

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab, Blida1



Faculté de Science de la nature et de vie
Département de biotechnologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en science de la nature et de la vie
Spécialité : Biotechnologie des plantes médicinales et aromatiques et produit naturels

Evaluation de l'activité antibactérienne des polyphénols et des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

Présenté par :

Soutenu le 27/06/2016

Moussa Leila

Touati Loubna

Devant le jury composé de :

Mr Bendali

M.A.A

Président

Mme. Belguandouz R

M.C.B

Promotrice

Mme Faidi H

M.A.A

Examinatrice

Mr Rabhi A

pharmacien Biologiste

Co-promoteur

Année universitaire 2015/2016

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience pour accomplir ce travail.

Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice Mme Belguendouz R, Maitre de conférences qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, et ses conseils judicieux.

Nous remercions Dr. Rabehi A, pharmacien biologiste assistant, responsable du laboratoire de bactériologie à l'hôpital de Hadjout, pour son aide précieuse, son encouragement et sa disponibilité jamais démentie tout au long de notre période de stage.

Nous remercions Mr Bendali A, Maitre assistant à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Blida -1- d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions Mme Faidi H, Maitre assistante à la faculté des Science de la Nature et de la Vie à l'université de Blida -1-, d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'être parmi le jury de ce mémoire.

Et à toute personne qui m'a aidée de près ou de loin à réaliser ce travail.

Loubna et Leila





Dédicace

Plus que jamais je dédie ce modeste travail

À la pensée de ma grande mère

À mes chers parents ma mère et mon père, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, Pour leur patience, leur amour, leur soutien moral que financier et leur encouragement.

À mon frère Sid Ahmed, mes sœurs ikram, Sanaa et son mari Mohamed et leur enfants Malak et Abd elhakim .

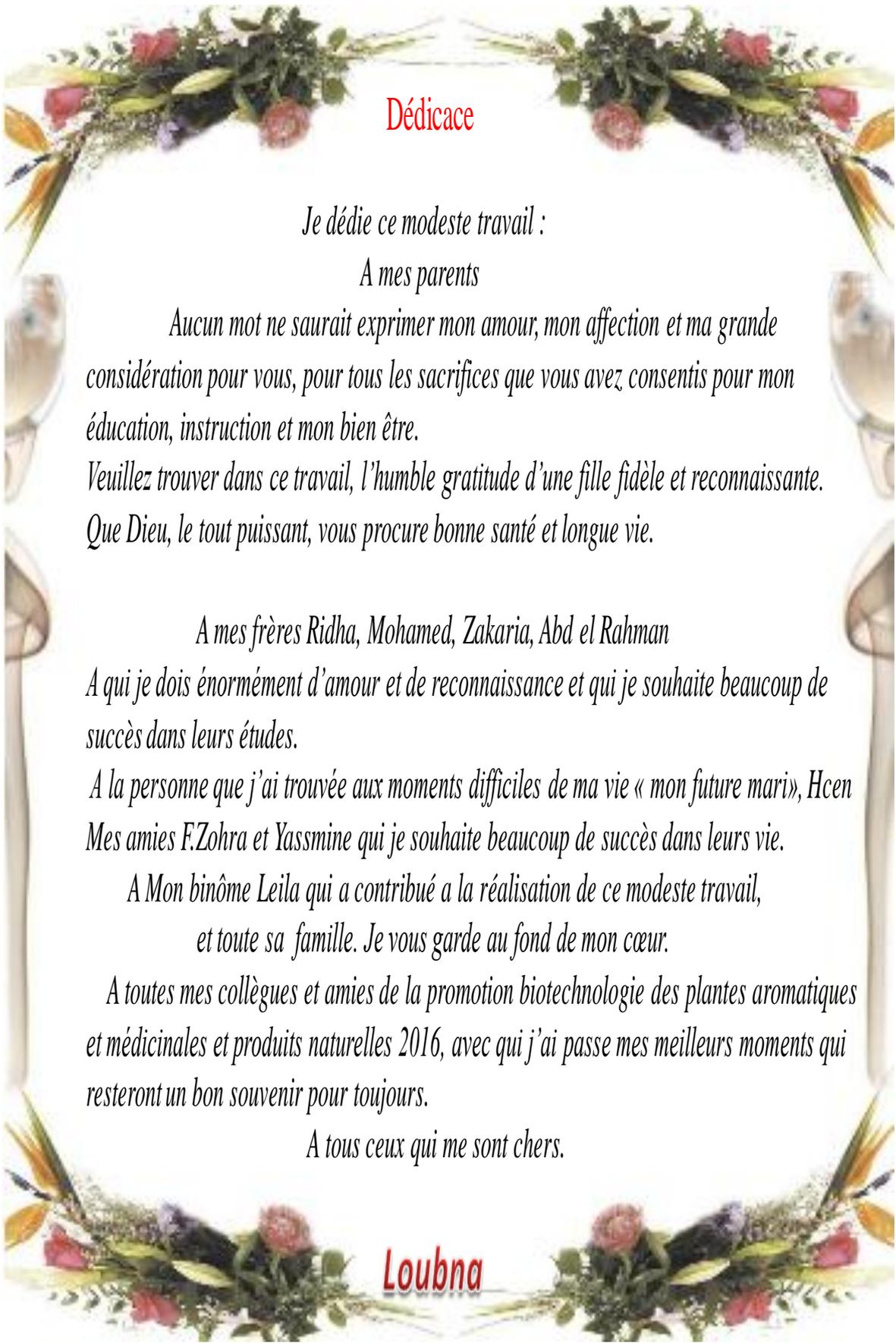
Pour celles et ceux qui ont partagé mes joies et mes Peines, qui m'ont tant aidé et soutenu, à toute ma grande famille et a mes deux chères amies Hassiba et Sara

Je le dédie aussi à tous la promo de Biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales et produit naturels et mon binôme Loubna

Veillez, tous, accepter mes hautes salutations et considérations.

Que Dieu puisse vous protéger.

Leila



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents

Aucun mot ne saurait exprimer mon amour, mon affection et ma grande considération pour vous, pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, instruction et mon bien être.

*Veillez trouver dans ce travail, l'humble gratitude d'une fille fidèle et reconnaissante.
Que Dieu, le tout puissant, vous procure bonne santé et longue vie.*

A mes frères Ridha, Mohamed, Zakaria, Abd el Rahman

A qui je dois énormément d'amour et de reconnaissance et qui je souhaite beaucoup de succès dans leurs études.

*A la personne que j'ai trouvée aux moments difficiles de ma vie « mon future mari », Hcen
Mes amies F.Zohra et Yasmine qui je souhaite beaucoup de succès dans leurs vie.*

*A Mon binôme Leila qui a contribué a la réalisation de ce modeste travail,
et toute sa famille. Je vous garde au fond de mon cœur.*

*A toutes mes collègues et amies de la promotion biotechnologie des plantes aromatiques
et médicinales et produits naturelles 2016, avec qui j'ai passé mes meilleurs moments qui
resteront un bon souvenir pour toujours.*

A tous ceux qui me sont chers.

Loubna

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I : Parties bibliographiques	
1. Présentation des agrumes	03
1.1. Origine et histoire des agrumes.....	03
1.2. Production des agrumes	04
1.3 .Caractéristiques et description des agrumes	05
1.4. Classification et systématique des agrumes.....	07
1.5. Exigences climatiques des agrumes	08
1.6. Exigences édaphique des agrumes	08
1.7. Les espèces étudiées	08
1.7.1. L'Oranger (<i>Citrus sinensis</i>).....	08
1.7.2. Le Citronnier (<i>Citrus limon</i>).....	09
2. Les polyphénols des agrumes.....	10
2.1. Généralités	10
2.2. Biosynthèse des composés phénoliques	11
2.3. Classification des polyphénols	11
2.4. Activité biologiques des polyphénols	12
3. Les huiles essentielles	13
3.1. Généralité sur les huiles essentielles	13
3.2. Huiles essentielles et essences des agrumes.....	13
3.3. Localisation des huiles essentielles.....	14
3.4. Composition des HE et des essences d'agrumes	15
3.5. Propriétés physiques des huiles essentielles.....	15
3.6. Huiles essentielles des espèces d'agrumes étudiées	16
3.6.1. Huiles essentielle d'orange	16
3.6.2. Huiles essentielle de citron	16
3.7. Domaines d'application des huiles essentielles.....	16
3.8. Extraction des huiles essentielles.....	17
3.8.1. Pression à froid.....	17

3.8.2. Hydrodistillation.....	17
3.8.3. Entraînement à la vapeur d'eau.....	18
3.8.4. Autres techniques.....	18

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. l'objectif	19
2. Matériel végétal	19
3. Méthodes de travail.....	20
3.1. Extraction des polyphénols	20
3.1.1. Détermination du rendement des extraits de polyphénol.....	21
3.1.2. Dosage des polyphénols	21
3.2. Les huiles essentielles	22
3.2.1. Extraction des huiles essentielles.....	22
3.2.2. Suivi de la cinétique d'extraction.....	23
3.2.3. Déterminations du rendement en huile essentielle.....	23
3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion	23
3.4. Antibiogramme	25

Chapitre III : Résultats et Discussions

1. Détermination du rendement	27
1.1. Détermination du rendement en extrait méthanolique	27
1.2. Détermination du teneur en polyphénol	27
1.3. Détermination du rendement en huile essentiel des écorces	28
1.3.1. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle.....	29
1.3.2. Cinétique d'extraction.....	29
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion	31
2.1. Les polyphénols	31
2.2. Les huiles essentielles	32
2.3. Comparaison de l'activité des huiles essentielles avec des antibiotiques.....	34
Conclusion	36
Références	37

Annexe

Liste des figures

Figure 01 : Coupe transversale d'une orange.....	7
Figure 02 : Effets biologiques des polyphénols.....	12
Figure 03 : Poches sécrétrices des huiles essentielles des <i>Citrus</i>	14
Figure 04: Verger du récolte.....	20
Figure 05 : Ecorces des fruits et leur poudre.....	21
Figure 06 : Protocole d'extraction des huiles essentielles par hydrosistillation	ANNEXE 1
Figure 07: Aromatogramme.....	26
Figure 08: Protocole des testes microbiologiques effectué au laboratoire de microbiologie...	27
Figure 09 : Rendement en extrait méthanolique de deux espèces de <i>Citrus</i>	28
Figure 10 : Rendements en huiles essentielles de deux espèces de <i>Citrus</i>	ANNEXE 2
Figure 11 : Cinétique d'extraction des huiles essentielles de deux espèces <i>Citrus</i>	31
Figure 12: Zones d'inhibitions observées chez les souches bactériennes testées sous le traitement de polyphénol de <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus limon</i>	32
Figure 13 : Zones d'inhibitions observées chez les souches bactériennes testées sous le traitement de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus limon</i>	34
Figure 14 : diamètres d'inhibitions des antibiotiques et des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i>	35
Figure 15 : Diamètres d'inhibition des antibiotiques et des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i>	36
Figure 16 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux.....	ANNEXE 2

Liste des tableaux

Tableau1 : Superficie occupée par les agrumes dans les principales wilayates.....	5
Tableau 2 : principales classes des composés phénoliques.....	11
Tableau 3 : Les teneurs en composés méthanoliques des deux espèces de <i>Citrus</i>	ANNEXE 2
Tableau 4 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles des deux espèces d'agrumes obtenue par hydrodistillation	30
Tableau 5 : L'évolution de la moyenne des volumes récupérés avec le temps sur les trois heures d'extraction par hydrodistillation.....	31
Tableau 6: sensibilité observées chez les souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>Citrus</i>	33
Tableau 7 : diamètres d'inhibitions observées chez les souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques.....	35
Tableau 8 : Matériel.....	ANNEXE 1
Tableau 9 : Composition de milieu de culture.....	ANNEXE 1
Tableau10: Généralités sur les antibiotiques utilisées.....	ANNEXE 1

ملخص

صناعة عصائر فاكهة الحمضيات التي تولد نفايات كثيرة و لتحديد قيمة استخراج البوليفينول و الزيوت الأساسية من هذه النفايات التي يمكن أن تكون مصدرا و اعدا من الجزيئات الحيوية.

تم الحصول على اكبر عائد للبوليفينول من قشر البرتقال بنسبة % 30.90 و على نحو مماثل تركيز البوليفينول قدر ب 174.19 mg EAG/g.Ms

بالنسبة للزيوت المستخرجة عن طريق التقطير المائي. الليمون أعطى مردود اكبر بنسبة 0.9%

الخصائص الحسية للزيوت الأساسية مطابقة للمعايير الدولية AFNOR

العمل المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي للليمون وجها لوجه مع *Enterococcus faecalis*

Acinetobacter baumannii *Escherichia coli*

أعطت قوة تثبيطية متوسطة باستثناء مع *pseudomonas aerogenosa*

أعطت مقاومة كاملة . أما بالنسبة للزيت الأساسي للبرتقال كان النشاط المضاد للبكتيريا منخفض

و بالعكس بالنسبة للبوليفينول لا تملك أي نشاط مضاد للبكتيريا

الكلمات الرئيسية :

الليمون ، البرتقال و الزيوت العطرية، البوليفينول، والنشاط المضاد للبكتيريا، قشر

Résumé

L'industrie des jus d'agrumes régénèrent beaucoup de déchets. La valorisation pour l'extraction des polyphénols et des huiles essentielles à partir de ces déchets pourrait être une source prometteuse de biomolécules d'intérêt.

Le plus important rendement en polyphénol totaux obtenu est des écorces de *Citrus sinensis* qui est de 30,90%. De même pour la teneur en polyphénols qui est de 174,19mg EAG /g Ms. Pour les huiles essentielles extraites par hydrodistillation, *Citrus limon* a donné un rendement plus élevé de 0.9%. Les propriétés organoleptiques des huiles essentielles sont conformes avec les normes AFNOR.

Le pouvoir antibactériens de l'huile essentielle de citron vis-à-vis de la croissance bactérienne des souches *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, montre une inhibition moyenne, sauf pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré une résistance totale. Pour l'huile essentielle des oranges, l'activité antibactérienne était faible. Par contre, les extraits phénoliques ne possèdent aucune activité antibactérienne.

Mot clés : *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, zestes, huiles essentielles, polyphénols, activité antibactérienne.

summary

The citrus juice industry regenerate a lot of waste. The valuation for the extraction of polyphenols and essential oils from waste could be a promising source of biomolecules of interest.

The largest total polyphenol yield is obtained from *Citrus sinensis* peel

Which is 30.90%. Similarly to the polyphenol content which is 174,19mg EAG / g Ms To essential oils extracted by steam distillation, *Citrus limon* gave a higher yield of 0.9%. The organoleptic properties of essential oils comply with the AFNOR standards

The antibacterial power of the essential oil of vis-a-vis of *Enterococcus faecalis* lemon, *Acinetobacter baumannii* *Escherichia coli*, shows an average inhibition, except for *Pseudomonas aeruginosa* strain which showed total resistance. For the essential oil of oranges, the antibacterial activity was low. By cons, phenolic extracts do not possess antibacterial activity.

Key words: *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, zest, essential oils, polyphenols, antibacterial activity.



Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui donne une grande diversité de structure chimique avec un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Ces plantes, dite aromatiques et médicinales, leur usage a pour but de se soigner grâce aux propriétés de leurs principes actifs. Ces plantes deviennent aujourd'hui d'authentiques médicaments qui jouissent du développement exponentiel des biotechnologies végétales, convertissant ainsi l'ancienneté des huiles essentielles qui remontent à l'aromathérapie en une brûlante actualité (Boukhatem, 2010). D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments. En effet, ces dernières années, les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les polyphénols, qui ont été particulièrement étudié en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé (Holley et al, 2005).

Les études épidémiologiques ont suggéré les effets bénéfiques des agrumes contre de nombreuses maladies dégénératives (Benavente-Garcia, Castillo, Marin, ortuño, & Rio, 1997; Tripoli, Guardia, Giammanco, MAJO, & Giammanco, 2007). Ces influences positives sur la santé humaine ont augmenté de manière significative la consommation des agrumes au cours des dernières années et on estime que la production mondiale d'agrumes atteint 72 millions de tonnes à la session 2007-08, dont l'orange est le plus commercialisé avec environ 45 millions de tonnes (USDA, 2008).

L'Algérie, par sa situation géographique qui renferme de multiples facteurs de pédogenèse, de variations climatiques, et de ressources hydriques, tous favorables à une culture intensive de cette flore parfumée, notamment de celle qui flatte aussi délicieusement la vue, le goût et l'odorat issue de l'agrumiculture (Jacquemon et al, 2010).

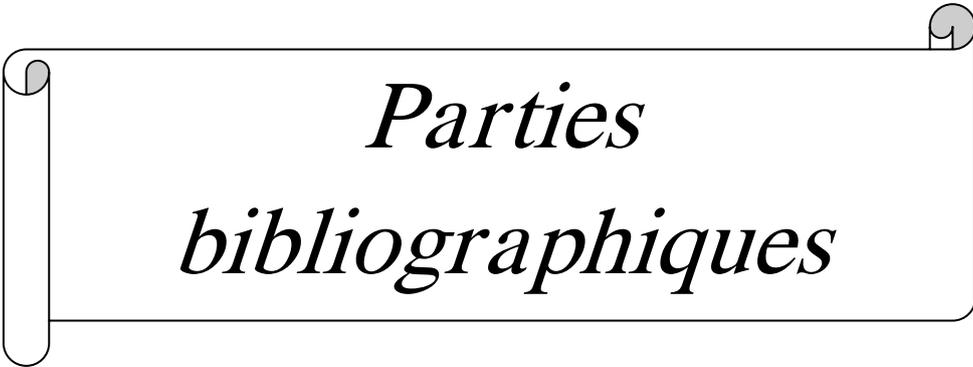
Les citrus ou agrumes, renferment un genre d'arbustes exotiques fournissant à notre pays (Mitidja) une production phare en matière de fruit (Imache *et al*, 2010); ces derniers sont très répandus par leur richesses en vitamines, oligo-éléments et huiles essentielles (Medjene et Madani, 2010)

L'usage domestique et industriel de ces grandes quantités d'agrumes, est conçue en particulier pour la production de jus, elle régénère des déchets tels que : les zestes, les pépins..., qui comptent pour environ la moitié du poids du fruit. Ces sous-produits peuvent être utilisés pour la production de la mélasse, des pectines, des huiles de pépins et des aliments du bétail (bocco, cuvelier, Richard, & berset, 1998; Jeong *et al*, 2004; Li, Smith, & Hossain, 2006).

Plusieurs études ont été menées sur les activités biologiques des huiles essentielles des agrumes telles que l'activité antimicrobienne (Hammer *et al*, 1999; Caccioni *et al*, 1998; risques d'altérations causés par les microorganismes.

A cet effet, et vue l'importance des agrumes comme plantes ou comme produits dérivés tel que les huiles essentielles, nous nous sommes intéressé à valoriser les écorces d'agrumes dans le domaine phyto-thérapeutique. Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche avec l'objectif d'étude comparative de l'activité antibactérienne, des polyphénols et des huiles essentielles des écorces de deux espèces à savoir, *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

Pour cela, nous avons partagé le travail en deux parties, une renferme la synthèse bibliographique sur les agrumes, les polyphénols, les huiles essentielles et les microorganismes étudiés. Dans la deuxième partie expérimentale, nous avons présenté le matériel et les méthodes utilisées de l'extraction et d'évaluation de l'activité antibactérienne, les résultats et discussion et en fin une conclusion.



*Parties
bibliographiques*

1. Présentation des agrumes

1.1. Origine et histoire des agrumes

Le mot agrumes d'origine italienne, est un nom collectif, masculin pluriel, qui désigne les fruits comestibles par extension, les arbres qui les portent, appartenant au genre Citrus. (Loussert ,1987).

L'histoire des agrumes, d'après Webber et *al.* (1967), remonte à 4000 ans avant J-C. où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du Sud-est Asiatique.

La première mention écrite sur les agrumes se trouve dans la littérature Sanskrit environ 800 ans avant J-C. La culture des agrumes a commencé en Chine probablement 500 ans avant JC. Le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Théophraste en 310 avant J-C. Les Botanistes grecs qui suivirent Alexandre le Grand dans ses conquêtes, ont découvert le cédratier en Perse et l'ont baptisé « Pomme de midi ». Le cédrat fut d'abord utilisé comme parfum et comme insecticide. Plus tard, il fut jugé comestible lorsqu'il était correctement préparé. Les romains ont importé les oranges et les citrons de leur province comme un luxe coûteux pour leurs banquets. Les plantes qu'ils cultivaient à Rome ont survécu mais portaient peu de fruits.

Au 10ème siècle, les conquérants arabes réintroduisent le cédrat en Europe et introduisent de nombreuses nouveautés telles que le citron et l'orange amère (bigaradier). Ces fruits ont été répartis autour de la méditerranée orientale, l'île de Sicile, le Nord d'Afrique jusqu'au Sud de l'Espagne (zone de Séville vers 1150). Aux XI et XIIème siècles et de retour de Jérusalem, les croisés propagent en Europe occidentale l'utilisation et la culture du citron, du bigaradier et de la lime. Les grands navigateurs, ont non seulement élargi notre vision du monde mais également joué un rôle important dans la diffusion des agrumes. C'est lors de son deuxième voyage que Christophe Colomb introduisit en 1493 le citron et la lime dans l'île d'Hispaniola (Haïti). Vasco De Gama découvreur de la route de l'Inde introduit en 1494 l'orange douce dans le Portugal. C'est par hasard que ces navigateurs, lors des grands voyages, découvrent le rôle de la vitamine C présente dans le citron comme moyen de lutte contre le scorbut. Depuis ce temps là les agrumes partent à la conquête du monde. Les premières plantations dans le continent américain furent introduites sur la côte de l'actuel

Mexique en l'an 1518, ensuite au Brésil en l'an 1540, en Floride en 1565, en Caroline du Sud en 1577, au Pérou en 1609, en Arizona en 1707, en Australie en 1718, en Californie en 1769 et au Texas en 1890. Le dernier agrume arrivé en Europe fut le mandarinier au début du 19ème siècle. Depuis lors, il est devenu l'un des agrumes les plus populaires et une source de développement continu.

1.2. Production des agrumes

Les agrumes occupent aujourd'hui la seconde place dans les échanges mondiaux des produits végétaux, avec environ 105 millions de tonnes, (FAO ,2014).

Les agrumes présentent une importance économique considérable en tant que culture de rapport dans de nombreux pays, en tant que produit d'exportation dans la plupart d'entre eux et enfin comme source d'emploi et d'activité économique, aussi bien dans le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (conditionnement, emballages, transformation, transport etc.) (Mohamed amine Ferhat et all, 2006).

Les Etats- Unis et Brésil qui dominent le marché, destinent une grande partie de leur production s agrumicoles à la transformation sous forme de jus. Le bassin méditerranéen produit des agrumes pour alimenter le marché international du fruit frais des exportations de l'ordre de 5.424100 tonnes pour la campagne de 1997 et 1998.

Les pays agrumicoles du bassin méditerranéen sont : L'Espagne, l'Italie, L'Egypte, le Maroc, la Grèce, L'Algérie, et la Tunisie, l'Espagne étant le premier pays producteur avec 5578000 tonnes en 1999, l'Algérie occupe la 7eme place (Madjdoub, 1996).

Le verger agrumicole national occupe fin 2006 une surface de 62902 hectares, soit 7,8% de la surface totale agricole. le verger agrumicoles est localisé dans trois zones :

*à l'est : wilayas d'El-taref et de Skikda.

*au centre : wilayas de Blida, Chlef et de Tipaza.

*à l'ouest : wilayas de Mascara, de Mostaganem et de Relizane.

Tableau.1 : Superficie occupée par les agrumes dans les principales wilayates (Année 2006) (Ministère d'agriculture 2006).

WILAYA	AGRUMES (ha)
Chlef	5808
Bejaia	1999
Blida	16304
Tlemcen	2478
Skikda	2257
Mostaganem	4166
Masacra	4200
Boumerdes	2197
El-taref	2165
Tipaza	3579
Ain-defla	2400
Relizane	4535
Alger	4948
Setif	4936

1.3 .Caractéristiques et description des agrumes

Les agrumes sont en principe cultivés autour de l'équateur, du 40° Nord au 40° Sud. On les rencontre par conséquent en priorité dans les climats de type méditerranéen.

Ce sont des plantes à cycle de développement annuel, arbre de taille moyenne comprise entre 2 à 10m de hauteur, ramifiés par de charpentières branches a tronc court limité en une dizaine de cm pour conduire la sève, et à rameaux souvent épineux (loussert, 1989).

Leur croissance végétative débute par de jeunes ramifications, de Février à Mai au printemps, jusqu'au mois d'Aout en été, et de Octobre à Décembre en automne (Loussert, 1989). Leur feuillage est dense à l'exception du genre Poncirus, les feuilles sont persistantes, entières, d'un vert vif brillant, et à pétiole développé orné d'ailettes (Polèse, 2008).

Tous les fruits des agrumes cultivés ont presque la même structure : l'écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines. Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse.

La pulpe, partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers peuvent varier de 5 à 18 (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes(Fig.1).

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou *flavedo*), qui recouvre le fruit et le protège. Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.

- Un mésocarpe (ou *albedo*) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.

- La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et *al.*, 2010).

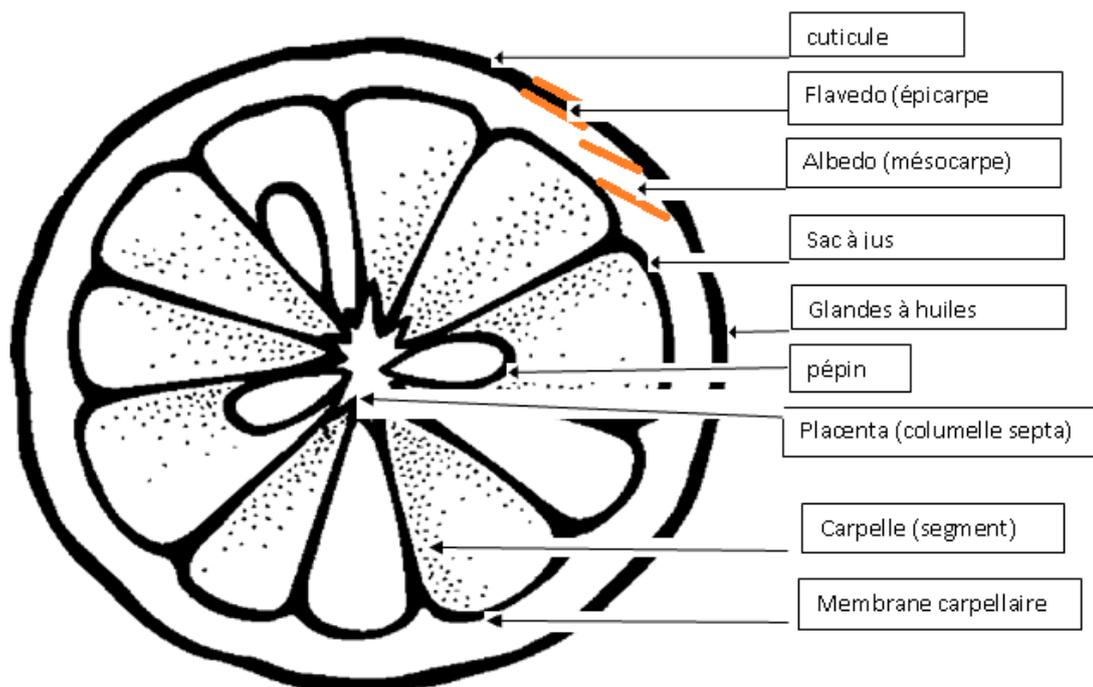


Figure.1: Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd,1995 ; Guimaraes et al, 2010).

Selon lousert(1989), leur système racinaire se localise essentiellement dans le premiers 100cm de profondeur où l'âge de l'arbre est fonction caractéristique du sol, de 2 à 3 racines principales fixatrices pouvant atteindre deux mètre de profondeur et des fines chevelus de racines secondaires nutritives.

1.4. Classification et systématique des agrumes

La majorité des taxonomistes considèrent que les agrumes dérivent du range suivant :

Embranchement : Spermaphytes.

Famille : Rutaceae.

Sous –embranchement : Angiospermes.

Sous-famille : Aurantioideae.

Classe : Dicotylédones.

Tribu : Citreae.

Sous-classe : Disciflores.

Genre : Citrus. (Ahmad Khan, 2007)

Ordre : Géraniales.

1.5. Exigences climatiques des agrumes

-La température

La température optimale permettant la croissance des agrumes ne dépasse pas 25°C à 30°C. Bien que l'idéal pour les Citrus est une gamme de température à moyenne variant entre 10°C-12°C en hivers et de 22°C- 24°C en périodes estivales (Loussert, 1989). Les gelées tuent les l'arbre, quant aux températures trop élevées ; elles maintiennent les fruits déjà mure d'une couleur vert-jaunâtre (Van Ee, 2005).

-L'humidité

Les Citrus réclament une bonne irrigation voire jusqu'au à 1000mm d'eau par an. En outre, l'eau de pluies qui stimule ces arbres est néfaste pour leurs cultures quand elle est en excès (Loussert, 1989). En matière d'hygrométrie, les orangers et les mandariniers nécessitent 2 mois de sècheresse pour fleurir, les pamplemoussiers poussent bien sous les tropiques humides. (Van Ee, 2005).

1.6. Exigences édaphique des agrumes

Du sable à l'argile lourde, les agrumes peuvent se cultiver, mais le sol argileux est le mieux adapté sur le plan fertilité. Un sol sableux grâce aux pores qu'il contient permet à la fois le passage de l'air et des solutés perméable ; aussi il confère aux racines un bon développement en profondeur. (Loussert, 1989). Un bon drainage est recommandé pour leur développement, néanmoins ils doivent être abrités ou protégés car le vent fort abime les arbres (Van Ee, 2005).

Par ailleurs, un pH adéquat compris entre 5 à 6, et un apport important de matières organique et minérale doivent être appliqué (Loussert, 1989).

1.7. Les espèces étudiées

1.7.1. L'Oranger (*Citrus sinensis*)

Possèdent une hauteur de 6 à 8 m, une durée de vie de 300 à 400 ans, une rusticité de -7°C / -8°C et une croissance rapide (Béatrice Pichon 2012 Mon jardin 54p). Son branchage arrondi est composé de rameaux pourvus d'épines fines et flexibles qui, naissent à l'aisselle

des feuilles. Ces dernières sont oblongues ou elliptiques, brillants et coriaces avec un apex aigu et une base arrondie (Colombo, 2004). Les fleurs sont blancs et très parfumées, les fruits naissent et mettent 10 à 20 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés les plus connues sont la Sanguinelle, Thomson Naval, Washington Naval Powell etc. (Loussert, 1989).

➤ **Utilisation**

Les écorces d'oranges sont utilisés en cuisine en fruits confits, pâtes de fruits, glaces, eau de fleurs d'oranger, liqueurs à base d'écorces d'oranges douces et amères. La partie carpelles est utilisée pour la consommation en frais ou pour extraire le jus de boisson.

En cosmétologie : les oranges rentrent dans la composition de nombreux parfums, crèmes et eaux de toilette (Mabberley, 1997, Mabberley, 2008 et Shu *al*, 2008).

1.7.2. Le Citronnier (*Citrus limon*)

L'arbre est d'une hauteur de 3 à 4 m, et d'une durée de vie d'environ 40 ans, supporte une température minimale de -2°C. Il produit de 30 à 40 t/ha. Les fruits sont juteux, acides et très parfumés avec une écorce jaune vif au printemps et en été. Les plus estimés sont dits « Première fleur » (récolte d'octobre à décembre) et « seconde fleur » (mars, avril). Les feuilles sont persistantes, odorantes, lancéolées, la floraison est remontante avec des fleurs blanches nombreuses, rosées et parfumées.

Le citron se conserve de 6 à 8 mois. Il est riche en sels minéraux et en vitamines C (52 mg / 100g) et P, en acides organiques, en sélénium, en fibres etc...Il est reconnu pour ses propriétés diététiques (35 kcal/100g). Le jus de citron contient essentiellement trois acides : malique, ascorbique et citrique.

➤ **Utilisation**

Les citrons ne sont pas consommés frais, mais ils peuvent être présents sur toutes les tables autour de la méditerranée indépendamment du fait qu'on sert de la viande, de la volaille ou du poisson. Le zest de citron finement gratté donne sa propre saveur qui est très prisée en cuisine et en pâtisserie, pour la fabrication de la limonade. Le jus de citron est pressé et utilisé en cuisine pour parfumer toute grillade ou frites.

Le jus de citron est également utilisé pour chasser les fourmis et permet de conserver les fruits et les légumes qui s'oxydent facilement à l'air. La pulpe restant après extraction du jus commercial est une importante source d'huile essentielle, de pectines et d'acide citrique qui sont utilisés pour des formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. En cosmétologie, le citron est utilisé pour resserrer les pores, il passe pour éclaircir la peau, résorber les comédons et s'utilise en masque antirides ou pour donner de l'éclat aux Cheveux.

En médecine, il est utilisé comme antiseptique naturel mais il est aussi connu pour d'autres actions : antirhumatismale, anti-ascorbique, antifatigue, diététique, digestive, expectorante et contre les effets causés par les allergies. En parfumerie, il entre dans la composition de nombreux parfums.

2. Les polyphénols des agrumes

2.1. Généralités

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont le Produit du métabolisme secondaire des plantes.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix *et al*, 2005). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Macheix *et al*, 2005).

Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (conférence internationale sur l'application des polyphénols, 2006).

2.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

-La voie de shikimate : C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Kening *et al*, 1995 ; Floss, 1997).

-La voie de phénylpropanoïde : commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, les iso flavonoïdes, les flavonoïdes, l'acide salicylique et des précurseurs de lignine (Hoffmann et al, 2004).

2.3. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes :

Tableau.2 : principales classes des composés phénoliques (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	catéchol	Nombreuses espèces
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices .fraises
C6-C3	Hydroxycinnamiques	Acide caféïque	Pomme de terre, citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglon	Noix
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Quercetine	Fruits, légumes
(C6-C3-C6)	Tanins condensés	procyanidol	Raisins, kaki

2.4. Activité biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun, 1997).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar Ali *et al*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al*, 2008) et antioxydants (Gomez-Caravaca *et al*, 2006). Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs.

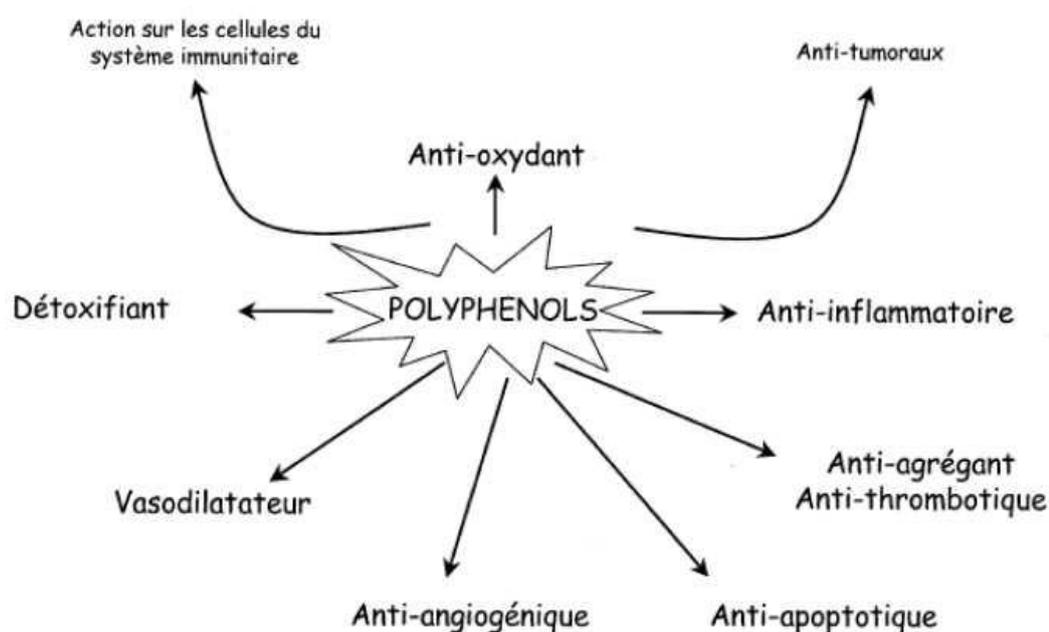


Figure. 2 : Effets biologiques des poly phénols

(Martin et Andriantsitohaina, 2002).

3. Les huiles essentielles

3.1. Généralité

Les huiles essentielles sont des liquides concentrés en composés aromatiques (odorants) et volatils provenant de plantes ou de fruits. Leur utilisation est connue depuis l'antiquité : des textes akkadiens datant de plus de quatre mille ans nous apprennent qu'à Babylone, on brûlait du cyprès pour enrayer les épidémies. De nos jours, ces huiles sont amplement utilisées en pharmacologie pour leurs propriétés curatives ainsi qu'en cosmétique, en parfumerie et dans l'alimentaire pour leurs propriétés odorantes.

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle, ce qui explique leur coût élevé. Cependant elles sont généralement diluées avant d'être utilisées à cause de leur toxicité à trop fortes concentrations : elles sont très souvent irritantes pour la peau lorsqu'elles sont utilisées pures. L'obtention de ces huiles essentielles présente donc un enjeu industriel important et pour cela, l'eau va être un solvant de choix pour le chimiste.

En effet, l'eau étant très peu chère et non toxique, elle va pouvoir être facilement utilisée en industrie en grande quantité. L'eau permet ainsi d'extraire la majorité des huiles essentielles selon deux techniques que sont l'hydro distillation et l'entraînement à la vapeur (Olympiade de la chimie l'ENS Lyon, SD).

3.2. Huiles essentielles et essences des agrumes

Les huiles essentielles de la famille des rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et de l'espèce ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction.

Les agrumes conduisant à la plus grande production d'huiles essentielles renferment l'orange, le citron, le pamplemousse, la mandarine.

La distillation à partir des fleurs d'agrumes conduit à une huile appelée « huile essentielle de néroli » très sollicitée par les parfumeurs. L'hydrolat qui est un sous produit de cette distillation s'appelle « eau de fleur d'oranger », très appréciée tant à l'échelle ménagère

qu'industrielle. Par contre, l'écorce des fruits d'agrumes contient une essence récupérée soit par distillation ou par expression à froid. Enfin, à partir des feuilles et des brindilles d'agrumes nous obtenons une huile qui porte le nom d'huile de petit grain (Peyron, 2002).

3.3. Localisation des huiles essentielles

Plusieurs familles botaniques en contiennent suffisamment d'huiles essentielles ; probablement dans toutes leurs parties notamment, les Lamiacées, les Myrtacées, les Rutacées et les Poacées,.....etc. (Roux et Cartier, 2007).

Néanmoins, il existe des structures tissulaires spécialisées pour leur sécrétion : cellules sécrétrices isolées ou épidermiques, poils épidermiques, poches sécrétrices comme pour les agrumes, et canaux excréteurs (Bendriss, 2003).

La Biosynthèse terpénique de ces essences se déroule au niveau du compartiment cytosol-réticulum endoplasmique (Douglas et all, 1995).

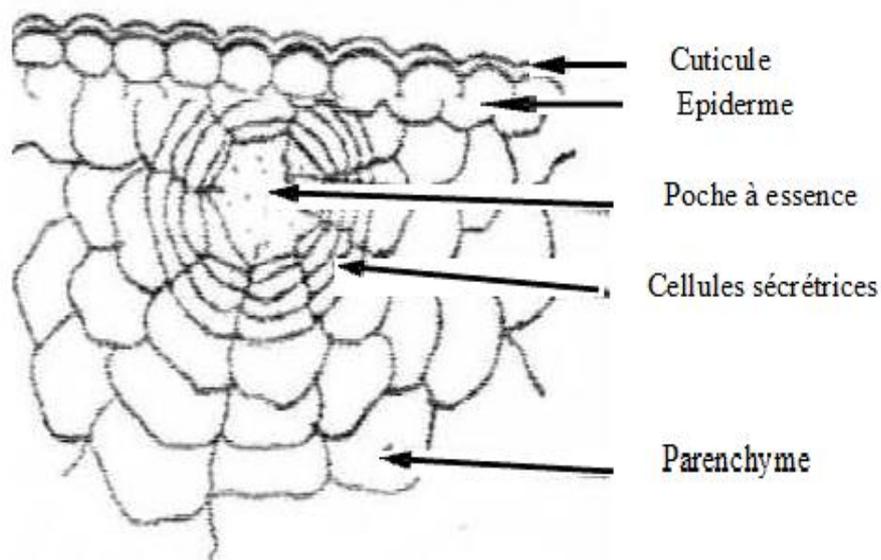


Figure 3: Poches sécrétrices des huiles essentielles des *Citrus* (Ferhat *et al*, 2010).

3.4. Composition des HE et des essences d'agrumes

Les huiles essentielles de Citrus contiennent une proportion relativement importante d'hydrocarbures terpéniques, dont le plus abondant est le limonène alors qu'il ne participe que peu à l'arome. Par contre, l'arome est dû à des aldéhydes, à des alcools, à des esters terpéniques, à des aldéhydes aliphatique et parfois à de l'antranilate de méthyle.

Les essences obtenues par expression à froid renferment de plus des constituantes non volatiles comme les coumarines.

Les essences de Citrus possèdent de nombreux dérivés dont la nature et la présence dans l'essence varient d'une espèce de Citrus à une autre. Ces dérivés appartiennent à cinq grands groupes de substances :

- Dérivés terpéniques** : mono terpènes et sesquiterpènes.
- Dérivés hydroxylés** : alcools aliphatiques, alcools terpéniques.
- Constituants carbonylés** : aldéhydes, cétones.
- Acides et esters** : acides aliphatique, acides terpéniques, esters.
- Dérivés de la benzopyrone** : coumarines, furo-coumarines, flavones.

3.5. Propriétés physiques des huiles essentielles

-Ce sont des produits très odorants, âcres, caustiques, non visqueux, et volatils à température ambiante. Ils sont sensiblement solubles à l'eau, très solubles à l'alcool et l'éther où ils forment des esprits ou teintures (Edouard et Méneville, 1838).

-A l'état solide ou en cristaux, les huiles essentielles ont un point de fusion et un point de congélation précis (Garnero, 1985). Leur pont d'ébullition est toujours supérieur à 100°C. (Duraffourd et Lapraz, 2002), Ce sont des liquides mobiles entrainables à la vapeur d'eau (Roux, et Cartier, 2007).

-Généralement incolores, hydrophobes, inflammables, et oxydables (Mil pied, 2009).

3.6. Huiles essentielles des espèces d'agrumes étudiées

3.6.1. Huiles essentielle d'orange

Obtenue des feuilles ou zeste par expression à froid, par distillation ou par solvant, sa densité est de 0,845 à 0,860, son pouvoir rotatoire est de +95° à +99°, elle règle les contractions cardiaques, indiqué dans les cas d'insomnie, de fièvre, de coliques et contre les rides car elle contient : du limonène, aldéhydes, géraniol, linalol, citral, citronellal, et le terpinéol (Sallé, 1991).

3.6.2. Huiles essentielle de citron

Extraite par les même procédés que les précédente, sa densité est comprise entre 0,850 et 0,870, à un pouvoir rotatoire de +57° à +68°, riche en : pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, citronellal, vitamine A et vitamine B. indiqué en cas : d'infection pulmonaire, d'anémie, de parasites intestinaux, et pour l'entretien de la peau. En contre, il est admis qu'en 15min elle neutralise les méningocoques, et en 1 heure les bacilles typhiques (Sallé, 1991)

3.7. Domaines d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (Grysole, 2005). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Pingot, 1998; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 ; Aprotosoiaie *et al* ; 2010). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes etantioxydantes (Conner, 1993 ; Hammer *et al* ; 1999). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (Grysole, 2005).Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Choi *et al* ; 2000 ; Robert et Lobstein, 2005 ; Bisignano *et al* ; 2011). Récemment, certaines études ont montré la

possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant (Himed, 2011 et Hellal, 2011).

3.8. Extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles, etc.), de la nature des composés (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins, etc.), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hellal, 2011).

3.8.1. Pression à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid (Lesley, 1996 ; Roux, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Fillatre, 2011). Ce procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation (Basil *et al.*, 1998 ; Roux, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010). Diverses techniques manuelle ou mécanique, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées (Ferhat *et al.*, 2010). Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008). Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).

3.8.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (Bruneton, 1993 ; Ferhat *et al.*, 2010). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993 ; Lucchesi, 2005 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Ferhat *et al.*, 2010). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).

3.8.3. Entraînement à la vapeur d'eau

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic, sans que le matériel végétal ne soit pas en contact avec l'eau (Belaiche, 1979 ; Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010). Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leurs poids spécifiques différents (Padrini et Lucheroni, 1996). Pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions, la fragilité thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).

3.8.4. Autres techniques

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités (Ferhat *et al.*, 2010). Parmi ces techniques, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons (Kaufmann et Christen, 2002 ; Hemwimon *et al.*, 2007 ; Piochon, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Dupuy, 2010), l'extraction par les fluides supercritiques ou encore l'eau à l'état subcritique (Kaufmann et Christen, 2002 ; Piochon, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Dupuy, 2010), l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par la flash détente (Ferhat *et al.*, 2010).



*Matériels
et méthodes*

1. l'objectif

Notre expérimentation a été réalisée sur une période allant Novembre à Décembre. Elle porte sur l'extraction des polyphénols totaux et des huiles essentielles de deux espèces de *Citrus* et l'étude de l'activité antibactérienne de ces extraits.

Notre étude a été effectuée au sein de trois centres :

-Le prélèvement des échantillons a été fait au niveau des vergers d'agrumes situés dans la région de la wilaya de Tipaza (Ahmeur el Ain pour l'oranger et Bourguigua pour le Citronnier).

-L'extraction des polyphénols et des huiles essentiels a été effectuée à l'université de Blida 1, Département des Biotechnologies, Laboratoire des plantes aromatiques et médicinales.

- Le test antibactérien a été réalisé au niveau de laboratoire de bactériologie de l'Hôpital de Hadjout Unité de microbiologie.

2. Matériel végétal

Les fruits choisis pour cette étude appartiennent aux espèces : *Citrus sinensis* (Oranger). *Citrus limon* (Citronnier). Ce choix revient à leur utilisation connue dans le domaine phytothérapeutique et aromatique, leur disponibilité en grande quantité dans la région de Mitidja et la valorisation des écorces du fruit habituellement et dans la plus part des cas considéré comme déchet organique.

La cueillette des fruits sains a été faite de manière aléatoire sur des arbres situés au centre du verger pour assurer l'homogénéité de l'échantillon et, durant le mois de novembre, période de début de maturation des fruits.



Figure 04: Verger de récolte

3. Méthodes de travail

3.1. Extraction de polyphénol

- Préparation des poudres d'écorces : les échantillons de fruits sont lavés, séchés avec une serviette propre et, l'écorce est récupérée à l'aide d'un économe de cuisine. Ces derniers sont ensuite laissés séchés dans un endroit aéré et à l'ombre sous une température ambiante pendant 15 jours, pour baisser la teneur en eau des écorces, conserver les molécules actives sensibles à la chaleur et à la lumière et éviter toute réaction d'altération et de prolifération des microorganismes.

Après le séchage, les épicarpes des fruits ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées avec un tamis de 0,1 mm de diamètre afin d'obtenir une poudre homogène.

La poudre est conservée dans des flacons en verre secs fermés hermétiquement et à l'abri de la lumière en vue de leur utilisation pour l'extraction des polyphénols.

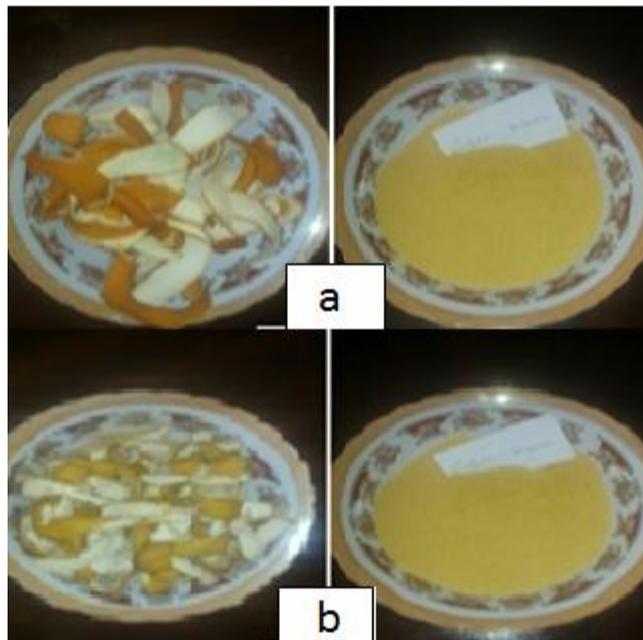


Figure 05: Ecorces des fruits et leur poudre (a :orange ,b : citron)

Mode opératoire

Au laboratoire, nous avons pesé 30 g de poudre d'écorce, mis dans un Erlenmayer avec 200ml de méthanol, laissé macérer pendant 15 jours sous une agitation temporaire, suivi de filtration (la 1^{ère} sur mousseline, la 2^{ème} et la 3^{ème} sur papier filtre de type Wattman afin de récupérer le solvant renfermant les polyphénols).

- L'extrait est par la suite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C.
- Récupération avec 10ml de méthanol.
- Décantation avec 10ml de l'hexane.
- Récupération de la phase aqueuse.
- Evaporation sous pression réduite 40°C.
- Récupération de l'extrait final de polyphénol dans 10 de l'eau distillé stérile.

(Boumaaza ; 2010)

3.1.1.Détermination du rendement des extraits de polyphénol

Le calcul du rendement des polyphénols totaux extraits de poudre d'écorce de fruits est réalisé par la formule suivante :

$$R = (m - m_0) / m_T \times 100$$

m : la masse du ballon après l'extraction .

m₀ : la masse du ballon vide (avant l'extraction).

m_T : la masse de la poudre végétale utilisé dans l'extraction .

3.1.2.Dosage des polyphénols

Le dosage des poly phénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al, 1999).

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₀O₄₀) et phosphomolipidique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), (Ribèreau-Gayon et al, 1972). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

Mode opératoire

L'extrait récupéré dans 10ml d'eau distillée stérile, est centrifugé pour faire sédimenter les éléments en suspension. Après récupération de la solution surnageante, le dosage des polyphénols est réalisé par un spectrophotomètre à uv visible et la teneur est mesurée en mg d'EAG/g de matière sèche.

Pour cela :

- 100 µl de chaque extrait est mis dans des tubes à essais ; avec 3,16 ml d'eau distillée et 200 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans H₂O distillée (v/v) ;

- Agiter vigoureusement puis laisser agir 6 min, ajouter 600 µl de carbonate de sodium à 20%.

- Incuber pendant 2h à température ambiante et à l'abri de lumière,

- Lire l'absorbance à 765 nm, par spectrophotomètre UV-visible

La même opération a été effectuée pour l'acide gallique à différentes concentrations (50/100/150/200/250) mg/ml. Cette étape nous permet d'établir la courbe d'étalonnage (Annexe 2).

Le blanc est représenté par le méthanol additionné au Folin-Ciocalteu, l'eau et le carbonate de sodium.

La concentration des polyphénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage (Figure 16 ANNEXE 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique/g de la matière sèche (mg EAG/g MS).

3.2. Les huiles essentielles

3.2.1.Extraction des huiles essentielles

L'hydrodistillation est réalisée par un appareil de type Clevenger. Elle consiste à laisser baigner directement 100g d'écorce dans un ballon rempli avec 600ml d'eau, laissé bouillir durant 3 heures. Les vapeurs après chauffage à ébullition entraînent au fur et à mesure des particules légères d'huile qui se condensent sur les parois plus froides (réfrigérant) du serpentin, ainsi ces essences seront récupérées par décantation dans un récipient gradué eppendorf qu'il faut séparer par la suite (Annexe1).

3.2.2. Suivi de la cinétique d'extraction

Selon Bachelot *et al* (2006), la cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Dans notre étude, le rendement a été déterminé chaque 15 minute en tenant compte du temps d'extraction dès la formation de la première goutte du distillat, cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition d'eau.

3.2.3. Déterminations du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est déterminé par le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la matière végétale traitée. Le rendement est exprimé en pourcentage, il est calculé selon la formule suivante :

$$R = (V/M) \times 100$$

R : rendement en huile essentielle (%).

V : volume obtenue d'huile essentielle (ml).

M : poids de la matière sèche (g).

3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode de diffusion sur milieu solide (Sokmen *et al*, 2004) modifiée dans laboratoire.

Cette méthode consiste à tester la sensibilité des souches vis-à-vis un produit donné, par diffusion de ce dernier à partir d'un disque imprégné de l'extrait. La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits de la plante, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait.

-Les souches testées

1. *Escherichia coli*

2. *Acinetobacter baumannii*

3. *Enterococcus faecalis*

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Mode opératoire :

Le matériel utilisé a été stérilisé à l'avance à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Après avoir décongelé le milieu de culture dans un autoclave, on le coule dans les boîtes de pétri puis on laisse refroidir pendant 20 à 30 mn.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sont ensemencées dans le Milieu de Mueller Hinton (MH) (Annexe2) et incubées à 37°C pendant 24h.

A l'aide d'une anse de platine, nous avons raclé quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. L'anse est déchargée dans 10 ml de l'eau physiologique. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

➤ **Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîte de Pétri. L'écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. Il est frotté sur la totalité de la surface de milieu MH, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

Les disques, de 6mm de diamètre, imprégnés par 10ul de chaque extrait sont disposés délicatement sur la surface de milieu de MH inoculée à l'aide d'une pince stérile. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque souche.

➤ **Incubation et lecture**

L'incubation est réalisée dans l'étuve pendant 24h à 37°C. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition (ZI) produit autour des disques sous forme des halos.

3.3.2. Pour les huiles essentielles

On utilise la même méthode que celle qu'on a utilisée pour les polyphénols mais cette méthode qui concerne les huiles essentielles on appelle l'aromatogramme.

➤ **Aromatogramme**

Est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

-Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constitutions cellulaires.

-Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

-Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de bactérie.

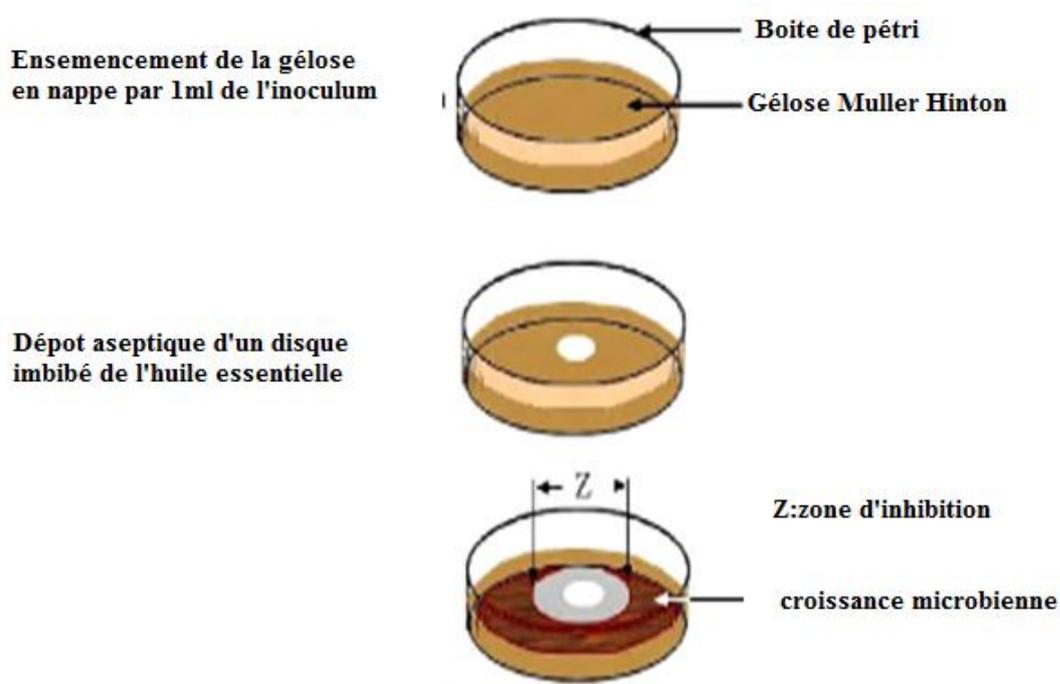


Figure 07 : Aromatogramme

3.4. AntibioGramme

Cette Méthode est appliquée uniquement pour les souches qui ont montré une sensibilité à nos extraits d'huile essentielles, qui consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (Tab 10, ANNEXE 2).

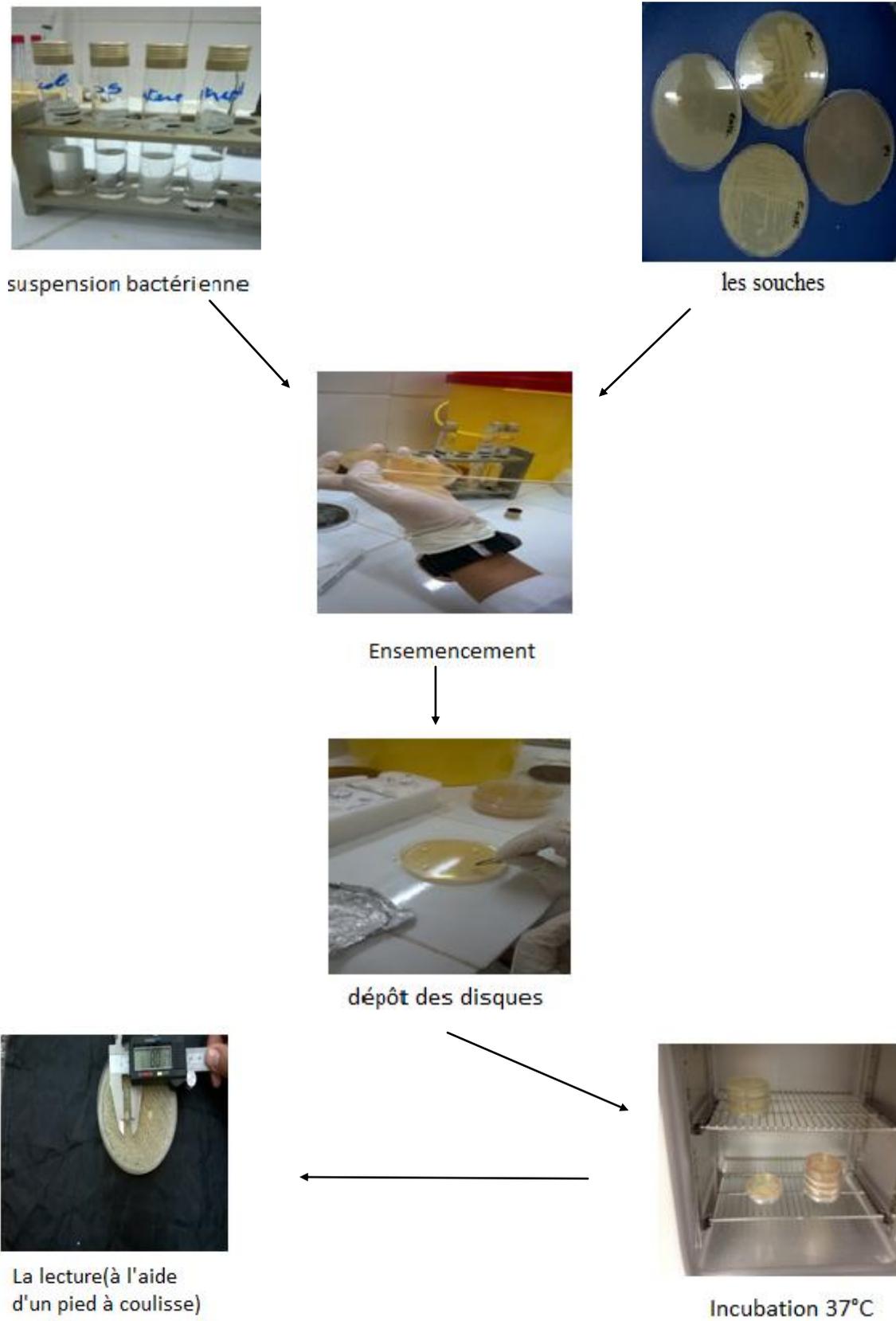


Figure 08: protocole des testes microbiologiques effectué au laboratoire de microbiologie .



Résultats

et discussion

1. Détermination du rendement

1.1. Détermination du rendement en extrait méthanolique

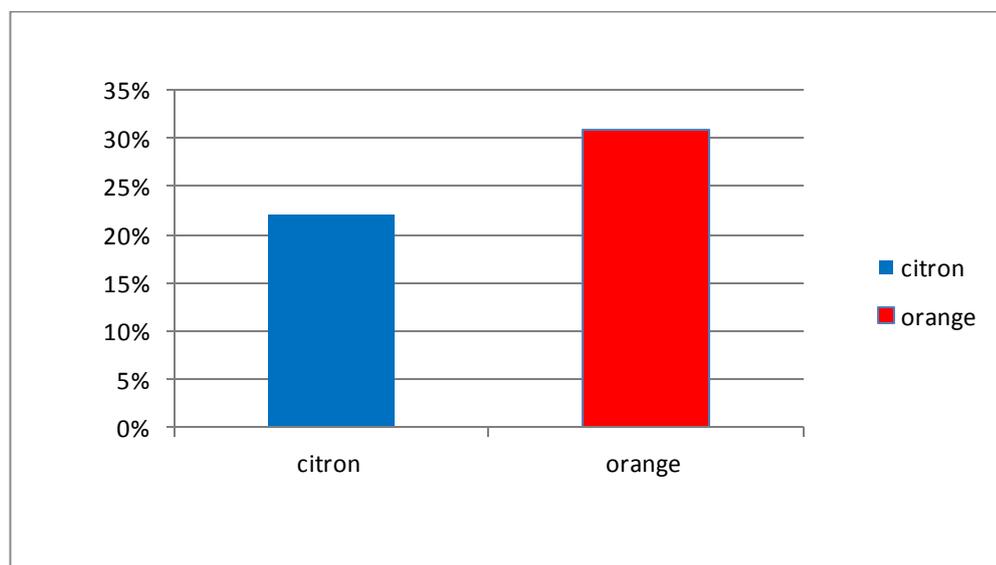


Figure 09 : Rendement en extrait méthanolique de deux espèces de *Citrus*.

Les résultats représentés dans les figures 14 montrent que le rendement en polyphénol totaux des écorces de fruits de *Citrus sinensis* est plus important (30,90%) que celui de *Citrus limon* (22,10%).

1.2. Détermination la teneur en polyphénol

Dosage de polyphenols totaux

La concentration des composés phénoliques de deux espèces de *Citrus* a été exprimée en termes de milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/matière sèche). Et calculé à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe 2).

Nous remarquons que les extraits de *Citrus* sont riches en polyphénols totaux, les teneurs sont plus importantes chez les deux 174,39 pour *Citrus sinensis* et 171,19 pour *Citrus limon*. Ces résultats montrent que le rendement en polyphénol totaux varie selon l'espèce végétale. Selon (Falleh et al, 2008 ; Podsdek, 2007 et Amaral et al, 2010), la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (origine géographique, conditions climatiques, les pratiques culturelles, la

maturité à la récolte et les conditions de stockage). Les résultats de (I. Moulehi *et al.*, 2012) confirment que la teneur en polyphénols montre des différences considérables, au cours des différentes périodes de maturité d'une espèce donnée.

1.3. Détermination du rendement en huile essentiel des écorces

Le rendement moyen en huile essentielle obtenu par hydrodistillation de *Citrus limon* est de 0,9%, et pour *Citrus sinensis* est de 0,7%.

Ce rendement est supérieur aux rendements obtenus par Blanco Tirado *et al.* (1995) et Hellal (2011) qui valent respectivement et 0,70 % (citron) et 0,50 (orange), mais il est inférieur aux rendements obtenus par Ahmad *et al.* (2006), Bourgou *et al.* (2012) et par Himed (2011) qui sont respectivement de 1,12%(citron) et 1%(orange). Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet variétal, les espèces, la période de récolte, les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraîcheur) et la méthode d'extraction employée. (Bourgou *et al.*, 2012).Le degré de maturation du fruit influe remarquablement le rendement de l'huile essentielle. Bourgou *et al.* (2012). La région géographique apparaît aussi comme un facteur influençant le rendement en HE. Nous rappelons que le citron utilisé dans la présente étude est collecté de la région de Bourgiga et l'orange dans la région d'Ahmer el Ain, Il est évident que ces régions se caractérisent par des climats différents et taux d'humidité différent.

1.3.1. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle

L'hydrodistillation des écorces des deux espèces étudiées nous a permis d'extraire des huiles essentielles dont les caractéristiques organoleptiques observées sont résumées dans le tableau ci-dessous

Tableau 4 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles des deux espèces d'agrumes obtenue par hydrodistillation .

Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur	Etat
Citrus sinensis 	Liquide Mobile Limpide	Jaune pale	Douce, Forte	Très volatile
Citrus limon 	Liquide Mobile Limpide	Jaune	Forte, caractéristique du zest de citron	Très volatile

D'après le tableau 4, les paramètres organoleptiques montrent que nos huiles essentielles ont un aspect liquide, limpide et mobile, de couleur jaune pâle et d'odeur douce forte pour *Citrus sinensis*, et un aspect liquide limpide mobile, de couleur jaune, et odeur forte caractéristique du zeste de citron et très volatile pour *Citrus Limon*. Ces résultats ont montré que nos huiles sont conformes avec ceux de la norme AFNOR (NFT75-203). Ce résultat est signalé par Abouda (2007), Madjene et Madani (2010), qui a mentionné que l'huile essentielle d'orange serait volatile, à odeur très forte caractéristique du fruit, incolore ou jaune pâle, à aspect liquide, mobile et limpide.

1.3.2. Cinétique d'extraction

Durant l'hydrodistillation, on a enregistré en moyenne l'évolution du volume des extraits sur les trois heures d'extractions Tableau (5).

Tableau 5 : L'évolution de la moyenne des volumes récupérés avec le temps sur les trois heures d'extraction par hydrodistillation.

Espèces	Volume de l'huile essentielle obtenue en ml				
	30mn	60mn	90mn	120mn	150mn
Orange	0,26	0,40	0,58	0,7	0,7
Citron	0,40	0,55	0,70	0,9	0,9

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction montrent que cette dernière passe par deux phases importantes (Fig. 16). La première phase correspond à l'augmentation du rendement d'extraction en huile essentielle, de 0,40% à 0,9% pour le citron, et de 0,26% à 0,7% pour l'orange. Cette augmentation s'observe dans l'intervalle de temps de 30 à 120min. La deuxième phase s'observe au-delà de 120 minutes et se caractérise par un palier où le rendement d'extraction a atteint un taux constant de $\pm 0,9\%$ pour le citron et de $\pm 0,7\%$ pour l'orange. Cette stagnation pourrait s'expliquer par l'épuisement des cellules de l'écorce en huile essentielle.

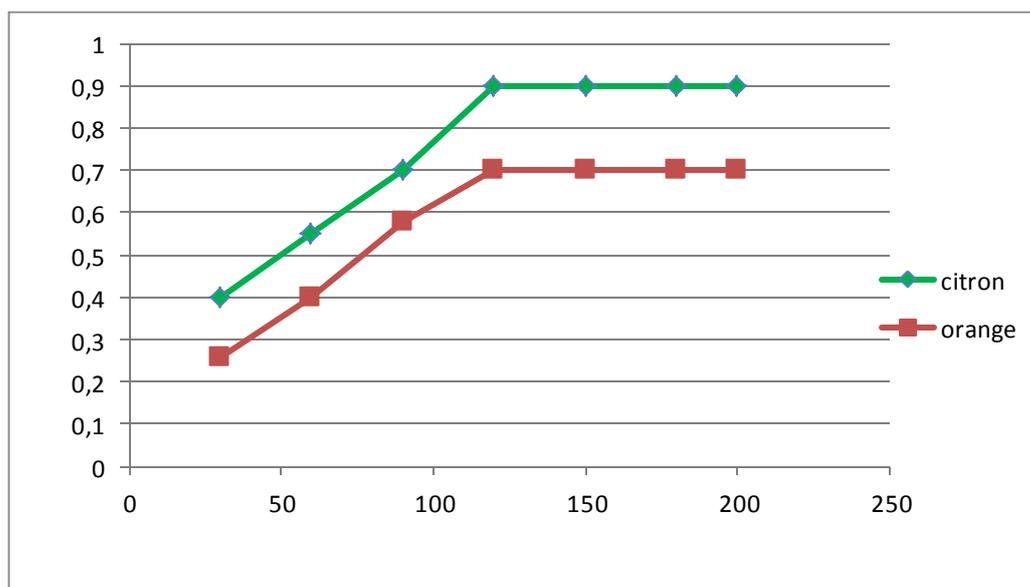


Figure 11 : Cinétique d'extraction des huiles essentielles de deux espèces *Citrus*.

Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Himed (2011) où la durée d'extraction observée a été de 120 min. A l'issue de ce suivi, la durée d'extraction de cette huile a été fixée à 120 mn.

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion

2.1. Les polyphénol :

L'activité antibactérienne a été testée pour les polyphénols totaux, les résultats représentés dans la figure suivant :

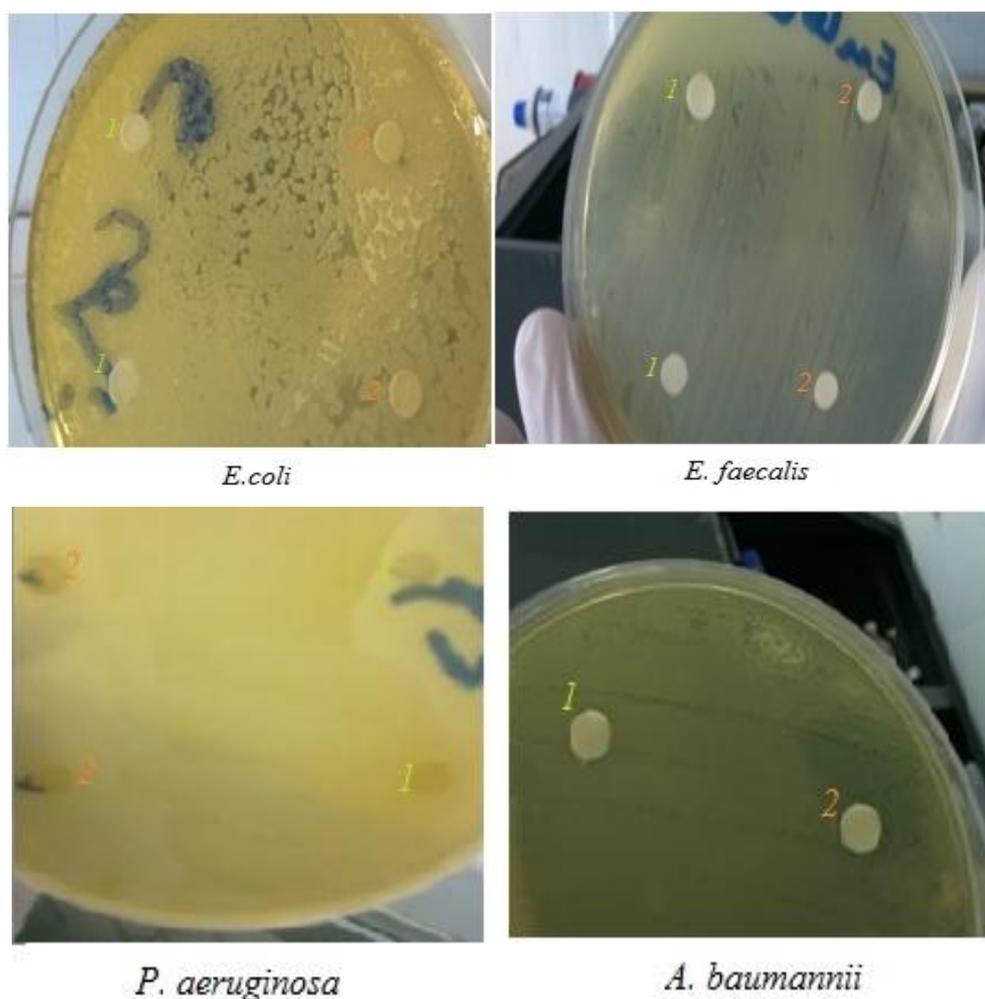


Figure 12: Zones d'inhibitions observées chez les souches bactériennes testées sous le traitement de polyphénol de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*. (1 : Citron, 2 : Orange)

D'après l'observation nous constatons que le polyphénol n'a exercé aucun effet antibactérien sur tous les souches testées pour l'extrait de citron et de l'oranger, absence d'activité antibactérienne détectable, diamètre d'inhibition < 6mm.

Ce résultat obtenu montre que nos extraits phénoliques ne possèdent aucune activité antibactérienne. Selon (bouterfas et al, 2014) l'évaluation du pouvoir antibactérienne des différents extraits peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tel que le type de l'espèce, les conditions ambiantes, les facteurs écologiques, les méthodes d'extraction, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la concentration de l'extrait, l'organe de la plante utilisé, le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires.

2.2. Les huiles essentielles

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de citron et d'orange sont regroupés dans le tableau (6).

Tableau 6 : sensibilité observées chez les souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de *Citrus*.

Souches	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Citron	Orange
<i>E.coli</i>	10	8
<i>E. faecalis</i>	12	6
<i>P. aeruginosa</i>	Aucune	Aucune
<i>A. baumannii</i>	9	7

Les résultats de la mesure des zones d'inhibitions des huiles essentielles vis-à-vis les bactéries montrent que l'huile essentielle de *Citrus limon* présente une activité inhibitrice sur les souches *E.coli* (ZI=10mm), *E.faecalis* (ZI=12mm), *A.baumannii* (ZI=9mm) et aucune activité sur *P.aeruginosa* par rapport à *Citrus sinensis* qui possède une faible activité inhibitrice *E.coli* (ZI=8mm), *E.faecalis*(ZI=6,5mm), *A.baumannii*(ZI=7mm)et aucune activité sur *P.aeruginosa*. Ces résultats montrent que l'activité antibactérienne de citron est supérieur à celle de l'orange, il est aussi signaler que les résultats sont satisfaisants notamment vis-à-vis de *E.faecalis* on a constaté des grandes zones d'inhibition. Au contraire on a remarqué que les diamètres d'inhibitions d'huile d'orange est faibles.

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limon* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalol (Rodov *et al*, 1995 ; Alma *et al*, 2004 ; Bezic *et al*, 2005 ; Tepe *et al*, 2006). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (Deba *et al*, 2008). Veldhuizen *et al*. (2006) ont attribué cette activité aux composés phénoliques dont l'amphipathicité de ces composés peut expliquer leurs interactions avec les constituants membranaires et ainsi l'activité antimicrobienne.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du citron a été étudiée par plusieurs chercheurs. Ferdeş et Ungureanu (2012) ont confirmé que l'huile essentielle du citron possède une activité antimicrobienne. De même, Deb Roy *et al*. (2012) ont trouvé un diamètre de zone d'inhibition, Ce résultat concorde avec notre constat.

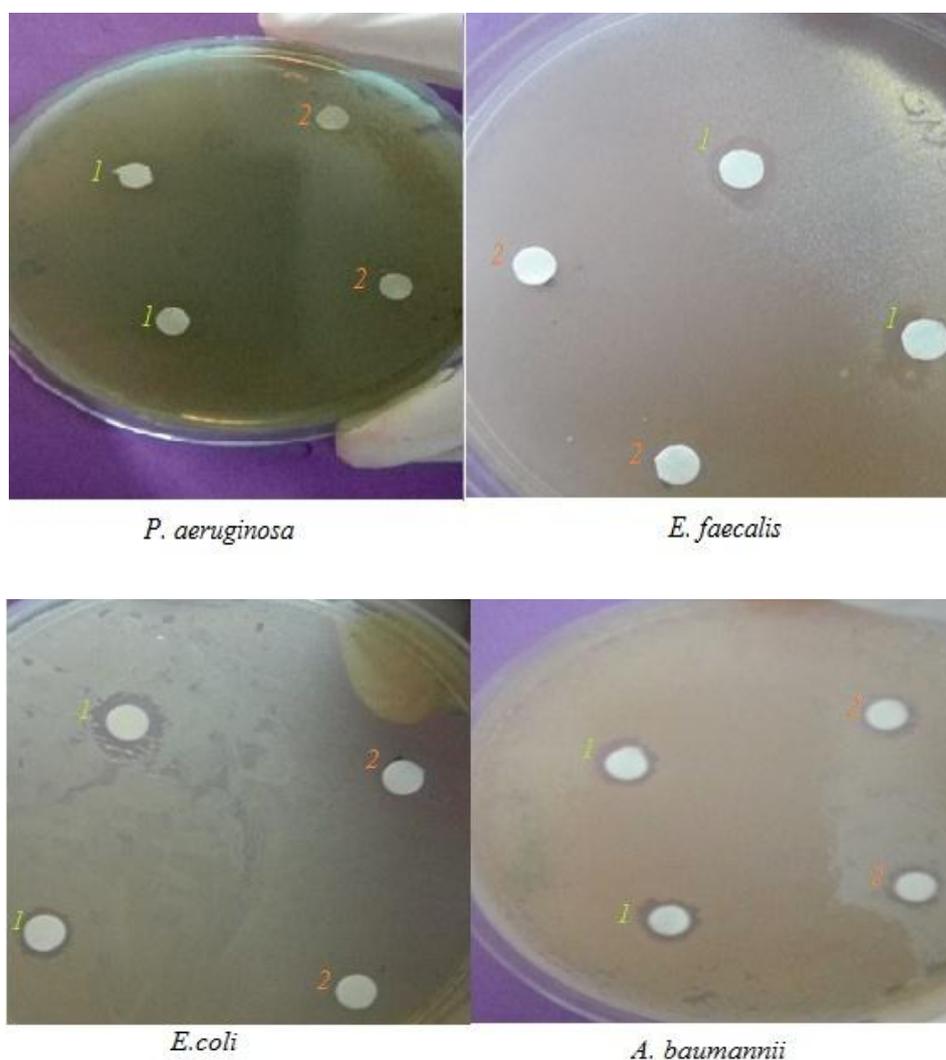


Figure 13 : Zones d'inhibitions observées chez les souches bactériennes testées sous le traitement de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* et *Citrus limon*. (1 : Citron, 2 : Orange)

2.3. Comparaison de l'activité des huiles essentielles avec des antibiotiques

Les résultats représentés dans le tableau et les figures suivantes :

Tableau 7 : diamètres d'inhibitions observées chez les souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques.

La souche	L'antibiotique	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>E.coli</i>	Imipénèm	30
<i>E. faecalis</i>	Vancomycine	23
<i>P. aeruginosa</i>	Imipénèm	27
<i>A. baumannii</i>	Tobramycine	17



P. aeruginosa



E.coli



E. faecalis



A. baumannii

Figure 14 : diamètres d'inhibitions des antibiotiques et des huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

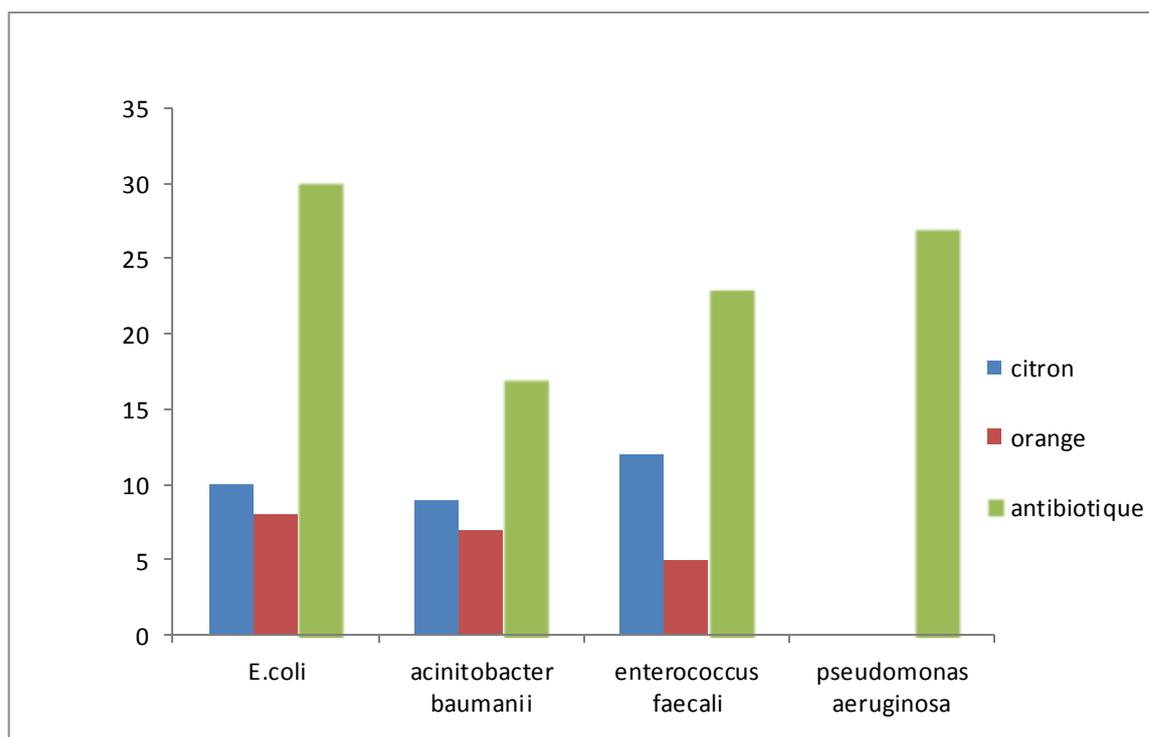
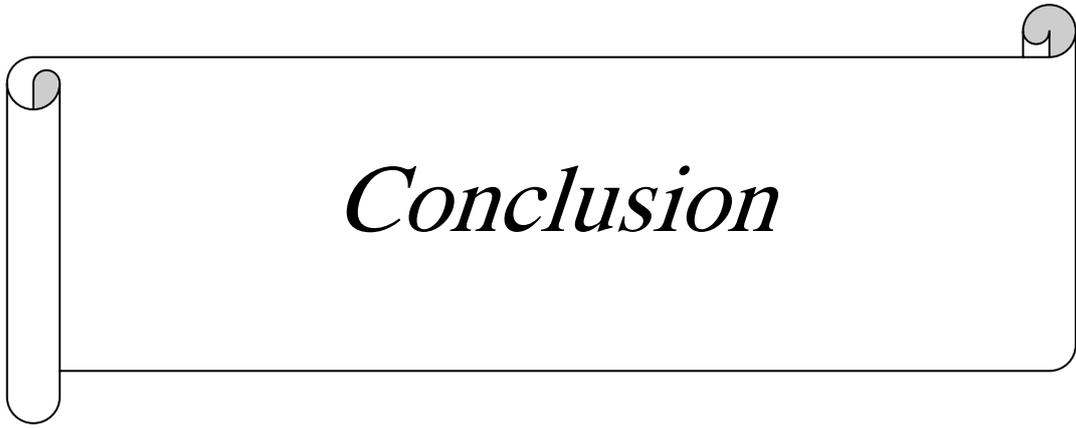


Figure 15 : Diamètres d'inhibition des antibiotiques et des huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

La figure 20 représente les diamètres d'inhibition de croissance bactérienne des deux huiles de Citrus et des antibiotiques contre les quatre souches testées. Le diamètre obtenu par méthode de détermination de sensibilité par diffusion en milieu solide (Muller Hinton) est inversement proportionnel à la concentration minimale inhibitrice du produit employé sur les souches testées, Du fait que cette méthode de diffusion en milieu gélosé génère un gradient de concentration.

L'antibiotique montre un pouvoir d'inhibition élevé par rapport aux huiles essentielles de citron et de l'orange. Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une étape essentielle de leur développement : synthèse de leur paroi, de l'ADN, des protéines, ou la production d'énergie, etc. Ce blocage se produit lorsque l'antibiotique se fixe sur sa cible, une molécule de la bactérie qui participe à l'un de ces processus métaboliques essentiels. (W. McDermott et D.E. Rogers, 1982). Donc, et après observation des diamètres d'inhibitions d'antibiotique et nos extraits, on conclue que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de citron et d'orange sur les souches testées est faible par rapport aux antibiotiques.



Conclusion

L'objectif visé par ce mémoire de fin d'étude est de valoriser l'écorce de Citronnier et d'oranger de la région de Mitidja (Tipaza), dans le domaine médical, pharmaceutique, cosmétique, alimentaire et en conservation.

L'extraction des polyphénols de la poudre d'écorce de fruit nous a révélé que les oranges sont plus riches en polyphenols que les citrons avec un rendement de 30,90%. De même pour la concentration en polyphenol qui est de 174,39mg EAG/Ms chez les oranges.

Les propriétés organoleptiques de nos huiles des deux espèces d'agrumes sont conformes aux normes AFNOR.

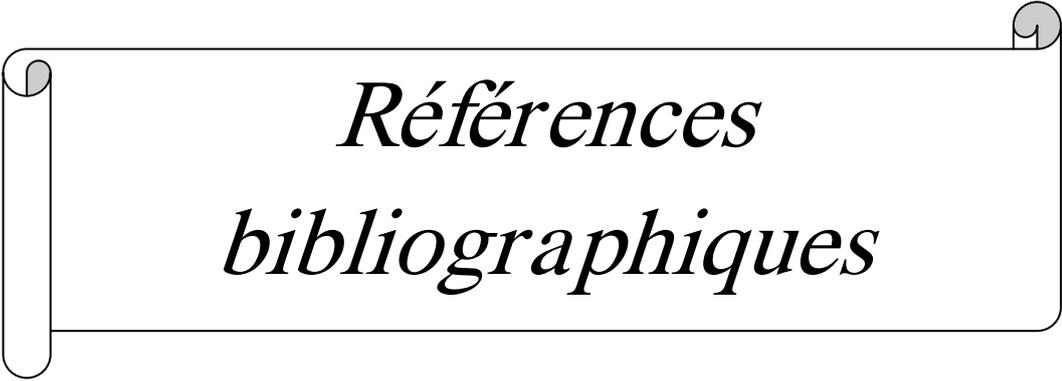
L'activité biologique précisément l'activité antibactérienne, nos huiles réagissent différemment où l'huile essentielle extraite. Celle de citronnier a montré un pouvoir antibactérien moyen avec une inhibition qui peut aller jusqu'à 12mm par rapport à l'huile d'oranger qui a une faible activité avec un diamètre de 8mm. Par contre les polyphenols des deux espèces ne possèdent aucune activité antibactérienne.

On ne peut pas, par contre, conclure que les souches testées soient sensibles (in vivo) à ces huiles essentielles, du fait que la définition clinique d'une souche sensible à un produit donné tient en compte de la pharmacocinétique et la toxicité de ce produit –in vivo- sur des modèles animaux et plus tard sur des humains. Des tests doivent être réalisés selon un Protocole rigoureux pour déterminer s'il ya ou pas une activité in vivo de ces produits en complément de travail. En perspective et dans le but de confirmer et approfondir nos résultats, il serait nécessaire également de :

-Tester d'autres méthodes d'extraction des polyphénols et des huiles essentielles et leur influence sur le rendement et la composition et la qualité chimique de ces dernières.

-Réaliser des échantillonnages de fruits durant différents stades de croissance pour étudier la variabilité des rendements en polyphénol et en huile essentielle et de l'activité biologique.

-l'évaluation de l'activité des extraits phénoliques et d'huiles essentielles sur d'autres souches.



*Références
bibliographiques*

1. **Ahmad Khan I., 2007:** Citrus genetics, breeding and biotechnology, CABI North American office, 370 P.
2. **Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., and Dorneanu V., Stanescu U.2010:** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 46-54
3. **AVRILJ-L DABERNAT H, DENIS F, MONTEIL H, 1992 :** bactériologie clinique 2^{ème} édition, Ed : ELLIPSES, ISBN : 2-7298-9218-4,585p.
4. **Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, and K.Y. 2007:** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. **12:** 607-621.
5. **Bahorun, T. (1997) :** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source D’approvisionnement potentiel. Food and agricultural resarch Council, Réduit, Mauritius. 83-94p
6. **BedouiH ; Benhammadi Z et Nacer N 2005-2006 :** Projet de résistance de Staphylococcus aureus aux antibiotiques ou secteur sanitaire de Ghardaïa. Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla P03
7. **Baser K.H.C. et Buchbauer G. 2010:** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.
8. **Belaïche, P. 1979 :** *Traité de phytothérapie et d’aromathérapie*. l’aromatogramme. Tome1. Ed. Maloine S.A., Paris,204 p.
9. **Bendriss, Houari, 2003 :** Bendriss Houari thèse de magister en génie chimique ; valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de « Ruta chalepensis, et Marrubium vulgare».
10. **BERCHE P., GAILIARD JL., SIMONET M., 1991 :** Bactériologie désinfection humaine .Ed : 10^{ème} édition. Masson. Paris. 660p
11. **Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Rio JA.** Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4505–4515.
12. **Bisignano G., Cimino F., Saija A. 2011:** Biological Activities of *Citrus* Essential Oils. In Dugo G.et Mondello L. *Citrus* Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group. pp.529-548

13. **Boukhatem M-N., Hamaidi M-S., Hakim Y., Saidi F., 2010:** extraction, composition, et propriété physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L*) cultivé dans la plain de Mitidja (Algérie). Nature et technologie, Blida; Algérie .37-38-39p.
14. **Bouterfas1,K., Mehdadi,Z, Latreche1, Aoua,L. 2014 :**pouvoir antimicrobien des flavonoides extraits des feuilles de *Marrubium vulgare L.* en provenance du mont de tessala (Algerie occidentale), Université Djillali-Liabése, Sidi Bel Abbés, Algérie, springer-Verlag France 2014.
15. **Bruneton J. 1993 :** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc,Lavoisier, Paris, pp. 91.
16. **C. Lilet ; J Bourdon ; B Toma ; N Marchal et C. Balbastre (1983) :** Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne ; Edition DOIN. PP 150-190.cie.Chebil.
17. **Choi H-S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. 2000:** Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. J. Agric. Food Chem., 48, pp. 4156-4161
18. **COCORIN N., GUERIN C., 2003 :** Valorisation chimique du végétal : les agrumes.
19. **Doulgas J.; Garvey M.C.; Croteau R., 1995:** Terpenoide metabolism, the plant cell 7, USA, 1015-1026p.
20. **Dulger B. et Gonuz A. 2004.** Antimicrobial activity of some Turkish medicinal plants. Pakistan journal of biological sciences. 7 (9): 1559-1562
21. **Dupuy A. 2010.** Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).France. 305 p.
22. **Duraffourd C., et Lapraz J.C., 2002 :** Traité de phytothérapie clinique, médecine et end biogénie, édition Masson, 827p.
23. **FAO: Food agriculture organisation, 2014**
24. **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., (2008):** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 331: 372-379.
25. **Fernandez-Gutierrez, A. (2006):** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 1220-1234.

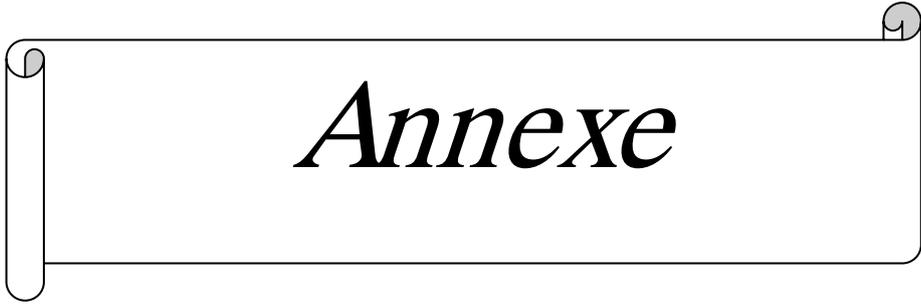
26. **Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010** : Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.
27. **Fillatre Y. 2011** : Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. *Thèse de doctorat* (volume 1), université d'Angers, France. 266 p.
28. **FINEGOLD S.M SUTTER V.L MATHISEN G.E 1983**: Normal indigenous flora: In hentges (D-J) human intestinal microflora in health and disease in Joly B, Reynaud.Ed: Academic press .A New York.pp:3-31.
29. **Floss H. G. 1997**: Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*. **14**: 433-434.
30. **Garnero J., 1985**: Abrégé de phytochimie, Edition Masson, Paris, 217.
31. **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006)** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.
32. **GUIMARAES R., BARROS L., BARREIRA J.C.M., SOUSA M. J., CARVALHO A.M. et FERREIRA I.C.F.R., 2010**: Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 48, pp: 99 –106.
33. **Grysole J. 2005** : La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique* : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162.
34. **HALOUI M., LOUEDEC L., MICHEL J.-B. et LYOUSSI B., 2000** : Experimental diuretic.
35. **Hellal Z. 2011** : Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.

36. **Hemwimon S., Pavasant P., Shotiprux A. 2007** : Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. Separation and Purification Technology, 54, pp. 44-50.
37. **Himed L. 2011** : Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine. 65 p.
38. **Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. et Legrand M. 2004**. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate Hydroxycinnamoyltransferase affects phénylpropanoide biosynthesis. Plant cell. **16** (6): 1446-1465.
39. **HENDRIX C.M. et REDD J.B., 1995**: Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In: Ashurst, P.R., 1995: Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.
40. **Jacquemond C., Agostini D., et Curk F, 2009** : Des agrumes pour CEVITAL (Algérie), BIHA. Bureau d'ingénierie en horticulture et agro-indusrie, Alger, 101p
41. **JOLY B., REYNAUD A.2003** : Entérobactéries : systématiques et méthodes de diagnostic .Ed TEC and DOC .paris .pp356-366-369
42. **Kaufmann B. et Christen P. 2002** : Recent extraction techniques for natural products: Microwaveassisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.*, 13, pp.105-113.
43. **Kening Y., Vincenzo D. L. et Normand B., 1995**. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phénylpropanoide pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. The plant cell. **7**: 1787-1799.
44. **Loussert R., 1989**: Les agrumes, volume 2, production, Edit. Lavoisier, Paris, 157p.
45. **Loussert R., 1989** : Les agrumes 1, Arboriculture, Edit. Lavoisier, Paris. 113p.
46. **Lesley B. 1996** : Plantes médicinales et aromatiques. Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61.
47. **Lucchesi M.E. 2005**) : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat* en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.143p.
48. **MABBERLEY D.J., 1997**: A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea* Vol.7 (2) pp: 167 – 172.

49. **MABBERLEY D.J., 2008:** Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications and uses, third edition. Cambridge University Press. 1040 p.
50. **Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C.** 2005. Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses Polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
51. **Madjdoub, f ., 1996 :** biologie de l'aleurode floconneux, *aleurothrixus floccosus* maskell (homoptrea, aleurodidae) dans un verger d, agrumes de la région de Draa ben khedda (Tizi-Ouzou).mémoire magister : biologie et écologie des populations : université mouloud mammeri tizi ouzou 73 p
52. **Mailhbiau P., 1994 :** La nouvelle aromathérapie, caractérologie des essences et tempéraments humains, 2éme édition Jakin, Paris. 635p.
53. **Martin S., Andriantsitohaina R., (2002) :** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéologie. **51:**304-315
54. **Mohamed amine Ferhat, Brahim Yousef meklati, Farid chemat ., 2010 :** citrus d'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions. 5p
55. **Mil pieds H., 2008 :** Progrès en dermato-allergologie, Edit GERDA, Bordeaux, 392.
56. **Ministère d'agriculture algérienne 2006**
57. **Murray BE.1990:** The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev; 3:46-65.
58. **NAUCIEL C, VILDE J-L ., 2001 :** Bactériologie médicale connaissance et pratique, édition : Masson, ISBN : 2-294-00428-0, 276p.
59. **NIEPCERON E ., 2012 :** Module bactériologie Etude de bactérie non exigeantes streptococcus pneumoniae FAM -2 FICHE -4 ©Fondation Mérieux
60. **Olympiade de la chimie l'ENS Lyon, SD.**
61. **Padrini F., Lucheroni M. T. 1996 :** Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris, pp.11, 15, 61 et 111.
62. **Parekh J. et Chanda S. V.** 2007. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.* **31:** 53-58.
63. **PEYRON L., 2002:** Production of bitter orange neroli and petitgrain oils. Cité In Dugo G. And Di Giacomo A., 2002: Citrus, the Genus Citrus. Edition Taylor and Francis. 642 p.

64. **Pingot A. 1998** : Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp. 230-236
65. **Piochon M. 2008** : Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. *Thèse de doctorat*. Université du Québec, pp. 5-9
66. **Rachel de la Roque, Olivier de la Roque, 1996-2001** : Encyclopedia of Medicinal Plants, 2nd Edition Dorling Kindersey limited, Londre
67. **Raymond Loussert., 1987** : Les agrumes
68. **Robert A. et Lobstein A., 2005** : Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
69. **ROMAIN A., PREVOT 1977** : Notion élémentaire .1ère Ed : presse universitaire de France à vendome .pp 132-135.
70. **Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A. et Jordán M. J. 2008.**
71. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* an *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control.*, **19** : 681-687.
72. **Roux D., Cartier O., 2007** : Cahier du préparateur en pharmacie, botanique, pharmacognosie, et phytothérapie, Tome 3, Edit Wolters Khumer, paris, 141p.
73. **Roux D. 2008** : *Conseil en aromathérapie*. 2ème Ed. Pro-Officina., 187 p.
74. **Sallé J., 1991** : les huiles essentielles. Edition Frison-Roche.Paris, 166p
75. **Sarni-Manchado P. et Cheynier V. 2006** : Les polyphénols en agroalimentaire. Ed a. Lavoisier. p2- 10.
76. **SHU G.J., DIANXIANG Z et MABBERLEY D.J., 2008**: Citrus Linnaeus, Sp. Pl. 2 : 782. 1753. Fl. China, Vol. 11, pp : 90 – 96.
77. **Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996**: biology of citrus. 1ere edition; Edition Cambridge University Press. 239 p)
78. **Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. (2007)**
a. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* (in press).
79. **Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M.** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 104 (2007) 466-479.
80. **Urquiaga I. et Leighton F. 2000.** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress.
a. *Biological Research.* **33** (2) : 55-64.

81. **Van Ee S., 2008:** La culture fruitière dans les zones tropicales, Wageningen, Pays-Bas. 3èmes édition, France, 203p.
82. **WEBBER H.J., REUTHER W. et BATCHELOR L.D., 1967:** The citrus Industry, volume 1: History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California Press.



Annexe



Matériel

Tableau 8 : les appareils et verreries et les produits chimiques que nous avons utilisé au cours de notre expérimentation.

Appareillage	Verrerie	Réactif et milieu de culture et accessoires
<ul style="list-style-type: none"> • Balance de précision • Etuve 37°C • Rota vapeur • Spectrophotomètre UV visible • Réfrigérateur (4°C) • Bec benzène • Autoclave 	<ul style="list-style-type: none"> • Becher 40 ml • Ballon 250 ml et 500 ml • Flacons en verre • Entonnoir en verre • Cuvette de spectrophotomètre en verre • Tube à essai • Micropipette • Pipette pasteur • Portoir • Boite de pétri 	<p>1 : Réactifs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Méthanol • Acide gallique • Hexane • Eau distillé • Eau physiologique • Folin Ciocalteu <p>2 : Milieu de culture</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muller Hinton <p>3 : Accessoires</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ecouvillon • Etiquette • Gants • Papier aluminium • Pince stérile • Seringue • Papier filtre • Spatule

Tableau 9 : composition chimique de milieu de culture

Milieu de culture	Muller Hinton
Composition	<ul style="list-style-type: none">• infusion de viande de bœuf : 300,0 ml• peptone de caséine : 17,5 g• amidon de maïs : 1,5 g• agar : 17,0 g• pH = 7,4

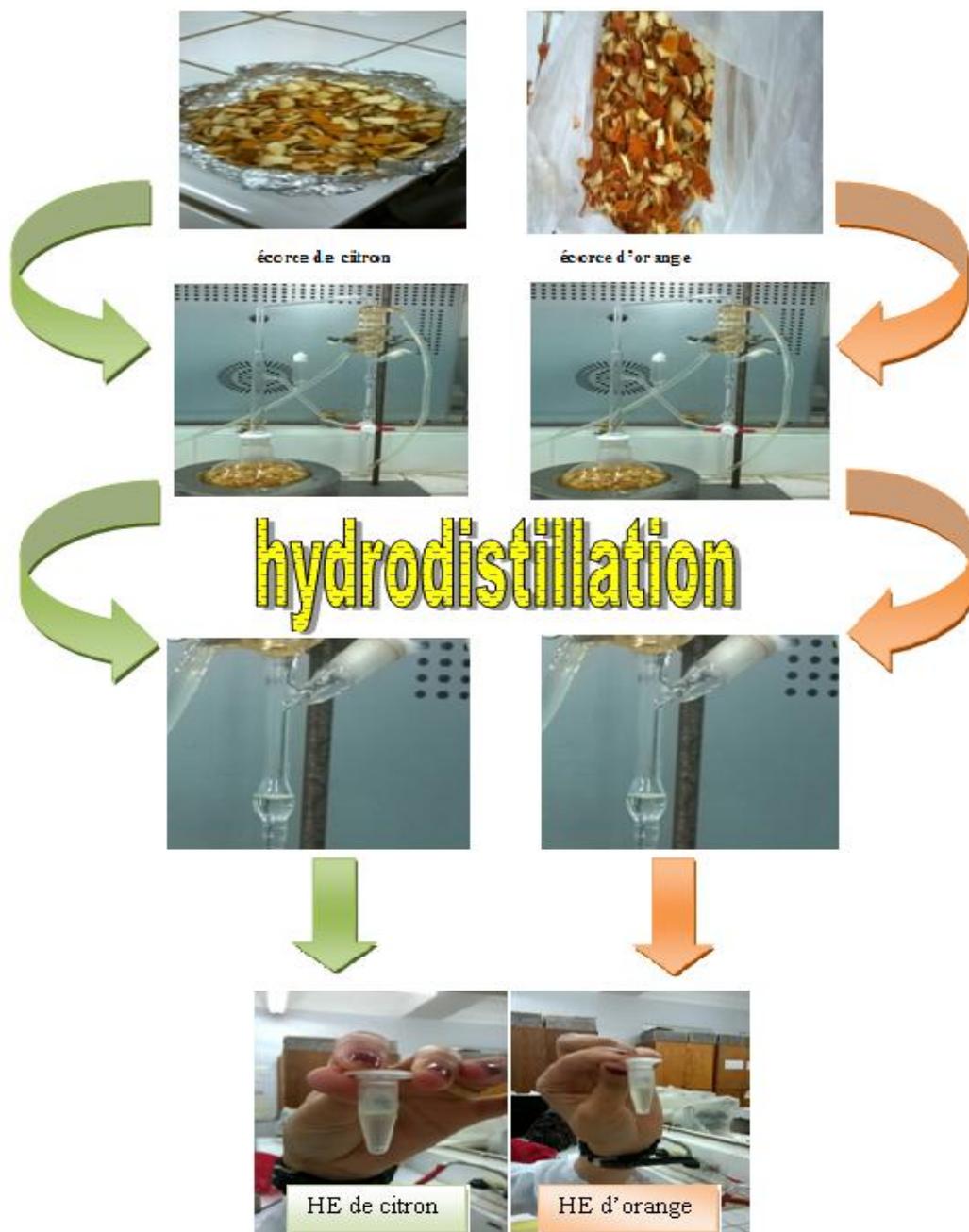


Figure 06 : Protocol d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .

Tableau 10 : Généralités sur les antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Définitions
<p>Tobramycine (Tazi A, Bricaire F, 2007)</p>	<p>La tobramycine est un antibiotique de la famille des aminosides produit à partir du <i>Streptomyces tenebrarius</i>. Son activité bactéricide est basée principalement sur l'inhibition de la synthèse des protéines, altérant ainsi la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la rupture progressive de l'enveloppe cellulaire puis éventuellement la mort de la cellule. La tobramycine se lie avec la sous-unité 30S des ribosomes bactériens et bloque la première étape de la synthèse protéique, à savoir l'initiation. Elle possède une action bactéricide à des concentrations égales ou légèrement supérieures aux concentrations inhibitrices.</p> <p>Les espèces sensibles de la vancomycine sont des aérobie de gram-tel qu'acinetobacter, Acinetobacter baumannii,...et d'autre aérobie de gram + sont résistantes tel entérocoques, Nocardia astéroïdes, staphylococcus méti-R, streptococcus</p>
<p>La vancomycine (Boutten, 2010)</p>	<p>La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides. elle a été découverte en 1956 par Eli Lilly à partir d'une culture de <i>Streptomyces Orientalis</i>. La vancomycine est bactéricide mais cette bactéricide est lente à apparaître ; sa biodisponibilité par voie orale est négligeable, la voie intraveineuse s'impose donc dans toutes les indications sauf une, le traitement per os de la colite pseudomembraneuse. La Vancomycine exerce donc son action uniquement sur les Gram positifs tel le <i>Staphylococcus aureus</i> ou les staphylocoques à coagulase négative et de streptocoques, et les entérocoques. Qu'on peut toutefois rencontrer en clinique humaine des souches d'entérocoques (surtout chez <i>E faecium</i>) résistant aux glycopeptides).</p>
<p>Imipenème</p>	<p>L'ampicilline est un antibiotique à spectre large de la classe des bêta-lactamines agissant sur les bactéries Gram-positives et sur certaines bactéries Gram-négatives. Elle est largement utilisée pour</p>

<p>(OMS, 2015)</p>	<p>traiter les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, la méningite bactérienne, les salmonelloses et l'endocardite. Elle est également employée dans le traitement des infections aux streptocoques B chez les nouveau-nés.</p> <p>L'ampicilline est une molécule hémisynthétique découverte en 1961. Cet antibiotique fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé. Il agit en inhibant la troisième et dernière étape de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, conduisant ainsi à la lyse cellulaire. La molécule est en général bien tolérée, excepté pour les personnes allergiques à la pénicilline.</p>
--------------------	---

Annexe 3: Détermination de la concentration en polyphénol en mg d'EAG/g de matière sèche (extrait)

$$C = \frac{c \text{ (mg/ml)} \times 10}{(m - m_0)}$$

10 : 10ml d'eau distillée utilisé pour solubiliser l'extrait

C (mg/ml) ×10 : quantité de polyphénol extraite

(m – m0) : masse d'extrait (matière sèche)

1-Détermination du facteur α : on sélectionne deux points

$$\alpha = \frac{Do(250) - Do(100)}{250 - 100} = 0.006$$

Donc : Do citron = Do blanc + α c citron

$$C \text{ citron} = \frac{Do \text{ citron} - Do \text{ blanc}}{\alpha} = \frac{1.05 - 0.37}{0.006} = 113.33 \text{ mg/ml}$$

$$C \text{ orange} = \frac{Do \text{ orange} - Do \text{ blanc}}{\alpha} = \frac{1.34 - 0.37}{0.006} = 161.66 \text{ mg/ml}$$

2-Détermination de la concentration en mg d'EAG /g de matière sèche extraite

$$C \text{ citron} = \frac{c \text{ mg/ml} \times 10}{m - m_0} = \frac{113.33 \times 10}{6.62} = 171.19 \text{ mgEAG/g de matière sèche}$$

$$C \text{ orange} = \frac{161.66 \times 10}{9.27} = 174.39 \text{ mgEAG/g de matière sèche}$$

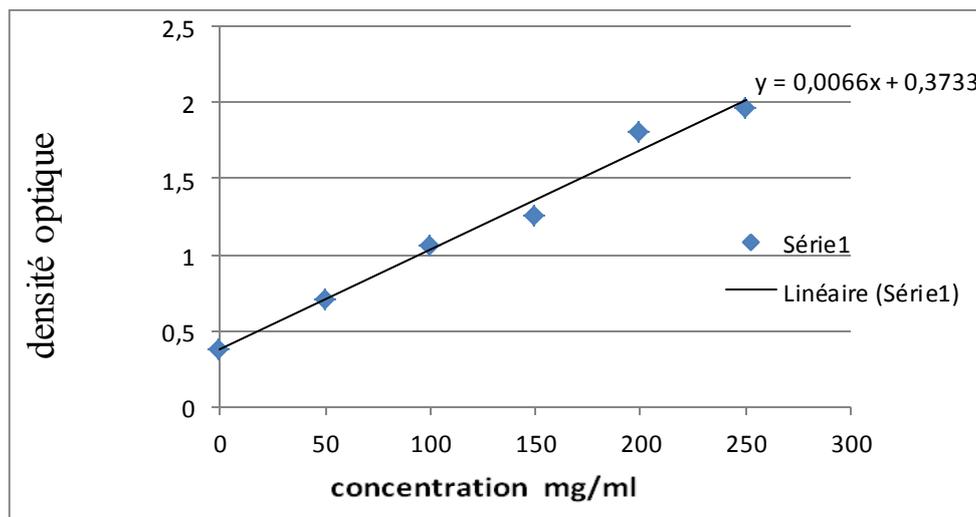


Figure 16 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux

Les résultats des analyses quantitatives en composés phénoliques des extraits des écorces de deux espèces de *Citrus*. Sont rapporté dans le tableau (3)

Tableau 3 : Les teneurs en polyphénols totaux des deux espèces de Citrus.

Les espèces	<i>Citrus limon</i>	<i>Citrus sinensis</i>
Teneur en polyphénols mg EAG/g Ms	171,19	174,39

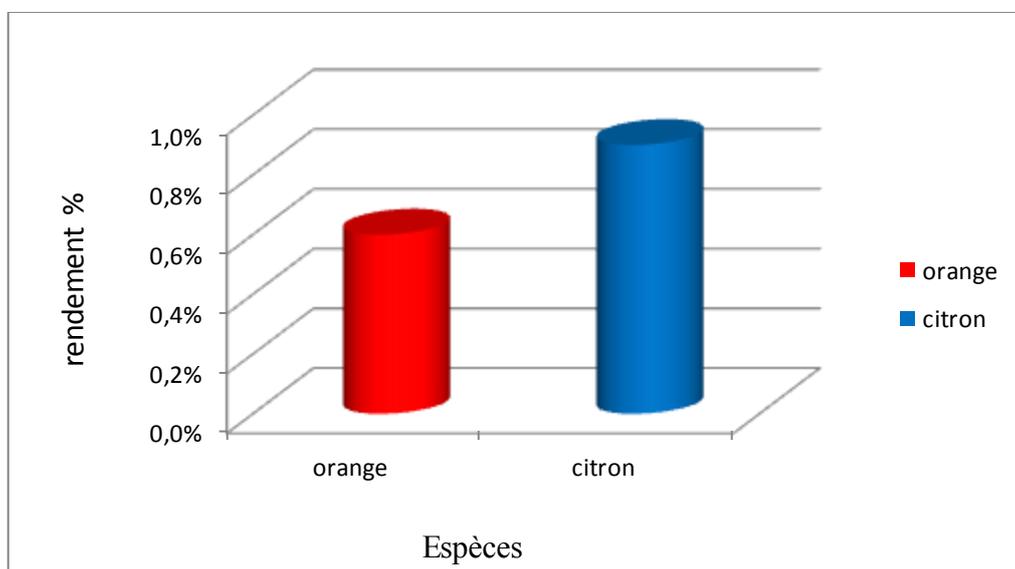


Figure 10 : Rendement en huiles essentielles des écorces