghemmi I, Jegham S, Njima Y.B, Hamdaoui G, Zemni, H, Marzouk B. (2011).** Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian *Citrus* varieties. *J. Sci. Food Agric*. 2011, 91, 142–151.
- **Ersus S, Cam M. (2007).** Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. *Chem. Nat. Compd*. 2007, 43, 607–609.
- **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).

- **FAO stat.(2016).**Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016. ([www.fao.org/faostat](http://www.fao.org/faostat)).
- **Fleming T. (2001).** PDR for herbal medicines. Citrus aurantium. Section edition. pp. 86-87.
- **Franck C.(2014).** Organisation du complexe d'espèce et décryptage des structures des génomes en mosaïque interspécifiques chez les agrumes cultivés. 2014. Thèse de doctorat.Université Montpellier 2 ; Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE Et des unités de recherche Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes (Agap) et Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia, IVIA, Valence, Espagne. P [35].
- **Ghafar M. F, PrasadK. N, Weng K. K, & Ismail A. (2010).** Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. African Journal of Biotechnology, 9(3). pp. 326-330.
- **GhasemiK, Ghasemi Y, &EbrahimzadehM. A. (2009).**Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak J PharmSci, 22(3), 277-281.
- **Giraud N.(1993).**"l'oranger doux, l'oranger amer". thèse d'exercice en pharmacie. Clermont-ferrand université de clermontferrand, (1993) :77p.
- **Gonzalez-molina E, Dominguez-perles R, Moreno D.A. ET, Garcia-viguera. (2010).** Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. Journal ofPharmaceutical and BiomedicalAnalysis, 51: 327-345.
- **Gorinstein S .Martin B, O ,Parek S ,Haruenkit R., Logek A ,Coz M , Libmanl , Traktenberg S.(2001).**comparaison of score biochemical characterisation of different cirus fruits ,food chern ,74 (3) (2001) 309.315.
- **GUEDADAG. (2016).**Ecologie du Pou de Californie, Aonidiellaaurantii (Hom : Diaspididae) sur citronnier dans la région de Rouiba.2016. Thèse de magister.ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE – EL-HARRACH – ALGER. Pp [11.12].
- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, 652p.
- **Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire; Application à l'étude des pricipaux groupes microbiens.Ed. DUNOD, 651p.

- **Hadbaoui Z. (2012).**Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat: Université de KasdiMerbah OUARGLA-ALGERIE).
- **Hamedi A, Zarshenas M, Jamshidzadeh A, Ahmadi S, Heidari R, Pasdran A.(2019).** Citrus aurantium (bitter orange) seed oil: Pharmacognostic, anti-inflammatory, and anti-nociceptive properties. *Herb. Prod.* 2019, 5, 153–164.
- **Harborne J.B.(1998).** Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis; Ed 3: CHAPMAN &HALL; p: 202-209.
- **HeD ,Shan, YWu Y,Liu, G Chen, B Yao, S.(2011)**Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD–ESI/MS., *Food Chem.*, 127 (2011) 880–885human chylomicrons upon ingestion of tangerine concentrate rich in betacryptoxanthin esters. *Arch BiochemBiophys.* 1995; 324(2): 385–390.
- **HINDI N.K.K. et CHABUCH Z.A.G. (2013).**Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 3(6): 74-78.
- **Ipek S, Haroon K , Seema P , Rita C , and Luca R.(2018).**An Overview on Citrus aurantium L.: Its Functions as FoodIngredient and Therapeutic Agent,*Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*Volume 2018, ID 7864269, 12 pages.
- **IsabelleC. (2004).** L'ORANGE AMER: Citrus aurantiaum Var. Amara Link.2004. Thèse de doctorat , Universités De LIMOGES, Faculté de pharmacie. P [16,17,18].
- **Jamel F .(2019).**la culture des agrumes, institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne , Alger .
- **Joffin J.N .Leyral G, (2006).**Microbiologie technique-TI-Dictionnaire des techniques. 4em édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. P368.
- **Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian A, Jaafar H.Z.E.(2012).**Phenolic compounds characterization and biological activities of Citrus aurantium bloom. *Molecules* 2012, 17, 1203–1218.
- **Khan MA, AliM, Alam P.(2010).** Phytochemical investigation of the fruit peels of Citrus reticulata Blanco. *Nat Prod Res. Formerly Natural Product Letters.* 2010; 24(7): 610–620.

- **Khettal B, Kadri N, Tighilet K, Adjebli A, Dahmoune F, & Maiza- Benabdeslam F. (2017).** Phenolic compounds from Citrus leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1). DOI: 10.1515/jcim-2016-0030.
- **Khoudali S, Essaqui A, Zertoubi M, Azzi M, & Benaissa M. (2014).** Study of antioxidant activity and anticorrosion action of the methanol extract of dwarf palm leaves (*Chamaerops humilis* L.) from Morocco [Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc].
- **La Berche J.C. (1999).** *Biologie végétale, (collection abrégée de sciences)*, Paris.
- **Labadie C, Ginies CG, uinebretiere M.H, Renard C.M.G.C Cerutti C, Carlin, F. (2015).** Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota. *Food Res. Int.* 2015, 76, 576–586.
- **Ladaniya M. S. (2011).** “Physico– chemical, respiratory and fungicide residue changes in wax coated mandarin fruit stored at chilling temperature with intermittent warming.” *Journal of food science and technology* 48(2): 150-158.
- **Lagha-Benamrouche S, & Madani K. (2013).** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.
- **Lagha-Benamrouche S, Addar L, Boudershem H, Tani S, & Madani K. (2017).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology*, (18), 28-35.
- **Larbi D, C. Ghezli and K. Djelouah. (2009).** "Historical review of Citrus tristeza virus (CTV) in Algeria. *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry Option Méditerranéenne.*" (2009): 107-110.
- **Li B.B, Smith B, Hossain Md M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels, I. Solvent extraction method; *Separation and Purification Technology*; 48: 182–188.

- **Liu YQ, Heying E, Tanumihardjo SA.(2012).** History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2012; 11(6): 530–545.
- **Logan N.A, Berg O, Bichop A.H ,Busse H, De Vos p. Fritze D, Heyndricks M .Kaampfer P, Salkinoja-Salonen M.S ,Seldin L, Rabinovitch L. et Ventosa A. (2009).** Proposed minimal standards for describing new tax of aerobic, endospore-forming bacteria. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ;59 :2114-2121.
- **Londoño-Londoño J,Lima V.R, Lara O,C recsyns kiPasa T.B, Arango J., Gil A, Ramirez Pineda J. R.(2010)** Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method, *Food Chem.*, 119 (2010)81-87.
- **Manthey J, Guthrie N, ET ,GrohmannK. (2001).** Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 135-153.
- **Martin-Lapierre. (2011).** Application de composts et de fumigants pour lutter contre la verticilliose (*verticillium dahlia*) de fraisier.
- **Marzouk B. (2013).** Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium L.*) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMedresearch international*, 2013.
- **Melendez P.A, Capriles V.A. (2006).** Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico; *Phytotherapy*; 13: 272–276.
- **Menichini ,F, Monica ,R., Loizzo, Bonesi ,M, Conforti ,F, Luca, D.D, Giancarlo, A, Statti, Cindio B, Menichini F.et Tundis R. (2011).** Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica L.* Cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages . *Food and Chemical Toxicology*, 49:1549–1555.
- **Messaoudi S,(2005).** "les plantes médicinales". Edition Dar et Maarifa.
- **MezianniL. Sidoune S. (2017).** Activités antioxydantes et antimicrobiennes de différentes parties de la bigarade. Mémoire en science biologique. Université de Béjaia, Algérie : 6-7.

- **Miladovic S, Ivekovic D. et Bozidar S.G. (2006).**A novel amperometric method method for antioxydant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68:175-180.
- **MOJZER E,B., HRNCIC M.K., SKERGET M, KNEZ Z, et BREN U. (2016).** Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 21(901): 1-38.
- **Mole S, Waterman P.G. (1987).**Tannic acid proteolic enzymes: enzyme inhibition substrat derivation. *Phytochemistry*, 26: 99-102.
- **Morton, J. (1987).** Sour Orange. In: *Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL. Repéréà :[https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/sour orange. html](https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/sour%20orange.html).
- **Moulehi S,BourgouI Ourghemmi T,Saidani M.(2012).**Varietyand ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) and bitter orange (*Citrusaurantium* L.) seeds extracts, *Ind. Crops Prod.*, 39 (2012) 74- 80.
- **Mukht AR. R, Khan M.M, Fatima B ,Abbas .M, Shahid A. (2005).** In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulate (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.
- **Naczk M, & Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- **Naczk M. et Shahidi F. (2004).**Extraction and analysis of phenolics inin food. *Journal ofChromatography A*, 1054(1–2), 95-111.
- **Ojeil A, El Darra N, El Haji Y, Bou Mouncef P, Rizk T.J. et MarounR.G. (2010).** Identification Et Characterisation De Composes Phenoliques Extraits Du Raisin Chateau KSARA,Lebanese Science Journal, Vol. 11, No. 2, 2010.
- **Okwu DE.(2008).** Citrus fruits: A rich source of phytochemicals and their roles in human health. *Int J Chem Sci*. 2008; 6(2): 451–471.
- **Oulebsir-Mohandkaci H, AitKaki S et Behidj-Benyounes N.(2016).**Phytochemical Study and Evaluationof Antimicrobial, Antioxidant and Insecticidal Activity of Essential Oils and Polyphenols of Bitter Orange (*Citrus Aurantium* L.).163-167. [doi.org/10.15242/IJACEBS.C0516212](https://doi.org/10.15242/IJACEBS.C0516212).

- **PanwarD, Saini A, PanesarP. S, & Chopra H. K. (2021).** Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: Progress towards circular economy. Trends in Food Science & Technology.
- **Paris R. et Nothis A. (1978).** Medicinal plant, Phytothérapie. Tome I. Ed Masson, Paris. Pp: 102-107.
- **Perry J.J ,Staley J.T, et Lory S.(2004).** Cours et questions de révisions PCEMPCEP.I° phenylalanineammonia lyase in groundunt by Pseudomonas fluorescens. Potential. Res .Microbiol. 157:538 -546.
- **Peterson J.J, Dwyer J.T, Beecher G.R, Bhagwet S.A, Gebhardt S.E, Haytowitz D.B. et Holden J.M. (2006).** Flavanones in orange, tangerines (mandarine), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. Journal of Food Composition and Analysis, 19: S66-S73.
- **Polese J.M. (2008).** Culture d'agrume. Edition artémis.
- **Ponce A.G, Fritz R, del Valle C.E. et RouraS.I.(2003)**-Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft undTechnologie, 36: 679-684.
- **Praloran J. (1971).** Les Agrumes: Techniques Agricoles et Productions Tropicales, France.
- **Prescott L.M, HarleyJ.P. et Klein D.A. (2010).** Microbiologie. 3<sup>TM</sup>me édition. De Boeck &Larcier.Bruxelle: 838-839.
- **Putnik P, Barba FJ, Lorenzo JM.(2017).**An integrated approach to Mandarin processing: Food safety and nutritional quality, consumer preference, and nutrient bioaccessibility. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2017; 16(6): 1345–1358.
- **RAHMAN K. (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical Interventions in Aging. 2(2): 219-236.
- **RAWSON N.E., CHI-TANG H. et SHIMING L. (2014).** Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. Food Science and Human Wellness. 3: 104-109.
- **Revilla E, Palomares F. et Delibes M. (2001).**Edge-core effects and the effectiveness of traditional reserves in conservation: Eurasian badgers in Donana National Park.Conserv. Biol. 15: 148 - 158.

- **Ribereau-Gayon P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. pp: 1-40.
- **Rincon AM, Vasquez AM, Vasquezand FC.(2005).**Chemical composition andbioactive compounds of flour of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela]. Arch LatinoamNutr. 2005; 55(3): 305–310. PubMed Abstract.
- **Rock E, &Fardet A. (2014).** Les antioxydants des agrumes: action en solitaire ou matricielle. Phytothérapie, 12(2), 66-75. DOI 10.1007/s10298-014-0852-8.
- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Food and Biological Systems. International Journal Of Food Science and Technology, 3, 121-137.
- **SANTHOSH N.A, ANTO P.V. et NEETHU B.N. (2015).** Evaluation on antimicrobial activity of fruit peels of selected citrus species against human pathogenicmicroorganisms. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 4(3): 278-281.
- **Sarrou E, Chatzopoulou P, Dimassi-Theriou K, &Therios I. (2013).** Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium L.* growing in Greece. Molecules, 18(9), 10639-10647.
- **SawssanM, Roula M. Abdel-Massih HR, Nicolas L , Chemat F,Francisco J. (2021).**Barba and Espérance Debs ,*Citrus aurantium L.* Active Constituents, Biological Effects and Extraction Methods An Updated Review,Molecules 2021, 26, 5832.
- **Scalbert A, & Williamson G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. The Journal of nutrition, 130(8), 2073S-2085S.
- **Scalbert A.(1991).** Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30:3875-3883.
- **Schimmenti E, Borsellino V. & Galati A.(2013).** Growth of citrus production among the Euro-Mediterranean countries: political implications and empirical findings. Spanish Journal of Agricultural Research 11 (3), 561 - 577.
- **Scnwos.(1962).**le mandarine commune ; note sur l'essence de mandarine ,AL AWANIA .5 ,PP 29.51.
- **Sidana J, Saini V, Dahiya S, Nain P, Bala S. (2013).** A review on citrus 'the boon of nature. Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 18: 20-27.

- **Singanusong R, Nipornram S, Tochampa W and Rattanatraiwong P .(2015).** Low powerultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and lime (*Citrus aurantifolia*) peels and the antioxidant. *Food Analytical Methods* 8:1112-1123.
- **SOUSA MC, BRAGA R.C, CINTRA B.A, et ANDRADE V.O.C.H. (2013).** In silico metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Research International*. 50: 102-110.
- **Swingle W.T.(1943).** The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. *The Citrus Industry*, 1. 415p.
- **Tahsin T, Wansi J. D, Al-Groshi A, Evans A, NaharL, Martin C, & Sarker S. D. (2017).** Cytotoxic properties of the stem bark of *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae). *Phytotherapy Research*, 31(8), 1215-1219.
- **Tian Q, MillerEG, Ahmad H, .(2008).** Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutr Cancer*. 2001; 40(2): 180–184.
- **Tounsi M.S, Wannas W.A ,Ouerghemmi I, Jegham S, Njima Y.B ,Hamdaoui, G ,Zemni, H.; Marzouk, B.(2011).** Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *J. Sci. Food Agric*. 2011, 91, 142–151.
- **Tripoli E, Guardia M, Gimmanco S, DiMajo D. ET Giammanco M. (2007).** Citrusflavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, 104: 466-479.
- **TSUTOMA H, MIWAKO K, KAZUTOSHI I, TOMO-OMI O, SUMIKO S, TUMOFUSA T, TAKASHY Y, (2005).**-Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*. *Phytochimie ; estry*, 2050-2051P.
- **Turner T. and Burri B.J.(2013).** Potential Nutritional Benefits of Current Citrus Consumption. *Agriculture*, 3(1), 170-187.
- **Ye XQ, Che JC, Liu DH, Jiang P, et al.(2011).** Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chem*. 2011; 124(4): 1561–6.
- **Yu et; Li X; LiuS, XuG, LiangY. (2009).** Comparative analysis of volatil constituent in citrus *Reticulata* Blanco using Gc-Ms and alternative moving window factor analysis; *J.Sep.Sc*; 32: 3457-3465.

- **Zhang H, Yang Y, & Zhou Z. (2018).**Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 256–263.

## Résumé

La valorisation des déchets d'origine végétaux, représente un créneau important dans l'exploitation des biomolécules. Dans cette optique d'idée, notre travail a été réalisé sur les écorces de deux espèces du genre *Citrus* (*C. reticulata blanco* et *C. aurantium*). Le travail commence par l'isolement des bactéries à partir de sols rhizosphériques de la région de Hammadi (Wilaya de boumerdes). Quatre souches isolées ont été identifiées comme membres du genre *Bacillus* et retenue pour la suite du travail.

Un criblage phytochimique des feuilles et des écorces des deux genres de *Citrus sp.* à été effectué et à révèle une richesse en molécules du métabolisme secondaires. Des extractions des flavonoïdes et des polyphénols totaux nous renseigne sur des rendements 0,23% et 0.2 % respectivement pour l'extrait flavonoïdes *C. reticulata blanco* et *C. aurantium*, alors que pour l'extrait des polyphénols totaux avec des rendement de 11,4 % et 7,1% successivement pour *C. aurantium* et *C. reticulata blanco*.

L'appréciation de l'activité antioxydant a été faite par le principe de DPPH, marquer de IC50 le plus élevé a une valeur de 50, 148 pour l'extrait flavonoïde *C.aurantium*.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne sur une gamme de souche bactérienne et fongique permet l'obtention de zone d'inhibition variable selon l'extrait, avec un maximum pour l'extrait phenolique des feuilles avec un diamètre d'inhibition 34 mm vis-à-vis la souche 4 , et un maximum pour l'extrait aqueux des grains avec un diamètre d'inhibition de 36 mm vis-à-vis la souche fongique *Aspergillus sp.*

**Mots clés :** *Citrus reticulata blanco* – *Citrus aurantium* – Isolement bactérien – Flavonoïdes – polyphenols totaux – DPPH – Activité antimicrobienne.

The volarization of plant waste represents an important niche in the exploitation of biomolecules. With this in mind, our work was carried out on the barks of two species of the *Citrus* genus (*C. reticulata blanco* and *C. aurantium*). The work began with the isolation of bacteria from rhizospheric soils in the Hammadi region (Wilaya of Boumerdes). Four isolated strains were identified as members of the *Bacillus* genus and retained for further work.

Phytochemical screening of the leaves and barks of the two genera of Citrus sp. was carried out and revealed a wealth of secondary metabolism molecules. Extractions of flavonoids and total polyphenols gave yields of 0.23% and 0.2% respectively for the flavonoid extracts from *C. reticulata blanco* and *C. aurantium*, and 11.4% and 7.1% respectively for the total polyphenol extracts from *C. aurantium* and *C. reticulata blanco*.

Antioxidant activity was assessed using the DPPH principle, scoring the highest IC<sub>50</sub> at 50.148 for the flavonoid extract of *C. aurantium*. Evaluation of the antimicrobial activity on a range of bacterial and fungal strains showed a variable inhibition zone depending on the extract, with a maximum for the phenolic leaf extract with an inhibition diameter of 34 mm against strain 4, and a maximum for the aqueous grain extract with an inhibition diameter of 36 mm against the fungal strain *Aspergillus* sp.

Key words: *Citrus reticulata blanco* - *Citrus aurantium* - Bacterial isolation - Flavonoids - total polyphenols - DPPH - Antimicrobial activity.

## LES ANNEXES

### Annexe 1. matériels et produits chimiques

Appareillage	Verrerie
Balance de précision	Béchers
Etuve	Pince + ciseau
Spectrophotomètre	Cuve de spectrophotomètre
Microscope optique	Embouts
Agitateur	ampoule a décanté
Bec benzène	micropipettes à volume réglables (100 et 1000 $\mu$ l)
Plaque chauffante	Spatule
Broyeur (moulinex)	Flacon avec bouchon
Règle	Fioles
Vortex	Erlenmeyers
Réfrigérateur	Eprouvettes
Bain-marie	Tubes à essai+ portoir tube
	Disque d'antibiotique
Rotavapeur	Boîtes de pétri stériles
Autoclave	Boîtes en verre
Tamiseur	Anse de platine
	Barreaux magnétique
	Entonnoir
	Pipettes pasteur
	Pipettes gradues

Solutions et réactifs	Formules chimiques
Réactif de folin-ciocalteu	/
Eau distillée	/
Eau physiologique	NaCl
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Alcool	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Acétate de sodium	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>
Acétat d'éthyle	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Acétat de plomb	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Pb
Carbonate de sodium	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Coupeau de Mg	Mg
Eau oxygénée	CH <sub>3</sub> COO-
Glycérol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Cristal violet	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> ClN <sub>3</sub>
Lugol	/
Fuschine	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub>
Chlorure de fer	FeCl <sub>3</sub>
Alcool isoamylique	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O
Acide sulfurique	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Réactif de Wagner	HCl
Iode	-
chloroforme	CHCl <sub>3</sub>
Ether d'éthylique	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O
acétate d'éthyle	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Acide ascorbique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O
2,2-diphényl -1- picrylhydrazyl	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Formol 40 %	/

Les milieux de culture utilisée	Les standards utilisés
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gélose nutritive</li> <li>• PDA</li> <li>• Gélose Mueller-Hinton</li> <li>• Milieux VF</li> <li>• Mannitol mobilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide gallique</li> <li>• Acide ascorbique</li> </ul>

- **Autre** : papier d'aluminium, papier absorbant, papier filtre, bavette, les gants.

## Annexe 2: : Préparation des milieux de culture des solution.

- **Réactif de WAGNER** :

<b>Iodure de potassium</b>	<b>2g</b>
<b>Iode</b>	1.27g
<b>Eau distillée</b>	100ml

- **Préparation de milieux PDA *Potato dextrose agar* (g/l):**

<b>Filtrat de pomme de terre</b>	<b>100g</b>
<b>Agar-agar</b>	10g
<b>glucose</b>	10g
<b>Eau distillée</b>	500ml

- **Eau physiologique** :

<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>NaCl</b>	<b>9g</b>

- **Préparation de milieux Mueller-Hinton** :

<b>Mueller</b>	38g
<b>Eau distillée</b>	<b>1000ml</b>
<b>Agar-agar</b>	<b>20g</b>

- **Milieu de conservation** :

<b>glycérol</b>	30ml
<b>Eau distillé</b>	<b>100ml</b>

- **Folin–ciocalteu**

<b>Folin–ciocalteu</b>	<b>1ml</b>
<b>Eau distillé</b>	<b>9ml</b>

### Annexe 3

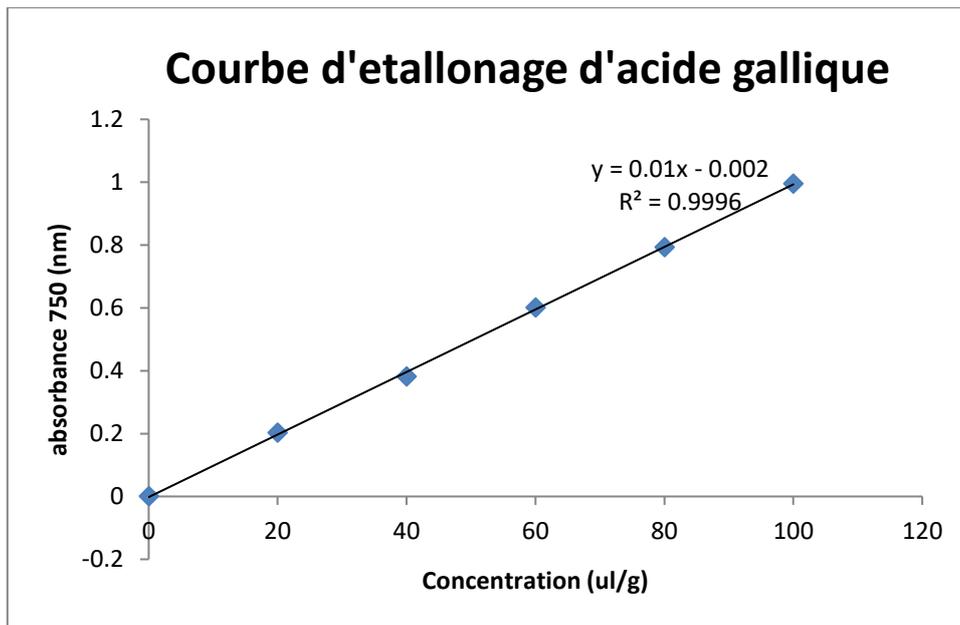
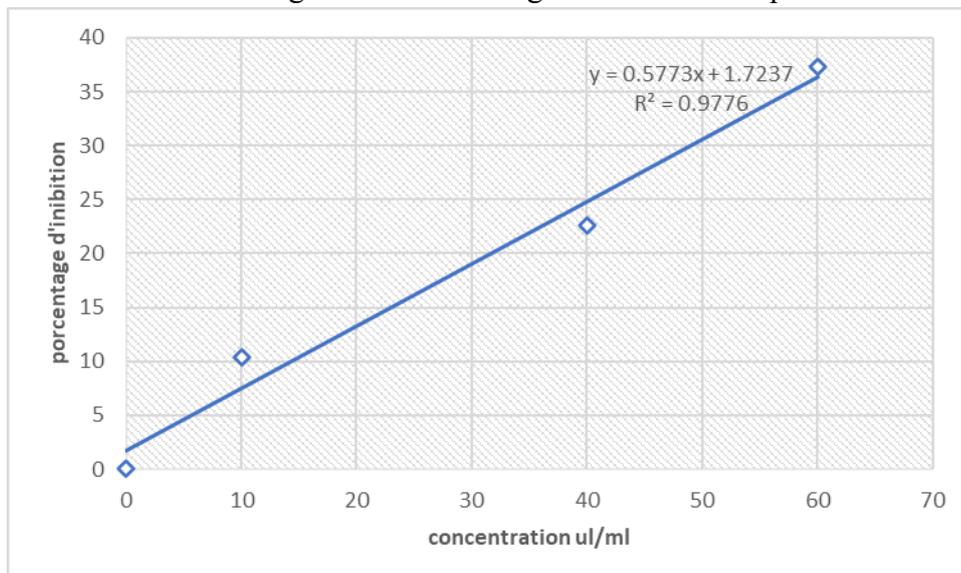


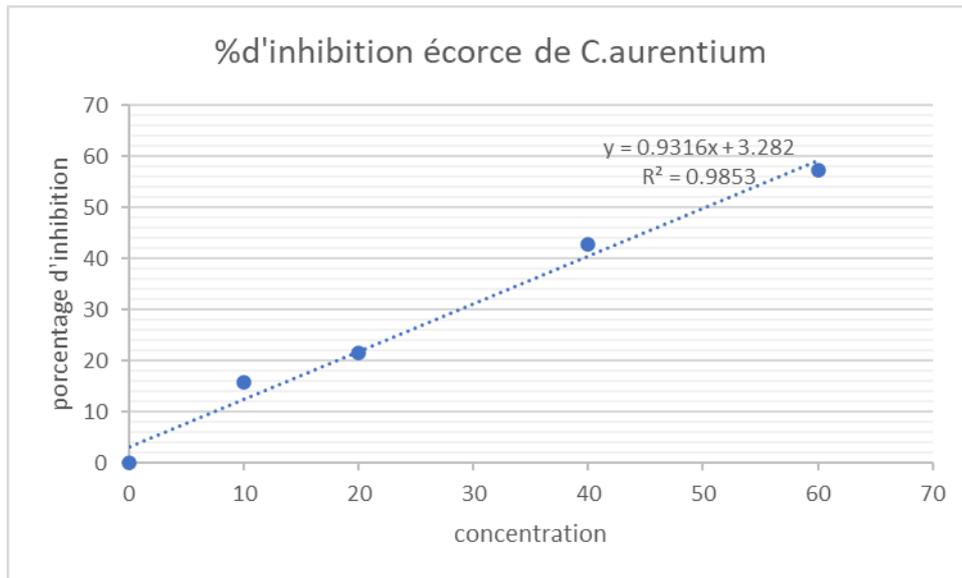
Figure 1.courbe d'étalonnage d'acide gallique.



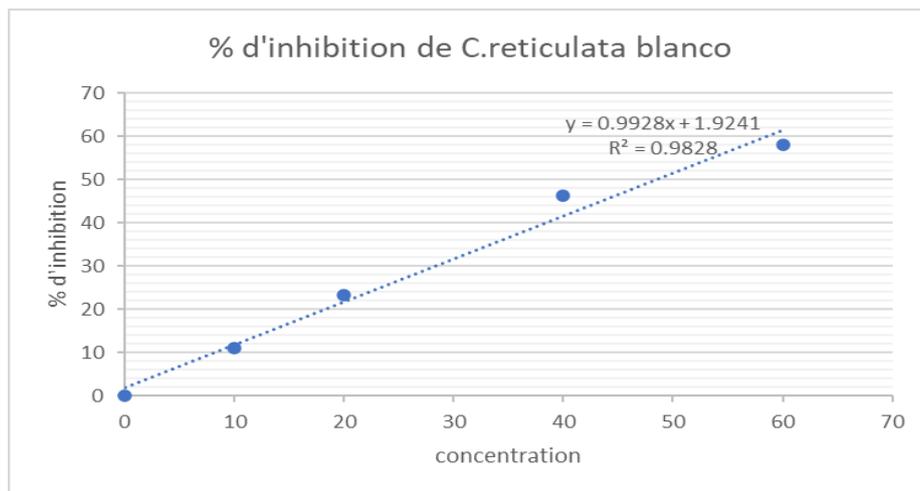
Photo . gamme d'étalonnage d'acide ascorbique



**Figure2 . la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique**



**Figure 3 les différent concentration de IC50 de *C.aurantium***



**Figure 4 . les différent concentration de IC50 de *C.reticulata blanco***