

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

Extraction de molécules bioactives des écores, feuilles et grains du *Citrus sinensis* et *Citrus maxima* et estimation de leur pouvoir antimicrobien sur des bactéries isolées d'un sol rhizosphérique

Présenté par :

ARAB Fella
BOUKOUACI Meriem

Devant le Jury :

<i>M^{me} Yahiaoui Karima</i>	<i>Présidente</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>
<i>M^{me} Mohand Kaci Hakima</i>	<i>Examinatrice</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>
<i>M^{me} Ait Kaki Sabrina</i>	<i>Promotrice</i>	<i>Pr.</i>	<i>UMBB</i>

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 YAHLIAOUI Karima, Professeure 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 Mohand Kaci Hakima, Professeure 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.

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Sommaire	
Introduction.....	01

CHAPITRE I: SYNTHES BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur les agrumes	03
I.1. Caractères généraux	03
I.2. Présentation du genre <i>Citrus</i>	04
I.2.1 Espèces du genre <i>Citrus</i>	05
I.2.1.1. L'Orange <i>Citrus sinensis</i> (tardive)	05
I.2.1.2 Le pamplemousse (<i>Citrus maxima</i>).....	10
I.3 Anatomie générale des agrumes.....	15
I.4 Les maladies des agrumes.....	17
I.5 Les propriétés biologiques des agrumes	18
II. Les biomolécules végétales	19
II.1. Les composés phénolique	19
II.2. Les huiles essentielles	20

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel	24
II.1.1. Matériel non biologiques.....	24
II.1.2. Matériel biologique	24
II.1.2.1 Matériel végétal	24
II.1.2.1 Sol	24
II.1.2.2 Microorganismes.....	24
II.2 Méthodes.....	25
II.2.1 Isolement	25

II.2.2 Caractérisation phyto-chimiques.....	31
II.2.1 Préparation du matériel végétal	31
II.2.1.1 Collecte des échantillons	31
II.2.1.2 Préparation des échantillons.....	33
II.2.2.1 Screening phyto-chimique	34
II.2.2.2 Extractions de composé phénolique	36
II.2.2.2.1. Extraction des tanins	36
II.2.2.2.2 Extraction des polyphénols totaux	38
II.2.2.2.3 Extrait aqueux des grains de <i>Citrus maxima</i> et <i>Citrus sinensis</i>	39
II.2.3 Dosage phytochimique	40
II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux	40
II.2.4 Extraction des huiles essentielles.....	40
II.2.4.1 Procédé d'extraction des huiles essentielles	40
II.2.4.2 Caractéristiques organoleptiques.....	43
II.2.5 Activités biologiques.....	43
II.3.5.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	43

CHAPITRE III: RESULTAT ET DISSCUTION

III.1 Résultat de l'isolement	46
III.1.1 Résultats de la caractérisation phynotypique des souches bactériennes isolées .46	
III.1.1.1 Etude macroscopique	46
III.1.1.2 Etude microscopique	47
III.1.1.3 Etude biochimique et physiologique.....	48
III.2 Résultat de l'étude phytochimique.....	51
III.2.1 Résultat du screening phytochimique.....	51
III.2.2 Extraction de substances bioactives	56
III.2.2.1 Extraction des tanins	56
III.2.2.2 Extraction des polyphénols totaux	56
III.2.2.3 Extrait aqueux	58
III.2.2.4 Dosages des polyphénols totaux	58

III.2.2.4 Extraction des huiles essentielles.....	60
III.2.2.4.1 Rendement d'extraction.....	60
III.2.2.4.2 Caractère organoleptique des huiles essentielles	61
IV.3 Activité antimicrobienne	62
CONCLUSION	69
Références bibliographiques	71
Annexe	

Liste des abréviations

Abs: Absorption

R: rendement

H.Es : huiles essentiels

C: *citrus*

Mueller-Hinton: MH

PDA: Potato dextrose agar

GN: gélose nutritive

S : souche.

Vf : viande fois.

PT: extrait des polyphénol totaux.

T: extrait tanniques.

E.A : extrait aqueux.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

E.coli : *Escherichia coli*

Liste des Figures

- Figure 01.** Classification des agrumes et origine génétique des *Citrus* cultivés.
- Figure 02.** Arbre de pamplemoussier
- Figure 03.** Diagramme résumant les différentes étapes du travail.
- Figure 04.** Mode opératoire d'extraction des tannins
- Figure 05.** Représentation schématique de l'extraction des polyphénols.
- Figure 06.** Taux d'extraction des polyphénols totaux des feuilles des deux échantillons
- Figure 07.** Teneur en polyphénols des deux extraits *C.maxima* et *C.sinensis*
- Figure 08.** Pourcentage en huiles essentielles obtenue pour *C.maxima* et *C.sinensis*

Liste des photos

- Photo 1.** Arbre de l'oranger.
- Photo 2.** Coupe transversale du fruit de *Citrus sinensis* (original).
- Photo 3.** Coupe transversale du fruit de *Citrus maxima* (original).
- Photo 04.** Echantillon de sol de la Rhizosphère de l'oranger (original).
- Photo 07.** Préparation du milieu de culture GN
- Photo 08.** *Citrus sinensis* variété tardive (original)
- Photo 09.** *Citrus maxima* pamplemousse (original)
- Photo 10.** Echantillon de sol de la Rhizosphère de l'oranger.
- Photo 11.** Etapes de préparation de la solution mère.
- Photo 12.** Série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-7}).
- Photo 13.** Préparation du milieu de culture GN.
- Photo 14.** *Citrus sinensis* variété tardive (original)
- Photo 15.** *Citrus maxima* pamplemousse (original)
- Photo 16.** Poudre végétales d'orange (écorce – feuilles-graines)
- Photo 17.** Poudre végétales de pamplemousse (écorce – feuilles-graines)(original)
- Photo 18.** Préparation de l'infusé des feuilles et écorce du pamplemousse (*Citrus maxima*) et de l'orange (*Citrus sinensis*) (original).

Photo 19. Dispositif de Clevenger d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation (photo original 2023)

Photo 20. Extraction des huiles essentielles à partir des écorces d'orange.

Photo 21. Extraction des huiles essentielles à partir des écorces de pamplemoussier (original).

Photo 22. Aspect des colonies purifiées sur GN (Original,2023).

Photo 23. Aspect microscopique des bactéries à Gram positif vue sous microscope photonique G* 40 (Original, 2023) (**S1:** Gram ⁺, **S2:** Gram ⁺, **S3:** Gram ⁺, **S4:** Gram ⁺).

Photo 24. Résultat de teste de catalase (Original,2023).

Photo 25. Résultat de test mannitol (original,2023).

Photo 26. résultat de test respiratoire (Original, 2023).

Photo 27. Quelque résultat positif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.sinensis* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques.

Photo 28. Quelque résultat négatif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.sinensis* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques.

Photo 29. Quelque résultat positif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.maxima* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques.

Photo 30. Quelque résultat négatif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.maxima* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques.

Liste des tableaux

- Tableau 01.** Description botanique de l'oranger
- Tableau 02.** Composition et valeur nutritive de l'orange
- Tableau 03.** Teneurs en minéraux et oligoéléments
- Tableau 04.** Teneurs en vitamines
- Tableau 05.** Distribution phyto-chimique d'orange
- Tableau 06.** Description botanique
- Tableau 07.** Composition et Valeur nutritive de pamplemousse
- Tableau 08.** Teneurs en vitamines
- Tableau 09.** Teneurs en minéraux et oligo-élément
- Tableau 10.** Composition chimique de pamplemousse.
- Tableau 11.** Principales maladies d'agrumes.
- Tableau 12.** Les souches bactériennes utilisées lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne.
- Tableau 13.** Région et date de récolte du matériel végétal.
- Tableau 14.** Molécules recherchés (Réactions de caractérisation et résultats attendus)
- Tableau 15.** Échelle de mesure de l'activité antimicrobienne
- Tableau 16.** Les caractéristiques macroscopiques des souches sélectionnés.
- Tableau 17.** Les caractéristiques microscopiques des souches isolées
- Tableau 18.** Résultats des tests biochimiques
- Tableau 19.** Résultat du screening chimique des écorces et des feuilles de *Citrus sinensis*
- Tableau 20.** Résultat du screening chimique des écorces et des feuilles de *Citrus maxima*
- Tableau 21.** Le rendement en tanins des écorces de *C.sinensis* et *C.maxima*
- Tableau 22.** Couleur et Aspect d'extraction phénolique des feuilles de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*.
- Tableau 23.** Rendement en polyphénol totaux des feuilles de *C.sinensis* et *C.maxima*
- Tableau 24.** Aspect et couleurs de l'extraiteux des grains de *C.sinensis* et *C.maxima*
- Tableau 25.** Résultats d'extraction de l'huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*

Tableau 26. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles des écorces de *Citrus maxima* et *Citrus sinensis*.

Tableau 27. Résultats des zones d'inhibition des témoins (eau distillé et éthanol)

Tableau 28. Diamètres de zones d'inhibition en millimètre des extraits de *Citrus sinensis* vis-à-vis des souches bactérienne et fongiques.

Tableau 29. Diamètres de zones d'inhibition en millimètre des extraits de *Citrus maxima* vis-à-vis des souches microbiennes et fongiques.

Introduction

Synthèse
bibliographique

Matériel et Méthodes

Résultat et discussions

Conclusion

Références
Bibliographiques

Les Annexes

Résumé

Dédicace

A mon très cher papa

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.

A ma Chère Maman

Si Dieu a mis le paradis sous les pieds des mères, ce n'est pas pour rien. Affable, honorable, aimable 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. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Je t'aime.... tu sais.

*Dédicace spéciale à la fleur de ma vie **Nessrine***, ma précieuse et unique soeur, ma moitié. Merci toujours pour ton soutien et ton amour pour moi. Que Dieu te protège pour moi.

*A mon cher frère **Dadi***

A tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.

A mon grand frère **Mourad**, que je considère comme mon second père. Merci pour tout et j'espère que Dieu vous sauvera. Merci de me protéger

Merci pour tout et j'espère que Dieu vous sauvera, Merci de me protéger.

*Au mari de ma sœur **Rachid***, que je respecte beaucoup, merci pour votre soutien. Que Dieu vous protège.

*A ma nièce et mon neveu **Ines** et **Yanis***, Avoir un neveu ou nièce le plus beau cadeau qu'une sœur puisse vous faire. Je souhaite du succès dans leur vie et d'obtenir les plus hautes notes.

*A mes amies **yousra** et **mimi**, **ryma**, **asma** et mon binôme **meriem** ``**samra**``* je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Arab fella

Dédicace

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu Allah qui m'a donnée la volonté, la santé et la force pour terminer ce travail.

*A ma très chère mère **Ratiba***

A la plus merveilleuse des mamans, qui m'as toujours soutenu Je voudrais te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi étant petite et jusqu'à maintenant.

Je t'aime beaucoup maman.

*A mon cher père **Azzedine***

Qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse. Qui m'avez toujours soutenu et encouragé et pour ses conseils précieux durant ces années d'études.

*A mes grands-parents **Papa achide et Mami***

Pour votre affection et tous les efforts que vous avez déployé durant toute ma vie, j'espère que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

*A ma très chère sœur **Zineb***

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

Je t'aime tellement.

*A mes cher frères **Abderrahmane et Mohamed amine***

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.

*A mon cher mari **Nassim***

Merci pour ta disponibilité toujours à mes cotes et tous ce que tu fais pour moi.

*A tout **ma famille et ma belle-famille** petits et grands*

*A mes meilleur amies **Ryma, Asma, Ikram** et mon binôme **Fella** pour l'agréables moments inoubliables qu'on a passés ensemble.*

Boukouaci meriem

Introduction

L'exploitation des résidus agroalimentaires en vue d'une valorisation a bénéficié au cours de ces dernières années d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales. Aussi, avec le développement des technologies, de l'industrie pharmaceutiques, chimique, alimentaires...etc, la recherche de biomolécules issues de cette biomasse de déchets biologique est devenue un axe très valorisant.

Les agrumes, appartiennent à l'une des grandes familles des plantes aromatiques surnommées les Rutacées (**Panwaret al, 2021**), ils représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes dans le monde. Leurs productions mondiale est estimée à plus de 115 millions de tonnes par an dont 517 milles tonnes ont été produits en Algérie. Cette dernière occupe la 19^{ème} place mondiale et la 2^{ème} dans le grand Maghreb. Ils incluent les citrons, les mandarines, les pomelos, les cédrats, les oranges, les pamplemousses et les limes ...etc. (**Lagha-Benamrouche et al, 2017**).

Les déchets générés après le pressage des agrumes (peaux, pulpes, pépins), représentent 50% à 60% de la masse des fruits pressés et les peaux constituent plus que la moitié (60% à 65%) de la masse de ces déchets, les déchets et principalement les peaux d'agrumes sont une source de molécules bioactives, l'extraction des composés bioactifs tels que les huiles essentielles et les polyphénols à partir des coproduits d'agrumes suscite un grand intérêt, grâce à la recherche d'antioxydants naturels ayant des propriétés anti-radicalaires, antibactériennes et antifongiques, et sont utilisés pour la prévention contre de nombreuses maladies (**El Kantar, 2019**).

Parmi les agrumes les plus recherchés par le consommateur notamment en Algérie, les oranges (*C.sinensis*) sont les plus consommées en raison de leur bonne saveur, leur valeur nutritive élevée et leur composition riche en molécules bioactives (plus de 170 composés phytochimiques sont décrits) (**Wang, 2007**). Nous retrouvons aussi le pamplemousse (*C.maxima*) qui est une espèce à valeur ethno-médicale, pharmacologique et phytochimique bien connues et les extraits ou composés purs de cette plante ont également été évalués pour un large éventail d'activités biologiques (**Sapkota, 2022**)

Ces déchets sont-ils réellement une source de substances bioactives telles que les polyphénols et les tanins et les huiles essentielles qui seraient capables d'exercer une activité antibactérienne efficace ?

C'est dans ce contexte, que notre travail de mémoire s'inscrit visant à étudier les composés bioactifs des fruits de ces deux espèces de citrus, et de tester leur pouvoir antimicrobien.

- Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique comportant une partie consacrée à la présentation de données générales sur les agrumes (leur origine, leur anatomie, leur taxonomie, la composition chimique, leur propriétés...) et une partie présentant les principes actifs.
- Le deuxième chapitre comporte la partie expérimentale, qui consiste en l'isolement a partir de sol rhizosphérique, ainsi que les extraction des tanins, polyphénols totaux et des huiles essentielles, ainsi une étude d'évaluation in vitro de l'activité anti-antimicrobien .
- Le troisième chapitre comprend les résultats obtenus ainsi que leur discussion suivie d'une conclusion générale.

I. Généralité sur les agrumes

I.1. Caractères généraux

Dans le monde l'histoire des agrumes a pris naissance il y a probablement 4000 ans dans les régions subtropicales, ils sont cultivés depuis environ 3000 ans, d'abord pour leurs arômes ensuite pour leurs fruits et leur huile essentielle (**Webber et al., 1967**).

Le mot agrume vient de latin *acrumen*, qui désignait autrefois les arbres dont les fruits ont une saveur aigre, les agrumes appartiennent à la famille des *Rutaceae* (**Couplan, 2012**) et contiennent six genres inter-fertiles *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* et *Clymenia* (**Scora, 1975 ; Dugrand-Judek, 2015**), les plus connues sont : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella* et sont considérées comme l'une des plus grandes espèces végétales (composée de 40 espèces) (**Singh et al., 2020 ; Bénédicte et Bachès, 2021**).

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces, leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence (**Polese, 2008**).

Les agrumes sont originaires d'Asie du Sud-est, ils sont répandus partout dans le monde et particulièrement dans le bassin Méditerranéen, dans plus de 140 pays. Les genres *Poncirus* et *Fortunella* sont originaires de zones septentrionales de l'Est de la Chine, tandis que ceux du genre *Citrus* ont une origine méridionale entre l'Inde et l'Indonésie (**Yu qui liu et al., 2012**).

▪ La classification générale des agrumes selon APG IV :

Règne : Plantae

Phylum : Tracheophyta

Classe : Magnolipsida

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

I.2. Présentation du genre *Citrus*

Parmi les trois genres d'agrumes les plus cultivés à travers le monde, le genre *Citrus* est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées dont les fruits sont comestibles tel que les citrons, les pomelos, les oranges, les mandarines.

Les agrumes appartenant à ce genre sont issus de 4 espèces de base : *Citrus medica* L. (cédratier), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinier), *Citrus maxima* L. Osbeck (pamplemoussier) et *Citrus micrantha* (limettier).

Et la combinaison entre ces 4 espèces de base est à l'origine de la diversité des agrumes (**Fig.1**)

***Citrus aurantium* (bigaradier)** : un hybride de première génération entre un pamplemoussier et un mandarinier

***Citrus sinensis* (oranger)** : provient de deux hybridations interspécifiques entre un pamplemoussier et un mandarinier.

***Citrus paradisi* (pomelo)** : découle d'un croisement naturel entre un oranger et un pamplemoussier.

***Citrus limon* (citronnier)** : résulte d'une combinaison entre un cédratier et un bigaradier (**Khefifi, 2015**).

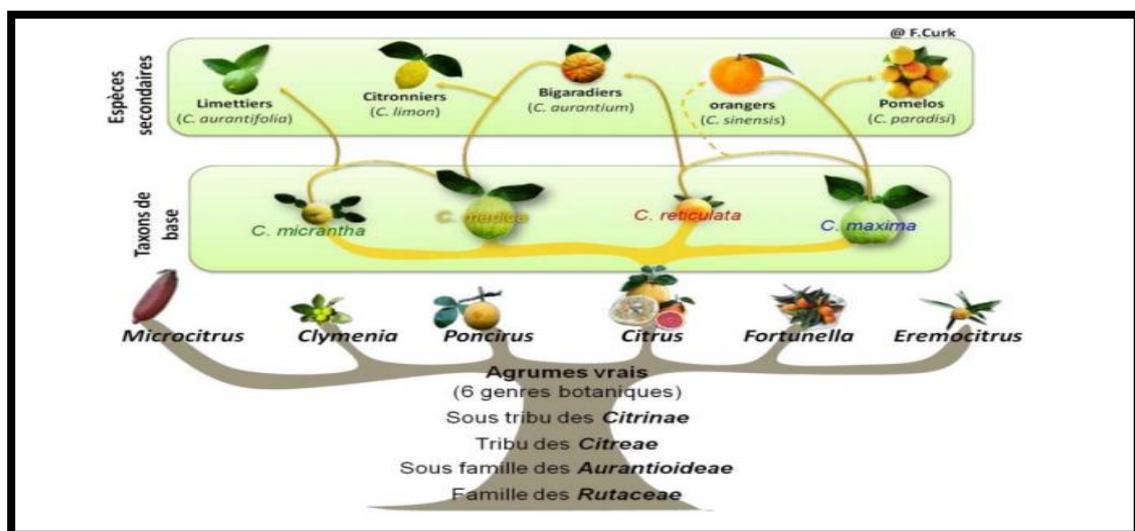


Figure 01 : Classification des agrumes et origine génétique des *Citrus* cultivés (Khefifi, 2015)

I.2.1. Espèces du genre *Citrus*

I.2.1.1. L'Orange *Citrus sinensis* (tardive)

a. Présentation

Citrus sinensis souvent appelé « orange » douce est apparu au XIII^e siècle, il vient de l'arabe « narangi » de la famille des Rutacées, c'est l'un des types d'agrumes les plus cultivés et les plus courants, il confond avec l'histoire de la Chine d'où il est originaire (Hellal, 2011).

Au cours du premier millénaire avant notre ère, l'oranger se propage très vite à l'ensemble des pays du Sud-est asiatique, puis arrive en Méditerranée au VII^e siècle.

Une fois implanté dans le bassin Méditerranéen, l'oranger est diffusé à travers le monde par les Européens, en Amérique du Nord et du Sud au XVI^e siècle, Afrique du Sud au XVII^e et Australie au XVIII^e (Webber et Herbert, 1967).

b. Position Systématique de l'orange

Selon APG IV la classification botanique de l'orange douce est la suivante :

- Règne : Plantae

-phylum : tracheophyta

- Classe : magnoliopsida

- Ordre : spindales

- Famille : Rutaceae

- Genre : *Citrus*

- Espèce : *sinensis*

-Nom vernaculaire : apelsin

-Nom scientifique du taxon : *Citrus * sinensis* (L) Osbeck

c. Description botanique

L'oranger est un arbuste sempervirent au port harmonieux et de croissance rapide, pouvant atteindre de 9 à 10 mètres de hauteur avec des branches épineuses portant des feuilles de forme des lames allant d'elliptiques, couleur vert sombre, ovales, coriaces et finement denticulées (photo.1 et Tab.1).

Le pétiole est légèrement ailé et émettant une forte odeur caractéristique d'agrumes en raison de la présence d'huile abondante, le calice des fleurs est de 4-5 lobé et il y a généralement cinq pétales et contient des glandes sébacées (**Favela-Hernández *et al.*, 2016**).



Photo 01. Arbre de l'oranger (originale 2023)

Fleurs	Le diamètre des fleurs d'orange est de 2 à 4 cm (0,8 à 1,6 po) blanches et immaculées, très parfumées. , simples, peu nombreuses, et souvent parfaites Formule florale : 5S+5P+ (5+5) E+ (2-5) C	
Feuilles	Les feuilles sont lisses, ovales, de 5-15 cm x 2-8 cm ses feuilles foncée et brillantes et légèrement ailées s'épanouissent à partir de fin du printemps	
Ecores	Grise, lisse ou à peine rêche.	
Fruits	Le fruit d'orange est un hespéride, c'est un type de baie dont la taille, la couleur, la forme et la qualité du jus variables en fonction des différents groupes aux quels ils appartiennent. Les fruits sont de forme globuleuse à ovoïde.	

Tableau 01. Description botanique de l'oranger (valiant., 2004 ; Milind *et al.*,2012)

Photo originale (2023)

d. Principales variétés d'orange

Les oranges douces *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sont les plus reconnus et les plus consommés, selon **Krezdorn, (1970)** et **Navarro, (2012)** on trouve trois catégories principales :

➤ Les oranges navels

Les blonds navels sont des fruits à maturation précoce (début novembre, fin janvier) (**Buffa, 1960**), connues pour leur excroissance « Navel » et quasi absence de pépins (**Saunt, 1990**). Elles sont particulièrement appréciées pour leurs excellentes qualités gustatives et leurs saveurs très douces, une peau épaisse facile à peler, elles sont moins juteuses par rapport aux autres variétés et elles s'adaptent au climat chaud des régions tropicales et semi tropicales.

➤ Les oranges blondes

C'est un groupe d'oranges dites communes à maturité fin décembre à mars (**Buffa, 1960**), cette variété se rencontre dans les vieilles plantations, ont une chair blonde avec peu de pépin plus cultivées pour leur productibilité, époque de production la variété la plus abondante est la valancia première variété commerciale de tous les types d'agrumes (**Kimball, 2012**).

➤ Les oranges sanguines

Les oranges sanguines a maturité de mars à avril, sont très juteuses, ce sont probablement les plus succulentes des oranges et possèdent la particularité d'avoir une chair rouge par la présence des pigments anthocyaniques fréquent dans nombreux fruits mais rare pour les agrumes, mis à part de minuscules points rouges à la surface de son écorce. La variété Moro est la plus colorée de toutes les variétés d'orange sanguine. La couleur rouge du fruit est un facteur important affectant le choix du consommateur et le marketing du fruit (**Choi, 2002 ; Titta et al., 2010**).

e. Composition chimique du fruit d'orange

Le *Citrus sinensis* présente une composition diversifiée contenant beaucoup d'eau, très peu de lipides, de protéine, de fibres, et les sucres qu'elle contient sont rapidement utilisables par l'organisme (**Tab.02**). Excellente source de vitamine (**Tab.04**) le fruit contient également des teneurs importante en minéraux et oligoéléments t'elle que le potassium, le calcium, le phosphore et d'autre composée (**Tab. 03**).

Tableau 02 : Composition et valeur nutritive de l'orange (Gallouin *et al*, 2013)

Composé	Teneur
Energie(Kcal)	45.00
Protéines(g)	1
Lipides (g)	0.2
Glucides (g)	8-12
Fibres (g)	1.5
eau (g)	86

Tableau 03 : Teneurs en minéraux et oligoéléments (Gallouin *et al*, 2013)

Composé	Teneur (mg)
Potassium	200
Phosphore	20
Calcium	45
Sodium	1.5
Magnésium	14
Fer	0.4
Zinc	0.1
Cuivre	0.06
Sélénium	0.002

Tableau 04 : Teneurs en vitamines (Gallouin *et al*,2013 ; Etebu *et al*,2014)

Composé	Teneur (ug)
Vitamine A	11
Beta-caroténe	87
Alpha-caroténe	7.000
Beta-cryptoxanthine	116.000
Folates totaux	30.000
Composé	Teneur (MG)
Thiamine (Vitamine B1)	0.08
Riboflavine (Vitamine B2)	0.04
Niacine (Vitamine B3 ou PP) en	0.3

équivalent en niacine totale	
Niacine (acide nicotinique)	0.575
Acide pantothénique (Vitamine B5)	0.5
Vitamine B6	0.1
Vitamine C	60
Vitamine E (tocophérols)	0.98
Vitamine B8	0.02
Vitamine B9	0.04
Vitamine K	0.03

De nombreux métabolites secondaires trouvés dans les fruits, la pulpe, les feuilles, l'écorce et les grains de *C. sinensis* contiennent les catégories de substances chimiques comme indiqué dans le tableau 05 (**Khan-Niazi et al, 2023**).

Tableau 05. Distribution phyto-chimique d'orange

composant	Organe	Référence
Flavonoïdes	Feuilles Écorce Fruits	(Gattuso et al. 2007)
Coumarines	Ecorce	(Sidana et al. 2013)
Caroténoïdes	Fruits	(Sidana et al. 2013)
Mucilage	Grains Ecorce Pulpe Fruits	(Abobatta, 2019)
Huile Essentielle	Fruits Grains Feuilles	(Abobatta, 2019)
Tanins	Fruits Feuille	(Abobatta, 2019)
Stéroïdes	Feuille	(Favela-Hernández et al, 2016)

f. Utilisation de l'orange

L'orange peut être consommée généralement crues ou bien sous forme de jus en raison de leur valeur nutritive élevée ou d'autres usages comme :

➤ Utilisation en médecine

L'orange est efficace dans la gestion de l'arthrite, l'asthme, la maladie d'Alzheimer, le Parkinson, la dégénérescence musculaire, le diabète sucré, les calculs biliaires, la sclérose en plaques, le choléra, la gingivite, la fonction pulmonaire optimale, et la maladie de Crohn (**Milind et al. 2012**).

➤ Utilisation culinaire :

L'écorce d'orange est utilisée pour la production des confites, pâtes de fruits, glaces, eau de fleurs d'oranger, liqueurs à base d'écorces d'oranges douces et amères (Bousbia, 2011).

➤ Utilisation en cosmétologie

Elle rentre dans la composition de nombreux parfums et eaux de toilette (Bousbia, 2011). Aussi la pulpe d'orange fraîche est utilisée pour traiter les maladies de la peau : l'acné, soins de visage (Valnet, 2001).

➤ Utilisation traditionnelles

C. sinensis est consommé partout dans le monde comme une excellente source de vitamine C, qui est un puissant antioxydant naturel et qui renforce le système immunitaire de l'organisme. Il a été utilisé traditionnellement pour traiter des affections telles que : les crampes, les coliques, la diarrhée, la bronchite, la tuberculose, la toux, le rhume, l'obésité, les troubles menstruels, l'angine de poitrine, l'hypertension, l'anxiété, la dépression et le stress (Favela-hernández *et al.*, 2016).

Le jus d'orange est utilisé pour (Milind *et al.*, 2012) :

- Éliminer les toxines de l'organisme et Maintenir l'hydratation.
- Utilisé comme médicament traditionnel pour le traitement de la tuberculose.
- Utilisé dans les troubles de l'estomac, il améliore l'appétit et prévient la constipation.

I.2.1.2 Le pamplemousse (*Citrus maxima*)

a. Présentation

Le fruit de *Citrus maxima* est un agrume nommé « pamplemousse » qui appartient à la famille des *Rutaceae* sous le nom scientifique maxima (Burm.) Merr ou *Citrus grandis* (L.). C'est une espèce d'arbres qui signifient grand et très grand, ce qui est un caractère important de cet agrume.

Le pamplemousse est originaire des îles de l'Indonésie et de la Malaisie, d'où il serait parti à la conquête de l'Asie, et des îles de l'océan pacifique prospéra en Chine ou il est connu depuis plus de quatre mille ans (**Blaisot, 2016**).

b. Position Systématique du pamplemousse

Selon APG IV la classification botanique de pamplemousse est la suivante :

Règne : Plantae

Phylum : Tracheophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Niveau du taxon : Espèce

Epithète spécifique : maxima

Nom générique du taxon : citrus maxima (Brum.) Merr .

Le pamplemousse possède deux cultivars:

- Cultivars à chair jaune (Marsh, Duncan)
- Cultivars à chair rouge ('Hudson', 'Star Ruby', 'Ray Ruby' 'Rio Rouge') (**Ollitrault et Navarro, 2012**).

c. Description botanique :

Le pamplemoussier est un arbre pouvant atteindre les 5 à 15 mètres de hauteur avec un tronc un peu tordu de 4 à 12 pouces (**Vijaylakshmi, 2015**), l'arbre est un fruitier d'une prolificité remarquable, capable d'une production inégalée par aucun autre *Citrus*. Il porte ses fruits en bouquets (**Brichet, 1946**) et au goût, le pamplemousse est aigre-doux (**Cassan, 2008**). Il pousse largement à des températures 25–32°C et précipitations 1 500–2 500 mm en 3-4 mois saison sèche. Il pousse bien dans le sable rugueux à l'argile lourde mais favorise les sols fertiles (**Sapkota, 2022**).



Figure.02 Arbre de pamplemoussier (Site internet n°1).

Tableau 06 : description botanique (Anonyme, 2003;Cassan, 2008;Blaisot, 2016)

Feuilles	Les feuilles sont ovales, brillantes, persistantes. et d'une couleur vert franc. De grande taille, allant jusqu'à 16 cm de longueur par 7 cm, avec une marge légèrement dentée vers l'extrémité qui est en pointe, et elles possèdent un pétiole ailé en forme de cœur.	
Fruits	Le pamplemousse est le plus gros des agrumes, allant de 15 à 30 centimètres de diamètre, et pouvant peser jusqu'à plusieurs kilos.	
Ecorce de fruits	Soit lisse soit granuleuse et très épaisse de couleur varie du jaune clair au vert clair	
Fleurs	Apparaissent au mois d'avril et sont blanc-jaunâtre et très odorantes. Mesurent 6 cm de large quand elles sont épanouies. Les fleurs d'une même cyme ont 5 sépales pour la première et 4 pour les autres, et autant de pétales.	
La pulpe	À l'intérieur du fruit se trouve découpée en quartiers dont les vésicules sont juteuses, jaune clair, roses ou rouges.	

Photo originale (2023)

d. Composition chimique du pamplemousse

La composition chimique du fruit de pamplemousse est constitué d'eau à environ 88%, son apport énergétique est modéré et il est essentiellement dû à des glucides, les fibres et les lipides sont moyennement abondants (**Tab.07**), ce fruit est particulièrement riche en vitamine C, les vitamines du groupe B sont bien

représentées (**Tab.08**), il contient également des différents minéraux comme : potassium, calcium, ...etc (**Tab.09**).

Tableau 07: Composition et Valeur nutritive de pamplemousse (Haineault, 1999)

Composant	Valeur
Energie (cal)	43
Glucides(g)	9.3
Protéine(g)	0.6
Eau(g)	89
Lipides(g)	0.1
Fibres (g)	0.6

Tableau 08 : Teneurs en vitamines (Haineault, 1999)

Composant	Valeur
Vitamine E (milli)	0.25
Vitamine B1 (micro)	48
Vitamine B2 (micro)	24
Vitamine B4 (micro)	28
Vitamine C	44

Tableau 09: Teneurs en minéraux et oligo-élément (Haineault, 1999)

Composition	Valeur
Calcium (milli)	18
Sodium (g)	1.6
Magnésium (milli)	10
Sélénium (micro)	0.2
Potassium (milli)	180
Fer (g)	0.34
Zinc (micro)	0.17
Cuivre (micro)	0.04
Iode (micro)	1.3

Des composés phytochimique appartenant à différentes classes chimiques tels que les alcaloïdes, les Stéroïdes, les flavonoïdes, les glycosides, les caroténoïdes sont présents. Le tableau 10, illustre les détails des phyto-constituants présents et les parties de plantes utilisées pour l'isolement.

Tableau 10 . distribution phytochimique de pamplemousse.

Composants	Parties de plantes (localisation)	Référence
Alcaloïdes d'acridone	Fruits et feuilles Fleurs	(Kretschmar ;Baumann., 1999)
Benzénoïdes	Jus Feuilles	(Correa <i>et al.</i> , 2016)
Caroténoïdes	Fruits	(Alqu'ezar <i>et al.</i> , 2008)
Coumarines	Peau du fruit Chair du fruit Écorce de tige	(Zhang <i>et al.</i> , 2017)
Constituants de l'huile essentielle (constituants volatils)	Feuilles d'écorces de fleurs Écorce de fruit Feuilles de fleurs	(Sapkota <i>et al.</i> , 2022)
Flavonoïdes	Feuilles Fruits écorces jus de fruits	(Cordenonsi, 2017)
Phénoliques	Fruits	(Khanam <i>et al.</i> , 2014)
Stéroïdes	Racine Fruit	(Sapkota <i>et al.</i> , 2022)
Triterpènes	Feuilles, pulpe de fruits et pépins	(Sapkota <i>et al.</i> , 2022)

e. Différents utilisation du pamplemousse

➤ Utilisation traditionnelles

La médecine traditionnelle joue un rôle clé dans la régulation de la santé humaine, la prévention et le traitement des maladies, le *Citrus maxima* a été privilégié dans la médecine traditionnelle à base de plantes pour ses nombreuses vertus curatives, les fruits ne sont pas seulement consommés, mais les autres parties de cette plante sont également utilisées dans la culture populaire (Vijaylakshmi, 2015 ; Anmol *et al.* , 2021 ; Sapkota, 2022).

➤ Utilisations médicinales :

Des études ont montré que le jus et l'écorce des fruits de *Citrus maxima* sont très nutritifs et ont de bonnes propriétés médicinales (Nwannek, 2018 ; Tocmo, 2020).

La pulpe et les écorces : sont utilisées comme apéritif, tonique pour l'estomac, stimulant cardiaque dans les affections cardiovasculaires, et également en

cas de toux ,ayant aussi des effets hypolipidémiques, hypoglycémians et anti-inflammatoires, antioxydant, antimicrobien, et anticancéreuses. Se sont révélées aussi comme antiasthmatique, sédatif, tonique cérébral, et dans le soulager les maux de tête et les troubles oculaires et pour le traitement des vomissements et de la diarrhée.

Le jus de fruit : a le potentiel d'améliorer la perte de poids et de favoriser la réduction du cholestérol.

Les graines : sont utilisées contre la dyspepsie, la toux et le lumbago. et également utilisé dans le traitement du cancer et des troubles gastro-intestinaux seraient également utilisés dans des maladies telles que la lèpre et l'asthme .

Les fruits : ce sont avérés dans la gestion du hoquet , de l'aberration mentale et de l'épilepsie.

I.3 Anatomie générale des agrumes

D'après **Escartin (2011)**, les fruits d'agrumes se caractérisent par une diversité morphologique importante, leur forme peut varier entre aplatie, ronde et oblongue et leur couleur du vert au rouge foncé, ils présentent la même structure anatomique cette structure correspond à une baie pluriloculaire.

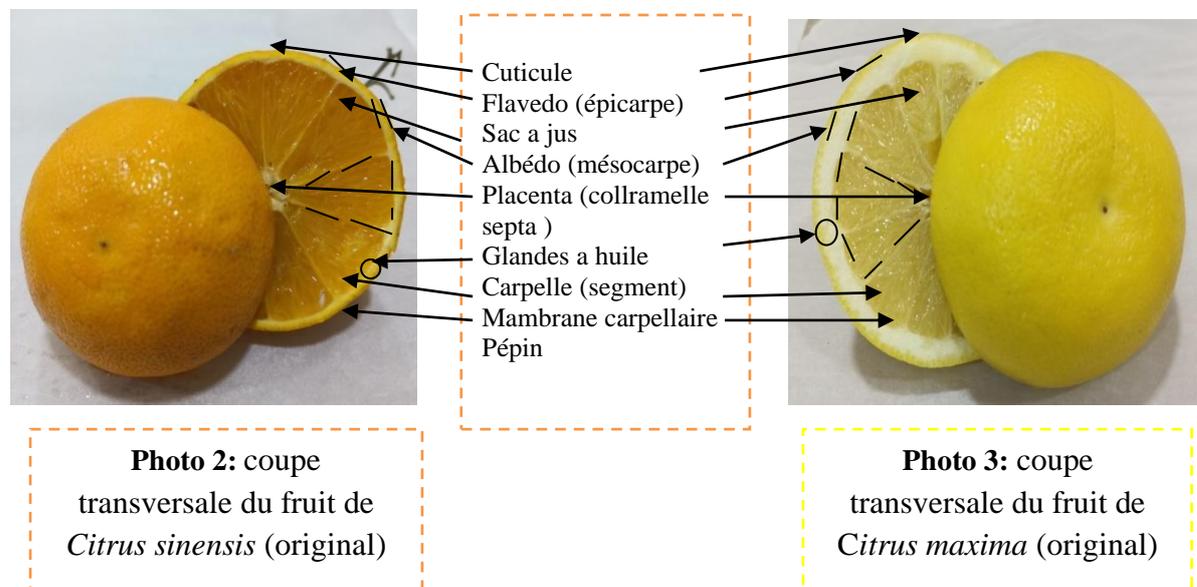
Le fruit est composé de peau, de pulpe, des graines et de jus. L'écorce représente entre 50 et 65 % du poids total du fruit les graines d'agrumes sont la portion inutilisée réelle représentant environ 2% -7% du poids total de fruit (**Hegazy, 2012 ; Omoba et al., 2015 ; Rafiq et al., 2016**), la structure du fruit est composée de deux parties distinctes : le péricarpe et l'endocarpe.

- a. **Le péricarpe (écorce) :** est la partie non comestible du fruit. Elle est composée de deux couches : le flavédo (épicarpe) et l'albédo (mésocarpe).
 - **Le flavédo :** est la couche externe, dont la couleur peut varier (jaune, verte, rouge ou orange) en fonction de sa composition en pigments. Il est riche en composés phénoliques. Ses glandes oléifères contiennent les huiles essentielles qui confèrent aux agrumes leurs odeurs caractéristiques.
 - **L'albédo :** est la couche moyenne, blanche et spongieuse. L'épaisseur de cette couche varie selon les espèces
- b. **l'endocarpe (pulpe) :** est issue d'un seul ovaire constitué de plusieurs carpelles soudés. Le nombre de segments ou « quartiers » varie entre 5 et 18.

Les quartiers sont entourés d'une membrane formée à partir de l'épiderme interne des carpelles. Les sacs à jus sont implantés autour d'un axe central et leurs vacuoles se remplissent de jus au cours du développement du fruit (Dugrand-judek, 2015).

Les graines d'agrumes (pépins) font partie de l'endocarpe, ils sont connus pour être une source potentielle de sous-produits précieux tels que les composés phénoliques les limonoïdes, les caroténoïdes et les tocophérols et de protéines sont aussi une source intéressante d'huile allant de 20 à 40% en poids qui ont des utilisations thérapeutiques bien déterminées (Rosa *et al*, 2019).

La coupe transversale (photo 2, photo 3) du fruit permet de distinguer les parties suivantes :



I.4 Les maladies des agrumes

Les agrumes, avec leur diversité, sont assujettis à une large gamme de maladies bactériennes, virales et fongique qui pouvant affecter les feuilles, les racines, les fruits. A travers les régions agrumicoles mondiales, il a été rapporté plusieurs cas de ces maladies graves dont les dégâts ont pris un aspect désastreux (Tab.11) (Agagna, 2016).

Tableau 11 . Principales maladies d'agrumes.

Maladie	Agent causal	Symptômes	Référence
La pourriture racinaire et du collet (ou gommose) :	<i>Phytophthora spp.</i> (<i>P. nicotianae</i> et <i>P.citrophotora</i>)	-Dépérissement de l'arbre -Jaunissement des feuilles -affecte la base du tronçet les membres inférieurs d'où une gencive claire est sécrété.	(Harley et al., 2016)
La Fumagine	<i>Capnodium citri</i>	Les insectes rejettent sur les feuilles et les rameaux, un miellat sur lequel le champignon responsable de la fumagine (<i>Capnodium citri</i>) trouve un milieu favorable à son développement.	(Feriani, 2019)
La Chlorose variéguée	<i>Xylella fastidiosa</i>	Sur la face supérieure des feuilles apparaissent des taches jaunes auxquelles correspondent à la face inférieure des zones gommeuses de coloration brun orange. Les fruits sont petits et durs.	(Curk et al., 2022)
Le Stubborn	<i>Spiroplasma citri</i>	-carences nutritionnelles -bloquant la croissance de l'arbre et la production de fruits	(Curk et al., 2022)
La Tristeza	<i>Citrus Tristeza Virus = CTV</i>	-la nécrose des vaisseaux du liber, tant dans la partie souterraine que dans la partie aérienne, interrompant la circulation normale de la sève. - Le bourgeon terminal dépérit et meurt. -L'arbre cesse toute croissance. -Les feuilles ont tendance à s'enrouler longitudinalement en présentant leur concavité vers le haut.	(Jamoussi, 1955)
L'Exocortis	<i>Citrus Exocortis viroide</i>	- un écaillage plus ou moins prononcé de l'écorce du porte-greffe (suivant la virulence de la maladie). - La mauvaise circulation de la sève, induit par l'écaillage, entraînent un affaiblissement général de l'arbre (nanisme, jaunissement du feuillage, réduction des productions	(Feriani, 2019)

I.5 Les propriétés biologiques des agrumes

➤ Activité antioxydant des *Citrus*

Les agrumes sont des végétaux importants en raison de leurs propriétés nutritionnelles et anti- oxydantes. Les antioxydants les plus connus sont les caroténoïdes (surtout le β -carotène), l'acide ascorbique, les tocophérols (vitamine E)

et les poly phénols. Ces derniers incluent les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques (**Hercberg *et al*, 2004**).

Les antioxydants sont des composés qui peuvent atténuer, inhiber ou prévenir l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (**Kim *et al*, 2004**). Comme ils ont montré des effets protecteurs dans différentes maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer et le vieillissement (**Liu *et al*, 2000**).

➤ **Activité anti-inflammatoire**

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

➤ **Activité antiallergique :**

Les citrus ont également des propriétés antiallergiques qui sont dues à leurs richesses 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**).

➤ **Activité antimicrobienne**

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales.

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

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou

d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

II. Les biomolécules végétales

II.1. Les composées phénolique

Les agrumes ont reçu beaucoup d'attention, en raison de leur composition chimique, contenant une quantité élevée des composés bioactifs, en particulier les polyphénols. Les composés phénoliques sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire des plantes depuis les racines jusqu'aux fruits (Kamran-Khan, 2010), ce sont des composés constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues, on distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les saponines ...etc (Lugasi *et al*, 2003).

Les composés phénoliques sont classés en deux grandes catégories: flavonoïdes et non flavonoïdes (Acide phénolique) (Kamran-Khan, 2010).

a. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols solubles dans l'eau qui se distinguent de la plupart des autres composés phénoliques naturels par leur capacité à s'adapter à l'environnement, sont couramment présents dans un grand nombre d'espèces végétales supérieures. Ils peuvent s'accumuler en grandes quantités (souvent plus de 10 % du poids sec) dans des organes ou des tissus particuliers (écorce, bois, feuilles, fruits ou racines). Les tanins se répartissent en deux groupes en fonction de leur structure les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Scalbert, 1991).

- **Les tanins hydrolysables** : sont des esters du glucose et d'acide gallique. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide-l'acide éllagique (Scalbert, 1991 ; Cowan, 1999).
- **Les tanins condensés** : formés par des condensations de dérivés de flavan qui ont été transportés vers les tissus ligneux des plantes, ce sont des oligomères de flavane-3-ol dérivés de la catéchine ou nombreux isomères (Cowan, 1999).

b. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un grand groupe de composés phénoliques bioactifs des végétaux, ce sont des pigments simples ou glycosylés les plus fréquents à côté de la chlorophylle et des caroténoïdes, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Krief, 2003 ; Stalikas, 2007**).

Ils sont très répandus dans les fruits des agrumes et dérivés tels que les jus et divers suppléments diététiques (**Liu et al, 2008**).

II.2. Les huiles essentielles

a. Généralités

Le terme "huile essentielle" remonte au XVI^e siècle et dérive de la drogue *Quinta essentia* nommée par le Suisse Paracelsus Von Hohenheim (**Burt, 2004**). Les huiles essentielles sont définies en pharmacopées Européennes, comme un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage ou par expression du péricarpe comme chez les agrumes.

Une huile essentielle appelée aussi essence est un mélange de substances aromatiques volatiles peu complexe issue et produit par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytopathogènes (**Huet, 1991 ; Lahlou, 2004 ; Lehmann, 2013**).

D'après la monographie de la pharmacopée européenne la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière à l'exception des fruits du genre *Citrus* qui sont toujours traités à l'état frais. Dans le cas de ce genre, dont les fruits sont traités par expression à froid, exceptionnellement l'AFNOR (Association Française de Normalisation) ne parle pas d'huile essentielle mais d'essence (**Lebon, 2020**).

c. Répartition et localisation des huiles essentielles dans le végétal

- **Répartition :**

Les végétaux supérieurs sont capables de produire des H.Es réparties en plus de 60 familles botaniques. Bien que les plantes aromatiques se répartissent sur un grand nombre de familles botaniques, certaines concentrent un grand nombre d'espèces

concernées Citons par exemple les *Lamiaceae*, les *Astéraceae*, les *Apiaceae*, les *Cupressaceae*, les *Rutaceae*, les *Lauraceae*, les *Myrtaceae*... (**Baser et Buchbauer, 2009**). L'essence peut représenter de 0,01% à 5% du poids sec d'une plante aromatique (**Faucon, 2015**).

Ils sont synthétisé au niveau de tous les organes de la plante les fleurs (bergamotier), les feuilles (menthe poivrée), mais aussi dans des écorces (cannelier de Ceylan), des bois (santal), des racines (angélique), des rhizomes (gingembre), des fruits (badiane), ou encore des graines (muscade) grâce a des tissus (**Burt, 2004 ; Caissard et al., 2004**).

- **Localisation :**

Les plantes du genre *Citrus* sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices. Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Le fruit d'agrumes se compose de l'épicarpe, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (**Kehal, 2013**).

c. Composition

Selon **Mahato et al., (2017)** les H.Es d'agrumes sont un mélange complexe d'environ 400 composés dont la teneur et la composition dépendent des éléments suivants de l'espèce, de la variété et du cultivar , de la culture, de l'extraction et des méthodes de séparation .

Les composés présents dans l'huile d'agrumes sont regroupés en cinq classes principales les monoterpènes hydrocarbonés, les monoterpènes oxygénés, les sesquiterpènes hydrocarbonés, et les sesquiterpènes oxygénés. Le limonène est l'un des principaux composants des huiles essentielles d'agrumes.

Les HE contiennent 85 à 99 % de composants volatils et 1 à 15 % de composants non volatils. Les composés actifs dans les H.Es sont très volatils et labiles à l'oxygène, à la chaleur ou à la lumière. Les constituants volatils sont un mélange de monoterpène

(comme le limonène) et de sesquiterpène les hydrocarbures et leurs dérivés oxygénés, y compris les aldéhydes, les cétones, les acides, les alcools et les esters.

Les composés volatils sont en outre classés comme alcools, éthers, aldéhydes, cétones, esters, amines, amides, les phénols, les hétérocycles et principalement les terpènes.

Les composés non volatils comprennent des hydrocarbures à longue chaîne, des acides gras, des stérols, des caroténoïdes et des composés hétérocycliques oxygénés (**Fisher et Phillips, 2006**).

d. Propriétés biologiques des Huiles essentielle

Le spectre d'action des H.Es est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. En outre, certaines essences douées d'une activité antifongique s'opposent au développement des champignons, des moisissures en les détruisant. Ces activités sont par ailleurs variables d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Les pouvoirs thérapeutiques offerts par les composés chimiques des H.Es font objet de nombreuses études et ils sont innombrables et variés exemple pour le limonène des *Citrus* qui a une action stimulante sur les sécrétions digestives et le p-cymène a un effet antalgique (**Franchomme et al., 2001**).

Chapitre II. Matériel et méthodes

Les expérimentations ont été réalisées au niveau des laboratoires pédagogiques de **Biotechnologie Microbienne** (Labo.15) et **Biotechnologie Végétale** (Labo.53) de la Faculté des Sciences de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes. Ils se sont étalés 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 réaliser cette étude est composé de verrerie, d'équipements, d'appareils. Il comprend aussi un ensemble de réactifs et produits chimiques (voir annexe 01).

II.1.2. Matériel biologique

II.1.2.1 Matériel végétal

Les organes végétaux choisis pour la présente étude sont l'écorce, feuilles et grains du pamplemousse *Citrus maxima* et de l'orange *Citrus sinensis*.

II.1.2.1 Sol

Le sol qui a servi à l'isolement des bactéries dans notre étude, provient d'une rhizosphère fruitière (oranger) de 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 Ressources Biologiques** 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.

Les souches sont entretenues par repiquage sur milieux nutritif favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C (Bactéries) et 48h à 27°C (champignon) (**Tab.12**).

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Tableau 12. Les souches microbiennes utilisées lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

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

II.2 Méthodes

II.2.1 Isolement

a. Préparation de l'échantillon de sol

L'échantillon de sol a été collecté stérilement à partir de la couche Rhizosphérique de l'oranger à une profondeur de 20 cm (**Photo 10**).

Le matériel biologique recueilli a été placé dans des sachets en plastiques stérile et étiquetés (date de l'échantillonnage, localité). Ces derniers ont été gardés au frais et transportés stérilement au laboratoire pour réaliser les analyses microbiologiques nécessaires.

-le sol rhizosphérique (RS) : est représenté par le sol étroitement lié aux racines



Photo 10. Echantillon de sol de la Rhizosphère de l'oranger (original).

Chapitre II. Matériel et Méthodes

b. Préparation des solutions mères

A partir de l'échantillon de sol, une solution mère a été préparée.

Au niveau du laboratoire le sol a été séché puis tamisé. 10g ont été pesé puis introduit dans 90 ml d'eau physiologique stérile. La solution obtenue a subi une agitation de 2 minutes à 120 rpm (**photo11**)



Etape 01. Tamisage



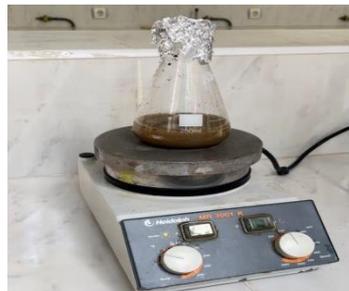
Etape 02. Préparation de matériel



Etape 03. Pesé 10 g du sol



Etape 06. Solution mère prête



Etape 05. Agitation pendant 2 min



Etape 04 Introduit dans 90 ml d'eau physiologique stérile

Photo 11. Etapes de préparation de la solution mère (original)

c. Préparation des dilutions

La solution mère a subi 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 12**).

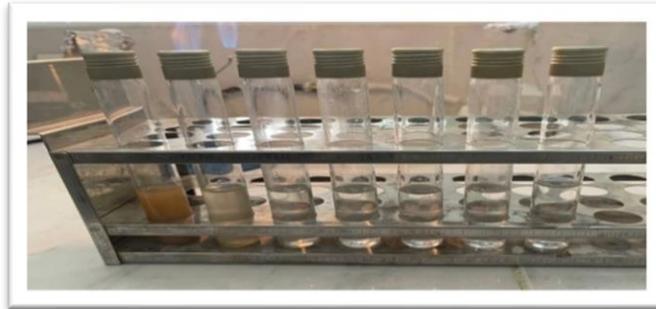


Photo 12. Série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-7}) (original).

d. Technique d'ensemencement

À proximité du bec Bunsen, un volume de 0,1 ml de chaque dilution a été prélevé puis étalé par épuisement à la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé nutritive (GN) (**photo 13**) dans le but d'isoler des souches. Les cultures ont été incubées pendant 24 à 72 heures à 30°C .



Photo 13. Préparation du milieu de culture GN (original).

e. Purification des isolats bactériens

La purification de la culture bactérienne, se fait par la technique d'ensemencement en stries, afin de disperser les bactéries à la surface du milieu de culture et d'obtenir des colonies bien isolées, après incubation de 24h à 72h pendant 30 °C.

La purification des souches se fait par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur (des colonies bien individualisées).

f. Conservation des isolats

La méthode de conservation (cryoconservation) consiste à repiquer les souches dans des tubes contenant l'eau distillée stérile et le glycérol à 30 %, puis incubé à 30C ° pendant 24h, ces dernières sont stockées par la suite à 4°C pour favoriser leurs viabilités et limiter les possibilités de variations.

g- Caractérisation phénotypique des isolats

❖ 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.

❖ 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.
- Suivie d'un rinçage rapide à l'eau distillée puis traité pendant 45 secondes par une solution de lugol et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée.

- 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.
- Suivi 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**).

f-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 de résultat s'effectue après 2 min.

Lecture : un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène :

- le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles
- le test de catalase 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 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 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 30C°, 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.2.2 Caractérisation phyto-chimiques

II.2.1 Préparation du matériel végétal

II.2.1.1 Collecte des échantillons

Les échantillons de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima* ont été récoltés frais, dans les wilayas de Boumerdes (région de Corso) et de Tizi Ouzou, au mois de février et mars 2023 (Tab.13)

Tableau 13. Région et date de récolte du matériel végétal.

Nom scientifique	Famille	Région de récolte	Date de récolte
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	Corso	Février 2023
<i>Citrus maxima</i>		Tizi Ouzou	Mars 2023



Photo 14. *Citrus sinensis* variété tardive (original)



Photo 15. *Citrus maxima* pamplemousse (original)

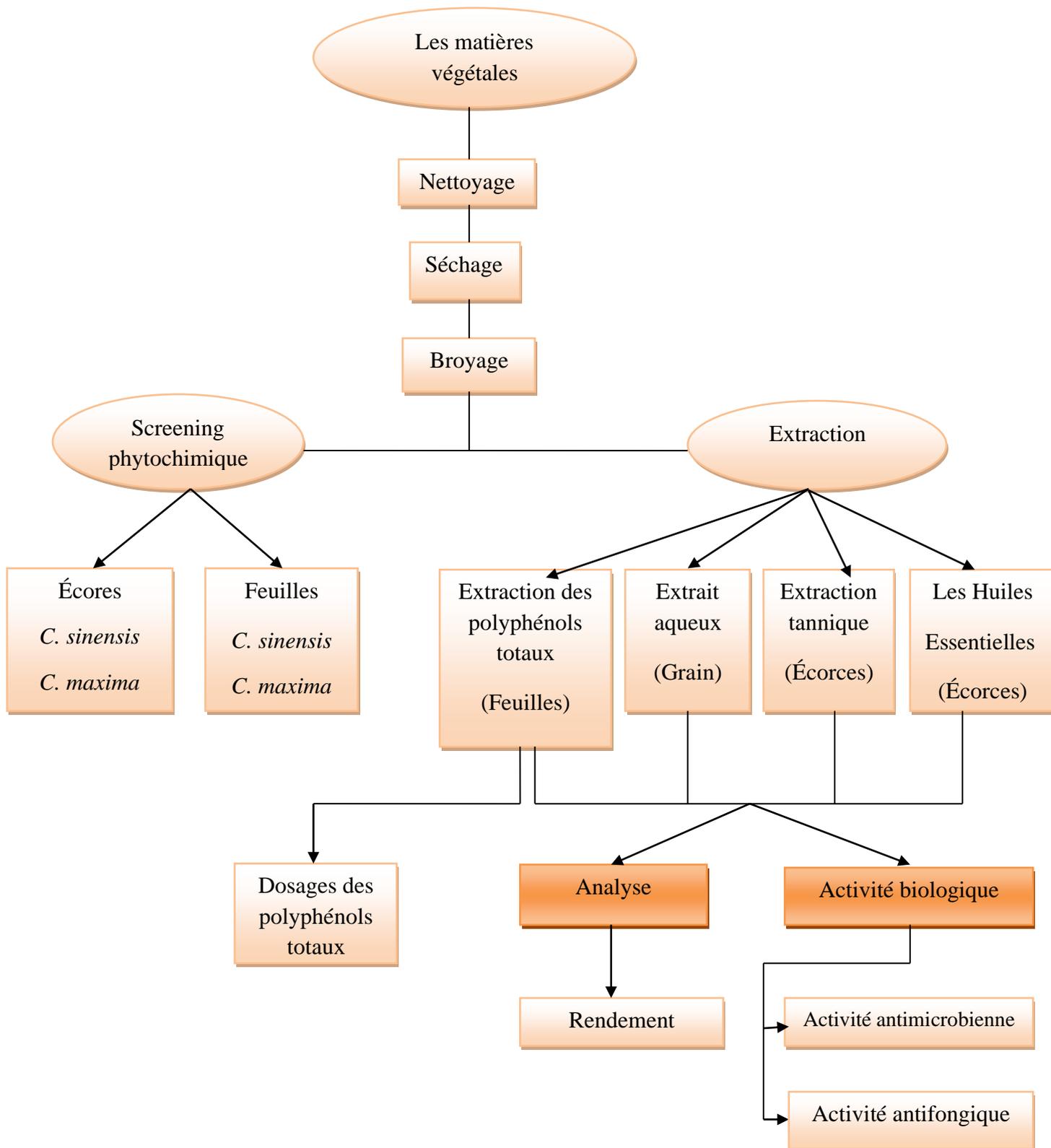


Figure 03. Diagramme résumant les différentes étapes du travail.

II.2.1.2 Préparation des échantillons

a. Nettoyage de l'échantillon

Les fruits sont lavés à l'eau du robinet, nettoyés et essuyés pour le débarrasser de toutes les impuretés, ensuite ils sont épluchés et l'écorce, grains, feuilles sont récupérée.

b. Séchage

Le séchage se fait à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 jours.

c. Broyage et conservation

Le broyage des échantillons son été réalisé à l'aide d'un broyeur électrique, et ce afin d'obtenir des poudres granulométriques plus au moins fine. Ces dernières ont été mises dans des boucaux en verre, étiquetés et conservés à température ambiante à 25 C° à l'abri de la lumière pour les prochaines utilisations.



Photo 16. Poudre végétales d'orange (écorce – feuilles-graines)(original)



Photo 17. Poudre végétales de pamplemousse (écorce – feuilles-graines)(original)

II.2.2.1 Screening phyto-chimique

a-Préparation de l'infusé

L'infusé à 10% de chaque partie de la plante (feuilles et écorces) est préparé par l'addition de 10g de poudre végétale à 50ml d'eau distillée chaude. Après 15mn de temps, le mélange est filtré et le filtrat obtenu est ajusté à 50ml par l'eau distillée (Photo 18) (Harbone, 1973 ; Paris et Nothis, 1978).

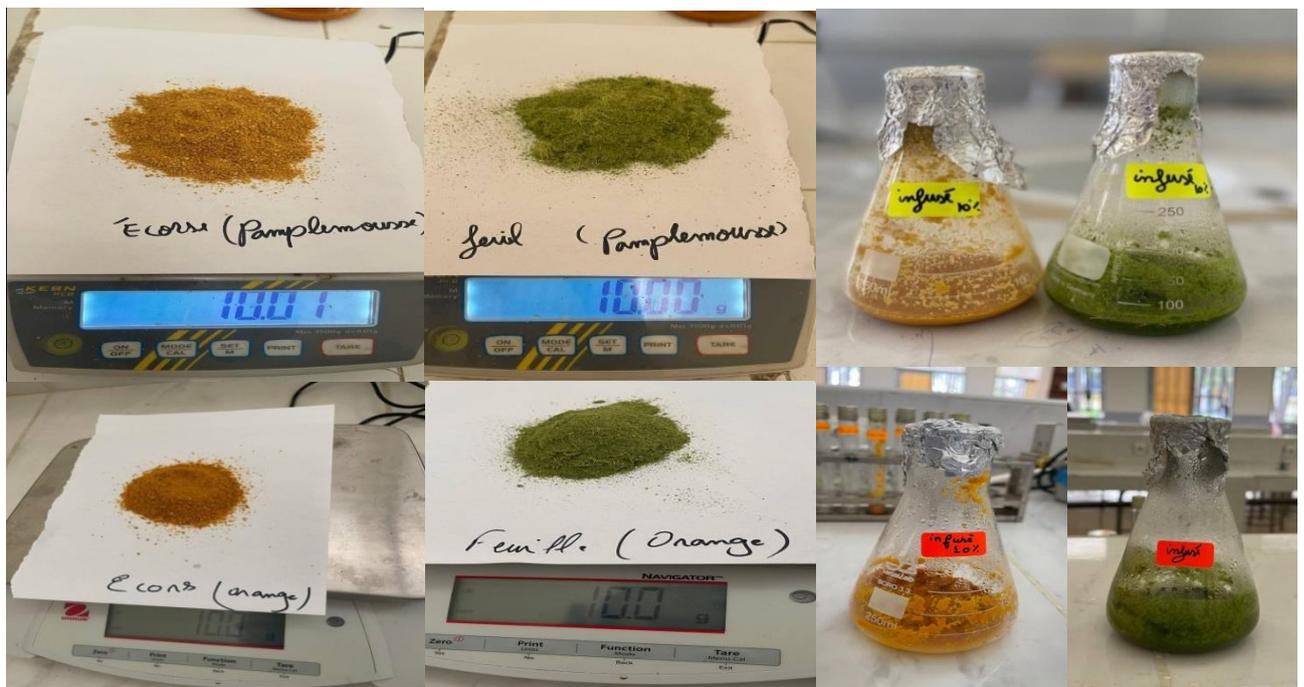


Photo 18. Préparation de l'infusé des feuilles et écorce du pamplemousse (*Citrus maxima*) et de l'orange (*Citrus sinensis*) (original).

b-Screening phytochimique

Les tests phytochimiques effectués sur les feuilles et écorces du pamplemousse (*Citrus maxima*) et de l'orange (*Citrus sinensis*) sont résumés dans le tableau suivant (**Tab. 15**). La méthode d'extraction est celle adoptée par le laboratoire des substances naturelles de **CRD SAIDAL**

**Tableau 14. Molécules recherchées
(Réactions de caractérisation et résultats attendus)**

composé	Molécules recherché	Mode opératoire	Résultat positif
Composé phénoliques	Tannins totaux	5ml infusé + quelques gouttes FeCl ₃	Apparition d'une Coloration bleu noire
	Tannins galliques	5ml infusé + 2g acétate de sodium +quelques gouttes FeCl ₃	Coloration bleu foncé
	Tannins catéchiqes	15ml infusé+10ml Formol 40%+ 5ml HCL	Coloration rouge
	Anthocyanes	5ml infusé + quelques gouttes HCL	Coloration rouge
	Flavonoïdes	5ml infusé+5ml HCL+un coupon De Mg+1ml alcool isoamylique	Coloration rouge orange
Composés terpéniques	Saponosides	5ml infusé + quelques gouttes Acétates de plomb	Formation de précipité Blanc
Composés azoté	Alcaloïdes	2g de poudre + 2ml de réactif de wanner	Précipité rouge
/	Amidon	2g poudre végétale + quelques Gouttes d'iode	Coloration bleu violette
Composé Réductifs	Mucilages	1ml infusé + 5ml éthanol +agitation10 à15minutes	Précipité floconneux
/	Glucosides	2g poudre végétal+ quelques Gouttes H ₂ SO ₄	Coloration rouge brique+violette

II.2.2.2 Extractions de composé phénolique

II.2.2.2.1. Extraction des tanins

➤ Protocole

Dans 100 ml de benzène et 100 ml de chloroforme, on ajoute 60 g de la poudre végétale (écores de *Citrus maxima* et *Citrus sinensis*). Le mélange est macéré pendant 24 heures. Après filtration, on élimine le filtrat qui contient les lipides et le chloroforme et on garde le résidu. A ce dernier, on ajoute 100 ml d'éther diéthylique pour l'élimination des phénols, des catéchines et de l'acide oxybutirique, puis on filtre. De la même façon, On ajoute 200 ml d'alcool méthylique et on effectue une macération pendant 45 minutes. Le filtrat contient les tannins et l'alcool méthylique. Enfin, on réalise une évaporation sous vide par un Rotvapeur, à une température comprise entre 40°C et 60°C pour récupérer l'extrait tannique. Ce dernier est obtenu sous forme d'un extrait sec au fond de ballon (**Bruneton, 1999**).

➤ Calcule de rendement

Le calcul de rendement en tanin est déduit par la formule suivante:

$$R\% = (M - M_0 / M_T)$$

Avec :

- R% : taux de la matière extraite.
- M : masse du ballon après l'extraction.
- Mo : masse de ballon vide (avant l'extraction).
- T : masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction.

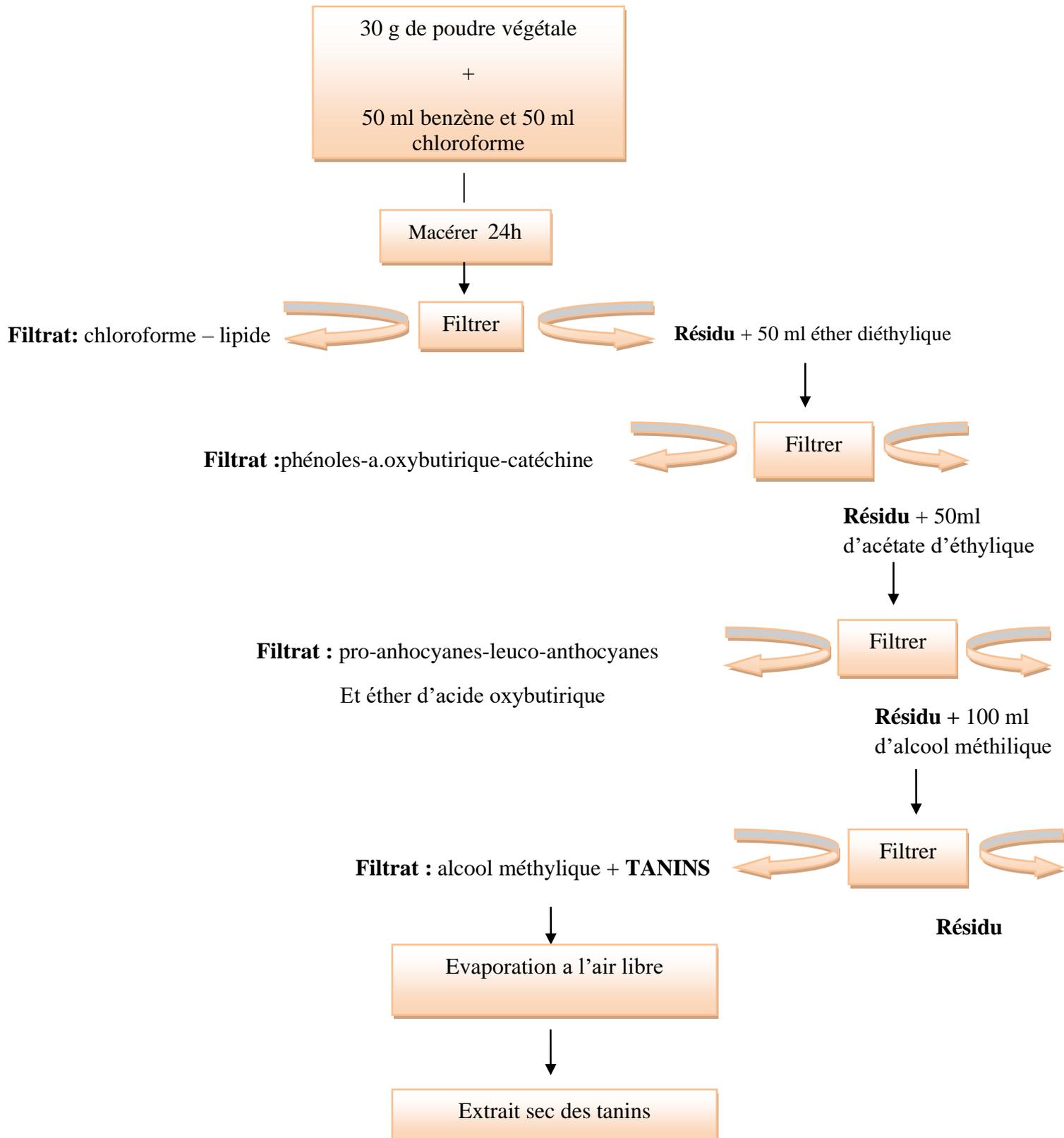


Figure 04. Mode opératoire d'extraction des tannins.

II.2.2.2 Extraction des polyphénols totaux

➤ **Protocol**

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

- **Etape 1** : 20 g de poudre végétale est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 3 jours.
- **Etape 2** : séparation de solvant méthanol de la poudre par filtration.
- **Etape 3** : le filtrat récupéré est mis dans un rotavapor 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.

➤ **Mode opératoire**

10g de poudre des feuilles de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima* sont mis dans 50g d'éthanol après une macération de 3 jours, les filtrats sont mis dans un rotvapeur, l'extrait de polyphénol est récupéré.

➤ **Calcul de rendement**

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

$$R\% = (M - M_0 / M_T)$$

Avec :

- R% : taux de la matière extraite.
- M : masse du ballon après l'extraction.
- M₀ : masse de ballon vide (avant l'extraction).
- T : masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction.

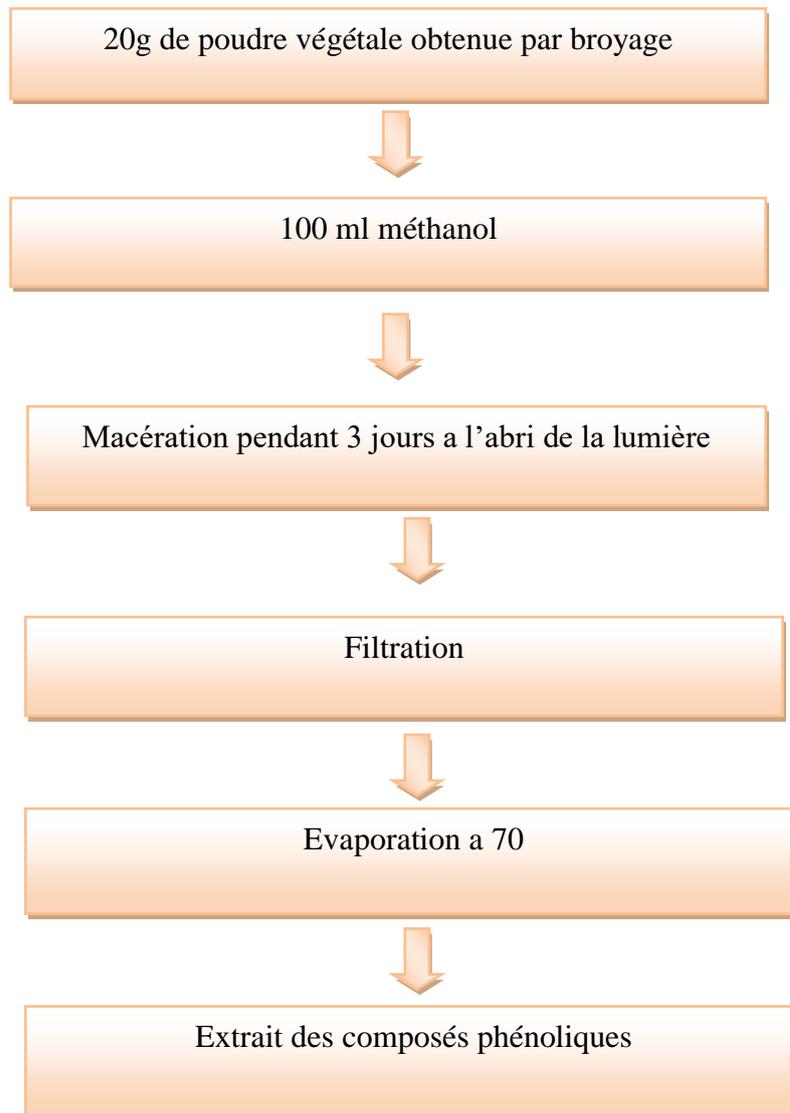


Figure . Représentation schématique de l'extraction des polyphénols.

II.2.2.2.3 Extrait aqueux des grains de *Citrus maxima* et *Citrus sinensis*

Selon la méthode de **Bougandoura et Bendimerad (2012)** modifiée, 50g de la poudre végétale a été soumise à une extraction par macération avec 500ml d'eau distillée, pendant 24H et à température ambiante (environ 20°C). L'ensemble est filtré sur du papier filtre afin de séparer le marc du filtrat. L'extrait aqueux a été récupéré et conservé au frais.

II.2.3 Dosage phytochimique

II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé sur l'extrait éthanolique des feuilles de *Citrus maxima* et de *Citrus sinensis*.

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de *Folin-Ciocalteu* (Singleton, 1999). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de *Folin-Ciocalteu* en un complexe ayant une couleur bleu constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot, 2006).

➤ Protocole

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par la méthode de Meyers *et al.* (2003). 100 microlitres d'extrait sont mélangés avec 750 microlitres de carbonate de sodium (7,5%) et 750 microlitres 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 (Annexe 03).

La concentration moyenne de l'extrait en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme (mg EAG/g).

II.2.4 Extraction des huiles essentielles

II.2.4.1 Procédé d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles de *Citrus maxima* et de *Citrus sinensis* sont extraites par la méthode d'hydrodistillation. Le dispositif d'extraction de type Clevenger est illustré dans (photo 19).

Les échantillons sont introduits dans un ballon de 1 litre imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 1 heure 30 à 3 heures jusqu'à épuisement de la matière végétale.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Les vapeurs chargées de substances volatiles sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité en deux phases:

- **Phase organique:** huileuse et très odorante appelée " huile essentielle" contenant la majorité des composés odorants.
- **Phase aqueuse:** odorante appelée " eaux aromatiques" contenant que très peu des composés odorants.

Les H.E extraites sont conservées à une température voisine de (-6,-1°C), dans des tubes fermés hermétiquement pour les préserver de la lumière et des variations de température principaux agents de dégradation (**Azmir, 2013**).

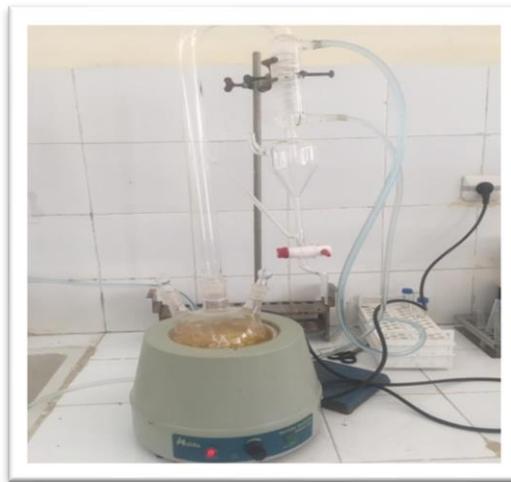


Photo 19. Dispositif de Clevenger d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation (photo original 2023)

Mode opératoire :

Après avoir épluché l'épicarpe de l'oranger ou pamplemoussier, les écorces sont coupées en petits morceaux :

- a) Pour l'orange 157g de l'épicarpe ont été pesés et mis dans un ballon à fond rond additionné de 500 ml d'eau distillée stérile puis installé dans le dispositif d'extraction (photo20).

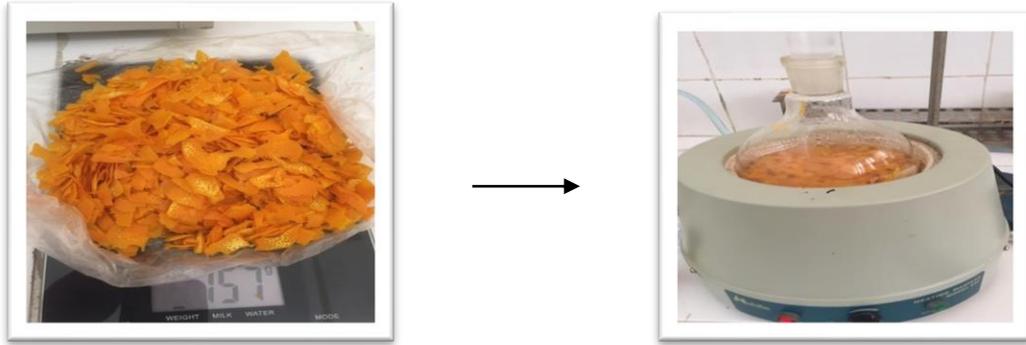


Photo 20. Extraction des huiles essentielles à partir des écorces d'orange.

b) 166g pour le pamplemousse préparé en deux fois (**photo21**) :

- **Premier cycle d'extraction** : 61g de l'épicarpe ont été pesés et mis dans un ballon à fond rond additionné de 150 ml d'eau distillée stérile
- **Deuxième cycle d'extraction** : 105 g de l'épicarpe ont été pesés et mis dans un ballon à fond rond additionné 500 ml d'eau distillée.

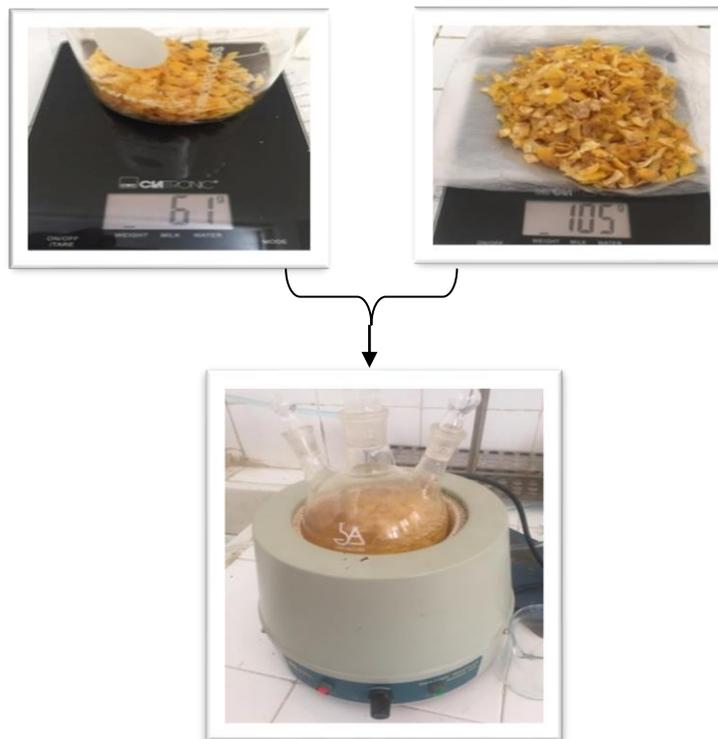


Photo 21. Extraction des huiles essentielles à partir des écorces de pamplemoussier (original).

Toutes les huiles essentielles produites ont été collectées et stocké à -4°C .

➤ **Calcul de rendement des huiles essentielles :**

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Rdt (\%)} = (\text{V rec}/\text{Mg}) * 100$$

Avec :

- **Rdt** : rendement d'extraction
- **Vrec** : Volume de l'huile recueilli
- **Mg** : masse de la plante.

II.2.4.2 Caractéristiques organoleptiques

L'évaluation correcte des propriétés organoleptiques des huiles essentielles revêt une très grande importance commerciale dans l'industrie pharmaceutique.

Les critères organoleptiques, les plus importants concernant beaucoup plus la texture, l'odeur, la couleur et liposolubilité, qui participent à la détermination de la qualité de nos huiles essentielles, et sont souvent liées à la maturité de notre végétal, aussi à la présence d'impureté à cause d'une mauvaise extraction ou d'un mauvais séchage (présence de microorganismes, de champignons, ...) (**Chiej, 1982**).

II.2.5 Activités biologiques

II.3.5.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne in vitro des extrait des composés phénoliques de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*, 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**

La technique utilisée pour ce test est celle décrite par **Marie et al.,(2003)**. Il s'agit de la diffusion sur gélose (méthode des disques) dont le principe est la détermination de la sensibilité ou la résistance des souches microbiennes et fongiques testées vis-à-vis des différents extraits.

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Cette méthode s'effectue par un dépôt des disques stériles de 6 nm de diamètre, imbibés de l'extrait à tester, sur une gélose préalablement coulée dans une boîte de pétri etensemencée par 10 UFC/ml des microorganismes à tester.

Après incubation, l'évaluation du pouvoir antimicrobien et antifongique de l'extrait se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo clair autour du disque absorbant.

a- Revivification et repiquage des souches

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 incube à 37 C pendant 24h pour les bactéries et à 28 C pendant 48h pour les levures et champignons (**Bolouet *al.*2011**).

b- Préparation de l'inoculum

A partir des cultures de bactéries et de champignon revivifiées, des suspensions microbiennes sont préparées dans des tubes stériles contenant de l'eau physiologique à 0.9%.

Les tubes sont agités pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex et on réalise une lecture de densité de chacune des suspensions préparées, à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm (**Bolou *et al.*,2011**), l'absorbance doit être comprise entre 0,20 et 0,30 pour les bactéries (concentration minimale qui assure la croissance microbienne).

Concernant les souches fongiques une série de dilution a été préparé (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) la suspension 10^{-3} a été utiliser.

c- Ensemencement

Les milieux de culture M-H et PDA liquéfiés et en surfusion à 45°C, ont été coulés dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Après refroidissement, chaque boîte estensemencée par étalement de la suspension bactérienne à tester.

d- Dépôt des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pièce stérile, des disques de 6 mm de diamètre précédemment stérilisés sont imbibés avec 10 μ l d'extrait à tester et déposés au centre de la surface gélosée (**Rozman et Jersek, 2009**).

Pour chaque souche, une culture témoin est réalisée en imbibant les disques avec le solvant d'extraction après la diffusion, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les champignons.

e- Lecture et expression des résultats

À la sortie de l'étuve, 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**).

f- Estimation de l'activité antimicrobienne

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

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

Echelle de sensibilité des souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Très fortement 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 discussion

III.1 Résultat de l'isolement

Le travail présenté dans notre étude porte sur l'identification des différents isolats bactériens dans la rhizosphère d'oranger, 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 l'oranger.

III.1.1.1 Etude macroscopique

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

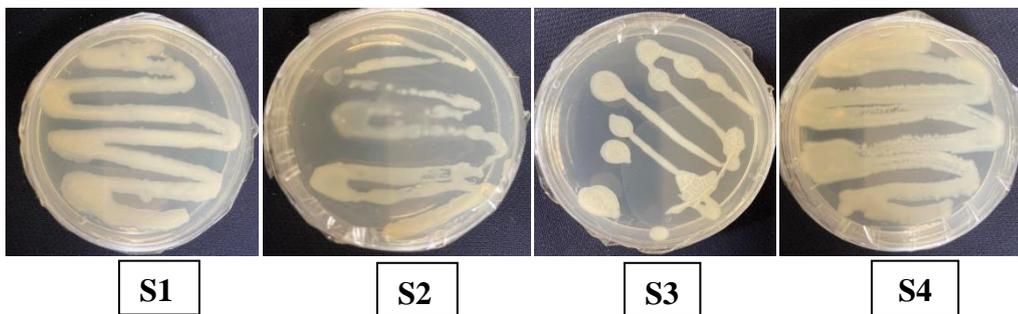


Photo 22. Aspect des colonies purifiées sur GN (Original,2023).

Les caractéristiques macroscopiques des souches sélectionnés sont résumés dans le tableau qui suit

Tableau 16. Les caractéristiques macroscopiques des souches sélectionnés.

Milieux	Isolat sélectionnés	Forme	Couleur	Elevation	Aspect de surface	Opacité	la consistance des colonies
GN	S1	CBR	Beige	Plate	Lisse	Opaque	Crémeuse
	S2	CBI	Crème	Convex	Lisse	Tranclucide	Crémeuse
	S3	CBI	Blanche	Plate	Rugeuses	Opaque	Sèche
	S4	CBR	Beige	Plate	Lisse	Tranclucide	Crémeuse

CBI : Circulaire a bord irrégulier , **CBR** : Circulaire a bor régulier.

La culture bactériennes sur GN nous a permis d'obtenir des colonies bien isolées. Ces dernières sont lisse (S_1, S_2, S_4) ou rugueux (S_3) et dont la forme est variable circulaire a bord irrégulier (S_2, S_3) ou régulier (S_1, S_4) aussi elles présente une élévation plate (S_1, S_3, S_4) ou convexe (S_2), leurs opacités est différente. Ces souches bactérienne sont caractérisé par une variabilité de couleur blanche (S_3) crème (S_2), beige (S_1, S_4) avec une consistance des colonies sèches (S_3) ou crémeuse (S_1, S_2, S_4).

III.1.1.2 Etude microscopique

La détermination du type de Gram est un critère d'identification très importants qui a été réalisé sur les quatres souches bactérienne isolés.

➤ La coloration de Gram

L'observation au microscope photonique des cellules après coloration de Gram nous révèle que les souches isolées ont une forme de bacilles ou bâtonnet long ou coque, elles apparaissent avec une couleur violetée donc nous supposant quelles sont à Gram positif (**photo 23**).

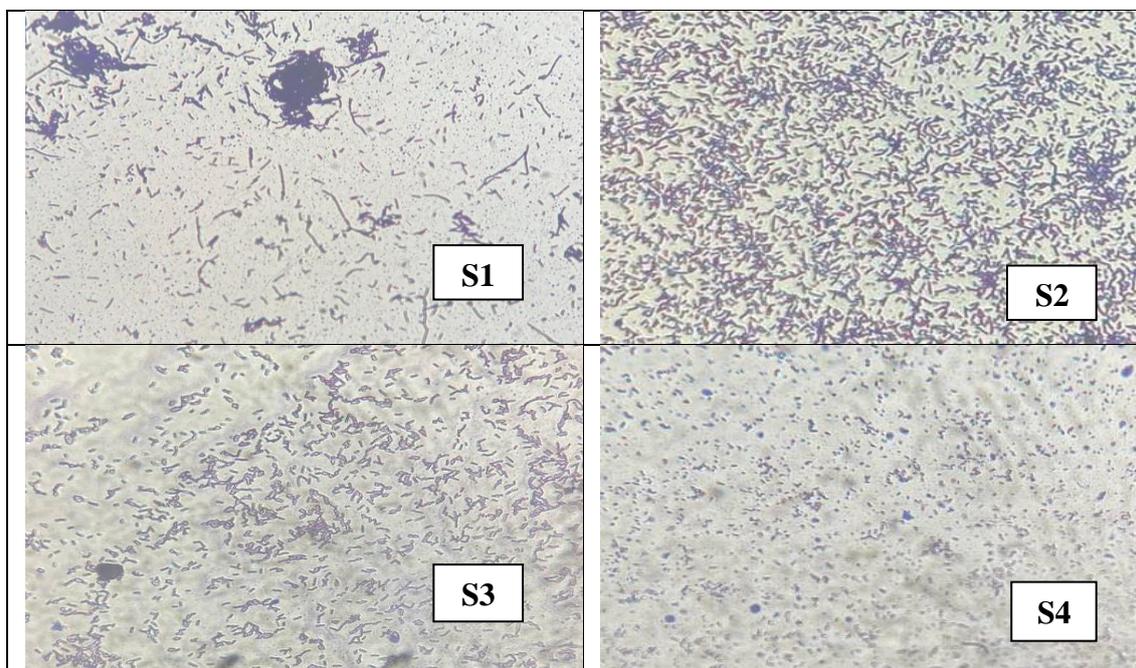


Photo 23. Aspect microscopique des bactéries à Gram positif vue sous microscope photonique G* 40 (Original, 2023) (**S1:** Gram⁺, **S2:** Gram⁺, **S3:** Gram⁺, **S4:** Gram⁺).

Les résultats de l'observation microscopiques sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 17. Caractéristiques microscopiques des souches isolées

Isolat	Coloration de Gram		
	forme	Gram	Mode d'arrangement
S ₁	Batonnet	Gram+	Isolé en chainettes
S ₂	Bacille	Gram+	Isolé en chainettes
S ₃	Bacille	Gram+	Isolé en chainettes
S ₄	Coque	Gram+	Isolé

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de diversité entre les souches selon le type de gram (G+ ou G-), toutes les souches obtenues sont à Gram +.

Les isolats S₁, S₂, S₃ et S₄ sont des bactéries à Gram +, de forme de bacilles, bâtonnet ou coque possèdent des caractéristiques comparables au genre *Bacillus*, elles sont assemblées selon un mode d'arrangement en chainettes et isolé.

III.1.1.3 Etude biochimique

➤ Test catalase

L'ensemble des souches isolées ont une réaction positive pour ce test, cette réponse se traduit par un dégagement gazeux sous forme de bulles d'air c'est la décomposition de peroxyde d'hydrogène avec libération d'oxygène (Guiraud, 1998) (photo 24).



Photo 24. Résultat de teste de catalase (Original, 2023).

➤ Test mannitol

Les résultats obtenus nous montrent que l'ensemble des souches sont capables de fermenter le mannitol par le virage de l'indicateur coloré du rouge vers le jaune orangé et d'autres ne le fermentent pas et la couleur reste rouge (photo 25).

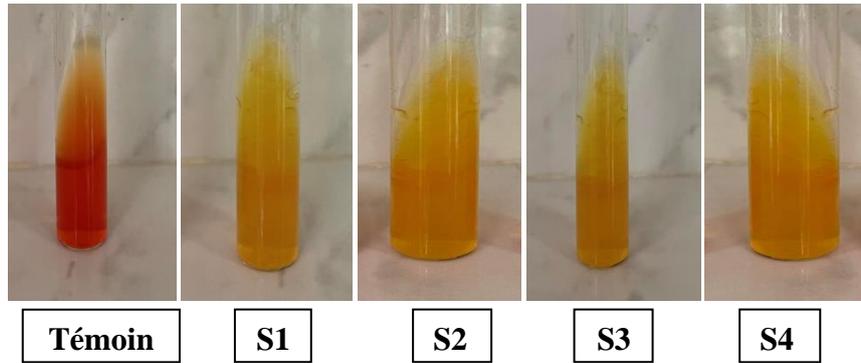


Photo 25. Résultat du test mannitol (original.2023).

➤ **Test respiratoire**

L'ensemble des souches testées pour leur type respiratoire sur milieu VF sont des aéro-anaérobies facultatives, cela se traduit par leurs croissances tout le long de la piqure centrale (**photo 26**).

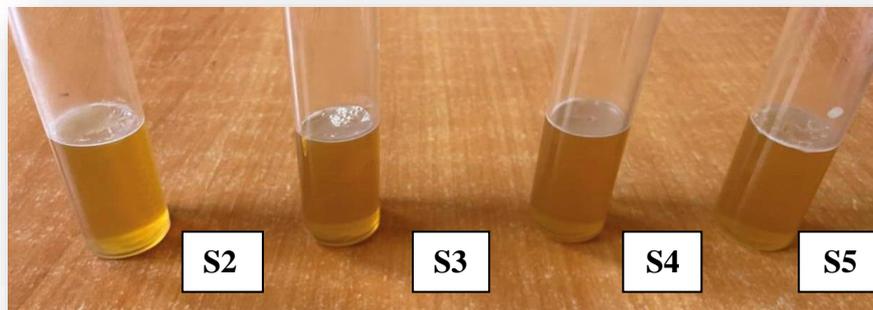


Photo 26. Résultat du test respiratoire (Original,2023).

Les tests biochimiques effectués pour l'identification des isolats S₁,S₂,S₃,S₄ et leurs résultat sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 18. Résultats des tests biochimiques

Tests	Catalase	Mannitol	Type respiratoire
S 1	+	+	AAF
S 2	+	+	AAF
S 3	+	+	AAF
S 4	+	+	AAF

AAF : aéro-anaérobies facultatif, **AS** : aérobie strict.

Après isolement de rhizobactéries qui a été effectué à partir d'un sol rhizosphérique de la culture d'oranger (région de boumerdes) sur milieu GN et après caractérisation phénotypique de ses souches, nous avons constaté que ces dernières appartiennent probablement au genre *Bacillus*.

Ce résultat est en accord avec les conclusions de **Bouizgarne (2013)**, qui décrit le groupe de PGPR le plus représentatif et le plus important dans le sol appartenant 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 blanche à beige, leur surface est lisse ou rugueuse. Ces 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 sa forme punctiforme et ronde avec un diamètre compris entre 1 et 3mm et une couleur beige ou crème. Quant à **Arahal et al, (2002)**, ils ont noté un aspect lisse, opaque avec élévation plat ou convexe.

L'étude microscopique des souches isolées montrent qu'elles sont des bacilles à Gram positif, assemblés en différents type d'arrangement soit isolées ou en chaînette.

Selon les travaux de **Guiraud (2003)**, ces résultats caractérisent le groupe de bactérie qui 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 (**Botelho et Leda, 2006**).

L'ensemble des isolats ont donné une réponse positive au test catalase par un dégagement gazeux sous formes de 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 48h à 28C° a permis d'observer chez les *Bacillus S₁,S₂,S₃* et *S₄* un changement de couleur rouge qui vire vers le jaune ce qui signifie la dégradation du D-mannose en fructose par ces bactéries.

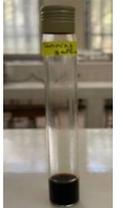
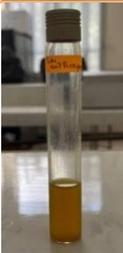
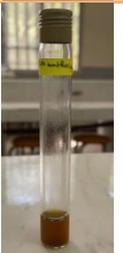
L'étude du type respiratoire sur le milieu VF confirme que les souches *Bacillus* sont des aéro-anaérobies facultatives , ce résultat est en accord avec ceux de (**Logan et De Vos, 2009**).

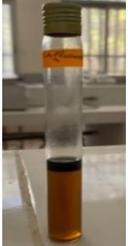
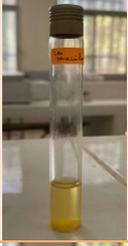
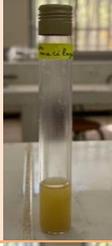
III.2 Résultat de l'étude phytochimique

III.2.1 Résultat du screening phytochimique

L'étude du screening phytochimique réalisé sur les feuilles et l'écorces des *C. sinensis* et *C. maxima* 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, selon leur intensité.

Tableau 19. Résultat du screening chimique des écorces et des feuilles de *Citrus sinensis*

Molécule recherché	Ecorces	Résultat obtenus	Feuilles	Résultat obtenus	Résultat positif
Tannin totaux	+++		+++		Apparition d'une Coloration bleu noire
Tannin galliques	+++		+++		Coloration bleu foncé
Tannins catéchiques	+		+		Coloration rouge
Anthocyanes	+		+		Coloration rouge
Saponosides	+++		+++		Formation de précipité Blanc

Alcaloïdes	+		+		Précipité rouge
Amidon	-		-		Coloration bleu violette
Flavonoïdes	++		+++		Coloration rouge
Mucilages	+		+++		Précipité floconneux
Glucosides	+++		+++		Coloration rouge brique+violette

- (-) : absence.
- (+) : présence en faible quantité.
- (++) : Présence en quantité moyenne.
- (+++) : Présence en quantité importante.
- (++++) : Présence en très forte quantité.

Tableau 20. Résultat du screening chimique des écorces et des feuilles de *Citrus maxima*

Molécule recherché	Ecorces	Résultat obtenus	Feuilles	Résultat obtenus	Résultat positif
Tanins totaux	+++		+++		Apparition d'une Coloration bleu noire
Tannins galliques	+++		+++		Coloration bleu foncé
Tannins catéchiques	+		+		Coloration rouge
Anthocyanes	-		+		Coloration rouge
Sponosides	+++		+++		Formation de précipité Blanc
Alcaloïdes	++		++		Précipité rouge
Amidon	-		-		Coloration bleu violette

Flavonoïdes	+		+++		Coloration rouge
Mucilages	+++		++		Précipité floconneux
Glucosides	+++		+++		Coloration rouge brique+violette

- (-) : absence.
- (+) : présence en faible quantité.
- (++) : Présence en quantité moyenne.
- (+++) : Présence en quantité importante.
- (++++) : Présence en très forte quantité.

Le nombre de « + » est en fonction de l'intensité de la coloration et/ou des précipités.

On constate que l'écorce et les feuilles de *Citrus sinensis* sont très riches en tanins totaux et tannin gallique ont ce qui concerne les tanins catéchiques ils existent en faible quantité. Nous remarquons la présence des saponosides, flavonoïdes et glucosides en quantités abondantes tandis que les anthocyanes et les alcaloïdes existent en faible quantité, le mucilage dans l'écorce est faible par rapport aux feuilles, avec l'absence d'amidon.

On note que l'écorce et les feuilles de *Citrus maxima* sont très riches en tanins totaux et tannin gallique, les saponosides ainsi que les glucosides, ils contiennent moyennement les alcaloïdes, et faiblement les tanins catéchiques, nous avons noté la présence de mucilage en quantité importante dans l'écorce de *C. maxima* par rapport à celui des feuilles alors que les flavonoïdes sont présents en quantité élevée dans les feuilles par rapport aux écorces, les anthocyanes sont absentes dans l'écorce et faiblement présents dans les feuilles avec absence d'amidon.

La comparaison entre les deux espèces montre que leurs écorces sont riches en tannin totaux, tannin gallique, saponosides et glucosides avec absence d'amidon, tandis que les tannins catéchique sont présents en petite quantité. Nous remarquons une différence entre certaines molécules telles que la présence des mucilages et les alcaloïdes dans l'écorce de *C. maxima* plus élevé par rapport au *C. sinensis*, par contre les flavonoïdes sont présent en quantité abondante chez *C. sinensis* et moindre chez *C. maxima*. Les anthocyanes faiblement présents chez *C. sinensis* et absent dans l'écorce de *C. maxima*.

La comparaison entre les feuilles des deux espèces révèle que toutes les molécules sont présentes en même quantité sauf pour les alcaloïdes qui sont retrouvé chez *C. maxima* en quantité plus élevée par rapport au *C. sinensis* contrairement aux mucilages qui sont riche dans les feuilles de *C. maxima* que *C. sinensis*.

Selon **Musa et al, (2019)** trois extrais différentes d'écorce de *C. sinensis* ont été testé, leur résultat du screening phytochimique montre une faible quantité de flavonoïde et alcaloïdes, avec une absence de saponoside et stéroïde et une quantité modéré en tannin et glucosides.

Les études de **Lagha-benamrouche et al, (2017)** sur différent variété d'orange révèlent la présence des composés phénoliques (tanins, flavonoïdes et coumarines), et des mucilages dans toutes les écorces des variétés étudiées, avec des proportions variables. Pour les autres constituants: saponosides et alcaloïdes, l'étude ne détecte pas leur existence. Les tanins sont présents dans toutes les variétés étudiées, sous formes de tanins totaux, catéchiques. Les flavonoïdes sont fortement abondants dans toutes les variétés étudiées.

Takita et al,(2007) et Cheong et al,(2016) , montrent une richesse des écorces d'oranges et de pamplemousses en terpènes. Les caroténoïdes sont déterminés fortement dans toutes les variétés d'oranges.

Les résultats de **Bouyahiaoui.(2015)**, sur l'écores et feuilles de *C. maxima* sont convergent avec nos résultats, il mentionne que l'écorce était très riche en tannins totaux, tannins galliques ainsi que les glucosides. Ils contenaient moyennement les mucilages et faiblement les saponosides et les alcaloïdes. D'autre part les résultats obtenus par les feuilles ont révélé que l'extrait était très riche en tannins galliques, saponosides, flavonoïdes, mucilages ainsi que les glucosides. Ils contenaient

moyennement les tannins catechiques et faiblement les tannins totaux et les anthocyanes.

III.2.2 Extraction de substances bioactives

III.2.2.1 Extraction des tannins

Les extraits ont été préparés par macération , en utilisant des différents solvants. Le rendement en tannin est représenté dans le tableau 21 qui suit ;

Tableau 21. Rendement en tannins des écorces de *C.sinensis* et *C.maxima*

Espèce	Masse initiale(g)	Masse final (g)	Rendements (%)	Photo
<i>C.sinensis</i>	40.9	40.87	0.1%	
<i>C.maxima</i>	41.5	41.44	0.2%	

D'après les résultats obtenus, les extraits des écorces des deux espèces testées, contiennent des tanins, une différence des rendements d'extraction a été observée avec des valeurs de 0.2% pour *C.maxima* et 0.1% pour *C.sinensis*.

III.2.2.2 Extraction des polyphénols totaux

➤ Rendement de l'extraction par macération

Les extraits ont été préparés par macération de trois jours, en utilisant un solvant polaire qui est l'éthanol. Les caractéristiques des extraits ainsi que les valeurs des rendements en polyphénols totaux sont mentionné dans les tableaux 22 et 23 qui suivent :

Tableau 22. Couleur et aspect des extraits phénolique des feuilles de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*.

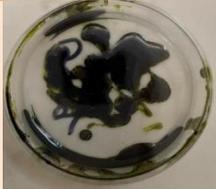
Echantillon	Couleur	Aspect	Extraction	Photo
<i>C.sinensis</i>	Vert foncée	Visqueux	Solvant (Ethanol)	
<i>C.maxima</i>	Vert foncée	Visqueux	Solvant (Ethanol)	

Tableau 23. Rendement en polyphénol totaux des feuilles de *C.sinensis* et *C.maxima*

Echantillon	Masse initiale(g)	Masse final (g)	Rendements (%)
<i>C. sinensis</i>	158.20 g	157.44 g	7.6
<i>C. maxima</i>	158.99 g	158.38 g	6.1

D'après les résultats obtenus, les extraits des feuilles des deux espèces, contiennent des polyphénols totaux, une différenciation des rendements d'extraction a été observée à une valeur de 7.6% pour *C.sinensis* suivie d'une valeur de 6.1% pour *C.maxima*.

Selon les travaux d'**Aribi et Fennouch (2016)**, le rendement obtenu sur *C.sinensis* 2.88% est inférieur à notre résultat. Par contre l'étude de **Tighilet, (2014)** sur d'autres variétés de *Citrus* utilisant le méthanol comme solvant d'extraction les rendements obtenus sont proches de ceux de notre expérimentation.

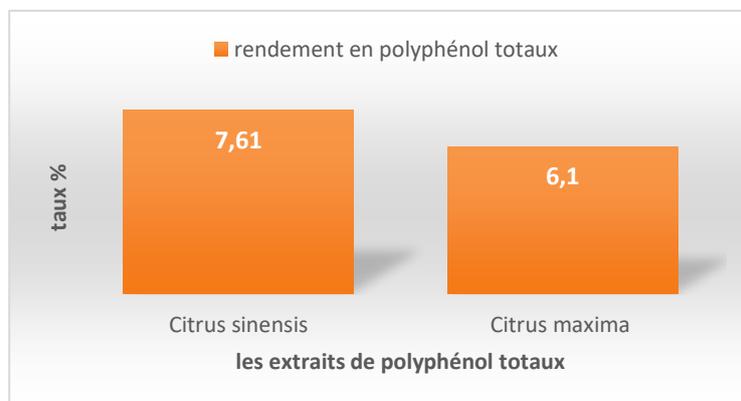


Figure 06. Taux d'extraction des polyphénols totaux des feuilles des deux échantillons

Bien qu'il est difficile de mettre en places des comparaisons avec les données bibliographiques à cause de la multiplicité des paramètres qui influencent les taux d'extractions pour une même espèce végétale, la différence de rendement d'extraction peut être due à plusieurs paramètres. C'est le cas de la température, la méthode d'extraction utilisée, la granulométrie de la poudre, l'origine et le type du matériel végétales utilisées, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leurs degrés de pureté (Naczka et Shahidi, 2004 ; Hayat *et al*, 2009).

III.2.2.3 Extrait aqueux

L'extrait aqueux a été réalisé sur la poudre des grains de *C.sinensis* et *C.maxima*. Les résultats obtenus sont classés dans le tableau 24 suivant :

Tableau 24. Aspect et couleurs de l'extrait aqueux des grains de *C.sinensis* et *C.maxima*

Espèce	Poudre de grain	Couleur	Photos
<i>Citrus sinensis</i>	5 g de poudre	Blanc	
<i>Citrus maxima</i>	3g de poudre	Blanc	

III.2.2.4 Dosages des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec la méthode spectrophotométrique qui est une technique colorimétrique. Après 2h d'incubation la couleur bleue confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif de Folin-ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le 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 ($y=0,01x + 0,002$) (annexe3). Les résultats obtenus sont exprimés en mg d'acide gallique équivalents par gramme d'échantillon (mg GAE/g).

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits phénoliques montre des résultats différents qui sont de 21.36 ± 0.04 mg EAG/gMS et $34.6\text{mg} \pm 0.05$

EAG/gMS, correspondants respectivement aux extraits de feuille de *C.sinensic* et *C. maxima*. Les concentrations des polyphénols totaux obtenues sont présentées dans la figure 07.

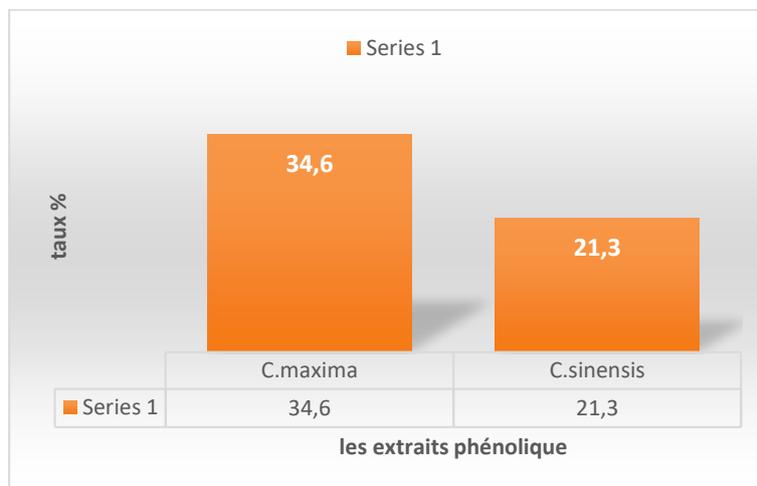


Figure 07. Teneur en polyphénols des deux extraits *C.maxima* et *C.sinensis*

D'après les résultats, la teneur en polyphénols totaux est significativement supérieure dans les extraits de *C.maxima* que dans ceux de *C.sinensis*, ces résultats sont en accord avec ceux démontré par d'autres travaux antérieurs sur la teneur totale de polyphénols des *Citrus* (**Gorinstein et al. 2001**). Toutefois, d'autres études ont montré que les teneurs en polyphénols totaux des extraits d'écorce de citron et d'orange sont variables et différent de nos résultats (**Ghasemi et al. 2009 ; Alexander, 2009**). Ceci peut être dû à la nature du solvant utilisé, la méthode d'extraction et la température d'extraction.

Selon (**Amarti et al. 2010**) la composition chimique des composés phénolique, 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. 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.2.2.4 Extraction des huiles essentielles

III.2.2.4.1 Rendement d'extraction

Les huiles essentielles d'écorces des espèces d'agrumes étudiées *C.sinensis*, *C,maxima*, sont obtenues par hydrodistillation, cette méthode est la plus utilisée, environ 80% des cas, car elle est la plus économique (**Kaloustian, et Hadji 2012**). Le tableau 25 résume les rendements moyens en huiles essentielles extraites.

Tableau 25. Résultats d'extraction de l'huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*

Echantillons	Durée de distillation (h)	Matière fraîche (g)	H ₂ O distillé utilisée (ml)	Quantité d'HE obtenus (ml)	Le rendement %	Photo	
Ecorce	2 h et plus	<i>C.maxima</i>	167	400	0.2	0.299	
		<i>C.sinensis</i>	157	400	0.7	0.636	

*Conditions de conservation : au sec, à l'abri de la chaleur et de la lumière.

Le résultat en HES d'écorce des deux espèces testées présente une différenciation de rendements d'extraction à une valeur de **0.636%** pour *C. sinensis* suivie d'une valeur de **0.299%** pour *C. maxima*.

Le rendement des écorces de *C. sinensis* est proche à celui trouvé par **Djenane (2015)**, qui a rapporté une valeur de 0.58% supérieur à celui de **Kamal et al. (2013)** avec 0.24%. **Hosni et al. (2010)** ont mentionné un rendement qui varié de 1.49% à 4.62% pour les écorces de différentes variétés (cultivars) de *C.sinensis*. Le rendement en HE de *C.maxima* est supérieur a celui obtenue par **Bouyahuaoui, (2015)**.

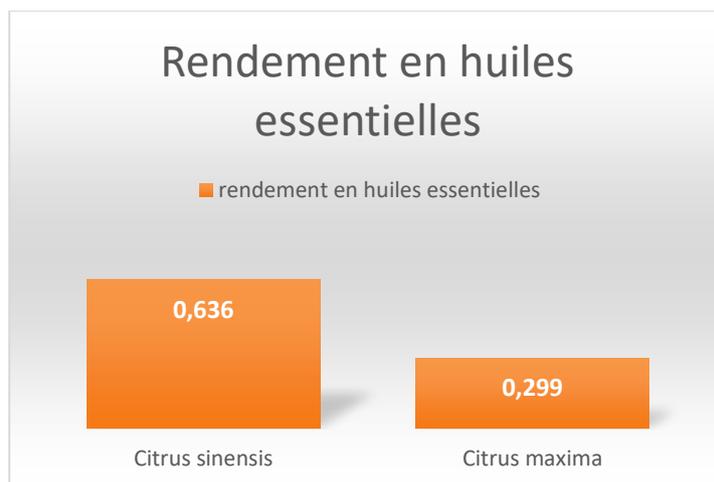


Figure 08. Pourcentage en huiles essentielles obtenue pour *C.maxima* et *C.sinensis*

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

III.2.2.4.2 Caractère organoleptique des huiles essentielles

L'évaluation correcte des propriétés organoleptiques des huiles essentielles revêt une très grande importance commerciale dans l'industrie pharmaceutique, les critères organoleptiques, les plus important concernant beaucoup plus l'odeur, la couleur et la saveur, qui participe à la détermination de la qualité de nos H.Es, et sont souvent liées à la maturité de notre végétale, aussi à la présence d'impureté à cause d'une mauvaise extraction ou d'un mauvais séchage (Dermene, 1985 ; Gilly, 1997 ; Lis-Blachin, 2002).

Après avoir recueillir les différentes fractions des huiles essentielles, celles-ci nous ont permis de repérer les éléments d'identification organoleptique comme couleur, la saveur, l'aspect, l'odeur et la solubilité qui sont regroupés dans le tableau 26 qui suit ;

Tableau 26. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles des écorces de *Citrus maxima* et *Citrus sinensis*.

Caractère	Couleur	Aspect	Odeur	Saveur	Solubilité
<i>Citrus sinensis</i>	Transparente	Liquide visqueux	Aromatique thypique des <i>Citrus</i>	Aromatique Amer	Liposoluble
<i>Citrus maxima</i>	Jaune pale	Liquide visqueux	Aromatique thypique des <i>Citrus</i>	Aromatique Amer	Liposoluble

Les huiles essentielles de *C.maxima* et *C.sinensis* montrent ont des caractères organoleptiques spécifiques et liés directement à l'espèce telle que l'odeur et la saveur. La couleur de l'HE de *C.sinensis* est transparente avec un aspect liquide visqueux et celle de *C.maxima* avec une couleur jaune pale et un aspect liquides visqueux.

IV.3 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits (HE, tannin, extrait aqueux et polyphenols totaux) a été évaluée vis-à-vis de quatre bactéries : *Escherichia coli*, *Streptocoque sp.* et les souches S₂et S₄ isolée. Et de deux champignons *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* Cette activité a été réalisée par la méthode d'aromatogramme sur un milieu gélosé solide Muller-Hinton et PDA respectivement aux bactérie et champignons. L'activité est estimée en termes de diamètre de zone d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant les échantillons à tester.

L'effet des témoins (eau distillé et éthanol) sur l'ensemble des souches testées est résumédans le tableau (Tab 26) qui suit

Tableau 27. Resultats des zones d'inhibition des témoins (eau distillé et éthanol)

Germes \ Extrait		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
		TE	ED
Souche bactérienne	E.coli	6.5	-
	Streptocoque sp.	-	-
	Souche S2	6.5	-
	Souche S4	6.5	-
Souche fongiques	Aspergillus sp.	7	-
	Penicillium sp.	-	-

L'eau distillée qui est un témoin neutre ne manifeste aucun effet par contre pour l'éthanol une faible sensibilité est obtenu avec E.coli , souche s2 , souche s4 et aspergillus sp. a des diamètre (6.5 et 7 mm) respectivement .

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 27 et 28 qui suivent

Tableau 28. Diamètres de zones d'inhibition en millimètre des extraits de *Citrus sinensis* vis-à-vis des souches bactérienne et fongiques.

Germes \ Extrait		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
		PT	T	E.A	H.E
Souches Bactérienne	<i>E.coli</i>	30	24	-	14
	<i>Streptocoque</i>	14	14	-	14
	Souche 2	12	34	-	10
	Souche 4	14	30	-	20
Souches Fongiques	<i>Aspergillus sp.</i>	36	16	23	12
	<i>Penicillium sp.</i>	30	-	-	-

PT: extrait des polyphénol totaux, **T:** extrait tanniques , **E.A :** extrait aqueux , **H.E :** les huilles essentielles.

Extrait phénolique

L'évaluation antimicrobienne a permis de noter que l'extrait phénoliques des feuilles de *C. sinensis*, a une activité très fortement inhibitrice sur *E.coli* avec une zone d'inhibition de 30mm, alors que pour les *Streptocoques sp.* et les souches 02 et 04 une activité modérément inhibitrice a été observé avec des valeurs de 14mm, 12mm et 14mm respectivement.

Ont ce qui concerne les souches fongique nous relevons une très forte sensibilité d'*Aspergillus sp.* et de *Penicilium sp.* avec des valeurs de 36mm, 30 mm respectivement.

Extrait tannique

L'extrait tannique d'écorce de *C.sinensis* à manifesté une très forte activité avec des valeurs d'inhibition entre 24mm et 34mm respectivement sur *E.coli* et la souche 2, suivi par une activité modérément inhibitrice a une valeur obtenue 14 mm vis-à-vis des streptocoques et 12 mm pour la souche 4.

Tandis que pour les souches fongiques nous obtenons pour cet extrait des diamètres très fortement inhibitrice compris entre 36 et 30 pour successivement *Aspergillus sp.* et *Pinicilium sp.*

Extrait aqueux

L'extrait aqueux des grains de *C. sinensis* ne manifestent aucune activité contre *E.coli*, *Streptocoque sp.* souche S₂ et souche S₄. Concernant les souches fongiques une forte sensibilité soit de 26mm est obtenue avec *Aspergillus sp.* contrairement au *Pinicilium sp.* qui n'affiche aucune sensibilité.

Huile Essentielle

L'huile essentielle de *C. sinensis* à exercer une importante activité vis-à-vis la souche S₄ avec un diamètre d'inhibition de 20 mm suivi par *E.coli* et *Streptocoque sp.* qui ont montré une activité modérément inhibitrices de 14mm, la souche S₂ affiche une légère sensibilité vers l'extrait des huiles avec un diamètre de 10 mm.

La souche fongique *aspergillus sp.* présente une sensibilité modérément inhibitrice soit de 12mm contrairement au *penicillium sp.* présent une résistant au HEs de *C.sinensis* .

Tableau 29. Diamètres de zones d'inhibition en millimètre des extraits de *Citrus maxima* vis-à-vis des souches microbiennes et fongiques

Germe \ Extrait		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
		PT	T	E.A	H.E
Souches Bactérienne	<i>E.coli</i>	20	32	-	32
	<i>Streptocoque</i>	10	14	-	22
	Souche 2	30	30	-	20
	Souche 4	22	22	-	30
Souches Fongiques	<i>Aspargillus sp</i>	10mm	14mm	20mm	10mm
	<i>Penicilium</i>	-	10mm	9mm	9mm

PT: extrait des polyphénol totaux, T: extrait tanniques, E.A : extrait aqueux, H.E : les huilles essentielles.

Extrait phénolique

L'évaluation antimicrobienne a permis de noter que l'extrait phénoliques des feuilles de *C. maxima*, ont une très activité fortement inhibitrice sur *E.coli*, souche S₂ et souche S₄ avec des valeurs de 20mm, 30mm, 22mm respectivement. Alors que pour *Streptocoque sp.* il représente une activité légèrement inhibitrice a 10mm. Ont ce qui concerne les souches fongique, une sensibilité moyenne contre *Aspargillus sp* et une résistance contre *Penicilium sp.* sont enregistrés.

Extrait tannique

L'extrait tannique d'écorce de *C.maxima* à manifesté une très forte activité sur *E.coli*, souche S₂ et souche S₄ avec des valeurs diamétrales de 32mm, 30mm, 22mm respectivement, suivi par une activité modérément inhibitrice a une valeur de 14 mm vis-à-vis de *Streptocoque sp.* Tandis que pour les souches fongiques nos résultats ont montré des diamètres modérément inhibiteurs compris entre 14 mm et 10 mm pour successivement *Aspargillus sp.*et *Penicilium sp.*

Extrait aqueux

L'extrait aqueux des grains de *C. maxima* ne manifeste aucune sensibilités contre la souches *E. coli*, *Streptocoque sp.*, souche S₂ et souche S₄. Concernant *Aspergillus sp* une forte activité de 20mm est obtenue contrairement au *Penicilium sp.* qui paraît faible sensibilité soit 9mm à l'extrait.

Huile essentielle

Il ressort que l'huiles essentielles de *C. maxima* a un pouvoir inhibiteur important sur la croissance diamétral de toutes les souches bactérienne testée, l'effet inhibiteur le plus fort est apparu chez *E.coli* et la souche S₄ avec des diamètres de 32 mm a 30 mm suivie par *Streptocoque sp.* et la souche S₂ avec des diamètres de 20 à 22 mm respectivement.

L'huile essentielle de *C.maxima* manifeste ue faible activité avec des diamètres de 10 mm, 9mm respectivement au *Aspargillus sp.* et *Penicilium sp.*

a. Comparaison de l'activité des deux espèces *Citrus sinensis* et *Citrus maxima*

D'après les résultats comparatives nous remarquant que l'extrait phénolique des feuilles de *C.sinensis* et *C.maxima* ont une activité inhibitrice qui s'est avérée la plus supérieure vers *E.coli* et la souche S₂ respectivement. Alors que l'extrait phénolique de *C.maxima* présente l'effet le moins inhibiteur sur *Streptocoque sp.*

Aspergillus sp. présent une zone d'inhibition la plus fort avec l'extrait éthanolique des feuilles de *C.sinensis*, contrairement au *Penicillium sp.* qui témoigne d'une résistance à l'extrait éthanolique de *C.maxima*.

On constate que l'extrait tannique des écorces de *C.sinensis* donne un résultat extrêmement sensible vers la souche S₂ contrairement au *C.maxima* qui donne de faible sensibilité avec *Streptocoque sp.*

Aspergillus sp. présent une zone d'inhibition importante avec l'extrait tannique d'écorce de *C.sinensis*, contrairement au *Penicillium sp.* qui affiche une résistance à l'extrait tannique de *C.sinensis*.

L'extrait aqueux ne manifeste aucune activité inhibitrice contre les souches bactériennes, contrairement aux souches fongiques qui ont donné des résultats positifs. L'extrait aqueux des grains de *C.maxima* a manifesté une forte activité vis-à-vis *Aspergillus sp.* et une résistance au *Penicillium sp.* contrairement à l'extrait aqueux des grains de *C.sinensis* qui a manifesté une forte sensibilité vis-à-vis *Aspergillus sp.* et aucune sensibilité affichée chez *Penicillium sp.*

Les huiles essentielles d'écorces des deux extraits ont donné des résultats positifs pour la plupart des souches microbiennes, *C.sinensis* et *C.maxima* ont exercé une importante activité vis-à-vis la souche S₄, *E.coli*.

Concernant les souches fongiques, *C.maxima* manifeste une faible activité au *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* et pour *C.sinensis* présente une sensibilité modérément inhibitrice vis-à-vis *Aspergillus sp.* et une résistance au *Penicillium sp.*

Des études réalisées par **Mathur et al., (2011)** sur l'écorce de trois variétés de citrus (*C.sinensis*, *C.Maxima* et *C.reticulata*) montre une activité importante des extraits éthanolique et aqueux sur *S.aureus*, ceci pourrait être due à une composition où à une teneur différente des plantes étudiées en composés phénoliques, ou le solvant utilisé.

Les résultats obtenus avec l'extrait aqueux des deux espèces affichent une sensibilité d'*Aspergillus sp.* vis-à-vis de l'extrait aqueux de *C. sinensis*, alors que la souche la plus résistante est *Penicillium sp.* avec l'extrait aqueux de *C.maxima*. Les travaux **Egbonu et Osuji (2016)**, sur les extraits aqueux des pépins de *C. sinensis* n'ont aucun effet antibactérien contre *Escherichia coli*, ceci corrobore nos résultats.

En ce qui concerne les huiles essentielles des deux espèces, la plus grande zone d'inhibition est obtenue chez *E.coli* avec HE de *C.maxima* et un diamètre d'inhibition de 32mm. Par contre la faible activité est marquée chez la souche S₂ avec l'HE de *C.sinensis* et un diamètre d'inhibition de 10 mm.

Photo 27 .Quelque résultat positif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.sinensis* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques

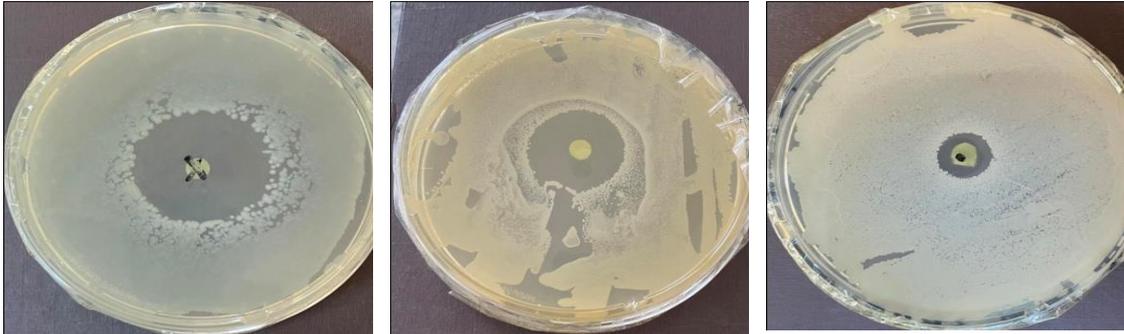


Photo 28.Quelque résultat négatif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.sinensis* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques

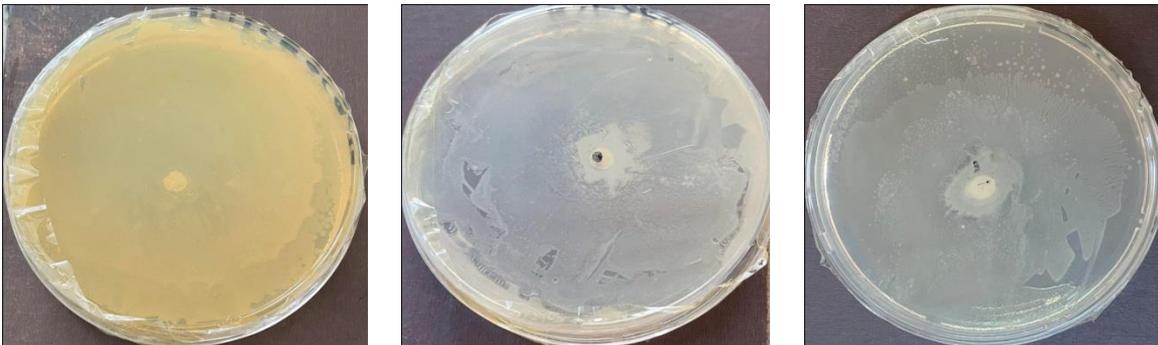


Photo 29. Quelque résultat positif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.maxima* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques



Photo 30.Quelque résultat négatif de l'activité antimicrobienne des extraits de *C.maxima* par la méthode d'aromatogramme par diffusion des disques



Conclusion et perspectives

Les *Citrus* sont une source fiable de principes actifs connus pour leurs actions thérapeutiques très intéressantes tel que les pouvoirs antimicrobiens, antioxydants, anti-inflammatoires...etc. à mettre à profit dans divers domaines : industrie pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique, etc. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la valorisation écorces, graines et feuilles des deux espèces agrumes *Citrus sinensis* et *Citrus maxima* afin d'évaluer le potentiel biologique à travers l'activité antimicrobienne des composés phénoliques et des huiles essentielles. Nous concluons notre travail en fonction de l'arrangement pratique.

Nous avons procédé au premier lieu à un isolement et identification des rhizobactéries à partir d'un sol d'agrumiculture d'oranger de la région de Corso (W. de Boumerde). Après isolement sur milieu GN et caractérisation macroscopique et microscopique complété par une série de tests biochimiques, les souches isolées sont probablement du genre *Bacilles* à Gram positif, à différents types d'arrangement soit isolé, en amas ou en chaînettes, avec des tailles variables, une forme circulaire régulière ou irrégulière et une couleur blanche à beige. Aussi leur surface est lisse ou rugueuse opaque ou translucide avec élévation convexe ou plate. L'ensemble des isolats ont donné des réponses positives au test catalase, avec un virage de couleur rouge vers le jaune sur milieu mannitol, l'étude de type respiratoire confirme que les souches sont des aéro-anaérobie facultatifs.

Le screening phytochimique révèle la richesse des deux extraits (feuilles et écorces) de *Citrus sinensis* et *Citrus maxima* en composés phénoliques (tanin total et tanin gallique), des composés terpéniques (saponosides), et des composés glucosides (glucosides) avec une variabilité dans les composés réductifs (mucilage). Les anthocyanes et le tannin catéchétique sont présents à de faibles quantités alors que les flavonoïdes ainsi que les alcaloïdes présentent à des quantités différentes. L'amidon est totalement absent chez les deux espèces.

L'extraction des tannins à partir de la matière végétale (écorce) par macération, en utilisant plusieurs solvants, nous permet l'obtention de rendements à des valeurs allant de **1.33%** pour *C. maxima* et de **0.66%** pour *C. sinensis*. Les rendements d'extraction des

polyphénols totaux des feuilles obtenu avec comme solvant d'extraction l'éthanol, varie de **7.6%** pour *Citrus sinensis* est de **6.1 %** pour *Citrus maxima*.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de spectrophotométrie est calculés à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($y=0,01x+0,002$). Les résultats montre que les feuilles de *Citrus maxima* contiennent des teneurs importantes de **34.6mgEAG/gMS** par rapport à ceux de *Citrus sinensis* avec **21.3 mg EAG/ Gms**.

Les huiles essentielles d'écorce fraîche des espèces d'agrumes étudiées, sont obtenues par hydrodistillation. Les rendements d'extraction vont de **0.636%** pour *C. sinensis* et de **0.299%** pour *C. maxima*. D'une façon générale, les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles sont variables selon beaucoup de facteurs (lieu de provenance, climat et ses diverses modifications, période de grandes pluies ou de sécheresses prolongées, époque et moyens de récolte, procédés d'extraction, etc.). Ceci explique la marge, souvent assez grande, laissée dans les constantes et pourcentage des composantes (**Valnet, 1984**).

Les résultats du pouvoir antimicrobien de nos quatre extraits : polyphénols totaux, extraits tannique, extraits aqueux et huile essentiel vis-à-vis de quatre souches bactériennes et 2 souches fongiques. Nous a permis de conclure que pour l'activité antibactérienne, l'extrait tannique de d'écorces de citrus sinensis a donner la plus importante zone d'inhibition contre la souche S4.

Et concernant l'évaluation antifongique l'extrait phénolique des feuilles de citrus sinensis est celui qui exerce un effet le plus élevé vis-à-vis d'*Aspergillus* sp.

En perspectives il serait intéressant de compléter cette étude par ;

- ✓ Réaliser un isolement plus approfondi de la rhizosphère d'agrumiculture. Et compléter l'identification génétique des isolas.
- ✓ Une étude comparative avec d'autres espèces du genre *Citrus*.
- ✓ Des études plus profondes sur d'autres activités biologiques (antivirale, anti-inflammatoire, antimicrobienne,.....).
- ✓ Faire plus d'analyses sur la composition chimique des HEs (HPLC, CGMS).
- ✓ Tester nos huiles sur une plus large gamme de souches résistantes.
- ✓ Elargir la recherche de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et polyphénols.

Référence bibliographique

- **Abobatta W F.(2019).** Nutritional Benefits of Citrus Fruits. Am J Biomed Sci & Res. 2019 - 3(4). AJBSR.MS.ID.000681. DOI: 10.34297/AJBSR.2019.03.000681
- **Agagna Y.(2016).** Rôle d'Aphytis melinus (Hymenoptera, Aphelinidae) dans la régulation des niveaux d'infestation du Pou de Californie Aonidiella aurantii (Homoptera, Diaspididae) sur citronnier à Rouiba (Doctoral dissertation, ENSA)
- **Alqu'ezar, M. Rodrigo, L. Zacarias.(2008),** "Carotenoid biosynthesis and their regulation in citrus fruits," Tree and Forestry Science and Biotechnology, vol. 2, no. 1, pp. 23–37, 2008
- **Anmol R J M, Pharm, Marium S, Pharm M, Tsong Hiew F , PhD, Chien Han W, BSc (Hons.), Lee Kuan Kwan, BSc (Hons.), Alicia Khai Yeen Wong, PhD, Khan F, M. Pharm, Md. Moklesur Rahman Sarker, PhD, Siok Yee Chan, PhD, Nurolaini Kifli, PhD, Chiau Ming L, PhD (2021),** Journal of Evidence-Based Integrative Medicine Volume 26, January-December 2021
- **Anonyme.(2003),** cultiver les agrumes, les guides mon jardin et ma maison édition glénat
- **Arahal D R, Castillo A M, Ludwig, W. Schleifer K H. et Ventosa I.(2002).** proposal of cobedia marina gen novcomb nov, within the Family Halomonadaceae, to include the species Halomonas marina • Systematic and Applied Microbiology .25:207-2011.
- **Aribi S . Fennouch S.(2016).** Evaluation des activités antihémolytiques et anti-inflammatoires des extraits éthanoliques de feuilles de citrus par test in vitro, université Abderrahmane Mira de Bejaia.
- **Azmir J, Zaidul I S M, Rahman M, Sharif K, Mohamed A, Sahena F, Jahurul M, Ghafoor K, Norulaini N. Omar A.(2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of food engineering, 117 : 426-436.
- **Baser K H C, Buchbauer G.(2009).** Handbook of essential oils: science, technology, and applications (1 ed.). CRC press.

- **Baser K H C, Buchbauer G.(2009).** Handbook of essential oils: science, technology, and applications (1 ed.). CRC press.
- **Bécher J.(1955).** Les maladies de dépérissement des Agrumes laboratoire de gryptogamie du museum national d'histoire naturelle
- **Bénédicte, Michel B.(2021),** les agrumes, Comment les choisir et les cultiver facilement, p5
- **Blaisot C.(2016),** Le marché des extraits de pépins de pamplemousse.Comparatif des produits existants et conseil à l'of ficine., Thèse de Doctoraten pharmacie, Université de Rouen,176pp.
- **Boizot N ,Charpentier J P.(2006).**Méthode rapide d'évaluation du contenu en composes phénoliques des organes d'un arbre fustier. Le cahier des techniques de l'Inra.P 79-82.
- **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 Liégé; 80 : 772-790.
- **Bougandoura N , Bendimerad N.(2012).** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. (Nepeta) briq. Revue des Bio Ressources, 2 :1-7
- **Bouizgarne B.(2013).** Chapter 2 Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease
- **Bousbia N.(2011).**Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires , THESE EN CO-TUTELLE Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique , p 36
- **Bouyahiaoui H.(2015)** L'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité insecticide des molécules bioactives du pamplemousse (Citrus maxima) contre le puceron noir de fève (Aphis fabae) Mémoire de master Spécialité Agroenvironnement et Bioindicateurs

- **Brichet J.(1946)** pamplemousse ou pomelo Équivoque à supprimer pour le plus grand bien de notre Industrie agrumicole Fruits d'Outre-Mer - Vol. 1, no 10, 1946
- **Bruneton J.(1999)**. Pharmacognosie- phytochimie- Plantes médicinales. Ed : Tec & Doc.Lavoisier, Paris, 1220 p
- **Buffa A, Gironière H ,Lemme J P.(1960)**, L'INDUSTRIE DES AGRUMES EN ALGÉRIE, Laboratoire de recherches de la Sojufruit à Boufarik, vol. 15, n° 9
- **Caissard, J C, Joly C, Bergougnoux V, Hugueney P, Mauriat M, Baudino S. (2004)**. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. Recent research developments in cell biology, 2, 1-15.
- **Cassan A.(2008)**, le guides des agrumes Édité par l'Institut Klorane, Fondation d'Entreprise pour la Protection et la Bonne Utilisation du Patrimoine Végétal
- **Celiktas O Y, Bedir, E, Vardar-Sukan F.(2007)**. In vitro antioxidant activities ofRosmarinus binus L. Seed oil : a potential solvent-free and high antioxydative edible oil.Food chemistry, 6 : 1291-1296.
- **Cheong M W, Chong Z S, Liu S Q, Zhou W B, Curran P, Yu B.(2012)**. Characterisation of calamansi (Citrus microcarpa) Part I: volatiles, aromatic profile and phenolics acids in the peel, Food Chem., 134 (2012) 686-695.
- **Chiej R. (1982)**. Les plantes médicinales. Edition Solar.
- **Choi M, Kim G, Lee H.(2002)**. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (Citrus sinensis) juice during refrigerated storage. Food Research International, 35(753-759).
- **Cordenonsi L M, Sponchiado R M, Campanharo S C, Garcia C V, Raffin, and R. P.(2017)** Schapoval, “Study of flavonoids presente in pomelo (Citrus maxima) by DSC, UVVIS, IR, 1H and 13C NMR an d MS,” Drug Analytical Research, vol. 1, no. 1, pp. 31–37,
- **Correa E, Quiñones W, Echeverri (2016)**F “Methyl- N- methylanthranilate, apungent compound from Citrus retic- ulata blanco leaves,” Pharmaceutical Biology,vol. 54, no. 4, pp. 569–571, 2016.
- **Couplan F.(2012)**.Les plantes et leurs noms: Histoires insolitesFrance: Quae.

- **Cowan M M.(1999)**. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- **Curk F, Luro F, Minuto G, Nieddu G.(2022)**. LES AGRUMES DU NORD DE LA MÉDITERRANÉE Éditions Alain Piazzola
- **Delarras C.(2007)**. *Microbiologie pratiques pour le laboratoire*. Ed Lavoisier. 463 p.
- **Djenane D.(2015)**. Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in Sardinapilchardus. *Foods*, 4(2), 208-228.
- **Dugrand-Judek A.(2015)**. Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus
- **Dugrand-Judek A.(2015)**. Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus.
- **Egbuonu A C C , Osuji C A.(2016)**. Proximate compositions and antibacterial activity of Citrus sinensis (Sweet Orange) peel and seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*. 12(3): 1-7.
- **Escartin I., 2011-** Guide des agrumes. Protection et valorisation du patrimoine végétal. Ed. Institut Klorane. CIRAD. Montpellier. 19p.
- **Etebu E, Nwauzoma A B.(2014)**.A review on sweet orange (*Citrus Sinensis* Osbeck): Health, diseases, and management. *Am. J. Res.* 2014, 2, 33–70
- **Faucon M.(2015)**. *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription*. Sang de la terre; 2015. 557 p.
- **Favela-Hernández,J.González-Santiago,O,Mónica,A.Ramírez-Cabrera,Patricia C.Esquivel-Ferriño,María del Rayo Camacho-Corona.(2016)** .Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis ,*Molecules* 2016, 21, 247; doi :10.3390 /molecules 21020247
- **Feriani J.(2019)**. la culture des agrumes, institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne,alger
- **Fisher K, and C A, Phillips.(2006)**."The Effect of Lemon, Orange and Bergamot Essential Oils and Their Components on the Survival of Campylobacter Jejuni, Escherichia Coli O157, Listeria Monocytogenes,

- Bacillus Cereus and Staphylococcus Aureus in Vitro and in Food Systems."Journal of Applied Microbiology 101 (6): 1232-40.
- **Franchomme P, Jollois R, Pénéol D.(2001).** L'Aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. Édition Roger Jollois
 - **Gallouin F, Tonelli N, François G ,(2013).** Des fruits et des graines comestibles du monde entier, Ed Lavoisier, p 545Gattuso, G.; Barreca, D.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U.; Caristi, C. Flavonoid composition of Citrus juices. Molecules 2007, 12, 1641–1673.
 - **Gattuso G, Barreca D, Gargiulli, C, Leuzzi, U,Caristi C.(2007)** Flavonoid composition of Citrus juices. Molecules 2007, 12, 1641–1673.
 - **Ghafar M F, Prasad K 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.
 - **Ghasemi K, Ghasemi Y , Ebrahimzadeh M.(2009).** Activité antioxydante, teneur en phénols et flavonoïdes des pelures et tissus de 13 espèces d'agrumes juillet 2009;22(3):277-81.
 - **Gonzalez-molina E, Dominguez-perles R, Moreno D,A, Garcia V.(2010).** Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51: 327-345.
 - gryptogamie du museum national d'histoire naturelle.
 - **Guiraud J P.(1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, 652p
 - **Guiraud J P.(2003).** Microbiologie alimentaire; Application à l'étude des principaux groupes microbiens. Ed. DUNOD, 651p.
 - **Haineault S.(1999).**les vertus thérapeutiques des agrumes les éditions quebecor
 - **Harborne J B .(1998).** Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis; Ed 3: CHAPMAN & HALL; p: 202-209.
 - **Harley I, Manner, Richard S, Buker, Easton Smith V, Ward D, Craig R. Elevitch.(2016).**Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat) Species Profiles for Pacific Island Agroforestry

- **Hayat K, Hussain S, Abbas S, Farooq U, Ding B, Xia S, Jia C, Zhang X, Xia W. (2009).** Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from Citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Sep Sci Technol*, 70: 63-70.
- **Hegazy A E , Ibrahim M I.(2012).** Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*. 18(5): 684-688.
- **Hellal Z.(2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) RSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU Magister en BIOLOGIE p-26
- **Herberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel, A.M, Favier A, Briançon S, (2004)** The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Archives of Internal Medicine* Vol(21).P : 2335-234.
- **Hosni K, Zahed N, Chrif R, Abid I, Medfei W, Kallel, M, Sebei, H. (2010).** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.
- **Jamoussi B.(1955).** Les maladies de dépérissement des Agrumes laboratoire de
- **Joffin J N, Leyral G,(2006).** Microbiologie technique-TI-Dictionnaire des techniques. 4^{um} édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine.P368.
- **Kalembe D , Kunicka A.(2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- **Kalembe D, Kunicka A.(2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- **Kaloustian J, Hadj-Minaglou F.(2012).** La connaissance des huiles essentielles qualotologie et aromathérapie en science et tradition pour une application pratique médicale raisonnée, collection : phtytotéarapie, edition : Spinger, Paris, pp. 20-30
- **Kamal G M, Ashraf M Y, Hussain A I, Shahzadi A, Chughtai M I.(2013).** Antioxidant potential of peel essential oils of three Pakistani citrus species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi*. *Pak. J. Bot*, 45(4), 1449-1454.

- **Kamran-khan M.(2010).** Polyphénols d’Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d’orange, synthèse de métabolites chez l’homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine thèse de doctorat en chimie des aliments Ecole Doctorale 306 « Sciences des Procédés – Sciences des Aliments »UMR 408 « Sécurité et Qualité des Produits d’Origine Végétale » P16
- **Khan Niazi M, Hassan F, ul Hassan Zaidi S,Z, Aslam1 A, Ain Shahid1Q, Arooj W, Talha N, Ghaffar S, Afzal Sahi1 A , Naem1 N.(2023)** Nutritional Potential of Citrus Sinensis and its Pharmacological Action: A Concise Review PAKISTAN JOURNAL OF HEALTH SCIENCES.
- **Khanam Z, Ching C H. Hazerra N, Mohd B, Sam K H, Bhat I U H.(2014)** “Phytochemical analyses and DNA cleavage activity of citrus maxima fruit,” in Proceedings of the International Conference on Chemistry and Environmental Sciences Research, Penang, Malaysia, 2014.
- **Khefifi H.(2015).** Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physico-chimiques des fruits d’agrumes au cours de la maturation jusqu’à l’abscission. Thèse de Doctorat.
- **Kim D k, Lee C Y.(2004)** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol 44.P: 253–273.
- **Kimball D A.(2012).**citrus processing: a complete guide: springer science & business media.
- **Krezdorn A.(1970).** *Citrus* cultivars for the tropics. Proc. Fla. State Hort. Soc, pp. 336-341.
- **Krief S.(2003).** these "METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES ET COMPORTEMENT ANIMAL ", 346p.
- **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.
- **Laurain-Mattar, D, Couic-M arinier, F.(2020).** Huile essentielle de Mandarine verte. Actualités Pharmaceutiques, 59(598), 57-59

- **Lebon A.(2020).** Guide à l'usage des huiles essentielles dans l'industrie cosmétique: comprendre les huiles essentielles de la plante au flacon, l'évaluation de leur sécurité et analyse des dispositions règlementaires. Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- **Lehmann H.(2013).** Le médicament à base de plantes en Europe. Statut, Enregistrement, contrôle. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de Strasbourg. Vol. I., 229 p.
- **Lehmann H.(2013).** Le médicament à base de plantes en Europe. Statut, Enregistrement, contrôle. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de Strasbourg. Vol. I., 229 p.
- **Liu E H, QI L W, Cao J, Li P, Li C Y et Peng Y B.(2000).** Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids.Molecules. 13: 2521-2544.
- **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, Ventosa A,(2009).** Proposed minimal standards for describing new tax of acrobic, endospore-forming bacteria. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ;59 :2114-2121.
- **Lugasi A, Hovari J, Sagi K,V, Biro L,(2003)** The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. Acta. Biologica Szegedientis Vol(4). P: 119-125.
- **Mahato N, Sharma K, Sinha M, Baral E, Hwan Cho M.(2017).** Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation.
- **Manthey J A, Guthrie N, Grohmann ,K.(2001).** Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medicinal Chemistry, 8, 135-153.
- **Marie H L.(2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylème. Mémoire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.), P35.
- **Martin-Lapierre.(2011).** Application de composts et de fumigants pour lutter contr la verticilliose (verticilium dahlia) de fraisier.

- **Meyers K J , Watkins C B , Pritts M P, Liu R H.(2003)**. Antioxydant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6887-6892.
- **Milind,P et Dev,C.(2012)**. Orange: Range of Benefits. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(7): 59-64.
- **Musa D D, Sangodele F, Hafiz S.(2019)**. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ORANGE (*Citrus sinensis*) PEEL,FUDMA *Journal of Sciences (FJS)*Vol.3, No. 1, March, 2019, Pp 375.
- **Naczki M,Shahidi F.(2004)**. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111
- **Ojeil A, El Darra N, El Hajj Y, Bou Mouncef P, Rizk T J, Maroun R G, (2010)**.Identification Et Caractérisation De Composés Phenoliques Extraits Du Raisin Chateau KSARA,Lebanese Science Journal, Vol. 11, No. 2, 2010.
- **Ollitrault P, Navarro L.(2012)**. *Citrus*. In: *Fruit Breeding*. Springer, pp. 623-662
- **Omoba O S, Obafaye R O, Salawu S O, Bolignon A A, Athayde M L.(2015)**. HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*. 4: 498-512.
- **Ouedrhira W, Bouhdida S, Mounyr B, El OualiLalamib A, Sandrine M, Fouad O C, Hassane G.(2015)**. Chemical composition of *Citrus aurantium L.* leaves and zest essential oils, their antioxidant,antibacterial single and combined effects, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1):78-84.
- **Paris R et Nothis A.(1978)**. Medicinal plant, *Phytothérapie*. Tome I. Ed Masson, Paris.Pp :102-107.
- **Perry J J, Staley J T, Lory S.(2004)**. Cours et questions de révisions PCEMPCEP.I° phenylalanine ammonia lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*. *Potential. Res .Microbiol*. 157:538 -546.
- **Polese J.(2008)** La culture des agrumes Editions Artémis.
- **Ponce A G, Fritz R, del Valle C E et Roura S I.(2003)** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679-684.

- **Prescott L M, Harley J P, Klein D A.(2010).** Microbiologie. 3TMme édition. De Boeck & Larcier.Bruxelle: 838-839
- **RAFIQ S, KAUL R, SOFI S,A, BASHIR N, NAZIR F, et NAIK G,A.(2016).** Citruspeel as a source of functional
- **Revilla E, Palomares F, 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.
- **Rosa A, Era B, Masala C, Nieddu M, ScanoP, Fais A.(2019).** Supercritical CO₂ extraction of waste citrus seeds: Chemical composition, nutritional and biological properties of edible fixedoils. *European Journal of LipidScience and Technology*, 121(7),1800502.
- **Rozmani T, Jersek B.(2009).** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis L.*) against different species of *Listeria*.
- **Sapkota B ,Devkota H , and Poude P .(2022) ,***Citrus maxima* (Brum.) Merr. (Rutaceae): Bioactive Chemical Constituents and Pharmacological Activities , Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2022, Article ID 8741669, 16 pages
- **Saunt J.(1990).**Citrus varieties of the world. An illustrated guide: Sinclair International Ltd.
- **Scalbert A.(1991) ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF TANNINS** Lahoratoire de Chimie Biologique (INRA), Centre de Biotechnologie Agro-Industrielle,Institut National Agronomique Paris-Grignon, 78850 Thiverval-Grignon. *FrancePhyfochemisrry*, Vol. 30, No. 12. pp. 3875-3883, 1991
- **Scora R W.(1975)** on the history and origin of citrus. *Bull Torrey Bot Club*, 102, 369–375 in Audray DUGRAND-JUDEK, 2015, Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus, UNIVERSITÉ DE LORRAINE
- **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
- **Singh B, Singh J P, Kaur A,Singh N.(2020).** Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, 109114

- **Singleton P.(2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie. Ed. Dunod, Paris, 541 p.
- **Stalikas D.(2007).** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30: 3268-3295.
- **Takita M A, Berger I J, Basilio-Palmieri A C, Borges K M, Souza J M, Targon M L N P.(2007).** Terpene production in the peel of sweet orange fruits, *Genet. Mol. Biol.*, 30 (2007) 841-847.
- **Tighilet K.(2014).** Effets antioxydants et anti-enzymes du brunissement des extraits de feuilles de citrus, *MAGISTER en Biologie Ingénierie Biochimie et Biotechnologie Université A.MIRA-BEJAIA*
- **Titta L, Trinei M ,Stendardo1 M, Berniakovich1 I, Petroni K , Tonelli C, Riso P, Porrini M , S Minucci1 S, Pelicci1 PG ,Rapisarda P , Reforgiato Recupero G , Giorgio1 M, (2010).**Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice ORIGINAL ARTICLE *International Journal of Obesity* (2010) 34, 578–588.
- **Tocmo R , Pena-Fronteras J, Calumba KF, Mendoza M, Johnson JJ(2020).**Valorization of pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) peel: A review of current utilization, phytochemistry, bioactivities, and mechanisms of action. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020;1—44
- **Valiant,J et Albrigo,L.(2004).**Flowe bud introduction of sweet orange trees [*Citrus sinensis* (L.) osbeck] effect of low temperature crop load and bud age . *J. Mer . Soc . Hort . Sci .* 2004 ; 129 : 158-164 .
- **Valnet J.(2001).** La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. France, 411.
- **Vijaylakshmi P, Radha R.(2015).** An overview: *Citrus maxima*. *The Journal of Phytopharmacology* 2015;4(5):263-267.
- **Webber, Herbert J, Walter R, Harry W, Lawton Willard, H (1967-1989),** *The Citrus Industry, Horticultural Varieties of Citrus*. Riverside CA 1903;6:
- **YuQiu L, Emily H, Sherry A, Tanumihardjo.(2012).** History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545

Résumé

Notre travail s'articule autour de la mise en valeur des déchets des sous-produits de deux agrumes de genre *Citrus* (*C. sinensis* et *C. maxima*) afin de déterminer leurs richesses en molécules bioactives. La partie pratique débute par un isolement bactérien d'un sol rhizosphérique et réalisé sur un milieu GN. Quatre souches ont été isolées et purifiées sur le même milieu. L'étude des caractères morphologiques, macroscopiques, microscopique et biochimique permet de rapprocher les souches isolées au genre *Bacillus*.

Un screening phytochimiques a été réalisé sur les feuilles et écorces des deux espèces d'agrumes, et a révélé un pourcentage élevé en composés phénoliques. Nous avons également procédé à une série extractions des tannins, des polyphénols totaux et de l'extrait aqueux. Les rendements d'extraction des tannis est de 0.1% et 0.2% respectivement pour *C.sinensis* et *C.maxima*, alors que le taux des polyphénol totaux pour *C.sinensis* est 7.6% qui présente le taux le plus élevé que pour *C.maxima* a 6.1%

Nous avons également extrait les huiles essentielles à partir des écorces fraîches par le biais d'un clevenger et les rendements obtenus varient de 0.63% et 0.29% successivement pour *C.sinensis* et *C.maxima*.

Ces extraits ont étaient testés sur une gamme de souche bactérienne et fongique pour évaluation de pouvoir antimicrobiennes.

L'activité antimicrobiennes nous à permet d'apprécier différentes zones d'inhibition vis-à-vis les souches bactériennes avec un maximum pour l'extrait tannique d'écorce avec un DI de 34mm contre la souche02 et maximum pour le polyphénol totaux des feuilles a 36mm vis-à-vis la souche fongique *aspergillus sp.*

Mots clé: *Citrus sinensis* - *Citrus maxima* – Isolement - Tanin – HE - Polyphénols totaux – Clevenger - Activité antimicrobienne.

Abstract

Our work revolves around the development of waste by-products from two citrus fruits (*C.sinensis* and *C.maxima*) in order to determine their richness in bioactive molecules. The practical part begins with bacterial isolation from rhizospheric soil on GN medium. Four strains were isolated and purified on the same medium. A study of morphological, macroscopic, microscopic and biochemical characteristics enabled us to relate the isolated strains to the *Bacillus* genus.

Phytochemical screening was carried out on the leaves and bark of both citrus species, revealing a high percentage of phenolic compounds. We also carried out a series of extractions of tannins, total polyphenols and aqueous extract. Extraction yields for tannins were 0.1% and 0.2% respectively for *C.sinensis* and *C.maxima*, while the total polyphenol content for *C.sinensis* was 7.6%, the highest of all, compared with 6.1% for *C.maxima*.

We also extracted essential oils from fresh bark using a clevenger, with yields varying from 0.63% to 0.29% successively for *C.sinensis* and *C.maxima*.

These extracts were tested on a range of bacterial and fungal strains for antimicrobial potency.

Antimicrobial activity enabled us to assess different zones of inhibition against bacterial strains, with a maximum for the bark tannin extract at 34mm ID against strain 02, and a maximum for the total leaf polyphenol at 36mm ID against the fungal strain *aspergillus sp.*

Key words: *Citrus sinensis* - *Citrus maxima* - Isolation - Tannin - EO - Total polyphenols - Clevenger - Antimicrobial activity.

LES ANNEXES

. **Annexe 01.**matériels et produits chimiques

Appareillage	Verrerie
Dispositif d'extraction (clevenger)	Anse de platine
Balance de précision	Béchers
Etuve	Pince + ciseau
Spectrophotomètre	Cuve de spectrophotomètre
Microscope optique	Embouts
Agitateur	ampoule a décanté
Bec bunsen	micropipettes à volume réglables (100,250 et 1000µl)
Plaque chauffante	Spatule
Broyeur (moulinex)	Flacon avec bouchon
Règle	Fioles
Vortex	Erlenmeyers
Réfrigérateur	Eprouvettes
Bain-marie	Tubes à essai+ portoir tube
boîtes de pétrie en plastique	Disque d'antibiotique
Rotavapeur	Boîtes de pétri stériles
Autoclave	Boîtes en verre
Tamiseur	Entonnoir
	Pipete pasteur
	Pipete graduée
	Barreaux magnétique

Solutions et réactifs	Formules chimiques
Réactif de folin-ciocalteu	/
Eau distillée	/
Eau physiologique	NaCl
Ethanol	C ₂ H ₆ O
Alcool	C ₂ H ₆ O
Acétate de sodium	C ₂ H ₃ NaO ₂
Alcool méthylique	CH ₃ OH
Acétat de plomb	C ₄ H ₆ O ₄ Pb
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃
Coupeau de Mg	Mg
Eau oxygénée	CH ₃ COO-
Glycérol	C ₃ H ₈ O ₃
Cristal violet	C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃
Lugol	/
Fuschine	C ₂₀ H ₂₀ ClN ₃
Chlorure de fer	FeCl ₃
Alcool isoamylique	C ₅ H ₁₂ O
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄
Réactif de Wanner	HCl
Iode	-
chloroforme	CHCl ₃
Ether diéthylique	C ₄ H ₁₀ O
Alcool mythélique	CH ₃ OH
Benzène	C ₆ H ₆
Formol 40%	-

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

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

Annexe 02,préparation de milieux de culture et des solutions

- Réactif de WAGNER :

Iodure de potassium	2g
Iode	1.27g
Eau distillée	100ml

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

Filtrat de pomme de terre	100g
Agar-agar	10g
glucose	10g
Eau distillée	500ml

- Eau physiologique :

Eau distillée	1000ml
NaCl	09g

- Préparation de milieux Mueller-Hinton :

Mueller	38g
Eau distillée	1000ml
Agar-agar	20g

- Milieu de conservation :

glycérol	30ml
Eau distillé	100ml

- Folin–ciocalteu

Folin–ciocalteu	1ml
Eau distillé	9ml

- Carbonate de sodium :

Carbonate de sodium	2g
Eau distiller	100ml

Annexe.03

Figure. Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

