

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA1



Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie

Mémoire

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master

Option : Biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales et des produits naturels

Thème

Caractérisation chimique des flavonoïdes d'écorces de fruits de *Citrus Clementina* et évaluation de leur activité antimicrobienne.

Présenté par :

Le : 14/09/2015

M^{elle} ALLAB Hadjer

M^{me} BENALLEL Kawter

Devant le jury :

M ^{me} HOUMANI Z.	Pr	U. BLIDA1	Présidente
M ^{me} MOUMENE S.	M.A.A	U. BLIDA1	Examinatrice
M ^{me} HAMICHE A.	M.C.B	U. BLIDA1	Examinatrice
M ^{me} BELGUENDOZ R.	M.C.B	U. BLIDA1	Promotrice

Promotion : 2014/2015

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à toutes les personnes qui nous ont aidées à l'accomplissement de ce mémoire.

Toutes nos profondes gratitudee à M^{me} BELGUENDOZ. R. Maître de conférences à l'université Saad DAHLEB de Blida pour son dévouement incomparable, son encadrement et pour la confiance qu'elle m'a accordé pour mener à bien ce travail.

Nous remercions vivement M^{me} Houmani Z. Professeure à l'Université Blida -1- d'avoir accepté de présider le jury.

Il nous est agréable d'exprimer nos sincères remerciements à M^{me} Moumen S. Maître assistante A à l'Université Blida -1-, et M^{me} Hamich. Maître de conférences à l'Université Blida -1- de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail et participer au jury.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos enseignants, qui nous ont formé et encadré durant tout le cursus universitaire.

Nous ne pouvons pas oublier de présenter nos remerciement et reconnaissance à tous les personnel administratif et technique du groupe SAIDAL, FILAÏLE ANTIBIOTICAT et les ingénieurs du laboratoire de recherche BPAM, pour leur encadrement, soutien et encouragements durant la réalisation de la partie expérimentale.

Cette liste de remerciements n'est pas exhaustive, que tous ceux avec lesquels nous avons interagi lors de ce travail, sans toutefois les avoir cités ci-dessus, sachent que leur contribution à la réalisation de ce mémoire a été grandement appréciée.



Dédicace



Au Bon Dieu qui nous a donné foi, santé et le courage de mener ce travail ;

Je dédie ce modeste travail :

Aux lumières qui ont toujours éclairées mon chemin Aux sources de mon énergie

A ceux que J'ai le plus chers au monde :

Ma mère et mon père

De m'avoir si bien éduqué et enseigner pour arriver à ce jour et surtout le soutien moral, je tiens à leur dire aussi que je ne pourrais qu'être fier d'eux,

*A ma Adorable Frères: **Hamza**. Et bien sur à mes chères sœurs **Nabila, Samia, Soumia, Khadîdja**. Vous étiez toujours à mes côtés. Je ne pourrai jamais imaginer ma vie sans vous. Que dieu vous garde, vous protège et vous offre une vie pleine de bonheur et de succès ! Que vous trouviez dans ce travail mes vifs sentiments d'amour et d'affection*

*A mon binôme **Kawter**, avec la quelle j'ai partagé les meilleurs moments de vie*

*Mes amis : **Meriem, Sabrina, zahiya, Soumia, Zakariya**, qui m'ont toujours aidé et encouragé, que dieu les protège en témoignage de ma profonde gratitude et, reconnaissance.*

Toute la promotion master 2 Biotechnologie des plants aromatiques et médicinal 2015.

A toutes les personnes qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Hadjer

Dédicace

Je dédie ce travail en signe de respect et de connaissances :

A. la lumière de ma vie, mes très chère parents « Omar et Sihem » lui ont toujours été a mes cotes, qui m'ont soutenue et encouragé et qui sans leur amour et leur compréhension, leur conseil et leur tolérance ; je n'ai jamais au atteindre mes objectifs.

Ma mère, mon père je vous dis merci et qui dieu vous protège pour nous.

A ma très chère sœur : Hadjer.

Mes très chers frères : Yasser et Abd el malek,

Mon marie : Menaouer.

A tous mes amis surtout : Lamia

A tous mes enseignants de puis la primaire jusqu'au l'université.

Tous les étudiants de biotechnologie des plantes médicinales et aromatique 2014-2015.

Ḳawter

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana <i>et al.</i> , 2001 et Erdman <i>et al.</i> , 2007)	13
Tableau 2 : Les microorganismes testés.....	21
Tableau 3: Les conditions de H.P.L.C (laboratoire physico-chimique (Saidal).....	34
Tableau 4 : Le gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification de l'extrait flavonoïde di et tri glycoside (laboratoire physico-chimique (Saidal).....	34
Tableaux 5 : Les conditions de H.P.L.C (laboratoire BPAM)	35
Tableau 6 : Le gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification de l'extrait flavonoïde di et tri glycoside (laboratoire BPAM).....	35
Tableau 7: Détermination du taux d'humidité	40
Tableau 8 : Analyse de variance par le teste GLM de l'humidité	Annexe 3
Tableau 9: Résultat de test phytochimique appliqué sur la poudre de l'écorce de <i>Citrus Clementina</i>	43
Tableau 10 : Rendements de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) de 12 échantillons	Annexe 3
Tableau 11 : Analyse de variance par le teste GLM pour le rendement des extraite	Annexe 3
Tableaux 12: Les valeurs de Ph (potentiel d'hydrogène).....	Annexe 3
Tableau 13 : Analyse de variance par le teste GLM pour le Ph.....	Annexe 3
Tableaux 14: Tenure des extraits en quercétine.....	Annexe 3
Tableau 15: Analyse de variance par le teste GLM de teneur des extraits en quercétine.....	Annexe 3
Tableau 16 : Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des extraits aqueux. Pour le mélange (1).....	55
Tableau 17 : Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des standards dans le mélange (1).....	56
Tableau 18 : Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des extraits aqueux. Pour le mélange (2)... ;.....	57
Tableau 19: Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des standards. Pour le mélange (2).....	57

Tableau 20 : Le résultat d'analyse par HPLC	59
Tableau 21: Le résultat d'analyse par HPLC.....	annexe 3
Tableau 22 : Principaux composés majoritaires contenus dans l'extrait d'épicarpe de <i>Citrus Clementina</i> en fonction du temps de rétention.....	62
Tableau 23: Diamètres des zones d'inhibition (<i>E.Coli</i>) obtenues par l'extrait de <i>Citrus Clementina</i>	annexe 3
Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibition (<i>Staphylococcus aureus</i>) obtenues par l'extrait de <i>Citrus Clementina</i>	annexe 3
Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibition (<i>Sarcinalutea</i>) obtenues par l'extrait de <i>Citrus Clementina</i>	annexe 3
Tableau 26: Diamètres des zones d'inhibition (<i>Bacillus subtilus</i>) obtenues par l'extrait de <i>Citrus Clementina</i>	annexe 3
Tableau 27: Diamètres des zones d'inhibition (<i>Candida albicans</i>) obtenues par l'extrait de <i>Citrus Clementina</i>	annexe 3
Tableau 28 : Le CMI	71

Liste des figures

Figure 1 : Origine géographique et diffusion des agrumes dans le monde (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).....	4
Figure 2 : Caractéristiques morphologiques d'un <i>Citrus</i> (Swingle et Reece, 1967)...	5
Figure 3 : Fruit de Clémentinier (Colombo ,2004).....	9
Figure.4. Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).....	12
Figure.5. Schéma simplifié des flavonoïdes (Dacosta, 2003).....	12
Figure.6. Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Milane, 2004).....	15
Figure 7 : Fruit non infesté au stade immature ;;	20
Figure 8: Fruit infesté au stade immature.....	20
Figure 9: La poudre de <i>Citrus Clementina</i>	21
Figure 10: Protocole d'extraction des flavonoïdes (Markham, 1982).....	25
Figure 11 : Le PH mètre.....	27
Figure 12: Méthode de dilution de la quercétine.....	28
Figure 13: Plaque de CCM.....	32
Figure 14 : L'appareillage de H.P.L.C.....	33
Figure 15: Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).....	34
Figure16: <i>Parlatoriaziziphi</i> (a) <i>Aonideillaaurantii</i> (c) sur fruit et (b,d) observées par une loupe binoculaire (Gr : 10×).....	38
Figure 18 : Analyse de variance de l'humidité.....	40
Figure 19 : Les quatre phases d'extraits	42
Figure 20 : Variation du Rendement de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) selon l'état sanitaire du fruit non et de l'arbre.....	43
Figure 21 : Variation du Rendement de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) selon l'état sanitaire de l'arbre et du fruit.....	44

Figure 22 : Variation du Rendement de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) selon l'état sanitaire de l'arbre et du fruit.....	45
Figure 23 : Analyse de la variance par le test GLM pour le rendement en extraits flavonoïdes	48
Figure 24 : Analyse de variance de Ph.....	51
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de quercétine	Annexe 2
Figure 26 : Tenure des extraits en composés flavonoïdes selon les facteurs étudiés...	49
Figure 27 : Analyse de variance de teneur en flavonoïdes	51
Figure 28 : Chromatographie analytique sur couche mince d'extrait aqueux de l'écorce de <i>Citrus Clementina</i> et les standards avec le mélange de solvants (1).....	52
Figure 29 :Chromatographie analytique sur couche mince d'extrait aqueux de l'épisperme de <i>Citrus Clementina</i> et les standards avec le mélange de solvants (2)....	53
Figure 30 : Profil chromatographique des flavonoïdes aglycones de <i>Citrus Clementina</i> dans la plante détectée par HPLC à 365nm.....	55
Figure 31 : Profil chromatographique de quercétine présent dans la plante détectée par HPLC à 365nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 32 : Profil chromatographique de rutine présent dans la plante détectée par HPLC à 365nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 33 : Profil chromatographique d'acide ascorbique présent dans la plante détectée par HPLC À A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 34 : Profil chromatographique d'acide tannique présent dans la plante détectée par HPLC À A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 35 : Profil chromatographique d'acide salicylique présent dans la plante détectée par HPLC À A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élutio.....	Annexe 2
Figure 36 : Profil chromatographique de catéchine présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 37 : Profil chromatographique d'acide coumarique présent dans la plante détectée par HPLC À A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 38 : Profil chromatographique d'acide gallique présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 39 : Profil chromatographique de phénol présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2

Figure 40 : Profil chromatographique de quercétine présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 41 : Profil chromatographique de rutine présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution.....	Annexe 2
Figure 42 : Profil chromatographique des flavonoïdes très polaire présent dans la plante détectée par HPLC à trois longueur d'onde 270 / 320/ 370 nm en mode d'élution.....	60
Figure 43 : Diamètres des zones d'inhibition (<i>E.Coli</i>) obtenues par les extraits de <i>Citrus Clementina</i>	61
Figure 44 : Diamètres des zones d'inhibition (<i>Staphylococcus aureus</i>) obtenues par les extraits de <i>Citrus Clementina</i> ... ::.....	62
Figure 45 : Diamètres des zones d'inhibition (<i>Sarcina lutea</i>) obtenues par les extrait sde <i>Citrus Clementina</i>	63
Figure 46 : Diamètres des zones d'inhibition (<i>Bacillus subtilus</i>) obtenues par les extraits de <i>Citrus Clementina</i>	64
Figure 47 : Diamètres des zones d'inhibition (<i>Candida albicans</i>) obtenues par les extraits de <i>Citrus Clementina</i>	65
Figure 48 : Résultats de teste d'antibiogramme des extraits de <i>Citrus Clementina</i>	66
Figure 49 : Résultat de CMI pour l'extrait flavonoïdes di et tri glycosides qui est un effet antibactérien sur la souche <i>Staphylococcus aureuse</i>	67

Résumé

Notre travail porte sur la composition chimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des composés flavonoïdes des écorces de fruits de *Citrus Clementina* selon l'âge de l'arbre, l'état sanitaire du fruit et de l'arbre, et la période phénologique.

Le teste phytochimique a mis en évidence la présence de flavonoïdes dans nos extraits. Cette richesse est confirmé par des rendements en flavonoïdes très polaire (45%), Flavonoïdes di et tri glycosides(10,26%), Flavonoïdes mono glycoside(5,63%) et flavonoïdes aglycones(3,43%).

L'analyse physico-chimique des extraits de *Citrus Clementina* montre que le PH de nos extraits est acide, ce qui favorise l'inhibition de la croissance microbienne. Les concentrations des composés flavonoïdes obtenus sont relativement importants dans leur majorité, la teneur en flavonoïdes di et tri glycoside est de 109,05 mg/ml, de flavonoïdes mono glycoside est de 101,72 de flavonoïdes aglycone est de mg/ml, 98,46 mg/ml et enfin de flavonoïdes très polaire avec 46,28 mg/ml. L'analyse qualitative des extraits aqueux par chromatographie sur couche mince (CCM) révèle la présence de la rutine, l'acide ascorbique et l'acide caféique. L'analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'extrait de flavonoïdes di et tri glycoside, de l'échantillon issu d'arbres non infecté portant des fruits mature non infecté, a révélé la présence de la quercétine par HPLC (Shimadzu) et l'acide ascorbique, quercétine et catéchine par HPLC (Agilent 1260). Le test de control biologique effectué dans ce travail par les composés flavonoïdes d'épicarpe de *Citrus Clementina*, ont montré que les souches *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, d'*Escherichia coli*, *Bacillus subtilus*, *Candida albicans* sont relativement sensibles à l'extrait de flavonoïdes aglycones, de flavonoïdes mono glycoside et de flavonoïdes di et tri glycosides, par contre les flavonoïdes très polaires montre une action inhibitrice uniquement sur le bacillus subtilus. La concentration minimale inhibitrice (CMI), étudiée pour la souche de *S. aureus*, est de 0.07 g/ ml.

Mots clés : *Citrus Clementina*, Ecorces de fruits, flavonoïdes, composition chimique (HPLC, CCM).Activité antibactérienne.

Abstract

Our work focuses on the chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of flavonoids compounds of the barks of fruits of Citrus according to the age of the tree, the health state of the fruit and the tree, and the phénologique period.

The phytochemical screening showed the presence of flavonoids. This richness is confirmed by yields ranging from 45%, 10.26%, 5.63%, 3.43% successively for very polar flavonoids, di- and tri Flavonoids glycosides, flavonoids mono glycoside flavonoid aglycones.

The physic-chemical analysis of extracts from *Citrus Clementina* shows that the PH of our extracts is acidic, which promotes the inhibition of microbial growth. The concentrations of flavonoids compounds are relatively large in their majority, the flavonoid contents were 109.05 mg / ml in the extract of di and tri glycoside flavonoids monitoring of those mono glycoside flavonoids extracted with 101.72 mg / ml respectively, 98.46 mg / ml in flavonoid aglycone extract and finally the very polar flavonoids extracted with 46.28 mg / ml. Qualitative analysis by thin layer chromatography on the aqueous extracts shows the presence of rutin, ascorbic acid and caffeic acid.

L' qualitative analysis by liquid chromatography with high performance of the extract of flavonods di and tri glycoside of the existent sample of existent healthy orchard trees bearing old fruit healthy mature fruiting stage, revealed the presence of the quercitine by HPLC Shimadzu and ascorbic acid, quercitine and catechine by HPLC1260 Agilent.

Biological control tests carried out in this by the flavonoids compounds of apocarps of *Citrus Clementina*, showed that stocks *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Yeast albicans* are comparatively sensitive to the extract of flavonoids aglycones, flavonoid mono glycoside and di and tri flavonoid glycosides, on the contrary the very polar flavonoids show an inhibitive action only on *Bacillus subtilis*. The minimum inhibitory concentration (MIC), designed for the strain of *S. aureus*, is 0.07 g / ml.

Key words: *Citrus Clementina*, Barks of fruits, flavonods, chemical composition .Antimicrobial activity.

يركز عملنا على التركيب الكيميائي وتقييم نشاط مضادات الميكروبات كبات الفلافونويد من قشر حمضيات كليمنتينا¹ ر الشجرة، والحالة الصحية للثمرة الفيزيولوجية

أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود مركبات الفلافونويد. ويؤكد هذا الثراء من خلال عوائد تتراوح بين 45 10.26 5.63 3.43 لفلافونويد القطبية جدا، جليكوسيدات فلافونويد البروميد وثلاثي، الفلافونويد أحادية غليكوزيدات، و فلافونويد.

وتظهر التحاليل الفيزيائية والكيميائية لـ من حمضيات الكليمنتينا مكانية الهيدروجين ph أنها حمضية، وهذا يساعد على تثبيط نمو الميكروبات. تركيزات الفونويد مهمة نسبيا في المستخرجات، محتويات الفلافونويد هي 109,05 /مل في مستخرج الفلافونويدات غليكوزيد دي وثلاثي يليها مستخرج الفلافونويد أحادية غليكوزيدات ب 101,72 / 98,46، فلافونويد وأخيراً مستخرج الفلافونويد القطبية جدا 46,28 / . التحليل النوعي بالنزوح الشاردي على مستخلصات المائية يكشف عن وجود روتين، حمض الاسكوربيك وحمض الكافيك

التحليل النوعي من كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء لمستخرج من الفلافونويدات غليكوزيد ثنائي وثلاثي من العينة المستخرجة من شجرة سليمة ذات ثمرة سليمة ، كشفت عن وجود كرسيتين بواسطة شيماردو ، وحمض الأسكوربيك، والكاتيشين والكارسيتين بواسطة 1260 اجيلنت. خنبارات المكافحة البيولوجية التي أجريت في هذا العمل من قبل مركبات الفلافونويد لقشرة الثمرة من حمضيات الكليمنتينا أظهرت أن *Sarcinalutea, Staphylococcus aureus, dEscherichia coli, Bacillus subtilus, Candida albicans* حساسة نسبيا لمستخرجات ، جليكوسيدات فلافونويد البروميد وثلاثي، الفلافونويد أحادية غليكوزيدات، و فلافونويد، اما الفلافونويد القطبية جدا اظهرت تأثير كبح فقط على *Bacillus subtilus*

التركيز الأدنى المثبط المدروس على سلالة *Staphylococcus aureus* هو 0.07 /

مفتاح الكلمات: حمضيات كليمنتينا، قشر الثمرة ، الفلافونويد، والتركيب الكيميائي ،

SOMMAIRE

Dédicace

Remerciement

Sommaire

Résumés (français, anglais, arabe)

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

PARTIE DE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ETUDE DE LA PLANTE

1- les agrumes.....	3
1-1 Origine, histoire et distribution géographique	3
1-2 Description botanique.....	4
1-3 Taxonomie.....	5
1-4 Ecologie des agrumes	6
2- Clémentinier.....	6
2-1 Historique	6
2-2 Description botanique	7
2-3 Classification et systématique	7
2-4 Le cycle végétatif de clémentine	8
2-5 Problème phytosanitaire	10

CHAPITRE II : LES COMPOSES PHENOLIQUES

1- Généralité	11
2- Biosynthèse des composés phénoliques.....	11
3- Classification	11
3-1- Les flavonoïdes	11
3-1-1- Généralités	11
3-1-2- Structure chimique	12
3-1-3- Classification.....	13
3-1-4- Propriétés physico-chimiques	14
3-1-5- Biosynthèse des flavonoïdes	14
3-1-6- Localisation et distribution des flavonoïdes.. ..	16
3-1-7 L'activité biologiques des flavonoïdes	16
4- Les souches microbiennes utilisées	17

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES

1- Lieu et durée de stage.....	19
2- Matériels.....	19
2-1- Matériel non biologique.....	19
2-2- Matériel biologique.....	20
2-2-1- Matériel végétal.....	20
2.2.1.1 Identification des maladies	20
2-2-2- Matériel microbiologique	20
3- Méthodes d'étude	21
3-1- Préparation du matériel végétale.....	21
3-2- Détermination du taux d'humidité.....	22
3-3- Tests phytochimique preliminaries (screening chimique)	22
3-4- Extraction des flavonoïdes	23
a. Macération et évaporation.....	23
b.Extraction liquide liquide.....	23
3-5 Calcul du rendement des extraits.....	26
3-6 Le potentiel d'hydrogène des extraits de flavonoïde	26
3-7 Méthodes de caractérisation chimique.....	27
3-7-1 Analyse quantitative par Spectrophotométrie UV/Visible.....	27
3-7-2 Analyse par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)	29
3-7-3 Analyse par la chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P)	32
a- L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire physico-chimique (Saidal).....	34
b- L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire BPAM	35
3-8 Evaluation de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes	36
3-9 Détermination des CMI	38

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSION

1- Détermination des ravageurs parasites des fruits de clémentinier.....	39
2- Détermination du taux d'humidité.....	40
3- Tests phytochimiquespreliminaries (screening chimique)	41
4- Extraction des flavonoïdes.....	43
5- Calcule du rendement d'extraction.....	44
6- Détermination de potentiel d'hydrogène	48
7- Teneur en flavonoïdes.....	49
8- Résultats d'analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince (C.C.M).....	51
9- Résultats de l'analyse quantitative et qualitative par la chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P).....	55

a- L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire physico-chimique (Saidal).....	55
b- L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire BPAM	55
10- Résultats des analyses microbiologiques	59
10.1 Résultats de l'effet antimicrobien.....	59
10.2 Détermination des CMI:	67
Conclusion	73
Références bibliographique	75



Introduction

Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base: nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux.

L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (GURIB-FAKIM, 2006).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

L'agrumiculture est l'une des cultures les plus importantes à travers le monde. Utilisée d'abord pour leurs fruits, les agrumes jouent un rôle très important et essentiel dans l'alimentation, la santé humaine, l'industrie agroalimentaire et les revenus économiques par le biais de l'exportation.

Les études épidémiologiques ont suggéré les effets bénéfiques des agrumes contre de nombreuses maladies dégénératives (Benavente-Garcia, 1997 et *al*). 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, 2010).

L'usage domestique et industriel de ces grandes quantités d'agrumes, en particulier pour la production de jus, régénèrent 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, Richar, 1998;et *al*).

En outre, ces sous-produits d'agrumes sont une bonne source de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes (des flavanones hétérosides) qui comprennent principalement naringine, hespéridine, narirutine, et neohespéridine.

La clémentine est également une source importante de flavonoïdes tels que les

Introduction

flavanones glycosylées et les flavones polyméthoxylées (Oufedjikh, 2000).

On s'interroge sur l'intérêt de ces substances occupant les espaces inter et intracellulaires des organes végétaux et, on se demande si, elles apporteraient une solution, au moins partiel, aux problèmes sanitaires qui justifiera leur intégration dans le programme de la valorisation des déchets.

Dans part notre travail, nous essayons d'exploiter les déchets des fruits d'agrumes, tel que les écorces, avec l'extraction des substances possédant des propriétés pharmaceutiques. Dans cette optique, une étude des caractéristiques chimiques et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits flavonoïdes des écorces de *Citrus Clementina* sont réalisée.

Notre travail comprend deux grands partie : le premier est consacrée pour une étude bibliographique sur la plante sélectionnée pour cette étude (*Citrus Clementina*), et les composés phénoliques des plantes plus particulièrement les flavonoïdes.

La deuxième partie illustre la partie expérimentale qui comporte : les matérielle et méthodes utilisés dans les différentes manipulations. Nous aborderons une présentation des techniques d'extractions, de séparation et d'analyse utilisées. Nous traiterons enfin des protocoles utilisés au cours des tests biologiques, est aussi consacrée aux résultats obtenus accompagnés d'une discussion et ponctués d'une conclusion générale.



Partie I :

Synthèse bibliographique

1. Les agrumes

1.1. Origine, histoire et distribution géographique des agrumes

L'histoire des agrumes est vieille de plusieurs millénaires et elle a croisé le destin de plus grandes civilisations, à toutes les époques.

Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique (De Rocca et Ollitrault, 1992).

Cependant, les données historiques plaident en faveur de l'existence de trois centres de diversification primaire (Webber, 1967 et Scora, 1988) :

- Le Nord-Est de l'Inde, les régions proches de la Birmanie et de la Chine, auraient abrité la diversification de *C. medica* et l'apparition de *C. aurantifolia*, *C. limon*, *C. aurantium* et *C. sinensis*.
- La Malaisie et l'Indonésie sont citées comme centre d'origine de *C. grandis*.
- Le Vietnam, le Sud de la Chine et le Japon seraient la zone de diversification de *C. reticulata* (Anonyme, 1998).

Ils étaient cultivés dans les montagnes d'Asie Orientale, entre les contreforts de l'Himalaya et le Sud Est de l'Asie (Jacquemond, 2008).

La diffusion des agrumes à travers le Monde s'est faite très lentement. Le cédratier a été la première espèce connue en Europe (300 ans av. J.-C. d'après Webber, 1967). Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduits dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XII^{ème} siècle, et le mandarinier au XIX^{ème} siècle. Le bassin méditerranéen constitue à présent une importante zone de production pour ces trois dernières espèces. L'introduction des agrumes en Afrique de l'Est a été faite par les commerçants arabes et hindous vers le XIV^{ème} siècle.

La diffusion vers le bassin du Congo a été assurée par la suite par les explorateurs portugais (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

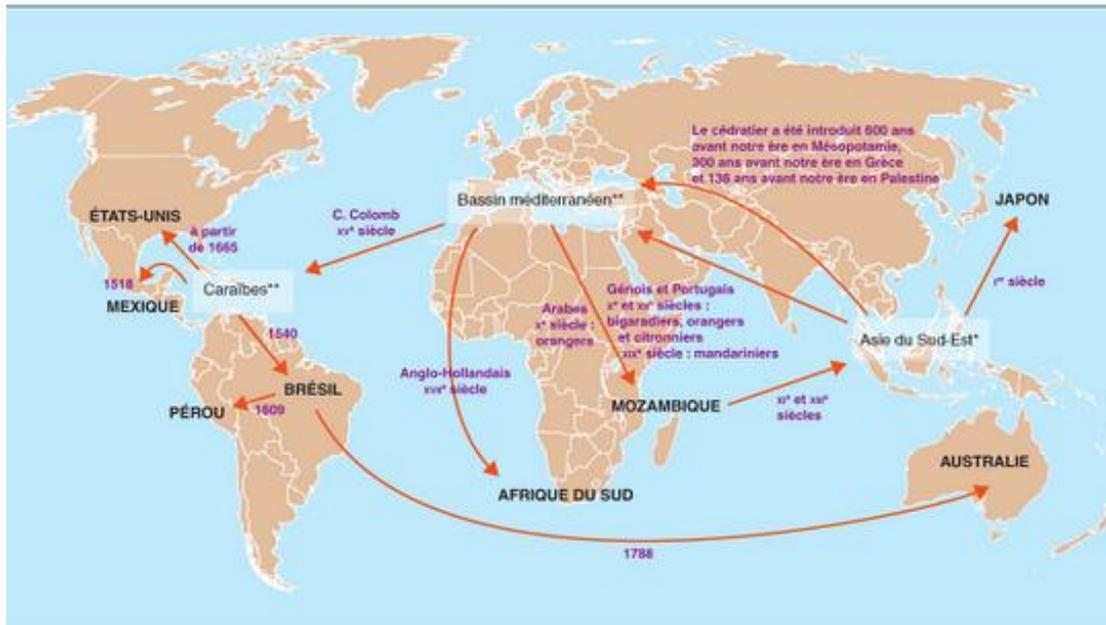


Figure 1 : Origine géographique et diffusion des agrumes dans le monde (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

1.2 Description botanique

Selon Polese J.M (2005), Les agrumes se présentent sous forme de petits arbres de 2 à 10 m de haut. A tronc court, à ramification et feuillage denses, peuvent vivre plusieurs années.

Les rameaux, parfois épineux, connaissent plusieurs vagues de croissance, la plus importante étant celle du printemps.

Les feuilles, d'un vert vif et brillant, sont persistantes et entières, sauf pour le genre *Poncirus*, chez lequel elles sont composées de trois parties comme celle du trèfle et caduques. La pétiole est souvent ornée d'ailettes, plus ou moins développées.

Les fleurs sont en générale blanches composées de quatre ou cinq pétales, souvent réfléchies vers l'extérieur. Très nombreuses, elles sont soit isolées, soit disposées en grappes.

L'aspect des fruits est très divers d'une espèce à l'autre. Le fruit est entouré d'une enveloppe ou d'une écorce plus ou moins épaisse de couleur variant à maturité entre le vert et l'orange le plus vif, en passant par toutes les nuances de jaune.

Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique (figure2). On distingue différentes parties :

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

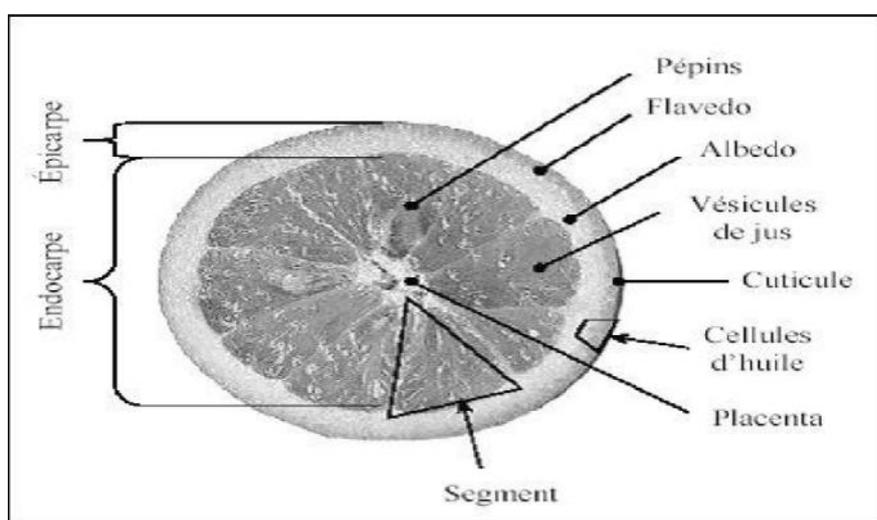


Figure 2 : Caractéristiques morphologiques d'un *Citrus* (Swingle et Reece, 1967)

1.3 Taxonomie

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées qui comprend trois genres : *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus* (Loussert, 1987). Le genre *Citrus* renferme la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits ou leurs huiles essentielles.

La classification des agrumes dans le règne végétale selon Loussert, (1989) :

- * Règne : Végétale
- * Embranchement : Spermaphytes
- * Classe : Dicotylédones
- * Ordre : Geraniales
- * Famille : Rutacées
- * Genre : *Fortunella* ; *poncirus* ; *citrus*
- * Espèces : *F. japonica* ; *f. margarita* ; *P. trifoliata* ; *citrus spp*

1.4. Ecologie des agrumes

Les agrumes présentent une grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes. La culture des agrumes est possible partout où la température moyenne de l'année est supérieure à 13°C et inférieure à 39°C. Les agrumes préfèrent les climats maritimes des zones subtropicales. En terme de besoins en eau, 120 mm par mois, soit 1200 à 1500 mm par an, représentent une quantité d'eau au-dessous de laquelle la culture des agrumes nécessite une irrigation (Anonyme, 2006).

Le clémentinier est l'espèce la plus sensible au vent par rapport aux autres espèces d'agrumes, selon (Rebour, 1950), ce facteur est le plus défavorisant dans une culture d'agrumes, il cause des dégâts inestimables sur les jeunes plantations (Selzer, 1946)

2. Clémentinier

2.1. Historique

La Clementina a été découverte en 1892 par le chef des pépinières de l'orphelinat agricole de Misserghin près d'Oran ; le révérend père Clément (Vital Rodier). Le religieux pense avoir découvert une variété hybride issue d'un croisement naturel entre la mandarine et la bigarade « l'orange amère » d'habitude immangeable. Le fruit paraît banal mais il possède l'énorme avantage d'être dépourvu de pépins. Le nouvel agrume acquiert rapidement une vraie notoriété, on appelle alors la « mandarine sans pépins » ou la « mandarine du père Clément » (Inra, 2010).

Il faut attendre 1902 pour voir apparaître la première description de la clémentine dans la revue horticole française. Le professeur Trabut de la société horticole d'Alger y consacre un article et lui donne le nom de son découvreur (Rebour, 1945).

La variété que nous connaissons aujourd'hui sous le nom clémentine commune, fut d'abord appelée mandarine du père Clément, puis baptisée définitivement « clémentine » par la société d'horticulture Algérienne sur proposition du docteur Trabut, (Boukella, 2008).

2.2. Description botanique

C'est un arbre qui ressemble au mandarinier, vigoureux, petit, au port érigé et dense, souvent épineux.

- Les feuilles sont allongées, pointues, vert brillant. Aux pétioles légèrement ailés.
- Les fleurs sont petites et blanches, très parfumées, solitaires ou en petite bouquets.
- Les fruits sont petits en générale, avec une écorce fine rouge-orangé à maturité, facile à éplucher : la pulpe est très juteuse et très parfumée, avec peu ou pas du tout de pépins. Le fruit mûrit de novembre février selon les variétés, mais certain variétés récentes arrivent à maturité plus tôt ou, au contraire, plus tarde (Polese, 2005).
- Les rameaux sont fins, pratiquement sans épines, de diamètre moyen et supérieur à celui des autres mandariniers.
- Le pédoncule est petit de 3 à 5mm, en moyenne 4mm. La peau est lisse, mince, finement granulée, brillante et peu adhérente.
- La pulpe est juteuse, de couleur orange foncé, à texture fine, très tendre et parfumée (Chapot, 1963 et Anonyme, 1968).

2.3. Classification et systématique

La classification de clémentinier selon Swingle(1959) cité par zellat(1989) est la suivante :

- Division : Embryophyla.
- Sous division : Angiospermae.
- Classe : Dicotylédones.
- Sous classe : Archicholomydeae.
- Ordre : Genariales.
- Famille : Rutacée.
- Sous famille : Aurantioideae.
- Tribu : Citriae.
- Sous tribu : Citrinae.
- Genre : *Citrus*.
- Sous genre : Eucitrus.
- Espèce : *Citrus Clementina*.

2.4. Le cycle végétatif de clémentine

Le cycle de développement des agrumes se caractérise en générale sur deux phénomènes parallèles : la croissance végétative et la fructification.

2.4.1. La croissance végétative

Selon Zellat (1989), elle se manifeste sur les jeunes ramifications au cours des trois périodes :

Au printemps, les ramifications s'allongent et développent de jeunes feuilles de coloration vert-clair, très distinctes des autres feuilles. Elle a lieu en fin février début mai. En avril-mai les poussées fructifères vont apparaître sur les ramifications, en premier lieu les boutons floraux, puis les fleurs.

En été (juillet- aout), trouve la poussée d'été plus ou moins vigoureuse suivent les températures, l'irrigation et la vigueur des arbres.

En automne (octobre, fin novembre), apparait la troisième poussée dite poussée d'automne.

Le développement floral se manifeste par la floraison, la pollinisation et la fécondation.

2.4.1.1. La fructification

a. La floraison

La floraison à lieu au printemps, de la fin mars au début mai.

Les boutons floraux qui proviennent des pousses fructifères les mieux alimentés évolueront en fruits.

La floraison du clémentinier est très abondante, elle est suivie d'une chute importante affectant le nombre de boutons floraux (Agrébi, 1984 in (Zellat NE., 1989).

Les chutes naturelles d'abord physiologiques et hormonaux sont nécessaires pour assurer un calibre convenable des fruits (Loussert ,1989).

b. La pollinisation et la fécondation

Pour la pollinisation, elle s'effectue au cour de la floraison, le pollen est transportée par le vent ou les insectes. Le développement parthénocarpique du fruit est déclenché

par la pollinisation d'où sa nécessité, dans ce cas la germination du grain de pollen dans le style de la fleur joue seulement un rôle d'excitateur qui entraîne sans qu'il y est fécondation complète, le développement de l'ovaire en fruit.

c. Développement du fruit

Le développement du fruit passe par trois étapes essentielles :

- **La Nouaison**

C'est la première étape du développement du fruit, qui suit la fécondation. On distingue sur l'arbre deux types de fruits : les uns colorés en vert brillant, à croissance rapide, prometteur de bonne récolte ; les autres colorés en vert jaune, plus petits prématurément chutent en juin, (Zellat, 1989).

- **Le Grossissement**

Il débute en mai- juin et il dépend d'après Zellat (1989) de l'âge et de la vigueur de l'arbre plus les conditions climatiques. A ce stade l'équilibre entre feuilles productrices de substance et fruits, zone de leur accumulation dont elle dépend étroitement aux conditions photosynthétiques, doit être respecté (Djerfaf, 1989).

- **La maturation**

Elle se fait en été. Le fruit poursuit son développement en grossissant pour atteindre en octobre son calibre définitif. Cette maturation se manifeste par le changement de coloration de l'épiderme de fruit et par la qualité de teneur en jus de sa pulpe (Loussert, 1985).



Figure 3 : Fruit de clémentinier (Colombo ,2004).

3. Problème phytosanitaire

Les agrumes sont attaqués par de nombreuses ravageurs qui occasionnent des dégâts très importants, en provoquant un ralentissement de la végétation, une diminution de rendement ainsi qu'une mauvaise qualité des fruits (Cassin, 1967 ; Vogel et Bove, 1972).

Les principaux ravageurs des agrumes sont les mouches de fruits (*Diptera* et *Tephritidae*), les thrips (*Scirtothrips* spp.), les cochenilles (*Aonidiella* spp., *Unaspis* spp., ...), les pucerons (*Aphis gossypii* et *Toxoptera citricida*), les aleurodes ou mouches blanches et les psylles (*Diaphorina citri*, *Trysoza erytrae*). Ils causent divers dégâts sur les plantes. Certains se nourrissent aux dépens de la plante entraînant des déformations des feuilles et fruits (pucerons, cochenilles, psylles) ; d'autres sécrètent des substances toxiques pour la plante ou pouvant attirer des fourmis et provoquer le développement des fumagines (Rey *et al*, 1986; Loussert, 1989). Ce sont également des vecteurs de maladies à virus comme la Tristeza (*Citrus Tristeza Clotrovirus*) transmis par les pucerons. Le greening véhiculé par les psylles est causé par une bactérie des espèces *Liberibacter africanum* et *L. asiaticum*. (Aubert, 1988,1992 ; Rey *et al*, 1986 ; Mariau, 1999 ; Tamesse *et al*, 2002).

1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

- celle de l'acide shikimique : est la voie de formation des métabolismes secondaires à partir de glucide.
- celle issue de l'acétate malonate : est la voie de synthèse d'acide phénolique et de autres composés phénoliques à partir d'unité d'acétate.

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (Martin, 2002).

3. Classification

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes (Walton et Brown, 1999).

3.1. Les flavonoïdes

3.1.1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus = jaune) (Male et Kunti, 2007).

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsable dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Les flavonoïdes ont été désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt et *al*, 2001).

3.1.2. Structure chimique

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone (Milane, 2004) à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Dacosta, 2003), portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Milane, 2004).

On signale que le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base (Milane, 2004).

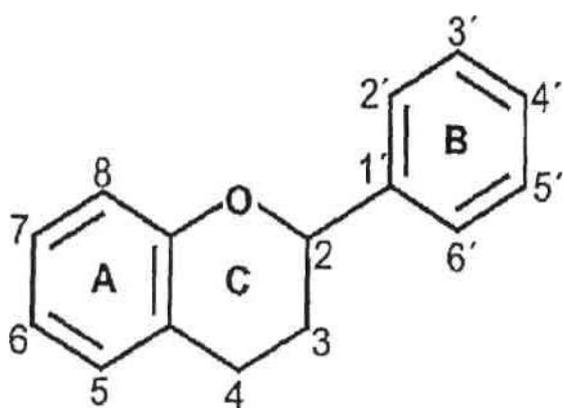


Figure4 : Structure de base des Flavonoïdes (Dacosta, 2003).

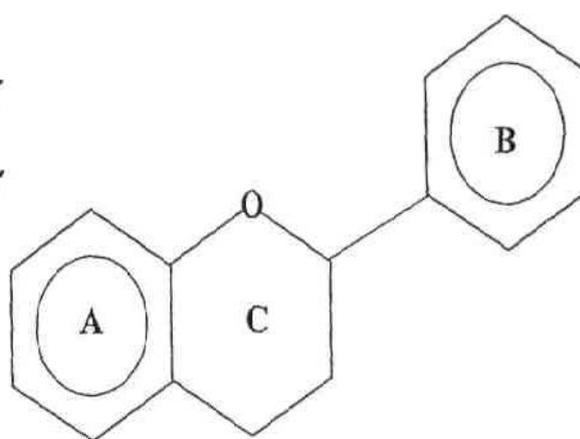
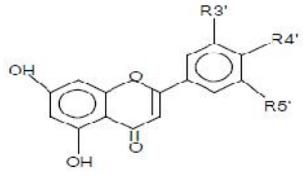
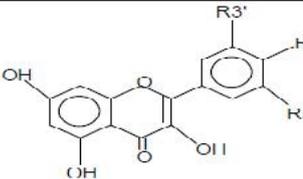
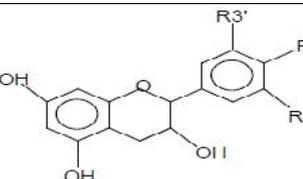
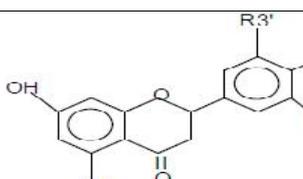
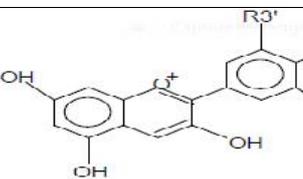
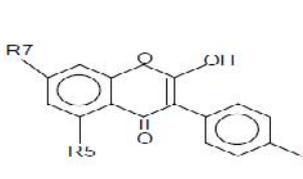


Figure5 :Schéma simplifié des flavonoïdes (Dacosta, 2003)

3.1.3. Classification

Selon la structure du cycle C, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les anthocyanidines et les isoflavones (Medic, 2004).

Tableau 1 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001 et Erdman *et al.*, 2007)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

3.1.4. Propriétés physico-chimiques

Les flavonoïdes aglycones moins polaires comme isoflavones, les flavonones et les flavones hautement méthoxylés et les flavons sont plus solubles dans les solvants tels que l'éther et le chloroforme (Vastropoulou et Vajias, 1986). Les composés phénoliques possédant un nombre insubstitué de groupement hydroxyle ou de sucres sont des composés polaires, généralement solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, le butanol, l'acétone, le diméthylsulfoxyde, l'eau, etc. (Benkrief *et al.* 1990). Les flavones résistent au traitement à la chaleur et ne sont pas déglycosylés (Day et Williamson, 1990).

Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte varie du blanc ivoire au jaune vif. Les hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool, les autres solvants organiques polaires, bon nombre entre eux ont une hydrosolubilité plutôt faible (rutoside, hespéridoside), insoluble dans les solvants organiques apolaires.

3.1.5. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en -coumarate puis en -coumaroyl-CoA.

Le -coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

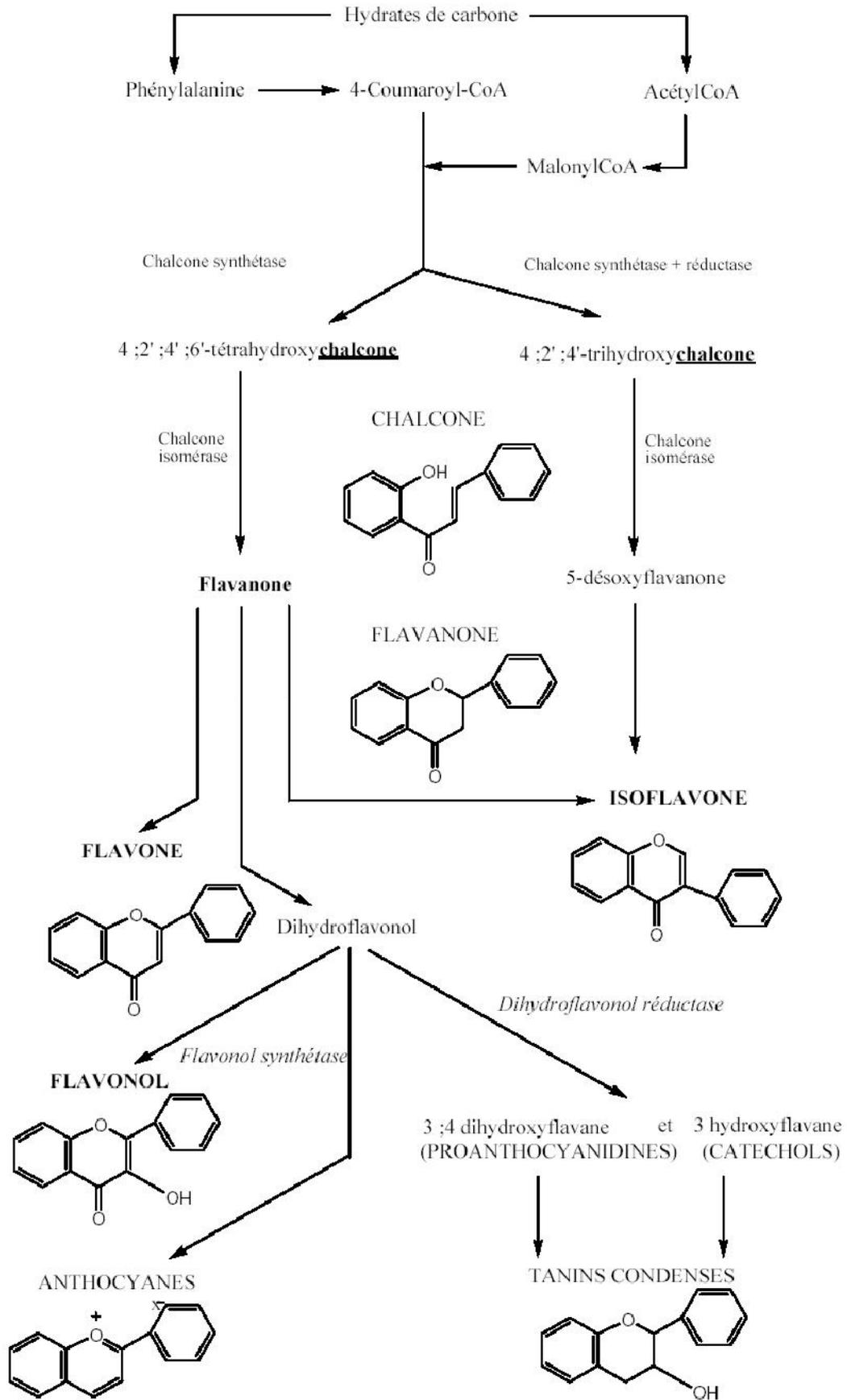


Figure 6 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Milane, 2004)

3.1.6. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remy et *al.* 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton, 1993).

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeyen *et al.*, 2002), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) (Urquiaga et Leighton, 2000)

3.1.7. L'activité biologique des flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales. Agissent comme des pigments ou des Co-pigments. Peuvent moduler la distribution d'auxine, comme elles fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Agis sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian *et al.*, 2007)

D'autres activités biologiques ont été attribuées aux flavonoïdes, citons à titre d'exemple les activités anti-inflammatoire, antiallergique, anti hypertensives (Middleton et Kandaswami, 1993 et Rice-Evans, 2001), antifongiques, antibactériennes (Tomas-Barberan *et al.* 1988), antioxydants (Aruoma *et al.*, 1995)

Des expériences menées sur des souris ont montré que la quercétine et la quercétrine avaient une activité antidiarrhéique très importante. Le mécanisme de ces composés consistait à augmenter l'absorption des électrolytes et de l'eau par la muqueuse intestinale (Galvez et al.1993a, Galvez et al. 1993b). Aussi d'autres flavonoïdes, comme l'apigénine, ont été décrits comme des composés bactéricides et bactériostatiques très efficaces (Basile et al. 1999, Cushnie et al. 2003, Martini et al. 2004). De même les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase (Goodarzi et al. 2006, Ouali et al. 2007).

4. Les souches microbiennes utilisées

4.1. Les souches bactériennes

- **Gram positif :**

Staphylococcus aureus

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas (Nauciel, 2000) irrégulier à la façon d'une grappe de raisin (Avril et al. 2000).

Staphylococcus aureus est un germe aérobie – anaérobie facultatif (Avril et al. 2000), doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoque (Nauciel, 2000).

Bacillus subtilis

C'est une bactérie forme bâtonnet de 3 à 9 μ de large, isolé en diplobacille ou en streptobacille. Elle est Gram positif, sporulée et mobile. Sur gélose elle se manifeste généralement par des colonies assez volumineuses ayant tendance à s'étaler (caractère invasif) plates, à bord un peu dentelé et présentant parfois un aspect irrégulier (Singleton, 1999).

Sarcina lutea :

C'est une bactérie Gram-positif, sphérique, saprophyte faisant partie de la famille des Micrococcaceae, aérobie obligatoire. *Sarcina lutea* est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. La bactérie peut aussi coloniser la bouche, des muqueuses, de

l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures humaines (Madigan et Martinko, 2005)

- **Gram négatif**

Escherichia coli

Escherichia coli est l'espèce type du genre *Escherichia* des entérobactéries. Appelée communément « colibacille » c.-à-d. « bacille à colon », cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à gram négatif aérobies. La plupart des *E. coli* se multiplient (18 à 24h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers (Joly et Reynaud, 2002).

C'est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine (Avril et al. 2000).

4.2. La souche fongique :

***Candida albicans* :**

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levure informes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginale, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco-cutanées (Delorme et Robert, 1997).



Partie II:

Partie expérimentale

1. Lieu et durée de stage

Notre stage pratique a duré Cinq (5) mois successifs. Il est basé sur le thème : Evaluation de l'activité antimicrobienne de flavonoïde de *Citrus Clementina* selon l'âge, l'état sanitaire du fruit et de l'arbre, le stade phénologique et de maturité du fruit.

La station choisie pour cette étude est située au niveau de la Mitidja (la première est située au niveau de ferme de Oulad allel a Sidi moussa wilaya de Alger et la deuxième est située au niveau de ferme Amiar a Boufarik wilaya de Blida). Le choix de cette station a été basé sur la richesse de cette région en culture agrumicoles favorisée par les conditions écologiques (climat, sol, précipitation et altitude).

L'étude expérimentale de notre projet a été effectuée au niveau de deux lieux:

✓ La première partie (l'extraction des flavonoïdes) a été réalisée au niveau du laboratoire BPMA (Biotechnologie des plantes médicinales et aromatiques et des produits naturels) Département de Biotechnologie, à Université Blida I.

✓ La deuxième partie a été effectuée au niveau de la filiale ANTIBIOTICAL de l'Entreprise de la fabrication des produits Pharmaceutiques SAIDAL de Médéa :

- Laboratoire de microbiologie, pour l'activité antimicrobienne.

- Laboratoire de physico-chimiques pour les analyses qualitatives (Chromatographie sur couche mince (CCM), Spectrophotomètre et la Chromatographie liquide (HPLC)).

2. Matériel

2.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé renferme l'appareillage, la verrerie et les produits chimiques. (Voir Annexes 1).

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Matériel végétale

Notre étude a porté sur les zestes (épicarpes) de fruit de *Citrus Clementina*, l'échantillon à été récolté dans la région de la Mitidja ((le verger âgé situé au niveau de ferme de Oulad allel a Sidi moussa wilaya de Alger a et le verger jeune situé au niveau de ferme Amiar a Boufarik wilaya de Blida)) selon l'âge de l'arbre (verger jeune 6ans et verger âgée 50ans), la période phénologique (période de fructification stade de maturé, et avant maturé) fruit maturé, et fruit non maturé) et l'état sanitaire du fruit [fruit infesté par des insectes, fruit non infesté par des insectes]. Deux prélèvements ont été effectués, le premier échantillonnage a été fait au mois d'octobre (Fruit non mature de couleur vert) et le second échantillonnage a été fait au mois de janvier et février (Fruit mature de couleur orange). (Fig. 7 et 8)



Figure 7 : Fruit non infesté au stade immature



Figure 8: Fruit infesté au stade mature

2.2.1.1 Identification du ravageur

Pour détecter le type de ravageur sur fruits infesté une observation est effectuée à l'aide de loupe binoculaire

2.2.2. Matériel microbiologique

Les souches utilisées, ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du complexe antibiotical SAIDAL de Médéa, le choix des souches a été fait en fonction de la disponibilité et de leur pathogénicité. (Tableau 2) :

Tableau 2 : Les microorganismes testés

Catégorie	Genre et espèce	Référence
Bactéries Gram négative (-)	<i>Escherichia. Coli</i>	ATCC10536
Bactéries Gram positive (+)	<i>Sarcina lutea</i>	ATTCC6633
	<i>Bacillus subtilus</i>	ATCC29737
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Institut pasteur
Levures	<i>Candida albaci</i>	ATCC10536

3. Méthodes d'étude

3.1. Préparation du matériel végétal

Les écorces, récoltées sont lavées avec de l'eau du robinet ensuite mises sur du papier et lissées séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité pour éviter le développement des moisissures et à une température ambiante, avec un brassage journalier pour éviter la photo oxydation des substances afin d'homogénéiser le séchage. Cette opération a duré quinze (15) jours. Une fois cette étape terminée, le matériel végétal est broyé en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

La poudre résultante est tamisée avec un tamis possédant des trous de 0,2 mm de diamètre afin d'obtenir une poudre homogène, ensuite conservée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière dans des flacons en verre secs fermés hermétiquement. (Fig 9).



Figure 9 : Poudre des écorces de *Citrus Clementina*.

3.2. Détermination du taux d'humidité

Selon la méthode de la pharmacopée européenne (2010) il s'agit de déterminer la différence en masse de l'échantillon (les épicarpes de *Citrus Clementina*) avant et après étuvage.

- **Mode opératoire**

Le taux d'humidité est la proportion effective (totale, dosable) d'eau dans une plante.

Elle a été déterminée selon la pharmacopée européenne à partir d'une masse de matière végétale introduite dans une étuve à 105c jusqu'au poids constant.

La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de séchage, elle est calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{(\text{poids } x - \text{poids } y)}{(\text{poids } x)} \times 100$$

Dont :

x : Poids de l'échantillon avant l'étuvage

y : Poids de l'échantillon après l'étuvage

H% : taux d'humidité exprimé en pourcentage

3.3. Test phytochimique pour identifier la présence des flavonoïdes

Le test est effectué sur la poudre de broyat. Elle est réalisée selon la réaction décrit par Okmu, (2005).

- **Mode opératoire**

Mettre 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'Hcl (la solution d'Hcl concentré à 37% est diluée à 1%) et macérer le tout pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : Prendre 10ml du filtrat et ajouter 5ml du NH₄OH concentré (30%)

Résultat : Apparition d'une couleur jaune dans le parti supérieur du tube à essai (Okmu, 2005).

3.4. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes se fait selon le protocole préconisé par (Markham, 1982). Dont les étapes essentielles sont :

a- Macération et évaporation

Peser 30g de poudre de l'épicarpe de la clémentine. Les mettre dans un Erlenmeyer Mayer, puis ajouter 100 ml de méthanol (CH₃OH) 85% (10V /V) et laisser macérer pendant 72 heures à 4°C dans un frigidaire. Les macérats subissent une première filtration par la mousseline. Ensuite suivi d'une deuxième extraction par macération dans 100 ml de méthanol à 85% (V/V) et laissés 1h puis filtrés. Suivi d'une troisième macération dans 100 ml de méthanol à 50% (V/V) et filtrés après 1h.

Les trois filtrats reçus par chaque extraction sont mélangés et filtrés par un papier filtre Wattman, puis subissent une évaporation à 40°C sous vide à l'aide d'un Rota vapeur.

La phase aqueuse obtenue est conservée à 4°C pendant 48 h et filtré par un papier filtre pour une deuxième fois pour en fin obtenir une phase aqueuse contenant les flavonoïdes. La phase organique (cires, lipides, chlorophylle, etc.) Est jetée (Markham, 1982).

b- Extraction liquide - liquide (à l'aide d'une ampoule à décanter)

Après filtration et l'évaporation sous vide, la solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le hexane puis le chloroforme qui élimine les composés non polaires (chlorophylle, lipide), puis l'acétate d'éthyle qui entraîne les monosides, et enfin par le butanol qui entraîne la majorité des hétérosides.

L'extrait aqueux obtenu est versé dans une ampoule à décanter. Nous avons ajouté 30ml d'hexane, laissé décanter un moment, jusqu'à séparation de deux phases bien distinctes (la séparation se fait selon la densité de l'eau et d'hexane). L'expérience s'est déroulée comme suit :

✓ Nous avons ouvert le robinet pour la récupération de la phase aqueuse. Le lavage avec l'hexane est répété jusqu'à l'élimination des graisses ainsi que les substances lipophiles (9-10 fois).

✓ La phase aqueuse obtenue subit ensuite une extraction par le chloroforme : le même volume du solvant est ajouté au volume de la phase aqueuse, cette extraction est répétée 3 fois.

✓ La phase aqueuse obtenue a subi encore une extraction par l'acétate d'éthyle qui entraîne les mono-o-glycosides et partiellement les di-o-glycosides, le même volume de la phase aqueuse est ajouté. Cette extraction est répétée 3 fois.

✓ La phase aqueuse obtenue subit une extraction par le butanol qui entraîne essentiellement le reste des di-glycosides, les tri-glycosides et les glycosides.

Une évaporation rotative sous vide à une température de 35°C est effectuée pour les différentes phases organiques 1, 2,3 qui ont été obtenus ; et la phase aqueuse 4 (Markham, 1982).

Enfin nous avons obtenu 4 types d'extraits de flavonoïdes :

- ✓ Extrait de chloroforme (Flavonoïdes aglycones)
- ✓ Extrait d'acétate d'éthyle (Flavonoïdes mono aglycosides)
- ✓ Extrait n-butanol (Flavonoïdes di et tri glycosides)
- ✓ Extrait aqueux (Flavonoïdes très polaire)

Les extraits obtenus sont de couleur jaune orange. Ils sont aussi pesés pour calculer le rendement de chaque échantillon.

Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol pur et conserve à -4°C. (Fig. 10).

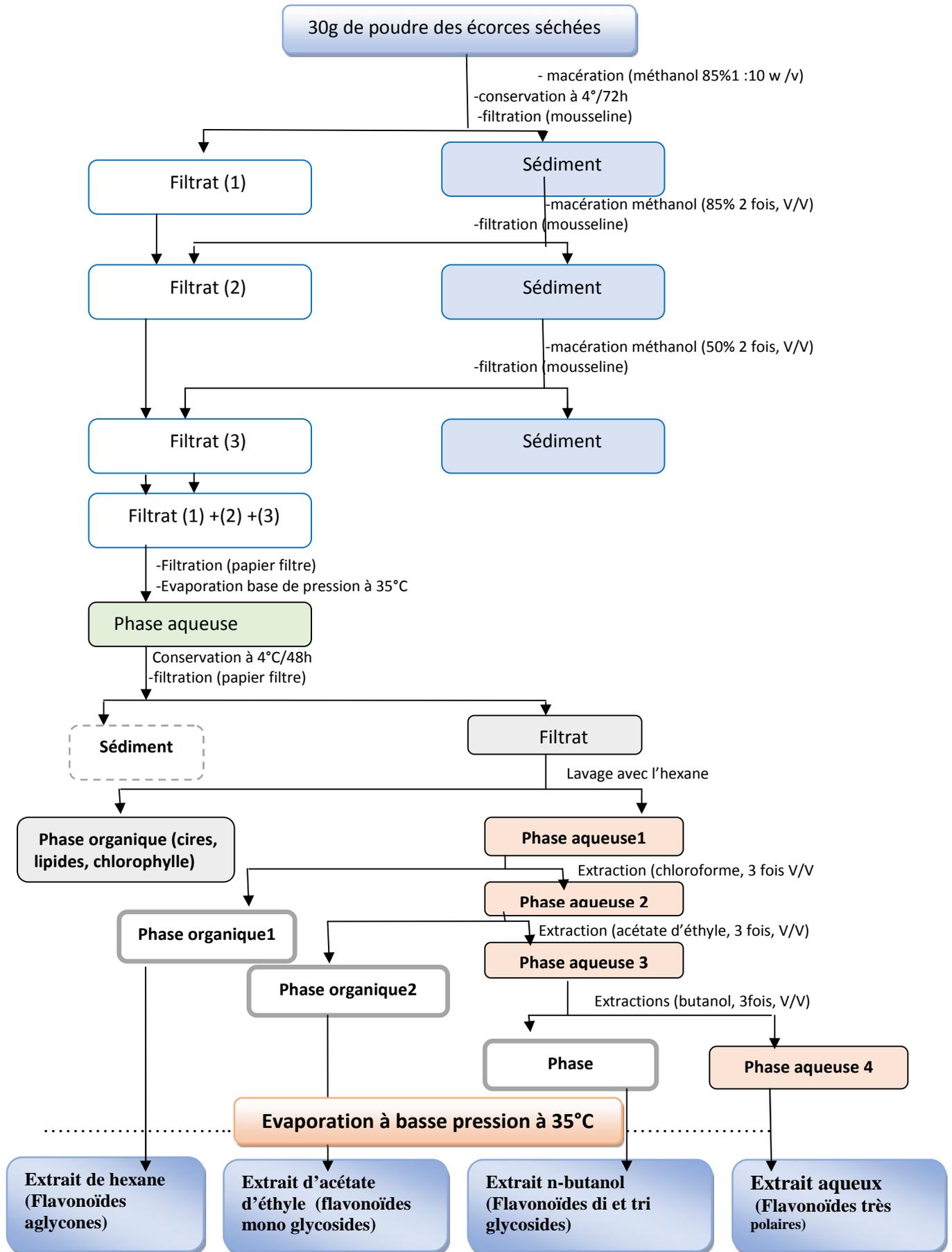


Figure 10: Protocole d'extraction des flavonoïdes (Markham, 1982)

3.5 Calcul du rendement

Le rendement en extrait est le rapport entre de poids d'extrait et le poids de la biomasse végétale à traiter.

Après évaporation du solvant au rota vapeur, chaque extrait sec est pesé et le rendement est ensuite déterminé. Il est exprimé en pourcentage % et calculé par la formule suivante

$$R = \frac{m^l - m_0}{m^m} \times 100$$

Avec :

m^l : la masse du ballon après l'extraction.

m_0 : la masse du ballon vide (avant l'extraction).

$(m^l - m_0)$: la masse de l'extrait sec.

m^m : la masse totale de poudre végétale utilisée dans l'extraction

3.6 Le potentiel d'hydrogène des extraits de flavonoïde

Il permet la croissance ou l'inhibition des microorganismes à tester selon le degré de l'acidité de l'extrait utilisé et la tolérance du microorganisme à ce degré d'acidité.

Le Ph est un nombre représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. Pour des raisons pratiques, sa définition est expérimentale.

La détermination du Ph est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes judicieusement choisies plongeant dans la solution à examiner ; l'une de celle-ci est une électrode sensible aux ions hydrogène (le plus souvent, une électrode de verre) et l'autre une électrode de comparaison (par exemple, une électrode au calomel saturé)

• Principe

Le principe de Ph mètre est l'indication de la solution si elle est acide ou basique, il est exprimé par une valeur numérique.

• Mode opératoire

Avant de commencer on va étalonner le Ph mètre puis on prend 6ml d'extrait de clémentinier, et on le met dans un flacon ensuite on va plonger la cellule de mesure de Ph mètre dans cette extrait et enfin on va lire la valeur de ce Ph.



Figure 11 : Ph mètre

3.7. Méthodes de caractérisation chimique

3.7.1. Analyse quantitative par Spectrophotométrie UV/Visible

L'estimation de la teneur en flavonoïdes contenus dans les extraits de *C. clementina* est réalisée par la méthode de Bahorun et *al.* (1996).

- **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau et *al.* 1972).

- **Mode opératoire**

- ✓ **La courbe d'étalonnage**

A partir de la solution mère de la quercétine (utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage) préparée dans le méthanol de concentration 1000 μ g/ml (20mg 20ml), on prépare des solutions filles de concentrations allant de 10 à 100 μ g/ml.

Dans une fiole de 5ml, on met 1 ml pour chaque dilution de solution fille de la quercétine, on ajoute 1 ml de trichlorure d'aluminium AlCl₃ à 2% (m/v) dans l'eau. Après incubation à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante, l'absorbance du

mélange a été mesuré à 430 nm. A partir des valeurs des absorbances obtenues par spectrophotomètre UV-visible (Perkin Elmer precisely Lambda 25) nous avons trace la courbe d'étalonnage de la quercétine.

✓ **Préparation de l'échantillon**

Effectuer la même opération pour les extraits flavonique en introduisant 1 ml de ces dernières dans une série de tubes et ajout de 1 ml d'AlCl₃ à 2%.

Le blanc est représenté par 1ml de 'méthanol additionné à 1ml d'AlCl₃.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *C. Clementina* sont calculées en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercitrine" à différentes concentrations (10-100µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine /ml

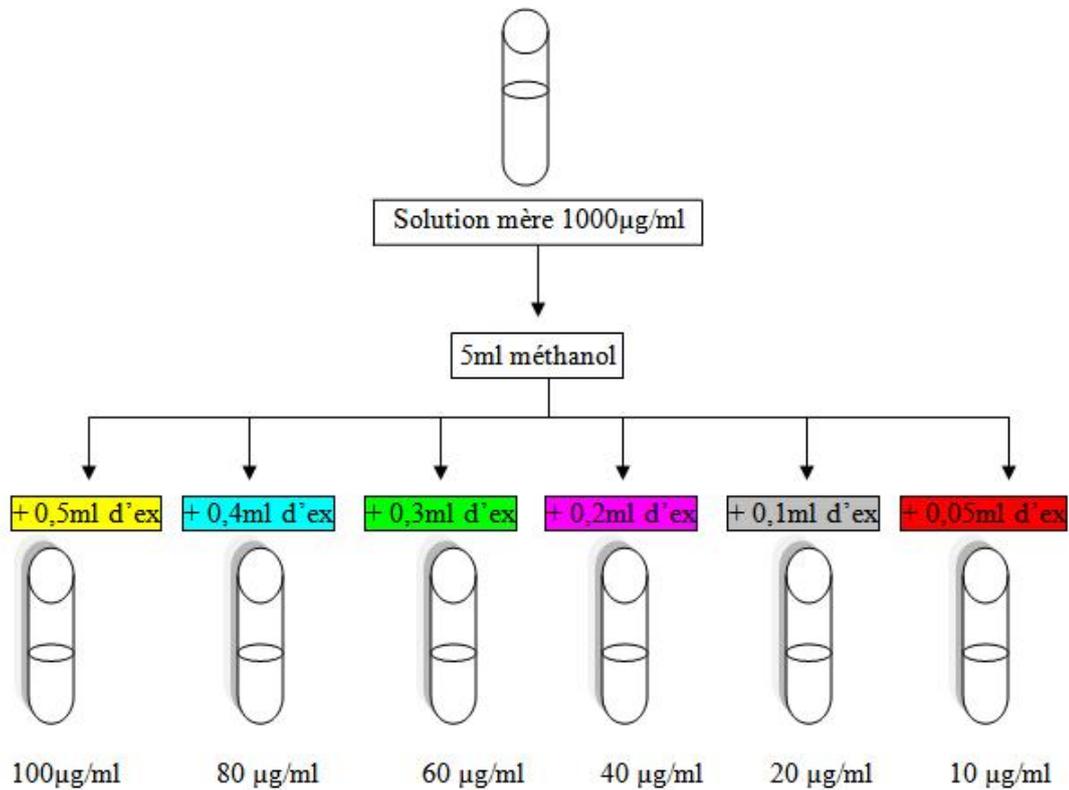


Figure 12 : Méthode de dilution de la quercétine

3.7.2. Analyse par Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

- **Principe**

La chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique de séparation analytique, rapide, simple et peu coûteuse. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un seul solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille de matière plastique ou d'aluminium. Après que, l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse, qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- **La cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre de forme variable, fermé par un couvercle.

- **La phase stationnaire** : une couche d'environ 0,25mm de gel de silice ou d'autre absorbant fixé sur la plaque à l'aide d'un liant.

- **L'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2à5%) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.

- **L'éluant** : un solvant pur ou mélange qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon (Antonot et Marchal, 1998).

- **Mode opératoire**

Lors de nos travaux nous avons utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice sur un support en verre de taille 20×20cm pour la séparation des extrait aqueux flavonoïque.

Notre protocole d'expérimentation est le suivant :

✓ Préparation de la phase mobile

La phase mobile, est préparée en utilisant deux systèmes de solvant :

- Toluène / Ethanol / Méthanol (4 : 3 : 3), (Aurangzeb *et al*, 2005).
- CH₂Cl₂/ Méthanol (80: 20), (Ribereau- Gayon, 1968 ; Budzianowski, 1991)

•Préparation de la cuve chromatographique

La phase mobile, ainsi préparée a été introduite (sous hotte ventilée) au fond d'une cuve en verre bien nettoyée et munie d'un couvercle avec une hauteur de 2cm. La cuve ensuite est laissée se saturer.

•Dépôt des échantillons

A l'aide d'une micropipette à 2cm du bord inférieur de la plaque, nous déposons 10µl de l'extrait de flavonoïde et d'étalon (quercitrine, rutine, acide caféique) ainsi on a tracé un trait à 12cm du premier spot pour marquer la fin du développement.

La plaque est déposée verticalement dans la phase mobile pour une bonne élution, la cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée.

•Développement de la plaque

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes des constituants à séparer. Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque doit être séchée à température ambiante. Si les spots ne sont pas colorés, elles doivent être révélées.

•Révélation

Si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques:

- **Révélation aux UV** : qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.
- **Révélation par des méthodes chimiques** : ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler (Latifou, 2005)

• **Identification des flavonoïdes**

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son Rf (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

• **Rapport frontal**

Pour que l'interprétation des chromatogrammes en CCM soit possible, il est nécessaire de calculer le RF, qui est déterminé par le rapport de la distance après migration et la distance de front de solvant.

$$\mathbf{RF = d / D}$$

d : Distance parcourue par le soluté (le constituant) en cm.

D : Distance parcourue par le front par l'éluant en cm.

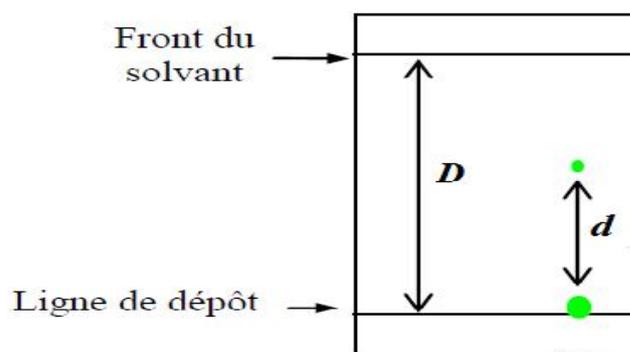


Figure 13: Plaquette de CCM.

3.7.3. Analyse par la chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P)

La clémentine est l'une des plantes les plus riches en composée phénoliques en général et en flavonoïdes en particulier, pour cela nous avons effectué une analyse qualitative par HPLC (Saidal) de l'extrait flavonoïde di et tri glycoside de l'échantillon issu d'arbres infestés par les cochenilles diaspines portant des fruits mature non infesté issus de verger âgée (50 ans) (qui à donné une meilleur zone d'inhibition) par rapport à deux étalons : rutine, Quercétine. une autre analyse par HPLC au niveau de laboratoire BPAM pour le même échantillon avec l'utilisation de neuf étalons : l'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide coumarique, l'acide salisalique, l'acide tannique, catéchine et phénol. Quercétine, rutine)

- **Principe**

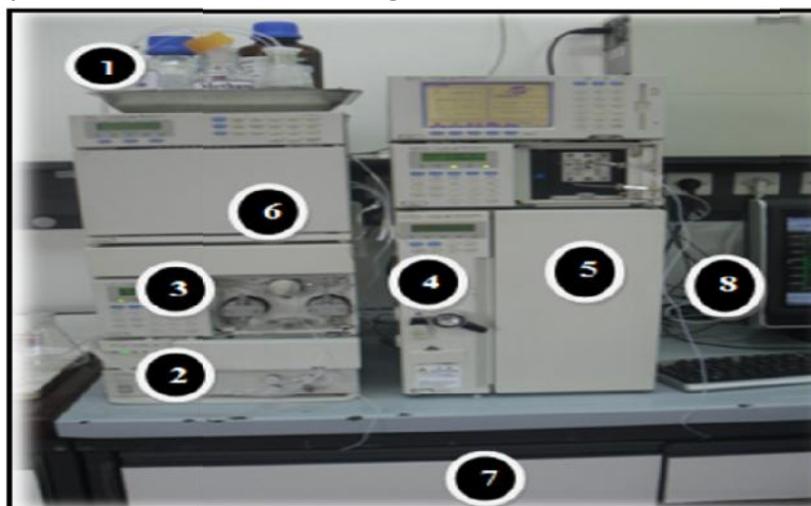
La chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P) est la technique la plus performante, utilisée pour la séparation et le dosage des produits non volatils thermo dégradables, tels que les composés phénoliques. Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération les analyses qualitatives et quantitatives d'un extrait complexe, ce qui permet l'étude des matériels végétaux très variés (Salgarolo, 2003 ; Pietta et *al*, 2003)

- **Appareillage de C.L.H.P**

Tout composé flavonique est caractérisé par son temps de rétention, c'est le temps écoulé entre le moment de l'injection et l'apparition du pic d'éluion. Ce temps de rétention n'étant parfaitement reproductible que dans des conditions expérimentales données, il est impératif de définir le système chromatographique dans lequel on travaille (Kamoun, 1997).

L'appareillage de la C.L.H.P est représenté schématiquement sur la figure 15; il comprend essentiellement :

- Un ou plusieurs réservoirs de la phase mobile.
- Un système de pompe.
- Un système d'introduction d'échantillon.
- Une colonne.
- Un système de détection et d'enregistrement.



1 : Bouteille réservoir de la phase mobil
2 : Module de dégazage
3 : Pompe
4 : Injecteur manuel (système d'introduction d'échantillon)
5 : Colonne
6 : Un système de détection
7 : Conteneur à déchets
8 : Système d'intégration et d'impression

Figure 14 : Appareil H.P.L.C.

a. Analyse par chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire physico-chimique (SAIDAL)

Tableau 3: Conditions d'analyse par H.P.L.C. (laboratoire physico-chimique (SAIDAL))

Matériel	Type et caractéristique	Fournisseur
-Colonne	C18	SHIMADZU
-Diamètre	4,6 cm	
-Longueur	25 mm	
- Température	25 C°	
Pompe :Débit	1ml/mn	SHIMADZU
Détecteur multifaisceaux	260nm 380 nm (365nm)	SHIMADZU
Micro-seringue	20µl	SHIMADZU

- **Préparation des échantillons**

- ✓ **Préparation de l'étalon**

Premièrement nous avons pesé 0,0016 mg de la poudre de la rutine que nous avons mis par la suite dans une fiole jaugée de 10ml, avec 5 ml de méthanol pur ajusté jusqu'au trait de jauge. On a met la fiole dans l'ultra son (appareil spécial pour bien mélanger la rutine et le méthanol et pour éliminer les bulles d'air) pendant quelque secondes.

- ✓ **Préparation de l'échantillon**

A l'aide d'une micropipette, 0,2 ml de l'extrait sont mises dans une fiole jaugée de 10ml ajuster le volume jusqu'au trait de jauge avec le méthanol pur, et mettre la fiole dans l'ultra son pendant quelque secondes.

L'extrait flavonoïde di et tri glycoside et la solution de la rutine et quercétine sont la phase stationnaire tandis que la phase mobile est formée du mélange :

Solvant A : CH₃COOH à 2% (acide acétique).

Solvant B: CH₃OH (méthanol pure).

Tableau 4: Le gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification de l'extrait flavonoïde di et tri glycoside. (Laboratoire physico-chimique (SAIDAL))

Temps (mn)	Solvant B	Solvant A
0	5	95
30	70	30
40	70	30

b. L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire BPAM

Tableau 5: Conditions de l'analyse par H.P.L.C (Laboratoire BPAM)

Matériel	Caractéristique	Type
-Colonne	C18	Agilent 1260
-Diamètre	4,6 cm	
-Longueur	250mm	
- Température	22 ± 8C°	
Pompe :	1ml/mn	
- Débit		
Détecteur multi-faisceaux	= 270nm, = 320nm et	
-longueur d'ondes	= 370nm.	
Micro-seringue	5µl	

✓ **Préparation des échantillons et des standards**

• **Préparation de l'extrait**

A l'aide d'une micropipette, 0,1 ml de l'extrait sont mesuré et mis dans une fiole jaugée de 10ml ajuster le volume jusqu'au trait de jauge avec le méthanol pur et l'extraits a été filtrés avant injection.

L'extrait et les standards sont la phase stationnaire tandis que la phase mobile est formée du mélange :

Solvant A : CH₃COOH à 0,2% (acide acétique).

Solvant B : Acétonitrile.

Tableau 6 : Gradient d'élution de la phase mobile utilisé pour la séparation et l'identification de l'extrait flavonoïde di et tri glycoside. (Laboratoire BPAM)

Temps (mn)	Solvant B	Solvant A
30	5%	95%

- **Préparation des étalons**

Des standards ont été injectés dans les mêmes conditions expérimentales. Ils permettent l'identification des pics des composés phénoliques en comparant les temps de rétention.

- c. **Expression des résultats**

Les flavonoïdes contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention obtenus par ceux des témoins.

3.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes

a. Objectif

Déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des bactéries à Gram-positif, des bactéries à Gram-négatif et de levure.

b. Principe

L'activité antimicrobienne des extraits flavonoïdes était testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (Osato 2009, Liao et al. 2010). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de patches imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antimicrobienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques.

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'extrait (Fig.16).

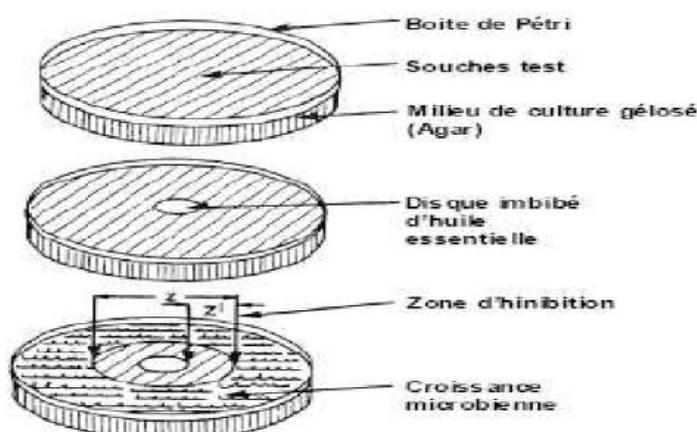


Figure 15: Illustration de la méthode de diffusion sur milieu gélosée sur boîte de Pétri (Zaika, 1988)

c. Préparation du milieu de culture et les suspensions microbiennes

Deux milieux de culture ont été utilisés :

✓ **Gélose de Soja Ttriptyque (GST)** : appelée communément Soja Agar DIFCO Réf 236950 pour les bactéries (*E. coli*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*)

✓ **Gélose de Dextrose de Sabouraud (GDS)** : appelé communément Sabouraud DIFCO Réf 210950 pour la levure (*C.albicans*)

Préparation (Annexe).

✓ **Stérilisation du matériel**

Le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

✓ **Coulage des boîtes de Petri :**

Après stérilisation, au refroidissement des milieux de 37 à 45 C°, nous coulons les boîtes aseptiquement sous une hotte à flux laminaire stérile (annexe 1). Nous utilisons des boîtes en plastique à usage unique, stérilisées par le fournisseur.

✓ **Préparation de l'inoculum**

Nous avons utilisé des cultures jeunes fraîchement réactivées. La réactivation se fait comme suit :

Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile, la souche du tube de milieu de conservation (gélose nutritive), Les souches sont ensemencées dans la gélose nutritive (Soja Agar ou Sabouraud) puis porté à l'incubateur à 35°C ± 2°C pendant 24 h pour les bactéries, et à 25°C pendant 48 heures pour la levure. Pour optimiser leur croissance.

Nous préparons la suspension de chaque souche séparément, en prélevant à l'aide d'une anse de platine stérile à 3 boucles de culture jeune, et on les dépose dans 5ml d'eau Physiologique stérile puis agite au vortex (Annexe 1).

d. Ensemencement et dépôt des disques

- **L'ensemencement**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

✓ Dépôt de disque

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose stérile (disque de référence : -NO : 321 261, ANTIBIOTICA-TESTBL TTCHEN Schleicher & Schuell W.-Germany. Diamètre : 9mm) (annexe 1) et l'imbibber avec l'extrait à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, ce dernier va absorber progressivement l'extrait jusqu'à l'imprégnation totale du disque.

✓ Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un lecteur de zone antibiotique (FISHER-Lilly) en mm (annexe 1).

3.9 Détermination des CMI

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu.

A partir de la solution mère de l'extrait préparée dans le méthanol de concentration 0,62 g/ml, nous avons préparé des solutions filles de concentrations allant de 0,49 à 0,07g/ml.

III. Résultats et discussion

Dans cette partie nous avons exposé les résultats de l'étude phytochimique, la caractérisation et à l'activité antimicrobienne des composés flavonoïdes extraits d'écorces de *Citrus Clementina*.

III.1. Détermination des ravageurs infestant des fruits de clémentinier

Les résultats observés par la loupe binoculaire montrent la présence de deux ravageurs vivant sur les fruits de clémentinier et appartenant à la famille des diaspididae :

La première espèce est *Parlatoria ziziphi* (poux noir de l'oranger) et l'autre est *Aonideilla aurantii* (poux rouge de Californie). (L'espèce et la famille ont été identifiées en présence de Mme Belguendouz tout en utilisant la clé de détermination des cochenilles diaspidines) (Fig. 16).

1- *Parlatoria ziziphi* (poux noir de l'oranger) et *Aonideilla aurantii* (poux rouge de Californie)

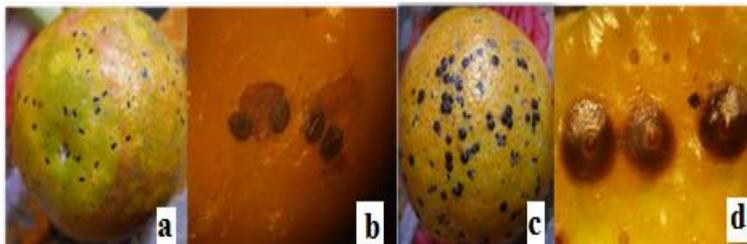


Figure 16 : *Parlatoriaziziphi* (a) *Aonideillaaurantii* (c) sur fruit et (b,d) observées par une loupe binoculaire (Gr : 10×).

III.2. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité obtenus suite à une dessiccation nous permet d'exprimer nos résultats en pourcentage de matière fraîche. Ces résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableaux 7 : Détermination du taux d'humidité

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
La maturité de fruit	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
Echantillons	Arbre non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté
Le taux d'humidité%	12,7	5,3	13,6	20,2	18,4	16,6	5,4	7,9	6,9	8,01	6,06	5,59

Selon (Houari et Ould Brahim, 2010), la teneur élevée en eau est en relation étroite avec l'activité métabolique. L'eau représente la phase aqueuse dans laquelle se font les réactions métaboliques et aussi elle fournit l'hydrogène indispensable aux réactions de biosynthèse.

Le taux d'humidité nous donne une idée sur la dégradation des principes actifs de la plante. Les poudres de l'échantillon d'arbre non infesté avec des fruits au stade mature non infesté issue de verger jeune) présente des taux d'humidité élevés par rapport aux autres, ce qui présente un risque de dégradation du principe actif.

Selon Bretaudeau et Fauré (1992), c'est la teneur en eau qui tient en dissolution tous les sels minéraux, les sucres, les enzymes et d'autres composés dans les fruits.

La variation de la teneur en eau peut être due aux :

- Expositions à différentes conditions pédoclimatiques
- Stade de maturation
- Répartition géographique
- L'âge de la plante
- L'état sanitaire de la plante et du fruit

III.2.1. Analyse statistique

Selon l'analyse de la variance effectuée par le test GLM, l'humidité varie d'une manière très significative ($p= 0,006$, $p<5\%$) en fonction de l'âge de l'arbre et significative ($p=0,079$, $p>5\%$) en fonction de la maturité des fruits. Les facteurs santé de l'arbre et santé du fruit n'ont aucun effet sur cette dernière. (Figure 18) annexe 1) (Tableau 8: annexe 3).

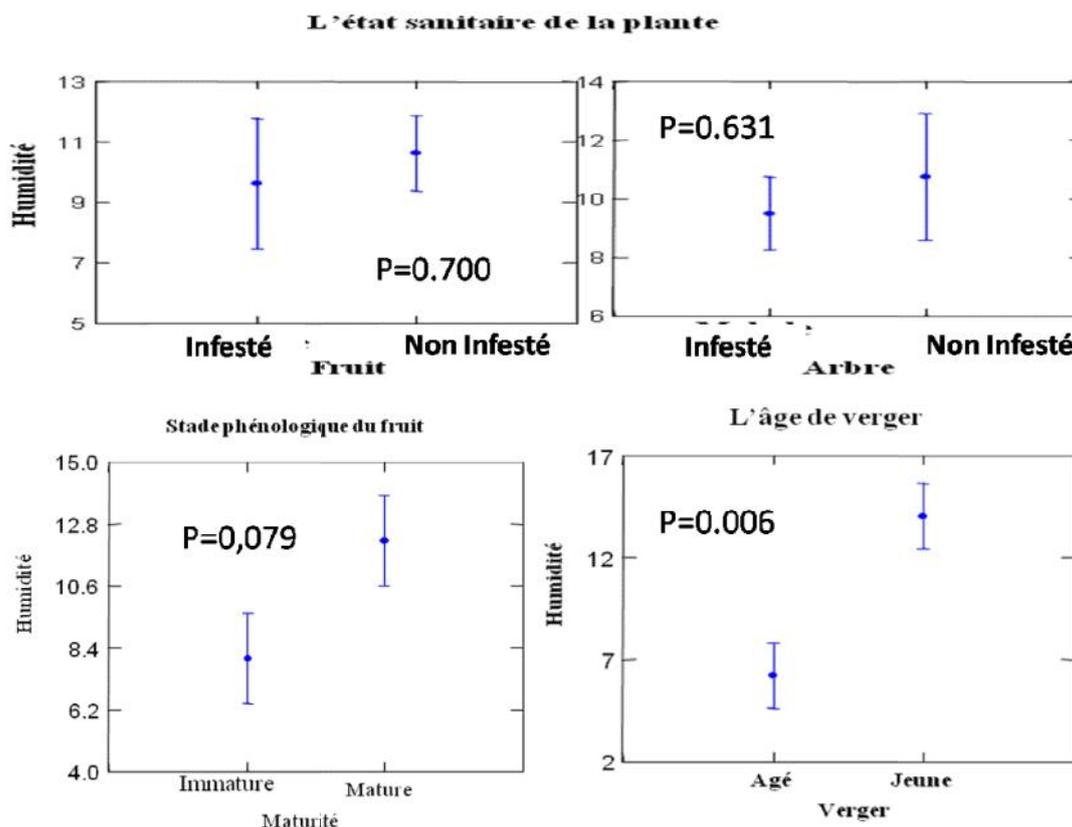


Figure18 : Analyse de variance par le test GLM pour l'humidité

III.3. Test phytochimique pour identifier la présence des flavonoïdes

Le test phytochimique réalisés sur le *Citrus Clementina* révèle la présence des flavonoïdes.

La mise en évidence des flavonoïdes constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé le test phytochimique sur la poudre de clémentinier,

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : .

Tableaux 9: Résultat de test phytochimique appliqué sur la poudre de l'écorce de *Citrus Clementina*.

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
La maturité de fruit	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
Echantillons	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté
La résultats	++	++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+++	+++

Les résultats expérimentaux, de l'étude phytochimique présenté dans le tableau (9), mené sur la poudre de l'écorce de *Citrus Clementina*, ont montré la présence certaine de flavonoïdes. La concentration variable entre les douze échantillons dépend d'un certain nombre de facteurs : le stade de maturation, le sol, les conditions climatique, la culture du clémentinier et le traitement auquel est soumise (Baustista et al, 2007).

III.3. Extraction des flavonoïdes

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe des polyphénols résidé dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante avec plus de 5000 composés déjà décrit(Gomez-Caravaca et al., 2006).

Les extraits flavonoïque obtenus présentent l'aspect d'une gelée colorée respectivement en rouge orangée foncé et claire.

L'extraction des zestes (écorces) de *Citrus Clementina* par macération dans le mélange méthanol /eau et la partition entre les différents solvants nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

- **Phase de hexane** : obtenue après affrontement par l'hexane mais elle est éliminée car elle ne contient que des matières grasses, des chlorophylles, et des impuretés.
- **Phase de chloroforme** : obtenue après affrontement par chloroforme, cette étape permet d'extraire les flavonoïdes aglycones
- **Phase acétate d'éthyle** : obtenue après affrontement par l'acétate d'éthyle, ce dernier qui permet d'extraire les flavonoïdes, en entraînant les aglycones, les mono-Oglycosides et partiellement les di-O-glycosides (Benkiki, 2006)
- **Phase butanol** : obtenue après affrontement par n-butanol, ce dernier qui permet d'extraire les flavonoïdes di et tri glycosides.
- **Phase aqueux** : constitué des flavonoïdes les plus polaires.

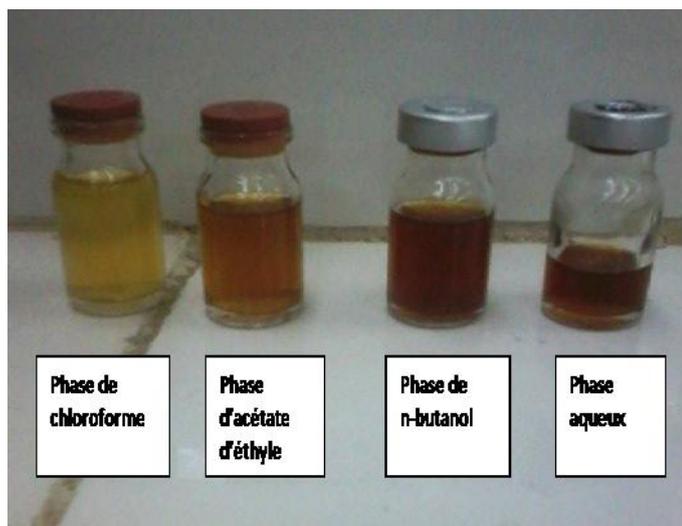


Figure 19: Les quatre phases d'extraits obtenus par l'extraction

III.4. Calcule du rendement en extraits flavonoides

L'extraits ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes, le rendement a été déterminé par apport à 30g de matériel végétal.

Les résultats obtenus sont mentionnées dans les tableaux 10 : (Annexe 3) :

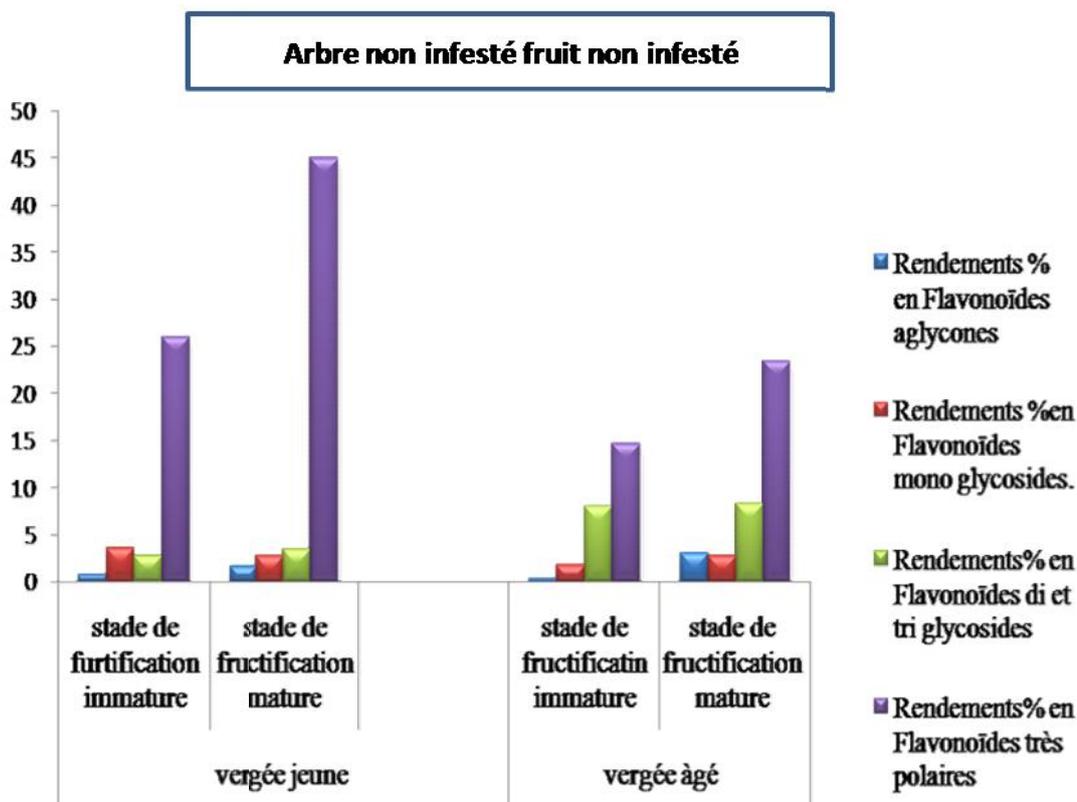


Figure 20 : Variation du Rendement de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) selon l'état sanitaire du fruit non et de l'arbre.

Les résultats montrent que l'écorce du fruit non infesté mature issu de l'arbre non infesté contient différentes fractions de flavonoïdes. Les rendements obtenus varient entre 0,33% et 45% dont le meilleur est celui de l'extrait de flavonoïdes très polaires avec 45%, et cela dans un verger jeune.

Les extraits en flavonoïdes di et tri glycosides issu du verger âgé au stade mature ont un rendement de 8,26%, suivi de l'extrait en flavonoïdes mono glycosides avec 3,53% du verger jeune au stade immature. Quant au plus faible rendement est celui obtenu par l'extrait en flavonoïdes aglycone issu du verger âgé au stade immature avec un pourcentage de 0,33%.

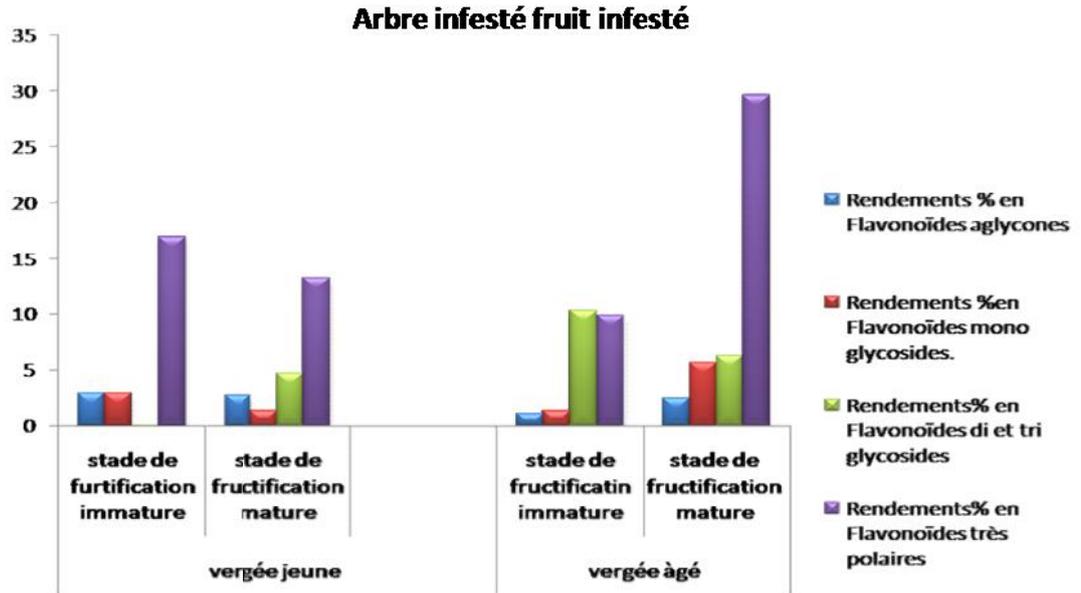


Figure 21 : Variation du Rendement de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) selon l'état sanitaire de l'arbre et du fruit.

Les résultats enregistrés dans la figure montrent que le rendement en flavonoïdes très polaires représente le rendement le plus élevé par rapport aux autres extraits flavonoïques. Il est apparu que les rendements sont meilleurs dans le verger âgé (29,6 %) pendant la fructification mature, aussi on a remarqué pendant la fructification immature issus de verger âgée un rendement en flavonoïdes di et tri glycosides très important 10,26%. le rendement en flavonoïdes mono glycosides dans le verger âgé au stade de fructification immature représente le plus faible rendement 1,06%.

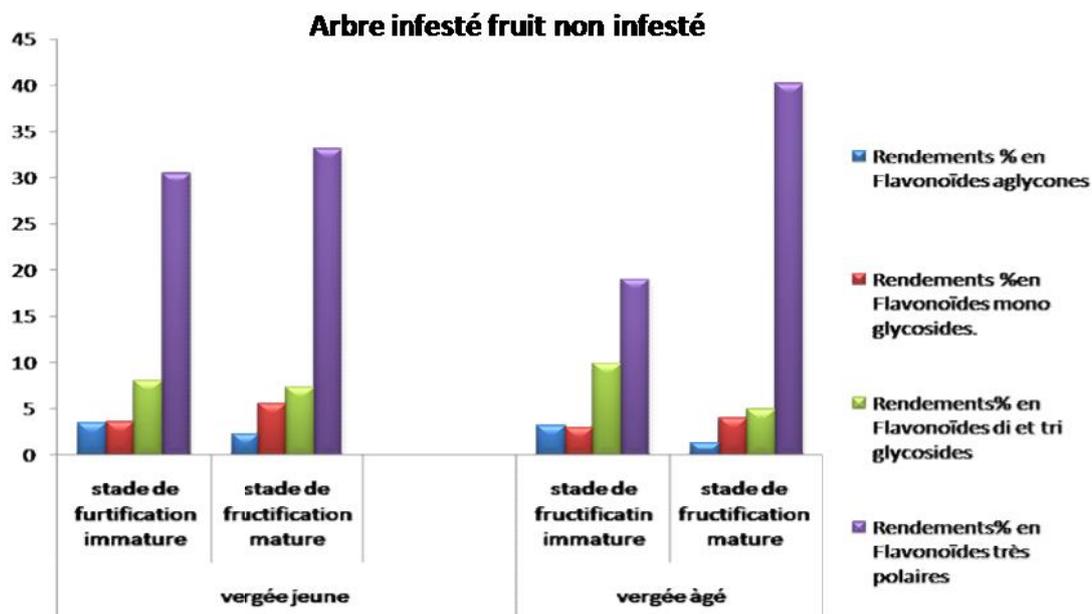


Figure 22 : Variation du Rendement de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) selon l'état sanitaire de l'arbre et du fruit.

Les rendements en extraits flavonoïde sont variables selon les vergers et la période phénologique de la plante. Cependant, les rendements les plus importants sont enregistrés dans l'extrait en flavonoïdes très polaires au stade de fructification mature issus de verger âgé (40,16%). On note aussi que l'extrait en flavonoïdes aglycones présent un très faible rendement avec 1,33%. Par rapport aux autres extraits

D'après les résultats obtenus dans la figure 20, 21 et 22 nous remarquons que les rendements en extrait sont variables selon: la maturité et la santé des fruits, de type de composé flavonoïde. En effet, nous notons bien une différence de proportion entre les extraits flavonoïques où on remarque que les flavonoïdes des extraits de l'espèce *Citrus Clementina* sont beaucoup plus polaires qu'apolaires, ce qui explique le rendement élevés de l'extrait aqueux (45%) par rapport aux trois autres extraits, flavonoïdes aglycones, flavonoïdes mono glycosides, flavonoïdes di et tri glycosides, alors que les flavonoïdes apolaires sont moins présents, deux fois moins abondants que les flavonoïdes polaires, du fait du faible pourcentage obtenus avec l'extrait chloroformique (flavonoïdes aglycone).

D'une manière générale, le protocole d'extraction des flavonoïdes de *Citrus Clementina* suivi, montre que cette espèce est riche en flavonoïdes, dont ceux

glycosylées (polaires) sont plus abondants que ceux non glycosylées (apolaires), cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. En effet (Sun *et al*, 2007) ont montré que, le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les polyphénols. En outre, selon Turkman *et al*, (2007), l'utilisation de l'acétate d'éthyle permet la dissolution d'une grande quantité de polyphénols, ce qui justifie le pourcentage élevé des extraits.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Bouزيد , 2009).

De façon générale, le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre, cela peut être attribué selon (Madi, 2009) aux :

- 1- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc.
- 2- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante.
- 3- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des flavonoïdes.

Analyse statistique

Selon l'analyse de la variance effectuée par le test GLM, le rendement varie d'une manière hautement significative ($p=0,000$, $p<5\%$) en fonction de type de composé flavonoïde et significative ($p=0,064$, $p=0,038$ $p>5\%$) en fonction de la maturité et la santé des fruits respectivement. Les facteurs âge de l'arbre et santé de l'arbre n'ont aucun effet sur ce dernier. (Fig 23) (Tab : 11 annexe 3).

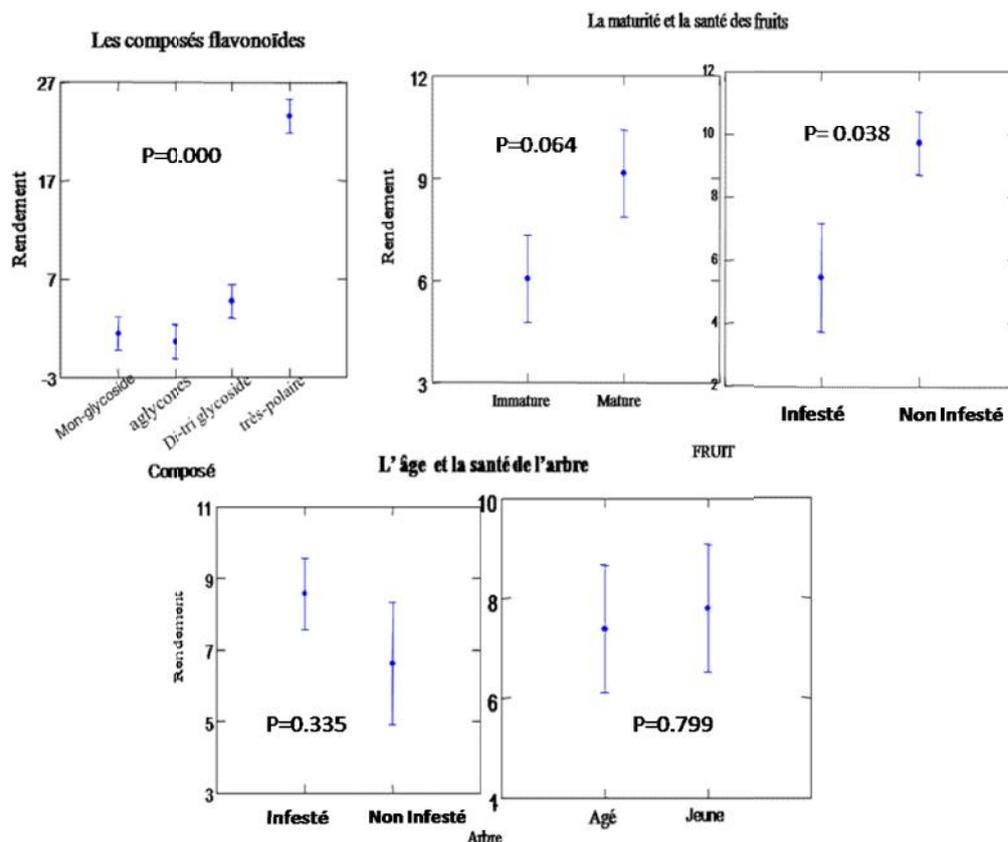


Figure 23 : Analyse de la variance par le test GLM pour le rendement en extraites flavonoïdes

III.5.2 Détermination de potentiel d'hydrogène : Tableau 12 (annexe 3)

L'une des paramètres qui peut agir sur la stabilité des flavonoïdes est le Ph, Ainsi, une élévation de la température et du Ph favorisent la dégradation des flavonoïdes. Dans ce cadre on a calculé le Ph de chaque extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) issus de douze échantillons. . En effet, la stabilité est plus faible à des ph basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules due soit à une déprotonation de ces composés (diminution du potentiel d'oxydation), soit à une stabilisation de l'oxydant (anion superoxyde) (Fargeix, 2000).

Le Ph de nos extraits varie entre 4,54 et 6,67 donc on constate que nos extraits est acide et les flavonoïdes sont stable donc l'absence de risque de dégradation de flavonoïdes.

III.5.3 Analyse statistique

Selon l'analyse de la variance effectuée par le test GLM, le Ph varie d'une manière significative ($p= 0,058$, $p<5\%$) en fonction de la maturité du fruit. Les facteurs âge du verger, santé de l'arbre et santé du fruit et type de composé n'ont aucun effet sur ce dernier. (Fig 24) (Tab 13 : annexe...).

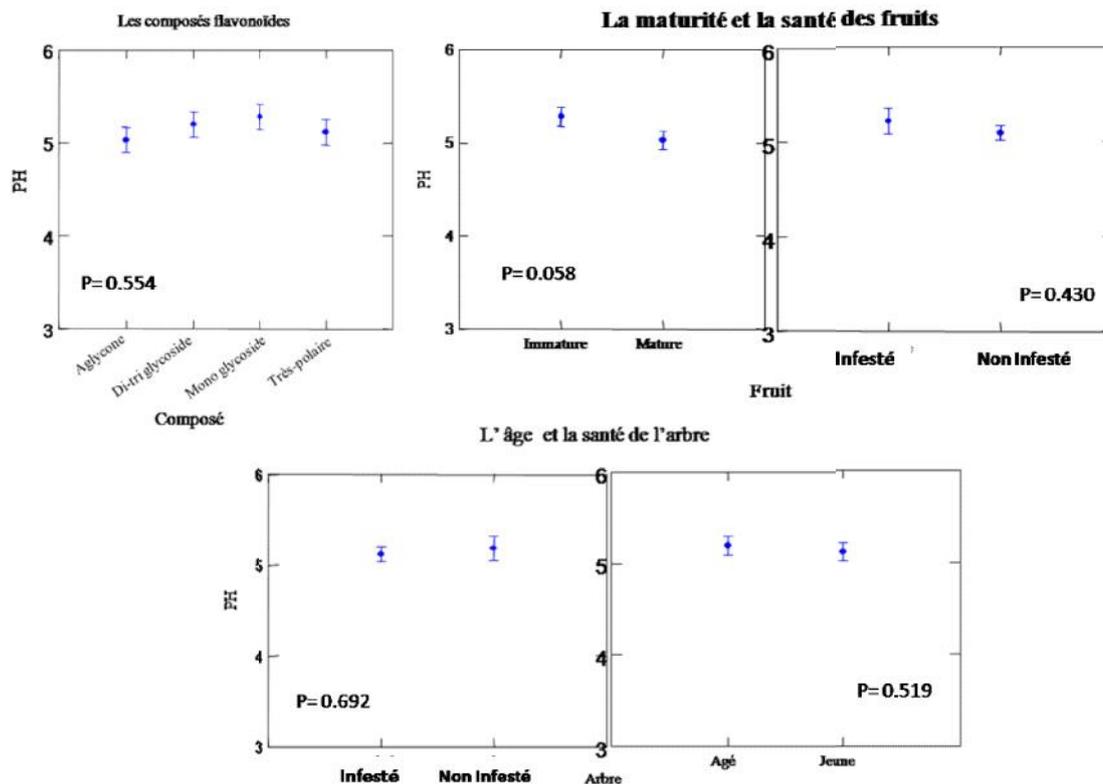


Figure24 : Analyse de la variance par le teste GLM pour le Ph des extraits flavonoïdes

III.6. Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon été la quercétine. La teneur en flavonoïdes exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine par millilitre d'extrait (mg EQ/ml). L'ajoute de la solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) aux 48 extraits forme une couleur plus ou moins jaunâtre. Cette coloration est due à la formation du complexe entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes. Les taux des flavonoïdes des 48 extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (figure : 25) (annexe 2) qui

suit une équation de type : $y = 9,160679 \cdot 10^{-4} \cdot X$ sachant que l'erreur résiduel = 0.005166 et le coefficient de corrélation= 0,984758mg équivalent quercétine /ml.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 14 (Annexe 3) et représenté dans les figures suivant :

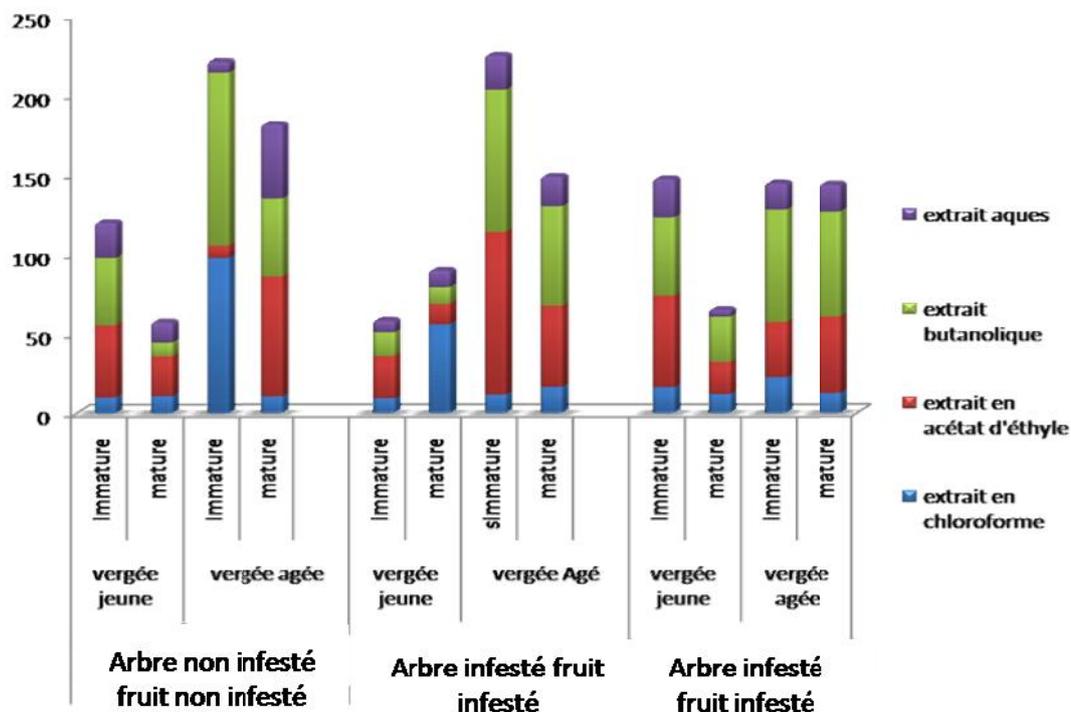


Figure 26 : Tenure des extraits en composés flavonoïdes selon les facteurs étudiés

D'après les résultats de la figure 26 nous remarquons :

La meilleure concentration en quercétine a été enregistré dans le fruit non infesté non mature issu d'un arbre infesté de vergée âgé avec une teneur en extrait butanolique (flavonoïdes di et tri glycoside) 109,05 mg/ml puis 101,72 mg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle (flavonoïdes mono glycoside) dans le fruit infesté non mature issu de l'arbre infesté dans le verger âgé puis 98,46 mg/ml pour l'extrait chloroformique (flavonoïdes aglycone) dans le fruit non infesté non mature issu d'un arbre non infesté de verger âgé puis dans le fruit non infesté mature issu d'un arbre sain de vergée âgé avec une teneur en extrait aqueux (flavonoïdes très polaire) 46,28 mg/ml.

Dans le verger âgé en obtient une meilleure concentration en quercétine par rapport au verger jeune.

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait butanolique est l'extrait le plus riche en flavonoïdes suivi par l'extrait d'acétate éthyle ensuite par l'extrait chloroformique. Cette différence dans les résultats dépend certainement de la polarité des solvants utilisés et leurs caractéristiques physico-chimiques. Et Cela est dû au solvant pour le fractionnement : l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Ces solvants peuvent libérer d'avantages les flavonoïdes complexes avec d'autres molécules.

En tenant compte, de la sélectivité de chaque solvant utilise pour le fractionnement on admet que les zestes de citrus est riche en di-Oglycosides et tri-glycosides et contient des flavonoïdes glycolyses et les aglycones. Ce qui est cohérent avec la découverte de **Mouly et al. (1998)**.

La teneur en flavonoïdes n'est pas stable et se diffère d'une plante à une autre même entre les espèces du même genre (**Madi, 2009**). Ceci pourrait être attribués aux différences de polarité des solvants, aux techniques d'extraction et aussi bien à d'autres facteurs environnementaux tels que le climat, l'exposition au soleil et la composition du sol, qui peut changer le métabolisme phénolique des plantes (**Chan, 2011**).

Les teneurs en flavonols varient fortement selon le type de fruit, le temps de croissance et l'exposition à la lumière. Ils peuvent être à l'état de traces ou présents à plusieurs centaines de milligrammes (**Aherne, 2002**).

III.6.1 Analyse statistique

Selon l'analyse de la variance effectuée par le test GLM, la teneur des extraits en quercétine varie d'une manière très significative ($p=0,002$, $p<5\%$) en fonction de l'âge de l'arbre et le type de composé flavonoïdes ($p=0,004$, $p>5\%$). Les facteurs santé de l'arbre et du fruit et la maturité du fruit n'ont aucun effet sur cette dernière. (Fig. 27) (Tab.15 :Annexe3).

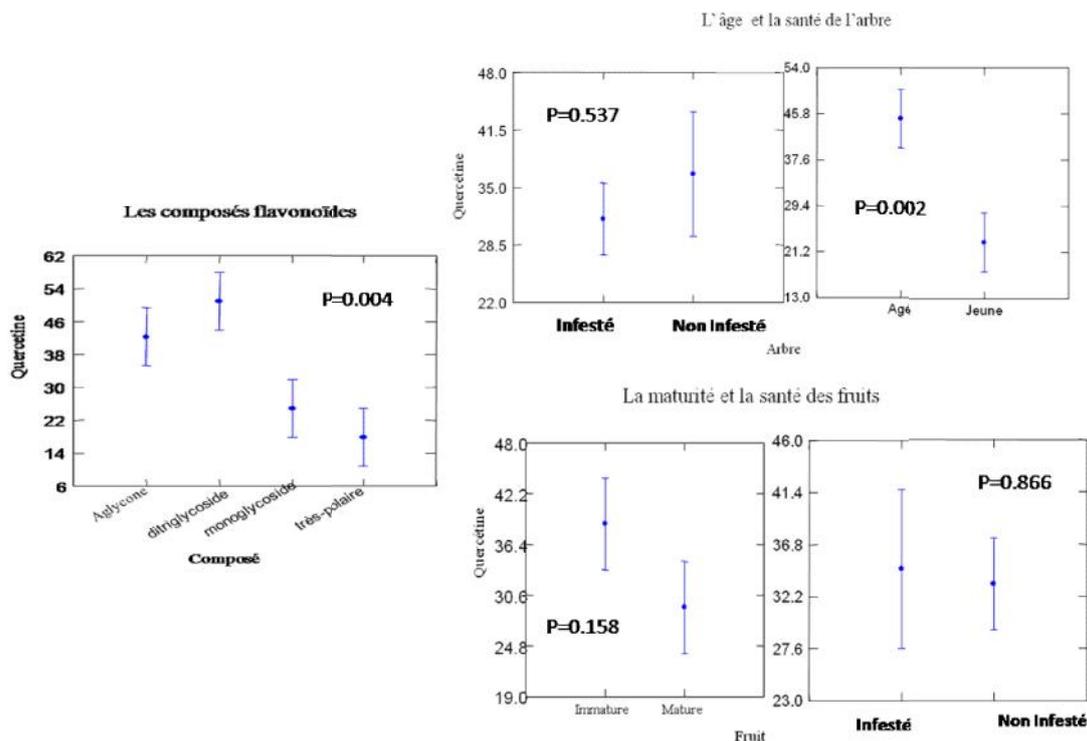


Figure 27 : Analyse de variance par le test GLM de la teneur des extraits en quercétine

III.7. Résultats d'analyse qualitative par Chromatographie sur couche mince (C.C.M).

Le choix de l'extrait (flavonoïdes très polaire) est lié au meilleur rendement des flavonoïdes dans tous les échantillons.

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux mélanges de solvants :

Mélange 1 : Toluène, méthanol, éthanol (40:30:30).

Mélange 2 : CH₂Cl₂/ Méthanol (80:20)

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous lampe UV (254), avant et, dans certains cas, après révélation par le réactif d'AlCl₃.

Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux 16, 17, 18, 19 et représentés dans la figure 28 et 29

I- Mélange 1 : Toluène, méthanol, éthanol (40:30:30).

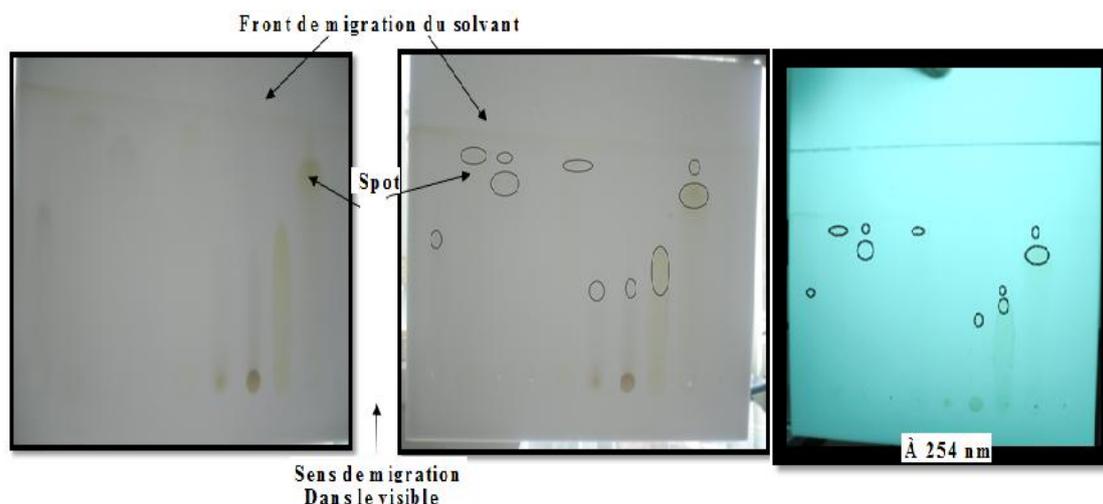


Figure 28:Chromatographie analytique sur couche mince d'extrait aqueux de l'écorce de *Citrus Clementina* et les standards avec le mélange de solvants (1).

Les spots flavoniques représentant les constituants du dépôt ont été caractérisés par leur fluorescence (couleur) et leurs rapports frontaux. Nous avons réalisé la révélation chimique par $AlCl_3$ vu que, certains spots étaient non visibles.

Comme il est illustré sur la figure précédant, nous avons déterminé le RF et couleur de chaque extrait et les résultats sont représentés dans les tableaux suivants.

Tableau 16: Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des extraits aqueux après révélation chimique et physique pour le mélange1.

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
Echantillon	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
UV à 254	Bleu	Jaune vert	Beige	Bleu	Vert	Beige	Jaune foncé	Jaune vert	Jaune vert	Beige	Jaune beige	Beige
FR	0,54	0,54	0,56	0,58	0,59	0,56	0,55	0,6	0,45	0,56	0,58	0,56

T1 : Arbre non infesté fruit non infesté. *T2* : Arbre infesté fruit infesté. *T3* : Arbre infesté fruit non infesté. *T4* : Arbre non infesté fruit non infesté. *T5* : Arbre infesté fruit infesté. *T6* : Arbre infesté fruit non infesté. *T7* : Arbre non infesté fruit non infesté. *T8* : Arbre infesté fruit infesté. *T9* : Arbre infesté fruit non infesté. *T10* : Arbre non infesté fruit non infesté. *T11* : Arbre infesté fruit infesté. *T12* : Arbre infesté fruit non infesté.

Tableau 17 : Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des standards après révélation chimique et physique. Pour le mélange 1.

Longueur d'onde	Les standards						
	Rutine	Quercétine	Coumarine	Acide ascorbique	Catéchine	Acide caféique	Acide salicylique
Visible	Jaune foncé	Jaune claire	Claire	Beige	Marron	Noire	claires
UV254	Jaune foncé	Jaune claire	Claire	Beige	Marron	Noire	claires
FR	0,55	0,90	-	0,56	0,90	0,95	0,80

La révélation de plaque CCM par la lumière UV à 254nm et par chlorure d'aluminium montre des spots de coloration et sauf l'acide salicylique et coumarine sont invisible

A travers les résultats de chromatogramme il ressort que :

L'acide ascorbique présente le même niveau de migration ($R_f = 0,56$) avec Les extraits aqueux de les échantillons T3 ; T6 ; T10 et T12, aussi on a remarqué que la rutine présente le même niveau de migration ($R_f = 0,55$) avec l'extrait aqueux T7.

On peut déduire donc que l'extrait aqueux de ces échantillons renferme la rutine (T7) et l'acide ascorbique (T3 ; T6 ; T10 et T12)

2- Mélange 2 : CH₂Cl₂/ Méthanol (80:20)

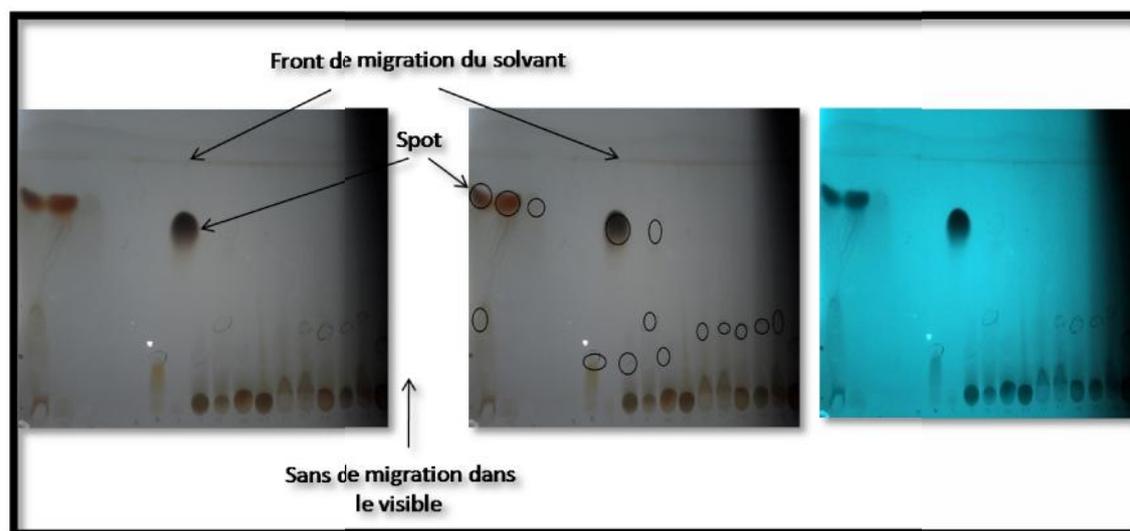


Figure 29: Chromatographie analytique sur couche mince d'extrait aqueux de l'épicarpe de *Citrus Clementina* et les standards avec le mélange de solvants 2.

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSION

Comme il est illustré sur la figure 28, nous avons déterminé le RF et couleur de chaque extrait et les résultats sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 18: Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des extraits aqueux. Pour le mélange 2

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
La maturité de fruit	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
Echantillon	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
UV à 254	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Beige	Marron	jaune	Jaune	Mauve	jaune	Jaune	jaune
FR	0,29	0,14	0,33	0,19	0,73	0,19	0,35	0,19	0,35	0,66	0,29	0,29

Tableau 19: Couleur des taches et les rapports frontaux obtenus dans le chromatogramme des standards pour le mélange 2.

Longueur d'onde	Les standards						
	Rutine	Quercétine	Coumarine	Acide ascorbique	Catéchine	Acide caféique	Acide salicylique
UV254	Jaune	Jaune	Claire	Jaune	Jaune	Beige	Jaune
FR	0,19	0,84	-	0,83	0,80	0,73	0,86

A travers les résultats de chromatogramme il ressort que :

La rutine présente le même niveau de migration ($R_f = 0,19$) avec Les extraits aqueux de les échantillons T4, T6. Aussi l'acide caféique présente le même niveau de migration ($R_f = 0,73$) avec l'extraits aqueux de l'échantillon T5.

Donc à partir de ces résultats (mélange 1 et 2), nous avons mis en évidence la présence de trois composés (la rutine, l'acide ascorbique et l'acide caféique) dans l'écorce du *Citrus Clementina* de ces deniers échantillons.

En 2001, Gorinstein et coll., ont déterminé la composition en acides phénoliques de la peau d'orange (même genre *Citrus*) par fluorescence. Les composés

identifiés par ordre décroissant sont l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide sinapique, l'acide férulique et l'acide ascorbique.

III.8. Résultats de l'analyse qualitative par la chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P).

a. L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire BPAM

L'extrait de flavonoïde di et tri glycoside de l'échantillon arbre infecté porte des fruits mature non infecté issus de verger âgé ont été analysés par HPLC. La phase mobile utilisée est formée du mélange :

Solvant A : CH₃COOH à 2% (acide acétique).

Solvant B : CH₃OH pure (méthanol).

Nous a permis d'obtenir le profil chromatographique par HPLC Agilent 1260 suivant :

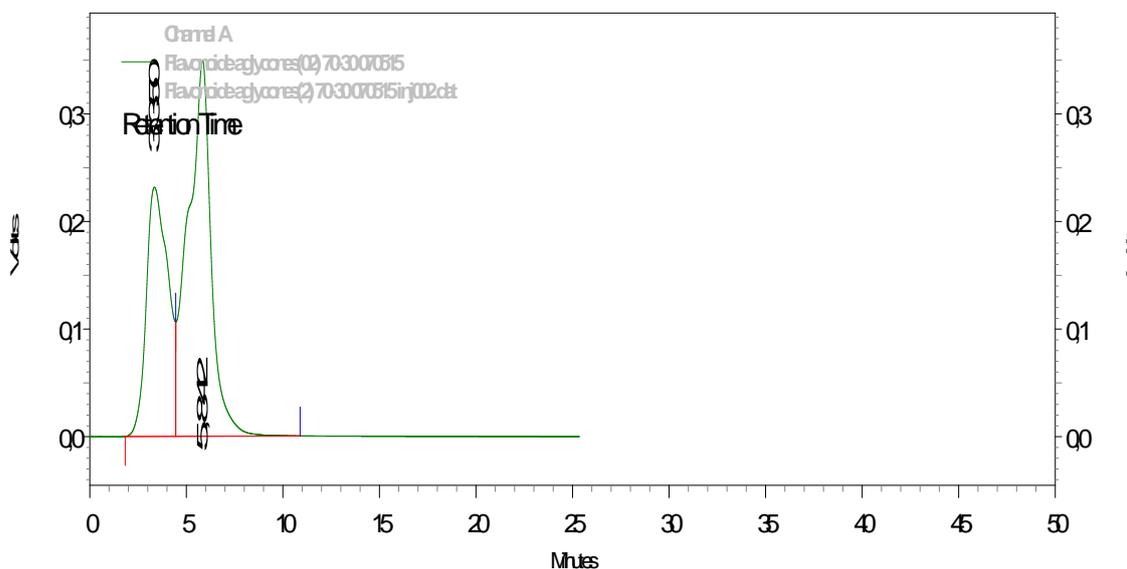


Figure 30 : Profil chromatographique des flavonoïdes aglycones de *Citrus Clementina* dans la plante détectée par HPLC à 365nm.

Les chromatogrammes du témoin (quercétine et rutine) sont représentés par fig. 31, 32 (Annexe 2).

En comparant les temps de rétention d'extrait à ceux des standards (rutine et quercétine), les résultats d'identification chromatographique pour les extraits d'épicarpe de *Citrus Clementina* en fonction des temps de rétention, sont donnés dans le tableau suivant ;

Tableau 20 : Le résultat d'analyse par HPLC

	= 365nm					
	Teneur %	Temps de Rétention (min)	Les étalons	Les étalons	Temps de Rétention	Résultat
L'échantillon	39,846	3,350		Quercitine	3,383	présence probable
	60,154%	5,842		Rutine	3,017	Absence

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans le chromatogramme permet l'identification probable de quercétine dans l'extrait de *Citrus Clementina*. Les résultats montrent la présence de quercétin qui a été identifié à (3,383) avec un pourcentage de rétention de 39,846%. Bien qu'il y a d'autre composé majoritaire et avec le manque de standard sont non identifié.

- Le deuxième composant, dont le pic est apparu à 5,842min, et présente un taux de rétention 60,154% ce composé est non identifié.

b. L'analyse par la chromatographie liquide à haute performance au niveau de laboratoire BPAM

Le même extrait de *Citrus Clementina* ont été analysés par HPLC SHIMADZU.

La phase mobile utilisée est formée du mélange :

Solvant A : CH₃COOH à 0,2% (acide acétique).

Solvant B : Acétonitrile.

Les chromatogrammes du témoin (l'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide coumarique, l'acide salisalique, l'acide tannique, catéchine et phénol, quercétine, rutine) sont représentés dans les figure (33-41) l'annexe 2.

Notre extrait a été identifié en comparant leurs comportements chromatographiques avec celui du témoin par comparaison du temps de rétention d'extrait et de témoins. Les résultats sont donnés dans le tableau 21) annexe 3:

Les chromatogrammes d'extrait sont représentés dans la figure suivant

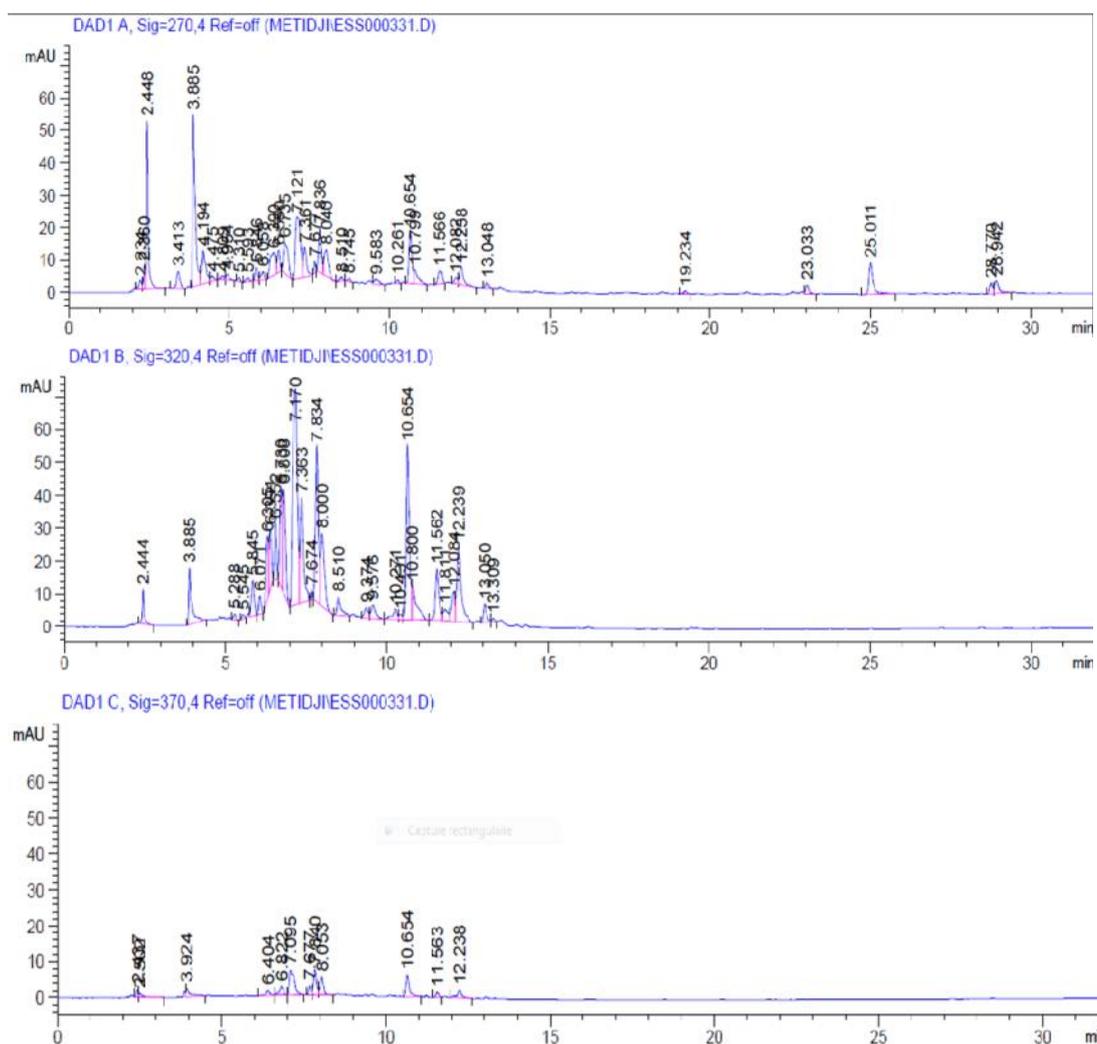


Figure 42 : Profil chromatographique des flavonoïdes très polaire présent dans l'écorce de *Citrus Clementina* détectée par HPLC à trois longueurs d'onde 270 / 320/ 370 nm en mode d'élution.

Les résultats montrent la présence de l'acide ascorbique qui a été identifié à 2.360 min avec un taux de rétention 1.3115% à longueur d'onde 270 nm, et

CHAPITRE VI: RESULTATS ET DISCUSSION

présence quercétine à (13.048 min) avec un taux de rétention 0.6286% à 270 nm et aussi la catéchine à 7.363 avec un taux de rétention 7.2692% à 320 nm.

Bien qu'il y a d'autre composé majoritaire (15,5070%, 10,6247% à 270nm) et avec le manque de standard sont non identifié.

Les résultats du tableau 22, montrent la présence composés majoritaires qui n'ont pas pu être identifiés par manque de standards.

Tableau 22 : Principaux composés majoritaires contenus dans l'extrait d'épicarpe de *Citrus Clementina* en fonction du temps de rétention

Loguer d'onde	Temps de rétention	Nom du composant	Teneur %
270	3.885	non identifier	15.5070
	7.121	non identifier	11.0743
	2.448	non identifier	10.6247
	10.654	non identifier	5.3424
	6.735	non identifier	5.2173
	25.011	non identifier	4.6788
	4.194	non identifier	4.6573
	6.390	non identifier	4.3423
	7.836	non identifier	4.2499
	8.040	non identifier	4.0324
	7.361	non identifier	3.6663
	12.238	non identifier	2.5331
	10.799	non identifier	2.2704
	3.413	non identifier	2.0583
	28.942	non identifier	2.0450
2.360	Ac ascorbique	1.3115	
13.048	quercitine	0.6286	
	Temps de rétention	Nom du composant	Teneur %
320	7.170	non identifier	19.2203
	10.654	non identifier	10.2931
	7.834	non identifier	8.9375
	7.363	catéchine	7.2692
	12.239	non identifier	6.3688
	6.808	non identifier	5.9190
	8.000	non identifier	5.4198
	6.730	non identifier	4.3100
	11.562	non identifier	3.5734
	10.800	non identifier	3.2486
	Temps de rétention	Nom du composant	Teneur %
370	7.095	non identifier	23.6889
	7.840	non identifier	14.5769
	10.654	non identifier	13.9979
	8.053	non identifier	11.5635
	12.238	non identifier	6.9989
	3.924	non identifier	6.8503
	6.822	non identifier	6.5407

III.9. Résultats des analyses microbiologiques

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de ces extraits, nous avons préféré de les tester contre plusieurs cibles à structures cellulaires et un métabolisme particulier.

Nous avons d'abord procédé à l'étude de leur sensibilité vis-à-vis des quatre extraits (chloroformique, butanolique, acétate d'éther, aqueux) issus de douze échantillons par la méthode de diffusion des extrais en disques en milieu gélosé. Ensuite nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur milieu solide.

III.9.1. Résultats de l'effet antimicrobien

Les tests de l'antibiogramme permettent de révéler la sensibilité ou la résistance des différents germes aux différents extraits flavonoïdes de *Citrus clementina*.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait est interprétés en fonction du diamètre des zones de l'inhibition des germes testés et motionnés dans les tableaux (23- 27) (Annexe 3).

Pour notre interprétation nous avons utilisés les intervalles de zone d'inhibition suivants (Chifundera et *al*, 1990) :

- [0 à 9 mm [pas d'inhibition ou souche résistante.
- [10 à 15 mm [: souche peu sensible.
- [16 à 20 mm [: souche sensible ou intermédiaire.
- Plus de 21 mm : souche très sensible.

Remarque : Les disques témoins de papier contenant seulement le Méthanol n'ont prouvé aucune zone d'inhibition, donc le Méthanol n'a pas d'effets sur les résultats de l'antibiogramme.

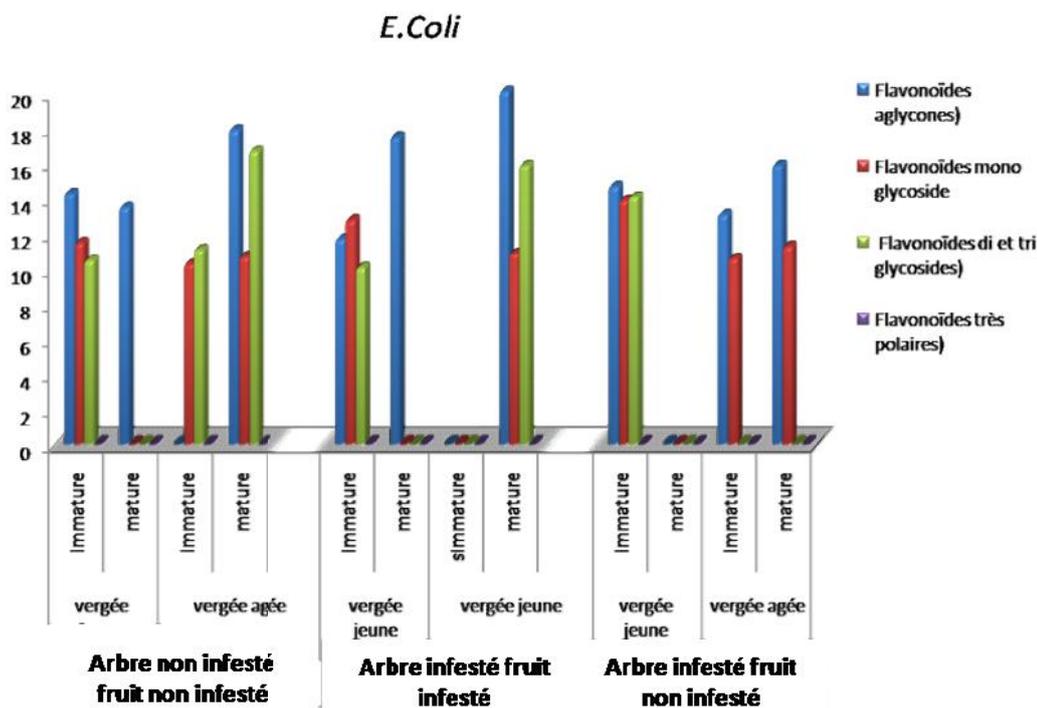


Figure 43 : Diamètres des zones d'inhibition (*E.Coli*) obtenues par les extraits flavonoïdes de *Citrus Clementina*.

Les extraits flavonoïques (flavonoïdes aglycones, flavonoïdes mono glycoside, flavonoïdes di et tri glycosides) de clémentinier donnent des zones d'inhibitions de croissance de *E.Coli* qui varient de 10mm à 20mm. La plus élevée est celle de l'arbre infesté fruit infesté mature issue de verger âgé (20mm) tandis qu'une résistance a été observée pour certains extraits. Ce qui montre l'effet des infestations de cochenilles, l'âge de l'arbre et le stade de maturité de fruits sur la qualité des extraits et de même sur leur activité biocide.

Une résistance totale est marquée pour les souches d'*E. Coli* contre les extraits aqueux de tous les échantillons.

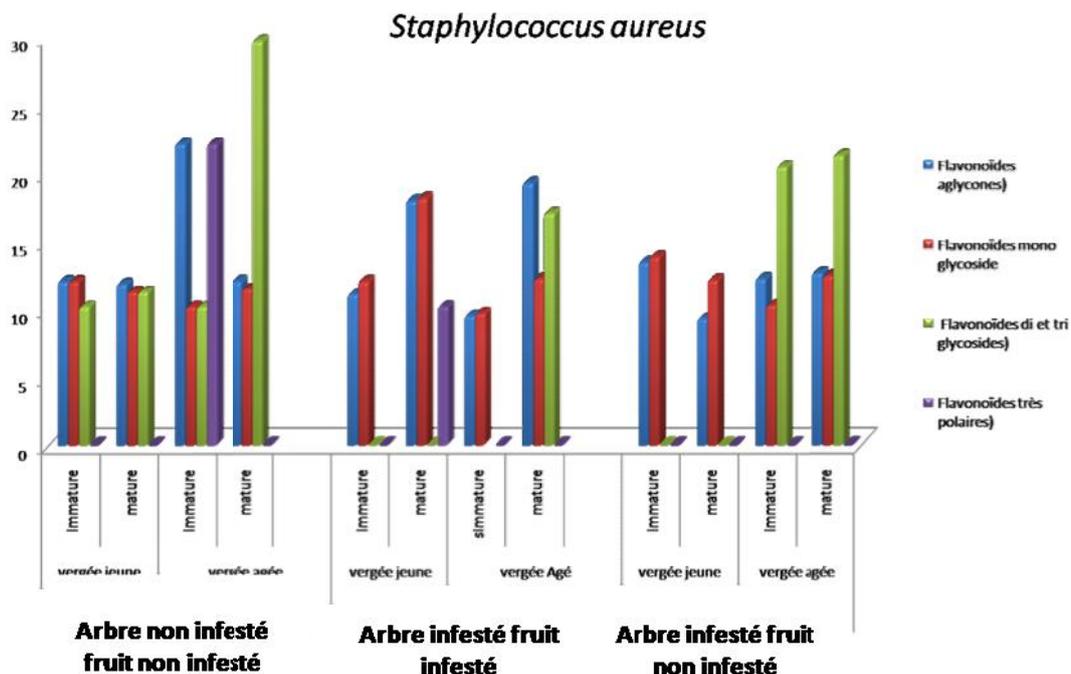


Figure 44: Diamètres des zones d'inhibition (*Staphylococcus aureus*) obtenues par les extraits flavonoïdes de *Citrus Clementina*.

Le *Staphylococcus aureus* montre une sensibilité à la plupart des extraits préparés de *Citrus Clementina* avec une grande sensibilité vis-à-vis des flavonoïdes di et tri glycoside de l'échantillon « arbre non infesté porte des fruits non infesté mature issus de verger âgé avec 29 ,6mm.

En fonction de diamètre d'inhibition, ce germe se situe dans l'intervalle peu sensible et très sensible aux extraits flavonoïdes aglycones et flavonoïdes mono glycoside et résistant et très sensible aux extraits flavonoïdes très polaires et flavonoïdes di et tri glycosides. Les diamètres d'inhibition sont variables en fonction de l'âge, l'état sanitaire et la période phénologique de la plante. Plusieurs études ont montré l'effet bactéricide des flavonoïdes sur un *Staphylococcus aureus* (Remdane, 2009).

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC peut s'expliquer parla probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le Ph, et aux extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentineet al, 2006).

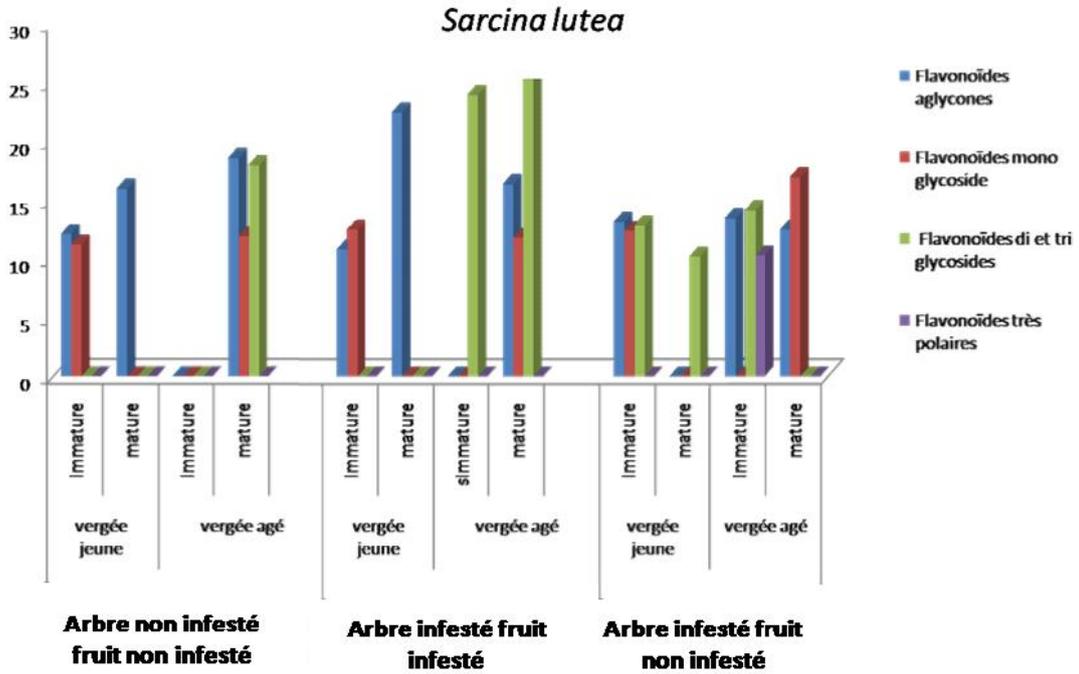


Figure 45: Diamètres des zones d'inhibition (*Sarcina lutea*) obtenues par les extraits flavonoïdes de *Citrus Clementina*.

Le *Sarcina lutea* montre une sensibilité à certains extraits préparés de la plante, avec une grande sensibilité vis-à-vis des flavonoïdes di et tri glycosides de l'échantillon arbres infesté porte des fruits infesté issus de verger âgé (24mm).

En fonction de diamètre d'inhibition, ce germe se situe dans l'intervalle résistant et très sensible à tous les extraits préparés.

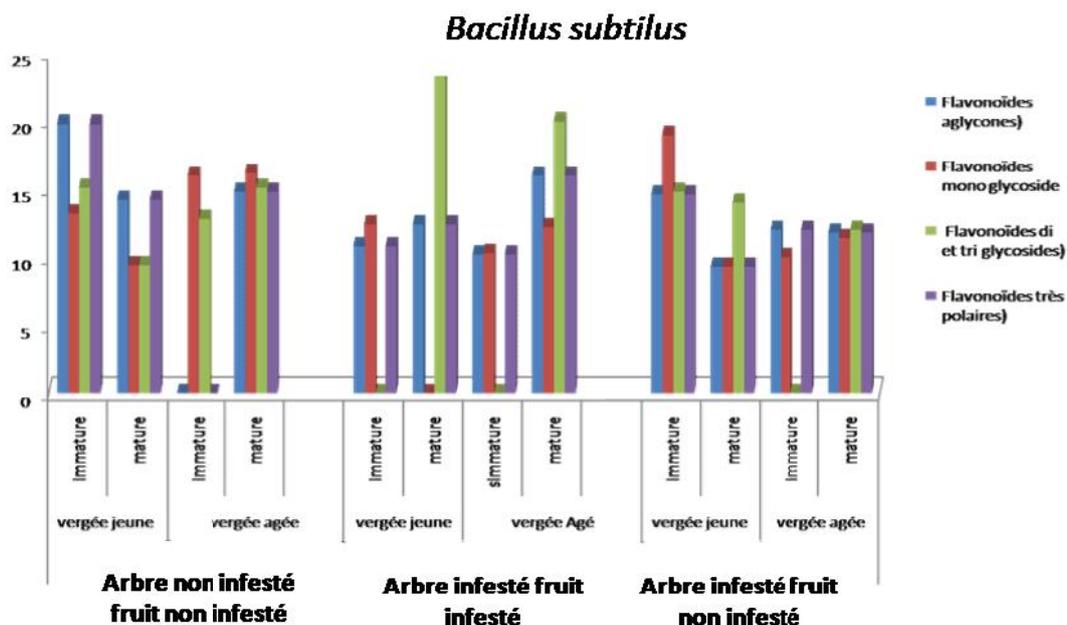
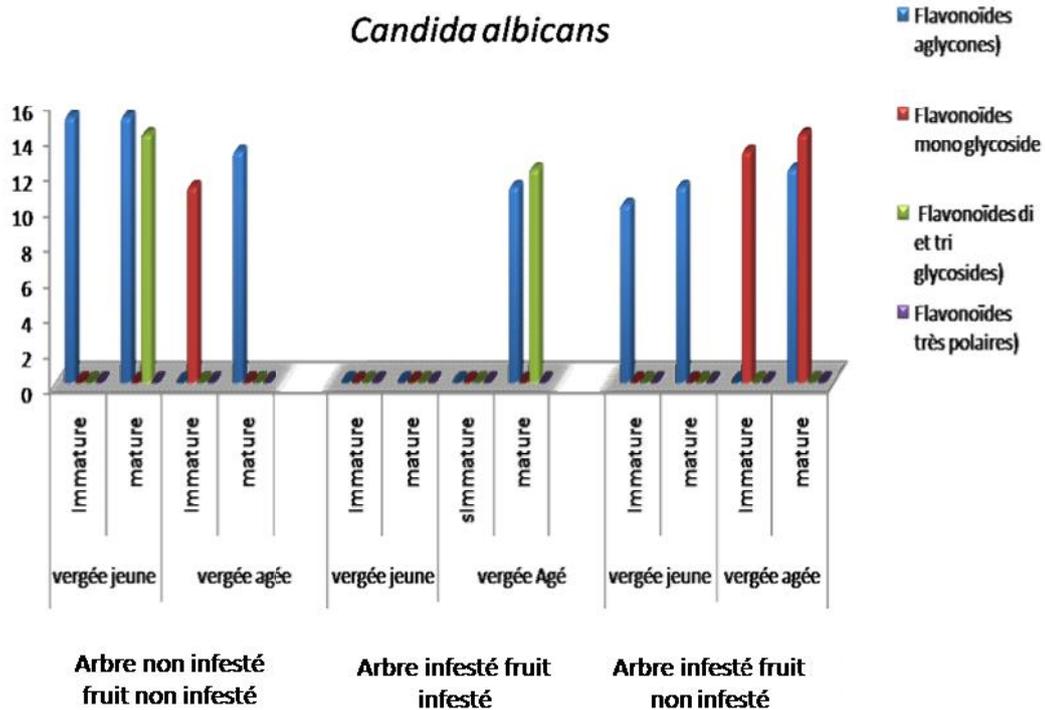


Figure 46: Diamètres des zones d'inhibition (*Bacillus subtilis*) obtenues par les extraits flavonoïdes *Citrus clementina*

D'après la figure 49, nous remarquons que les quatre extraits présentent une action inhibitrice sur le *Bacillus subtilis*, avec une grande sensibilité vis-à-vis des flavonoïdes di et tri glycosides de l'échantillon fruits mature infesté d'arbres infesté issus de verger jeune (25mm). Les extraits aqueux ont donné un diamètre plus au moins important 19,8 mm, c'est le diamètre le plus élevé enregistré de l'échantillon fruits non mature non infesté des arbres non infesté issus de verger jeune.



. **Figure 47:** Diamètres des zones d'inhibition (*Candida albicans*) obtenues par les extraits flavonoïdes de *Citrus Clementina*

D'après la Figure, nous constatons facilement que les flavonoïdes très polaire d'épicarpe du *Citrus Clementina* n'a pas une bonne activité sur la souche *Candida albicans*.

Les résultats microbiologiques ont montré que les flavonoïdes *Citrus Clementina* agissent différemment sur les espèces bactériennes testées.

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe (la sensibilité et de *Sarcina lutea*, et *Staphylococcus aureus* aux flavonoïdes testés) ou une action moindre (*Escherichia coli*, et *Bacillus subtilis*) voire même nulle sur un autre (la résistance de *Candida albicans*.)

La sensibilité des bactéries à gram+ est due selon (Balentine et al, 2006) à plusieurs facteurs tels que principalement les changements environnementaux et en particulier le Ph et l'absence de la membrane externe chez le microorganisme.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Fallehet *al*, 2008 ; Hayouniet *al*, 2007 ; Turkmenet *al*, 2007 ; Shanet *al*, 2007 ; Koné *et al*, 2004). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des proies dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en Na Cl (Georganteliset *al*, 2007).

Les différences trouvées peuvent être attribuées également aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction (Moreira *et al*, 2005 ; Sagdic et Ozcan 2003 ; Celiktas *et al*, 2007a, Turkmen *et al*, 2007), préparation de l'extrait, solvant utilisé, la sensibilité des bactéries (Loziene *et al*, 2007), la charge du disque qui influe sur l'activité antimicrobienne, Rasooli et ses collaborateurs, (2008), la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi les résultats (Natarajan *et al*, 2005) et (Fazeli *et al*, 2007) et en fin l'organe de la plante utilisé (Natarajan *et al*, 2005) et sa composition chimique.

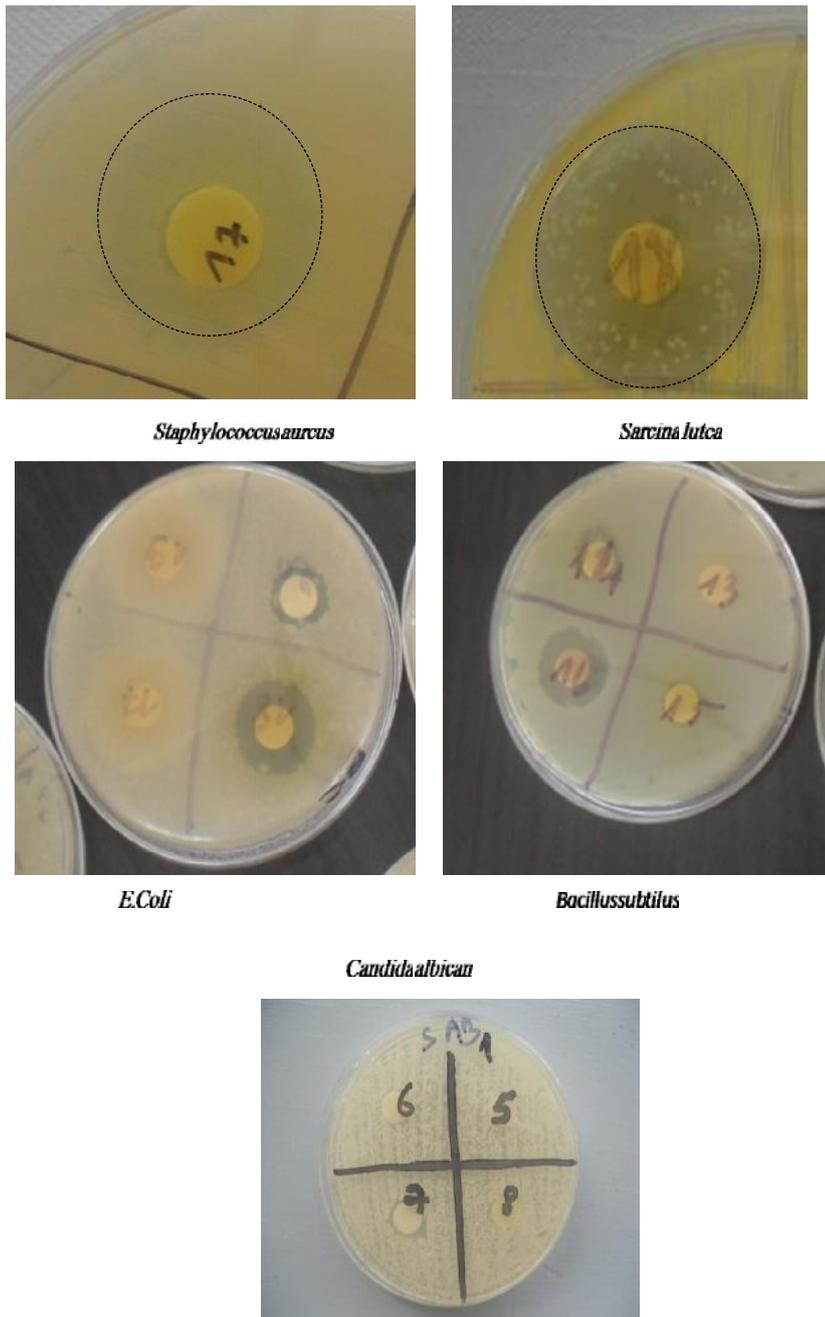


Figure 48: Résultats de tests d'antibiogramme des extraits flavonoïdes de *Citrus Clementina*

Malgré l'existence des zones d'inhibition, relativement déférentes, nos résultats prouvent montrent l'existence de l'activité antibactérienne des extraits flavonoïdes de l'écorce de clémentine contre les cinq souches pathogènes testés. Donc, il est intéressant d'estimer la CMI de *Staphylococcus aureus* la souche la plus pathogène.

Détermination des CMI

La détermination de CMI de l'extrait qui possède la plus fort zone d'inhibition (29,6mm) par la méthode de dilution en milieu gélosé donne les résultats suivants (tab.28) :

Tableau 28 : Valeurs des concentrations pour l'extrait qui a un effet antibactérien sur la souche *Staphylococcus aureus* exprimées en pourcentage (%)

Pourcentage	100%	80%	60%	50%	25%	12%
La concentration de l'extrait g/ml	0,623	0,4984	0,3738	0,3115	0,1531	0,074
Zone de inhibition	29,6	22,1	18	15,4	10,3	Abs

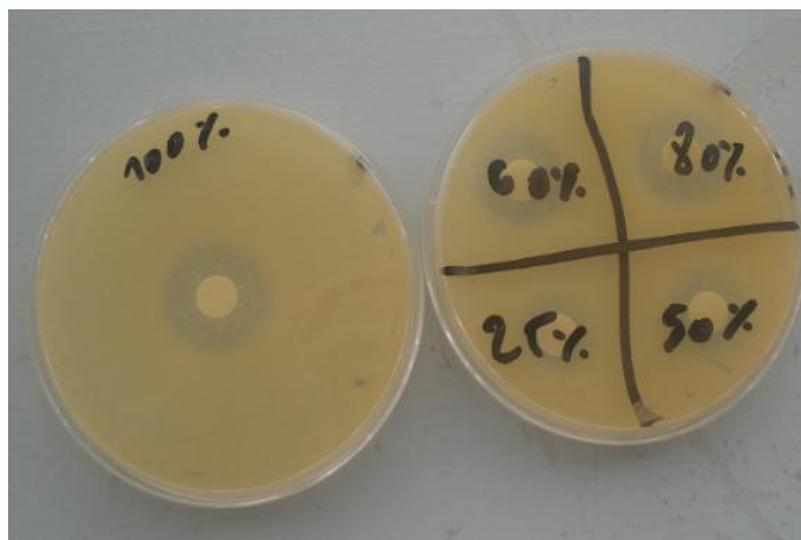


Figure 49 : Résultat de CMI pour l'extrait flavonoïdes di et tri glycosides qui est un effet antibactérien sur la souche *Staphylococcus aureuse*

La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits, ce qui a été constaté aussi par Dordevic et ses collaborateurs, (2007).

Une concentration décroissante d'extrait 0,623g /ml à 0,07g/ml, indique une diminution de plus en plus marquée des zones d'inhibition

La souche *Staphylococcus aureus* montre une très grande résistance à la concentration 12% avec une concentration minimale d'inhibitrice 0,07g/ml.



Conclusion

Conclusion générale

En raison de la tendance vers l'utilisation des produits naturels à cause de leurs rôles potentiels en soins de santé, cosmétiques et comme complément alimentaires, de nombreux chercheurs se sont orientés vers la recherche et la mise en place de nouvelles formules à base de produits biologiques isolés des extraits des êtres vivants notamment les plantes.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la composition des extraits en composés flavonoïdes d'écorce de *Citrus Clementina* et leurs effets antimicrobiens selon l'âge, l'état sanitaire et le période phénologique de la plante.

Le teste phytochimique a révélé la présence des flavonoïdes dans les écorces de clémentine. Les différents extraits flavonoïques (aqueux, butanolique, acétate éthyle, chloroformique) obtenus ont donné un plus grand rendement observé chez l'extrait flavonoïdes très polaires (45 %) de l'échantillon issu des arbres non infecté, d'un verger jeune et portant des fruits non infecté mature, par contre le plus faible rendement a été obtenu avec les extraits flavonoïdes di et tri glycosides (0,03%) de l'échantillon issus des arbres infecté d'un verger jeune, portant des fruits infecté non mature.

L'estimation quantitative des flavonoïdes a montré que les teneurs en flavonoïdes sont variables. La teneur des l'extrait flavonoïdes di et tri glycoside issus des arbres sains d'un verger âgé portant des fruits non infecté non mature, constitue la fraction phénolique la mieux représentée (109,05 mg/ml), suivi par l'extrait flavonoïdes mono glycoside (101, 72 mg/ml) issu des fruits infecté non mature des arbres infecté situés dans un verger âgé. Cependant, nous avons remarqué une faible teneur en flavonoïdes dans l'extrait aqueux (flavonoïdes très polaire) (4,356 mg/ml) de l'échantillon venant des arbres infecté portant des fruits non infecté mature issue de verger jeune.

Le Ph de nos extraits est varié entre 4,54 et 6,67, donc on constate que nos extraits flavonoïdes sont acides, donc stable avec l'absence de risque de dégradation rapide et un pouvoir de conservation élevé.

La Chromatographie sur couche mince nous a permis de révéler la présence d'un flavonoïde qui est la rutine et deux autres composés qui sont : l'acide ascorbique et l'acide caféique dans nos extraits aqueux, mais ces résultats restent relatifs.

Conclusion générale

L'analyse qualitative par chromatographie lipidique à haute performance (Agilent1260: HPLC) de l'extrait de flavonoïdes di et tri glycoside de l'échantillon arbre non infesté portant des fruits mature non infesté issus de verger, a révélé la présence de l'acide ascorbique, la quercétine et la catéchine. Et par (Shimadzu : HPLC) a révélé la présence de quercitine.

Les tests biologiques effectués dans ce travail ont montré que les souches *Sarcinalutea*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* sont relativement sensibles à l'extrait de flavonoïdes aglycones, flavonoïdes mono glycoside, flavonoïdes di et tri glycosides d'épicarpe de *Citrus Clementina*, par contre les flavonoïdes très polaires montre une action inhibitrice sur le *Bacillus subtilis*.

La concentration minimale d'inhibitrice CMI, étudiée pour la souche de *S. aureus*, est de 0,07g/ml.

La technologie industrielle peut donc exploiter les zestes de clémentinier, riche en flavonoïdes possédant un pouvoir inhibiteur microbien. L'Algérie, où l'agrumiculture occupe la première place parmi l'arboriculture fruitière, a la chance d'exploiter cette ressource dans le domaine de la valorisation des déchets industriels fruitier en tant qu'une source économique importante.

Ce travail nous a permis de nous initier à un grand nombre de techniques expérimentales au même titre que la méthodologie à suivre pour mener à bien une étude phytochimique d'une plante. Il constituera pour nous une base de départ pour des recherches plus approfondies dans l'axe que nous nous sommes fixé de suivre dans le cadre du projet sur la culture des agrumes de la Mitidja.

Et comme perspectives nous proposons de :

- Faire une étude biochimique pour les extraits d'épicarpe de *Citrus Clementina*.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles intéressantes dans le domaine de la santé, le cosmétique et complément alimentaire comme solution alternative aux produits synthétiques.
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires d'autre activité biologiques des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.



Références Bibliographiques

Référence bibliographique

Anonyme. (1998). Les agrumes. Bureau des Ressources Génétiques, plate-forme espèces tropicales et méditerranéennes

Atonot, R. Marchal. (1998). The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*. 39p.

Anonyme, 2002 : Pharmacopée européenne.

Aherne A.S., O'Brien Nora M. (2002). *Nutritional Sciences*, 18, 75-81,

Anonyme. (2004). Information de marché dans le secteur des produits de base. Agrumes. *CNUCED*.

Aurangzeb H. et Muhammed Nawaz T. 2005. Flavonoids from the leaves of *Impatiens bicolor*. *Turkish journal of chemistry.*, **29** : 65-70.

Amlan K., Patra J.S., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71 : 1198–1222.

BUDZIANOWSKI J., 1991- Separation of flavonoid glycosides from their galactosidic analogues by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 540: 469

Bretaudeau J et Fauré Y. (1992) : Atlas d'arboriculture fruitière. Tec et Doc (Ed). Paris, 289p

Bruneton, J. (1993). Composés phénoliques: Shikimate-acétates. In : « Pharmacognosie : phytochimie, Plantes médicinales ». *Technique et Documentation-Lavoisier (Paris) ; Chap. 3* : 199-383.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*. 1996; 46: 1086-1089.

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..

Bruneton J., 1999- Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 3e édition Tec et Doc, Paris.

Basile A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochem.* 1999, 2 (8): 1419-82

Référence bibliographique

Benkrief,R .,Brum,B.M., Tillequin, F., Koch,M. (1990). Alcaloïdes et flavonoïdes des parties aériennes de hammada articulata ssp. Scoparia. *Ann Pharmaceutique Française.* 48 (4) : 219-224.

Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2123-2129.

Balentine, C.W, Crandall, P.G, O'Bryan, C.A, Duong, D.Q, Pohlman, F.W,(2006) : The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science.* **73**: 413-421.

Benkiki N. 2006. Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana, Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat de l'université Haj Lakhdar de Batna.

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

Bautista,O,Fernandez F., Lopez R.,Gomes p.2007 : (the effects of oenological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristic). *Journal of food composition and analysis* 20 pp 546-552.

Boukella, N. (s.d)., 2008. La clémentine, rapport d'I.T.A.F. Boufarik : 42.

Bouزيد.W, « Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Crataegus monogyna* Jacq.» Mémoire de magistère université –el hadj lkhder- batna, 2009.

Chapot. 1963 : La clémentine AL AWANIA, revue de la recherche agronomique marocaine I.N.A EL-Harrach, 64p.

Cassin J, 1984 : comportement des variétés d'agrumes dans les différentes régions de production. *Fruit*, vol.39,n°04.pp 263-275.

Chifundera K ., Bury W M., Kizungub, 1990 : screening phytochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomorus*-short communication *Fitoteapia.* P : 535-539

Cowan M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12 : 564–582.

Référence bibliographique

Cushnie TP, Hamilthoh VES, Lamb AJ. Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 2003, 158(4): 281-9

Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007a) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100: 553-559.

Curck.f., 2008 : la clémentine de crose ou quand recherches INRA et terroir s'associent en faveur d'un produit de qualité, Agriculture, INRA : 5.

Chan K. W, Lqbal .Sh, Nicholas M. H. Khong and Abdul Salam . B "Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction" *Journal of Medicinal plants Research* Vol. 5(25), 2011, pp 6067-6075.

Djerfaf M. 1989 : comportement du clémentinier à l'irrigation par deux systèmes localisés goutte à goutte et Microjet. Incidence sur la croissance et la fertilité. Thèse ing. Agr. Inst. Nat. Ens. Sup. blida 96P ;

De-Rocca-Sierra, & Ollitrault, P. (1992). Les ressources génétiques chez les agrumes. *Le courrier de l'environnement de l'INRA*, 3,

Day, A.J., Williamson, G. (1999). Human metabolism of dietary quercetin glycosides In: "plants polyphenols, 2: chemistry, Biology, pharmacology, pharmacology, Ecology". Eds. Gross et al. Kluwer Academic (New York): 415-434.

Dacosta, E. (2003) Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.

Dordevic, S., Petrovic, S., Dobric, S., Milenkovic, M., Vucicevic, D., Zizic, S., Kukic, J. (2007) Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J Ethnopharmacol.* 109: 458-463 .

Deba, F., Dang Xuan, T., Yasuda, M., Tawata, S. (2008) Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control.* 19: 346-352 .

Fargeix, D. Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon, 2000.

Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., Macheix J.J. (2005) Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes 336 p

Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N. (2007) Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 18: 646-649

Référence bibliographique

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.

Galvez J, Crespo J, Jimenez J, Suarez A, Zarzuelo A. Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats. *J. Pharmacol.* 1993 a, 45: 157-9.

Galvez J, Zarzuelo A, Crespo J, Lorente MD, Acete MA, Jimenez J. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* 1993 b, 59: 333-6.

Griffon, M., & Loeillet, D. (2000). Production et consommation d'agrumes dans le monde. Evolution et Eléments de prospective. *Comptes rendus de l'académie d'agriculture de France*, 86(8).

Gorinstein S., Belloso O.H., Park V.S., Haruenkit R., Lojek A., Ciz M., Caspi A., Libman I., Trokhtenberg S., *Food Chemistry*, 74, 309-315, 2001.

Ghedira K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother.* 2005; 3: 162-169.

Goodarzi MT, Zal F, Malakooti M, Safari MR, Sadeghian S. Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.* 2006, 44(1): 41-5.

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.

GURIB-FAKIM A., 2006- Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 27: 1-93.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*. **76**: 172-181.

Harborne J. B. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 1997; 14: 83-98.

Hayouni, E.A, Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* (in press).

Houari .H.et Ouled Brahim.Z : « Etude phytochimique d'une plante medicinale a effet thérapeutiques *Ajuga reptans* L.(schreb), *Yvetta musquée* » département de biologie, université de Blida, 2010.

IRNA, « les grands hommes », édition 2010 des journées européennes du patrimoine (JEP Du 18 au 19 septembre), (2010).

Référence bibliographique

Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agri. Food Chem.* 52 (2004) 3389- 3393.

Jean Marie Polese., 2005: la culture des agrumes.

Kamoun.P, (1997). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Médecine et science. Edition : Flammarion, Paris, pp 417.

Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. (2004) Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* **93**: 43-49.

Kamra D.N., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science.* 89 (1) : 124–135.

Kamra D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C., 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* 1293 : 156–163.

Loussert R., 1985 : les agrumes. Ed. J. H. Baillié, paris. 136P.

Loussert, 1987. Les agrumes. L'arboriculture. Ed. Lavoisier.vi, Paris, 147p : 113.

Loussert.1989. les agrumes.volume 1 arboriculture. Paris,France, Technique et documentation Lavoisier147p

Loussert R., 1989: Les agrumes production. Ed. sci. Univ., Vol. 2, Liban, 280p.

Loussert, R. (Ed.). (1989). *Les agrumes. 2-Production. Techniques agricoles méditerranéennes.* Paris.

Loziene, K., Venskutonis, P. R., Sipailiené, A., Labokas, J. (2007) Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem.* **103**: 546-559.

Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambouriss trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.

Li BB, Smith B, Hossain MM. Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 182-188..

Mouly P., Gaydou E.M., Auffray A., Journal of chromatography A, 800, 171-179, 1998.

Mariau D, 1999 : Les maladies des cultures pérennes tropicales. 287p.

Référence bibliographique

Morton, L. W., Amsha, A., Caccetta, R., Puddey, I. B., Croft, K.D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27: 152-159.

Martin S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51: 304-315.

Milane, H., (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.

Medic-Saric M., Jasprica I., Smolcic-Bubalo A., Monar A. (2004), " Optimisation of Chromatography of flavonoids and phenolic acids". *Croatica Chemica Acta*, 77: 1-2, 361-366.

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

Male_Év D. É. and Kunti_ç V. Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem. Soc.* 2007; 72: 921-939.

Madi .A, (2009). " caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Tthym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologique ». Mémoire de magistère, pp 54-55

Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K. and van Leeuwen P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American J. Clinic. Nutr.* 2001; 74: 418-425.

Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, 33 : 2-16.

Nauciel, C. (2005). Bactériologie médicale. 2^édition Masson. Paris, ISBN.,294

Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G. (2005) Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol.* 102: 123-126.

Oufedjikh, H.; Lacroix, M.; Mahrouz, M.; Amiot, M.J. Effect of g irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. ex. Tanaka. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48: 559-565.

Okmu,D.E., 2005, "Phytochemical, Vitamine and minerals contents of two Nigerian medicinal plants " *Int-J MolAdvSci:* 1(4) p 375- 381.

Pieta,PG., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal products.* 63 : 1035- 1042.

Référence bibliographique

- Polese J.M**,2005. La culture des agrumes, Ed, ISBN 68 p
- Polese, J. M. (2008)**. La culture des agrumes In Artemis (Ed.) (pp. 93).
- Rebour H., (1945)** : « les agrumes », ed. Union des syndicats de production d'agrumes, Alger, 485p.
- Rebour H, 1950** : Les agrumes en Afrique du Nord. Ed. Union des Syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, 485, 502 P.
- Ribéreau-Gayon P., (1968)** : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. DUNOD Paris.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud m, Ribéreau-Gayon P and Sudraud P**. Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins. Ed. Dunod, Paris, 1972, p. 671.
- Remsey C., Manach C., Texier O. and Regerat F**. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Med. Nutr.* 1996; 32: 17-27.
- Rice-evans C.A. et Packer L.,(1998)** ; Flavonoids in Health and Disease; Ed: MARCEL DEKKER; p: 61- 160.
- Rice-Evans C. (2001)** Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. **8**:797-807. Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Alarcon-Aguilar, F.J. (1995) Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J Ethnopharmacol.***48**: 25-32.
- Reich E, Schibli A**. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants (illustrated edition). Ed. Thieme Medical Publishers Inc. New York, 2007.
- Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B.(2008)** Antimycotogenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International J of Food Microbiology.***122**:135-139.
- Seltzer P .,** "Le climat de l'Algérie ", Inst. Meteo. Phy. Globe, Univ. Alger, (1946) ,219P .
- Scora, R. W. (1988)**. *Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus*. Paper presented at the VIth International Citrus Congress.
- Spiegel-Roy, P., & Goldschmidt, E. E. (Eds.), (1996)**. *Biology of citrus*.
- Simon Van EE.,** « La culture fruitière sous les tropiques », AGRODOK 5, ISBN 9072746-41-4, (1998). 92P.
- Singleton,(1999)**. Bactériologie, édition : Dunod, Paris, p 415
- Sasaki K, Takahashi T**. A flavonoid from *Brassicarapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochem.* 2002, 61 (3): 339-43.

Référence bibliographique

Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007) The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. **117**: 112- 119.

Sun G, Khtan B, Huang S, Whiteman M et Zhu Y, 2002. Effects of naturals products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta pharmaco*. 23, 1142p.

Sagdic, O., Ozcan, M. (2003) Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*.**14**: 141-143.

Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. **12**:484-496.

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.

Urquiaga I. et Leighton F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, **33** (2) : 55-64.

United States Department of Agriculture/Foreign Agricultural Service. (2010). Citrus: World markets and trade. Available from <http://www.fas.usda.gov>. Accessed 28.09.2010.

Urquiaga I. N. E. S. and Leighton F. E. D. E. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* 2000; 33: 55-64.

Vogel R, et Boune JM, (1976) : La nouvelle technique d'indexation de la cohexie xylopoose, son utilisation en Corse. *Fruits*, vol.31,n°2, pp93-96.

Vistaropoulou, V.E., vajias,C. (1986). Methylated flavones from teucrium polium. *Planita Med*. 5: 344-432.

Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.*, **53** (377) : 209 - 210.

Van-Ee, S. (2005). *La culture fruitière dans les zones tropicales*. Wageningen.

Walali-Loudyi, D. E. M., Skiredji, A., & Hassan, E. (2003). Fiches techniques : le bananier, la vigne, les agrumes. In T. d. t. e. agriculture (Ed.). Rabat: Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II.

W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. et Burrowes J. 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, **137** (3 supp 1): 718 s-737 s.

Référence bibliographique

Williamson G. et Burrowes J. (2007). Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. Journal of Nutrition., **137** (3 suppl): 718 s-737 s.

ZAIIKA, L. L. 1988-. "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination" Journal of Food Safety Vol. 9(2): 97-118.

Zellat NE., 1989 : Entomofaune dans un verger d'agrumes à Mohammadia (*Mascara*). Aperçu bioécologique de *P. ziziphulucas*, (Homoptera, Diaspididae), *Aleurothrixus Floccosus* Marskell (Homoptera, Aleurodidae) et *Ceratis Capitata* Wiedmann (Diptera-Trypetidae).



Annexe

Annexe 1

Annexe des matériels

Matériels non biologiques :

Appareillages :

- ✓ Mixeur
- ✓ plaque chauffante
- ✓ Autoclave
- ✓ Ecouvillon
- ✓ Bec benzen
- ✓ Papier filtre
- ✓ HPLC
- ✓ Ph mètre
- ✓ Réfractomètre



Rota vapeur



Balance à précision



Spectrophotomètre



réfrigérateur

Annexe 1



Haute



Les disques



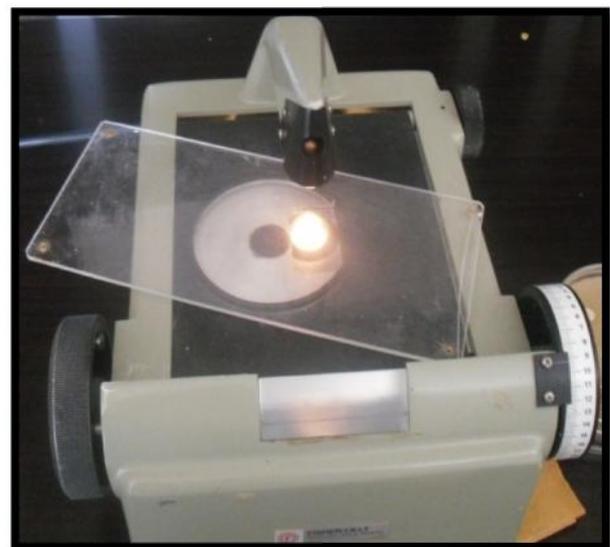
Agitateur magnétique



bain marée



Etuve



Appareil de lecture des zones d'inhibition

Annexe 1

Verrerie

- ✓ Boites de petri
- ✓ Cuve de CCM
- ✓ Plaque de CCM
- ✓ Ampoule à décantier
- ✓ Pipettes pasteur
- ✓ Les tubes à essai
- ✓ Fioles
- ✓ Bécher
- ✓ Erlen meyer
- ✓ Ballon
- ✓ Pipettes graduées
- ✓ Flacons

Les produits chimiques et les réactifs :

- ✓ Méthanol CH_3OH
- ✓ Hexane
- ✓ Chloroforme
- ✓ Acétate d'éthyle $C_4H_8O_2$.
- ✓ n-butanol
- ✓ eau distillé
- ✓ trichlorure d'aluminium $AlCl_3$
- ✓ quercitrine
- ✓ Rutine
- ✓ Acide chlorhydrique : HCl
- ✓ NH_4OH
- ✓ alcool iso amylique $C_5H_{12}O$.
- ✓ Toluène C_7H_8
- ✓ Ethanol C_2H_4O .
- ✓ acide acétique CH_3COOH à 2%
- ✓ CH_3OH pure (méthanol).

Milieux de culture utilisés :

- **Gélose dextrose de sabouraud :**

C'est une servant à la culture des champignons est des microorganismes acides.

Préparation

- Mettre 65g de poudre en suspension dans un litre d'eau distillée, bien mélanger
- Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant 1mn de manière à dissoudre parfaitement la poudre
- Passer à l'autoclave à $121^\circ C$ pendant 15mn en évitant le sur échauffement.
- Pour usage laboratoire $ph= 5,6 \quad 0,2$.

Annexe 1

On a pour un litre préparé la composition suivante :

- Digestion enzymatique de caséine 10g.
- Dextrose 4g
- Gélose 15g.

- **Gélose de Soja Triptyque**
- Dissoudre 40g de poudre dans 1 litre d'eau distillée, chauffer et agiter jusqu'à ébullition
- Répartir en tube à vis ou en flacon.
- Bouchonner, capsuler et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Annexe de figure

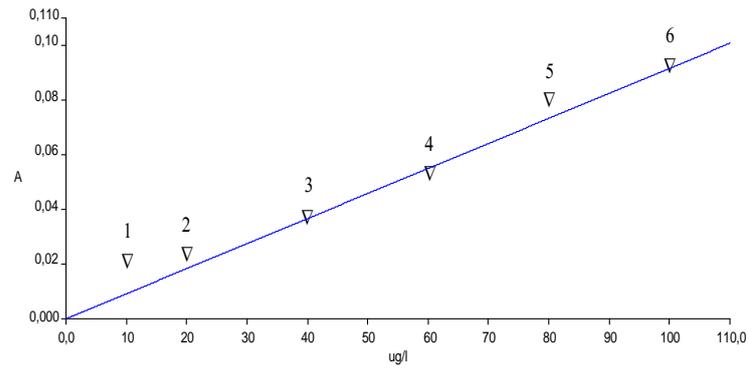


Figure 25: La courbe d'étalonnage de quercétine

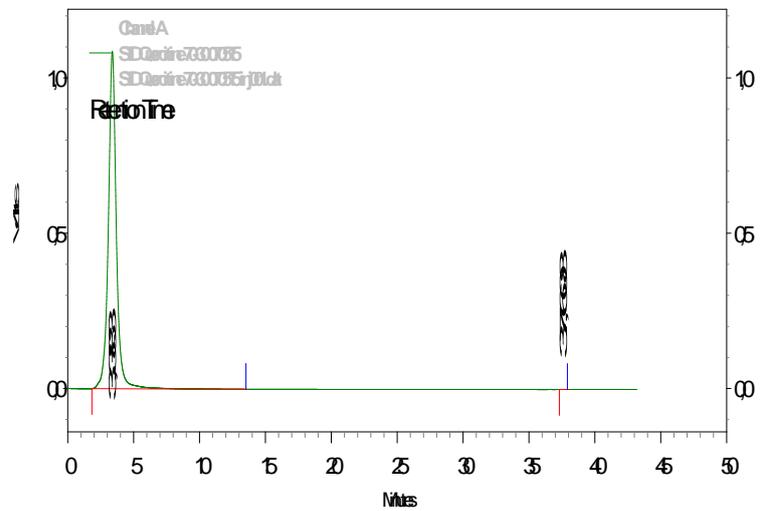


Figure 31: Profil chromatographique de quercétine présent dans la plante détectée par HPLC à 365nm en mode d'élution.

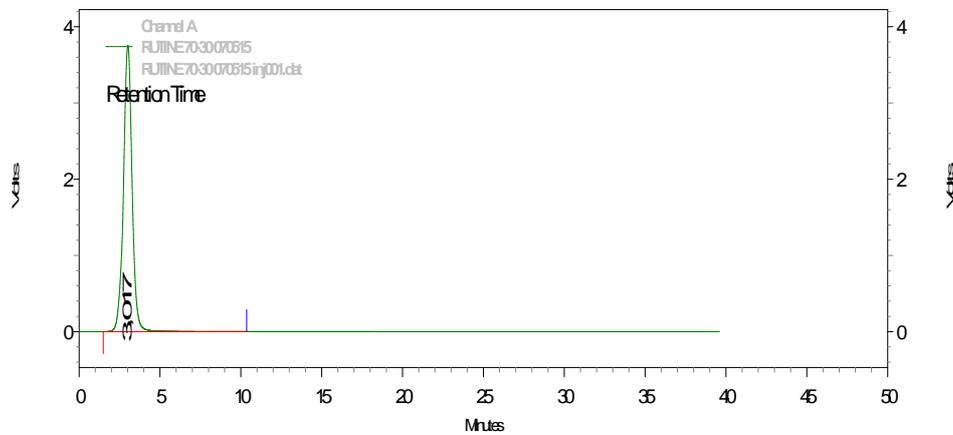
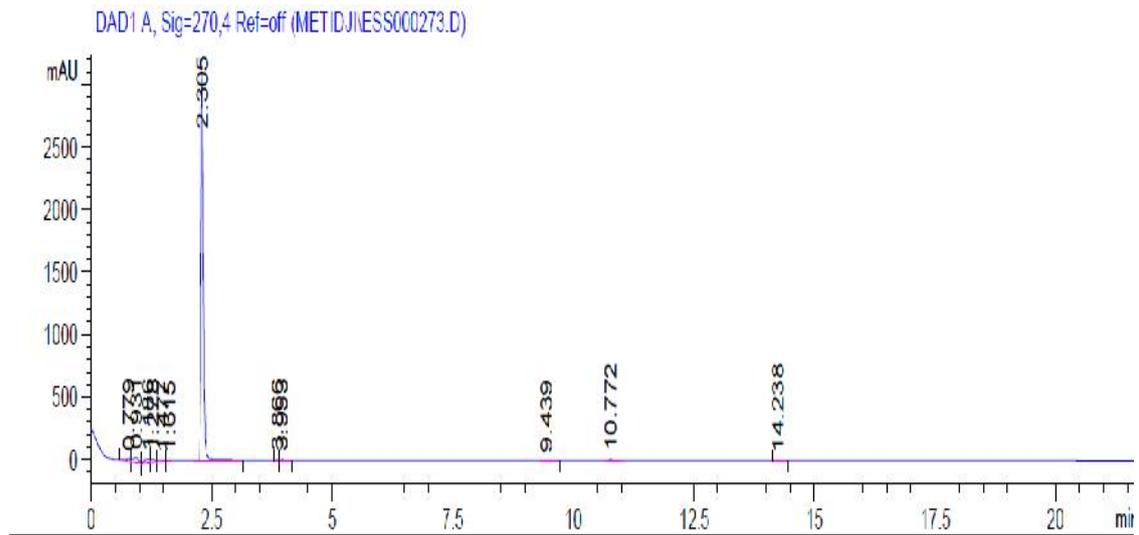
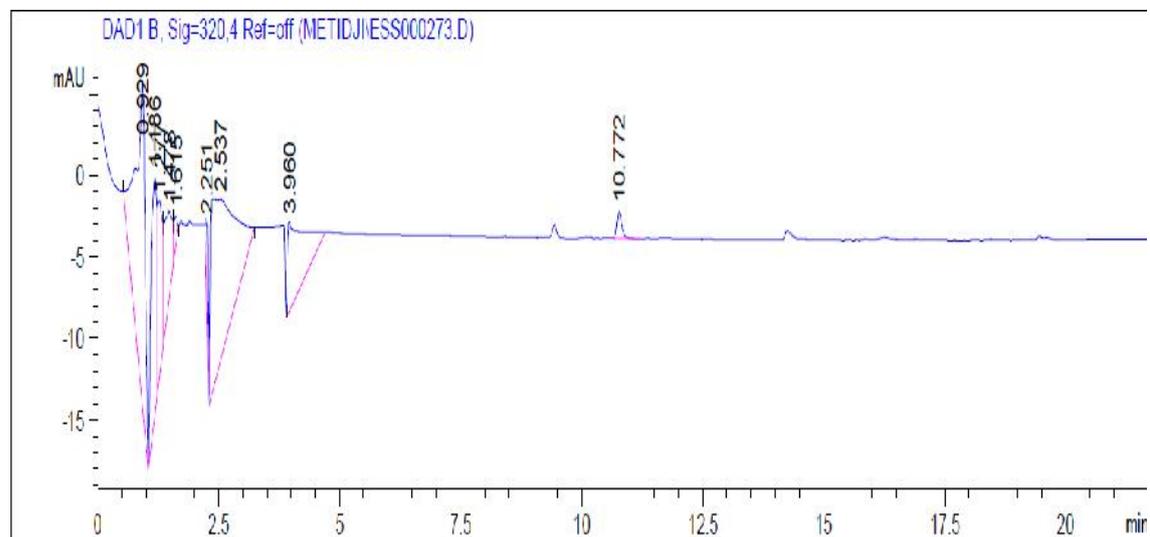


Figure 32 : Profil chromatographique de rutine présent dans la plante détectée par HPLC à 365nm en mode d'élution.

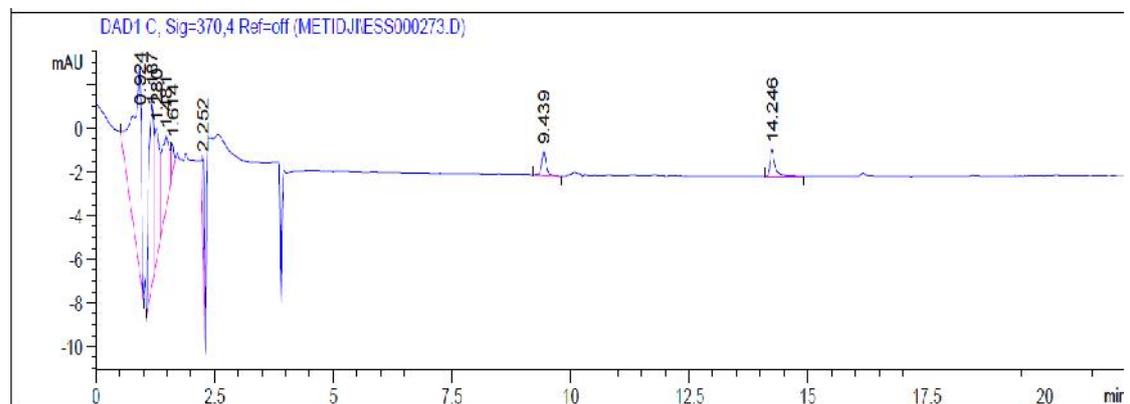
Annexe : 2



A



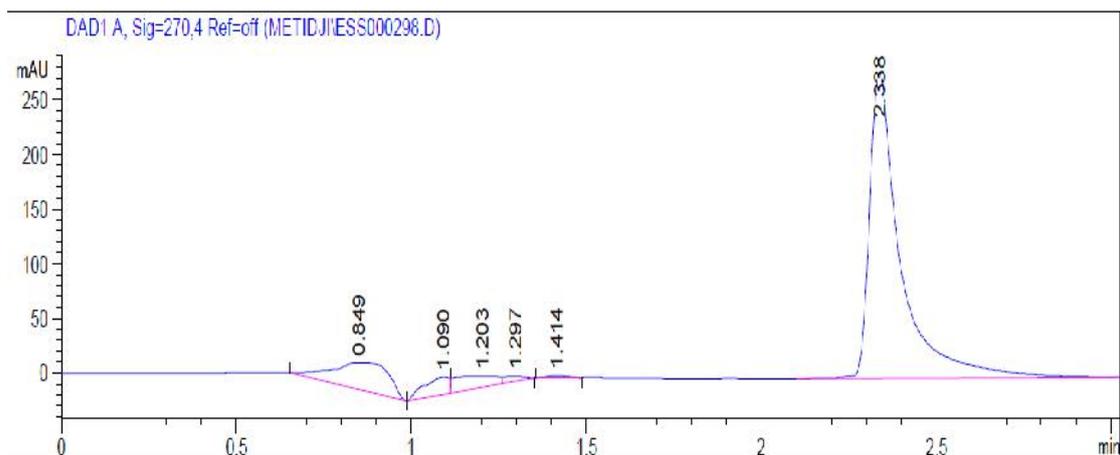
B



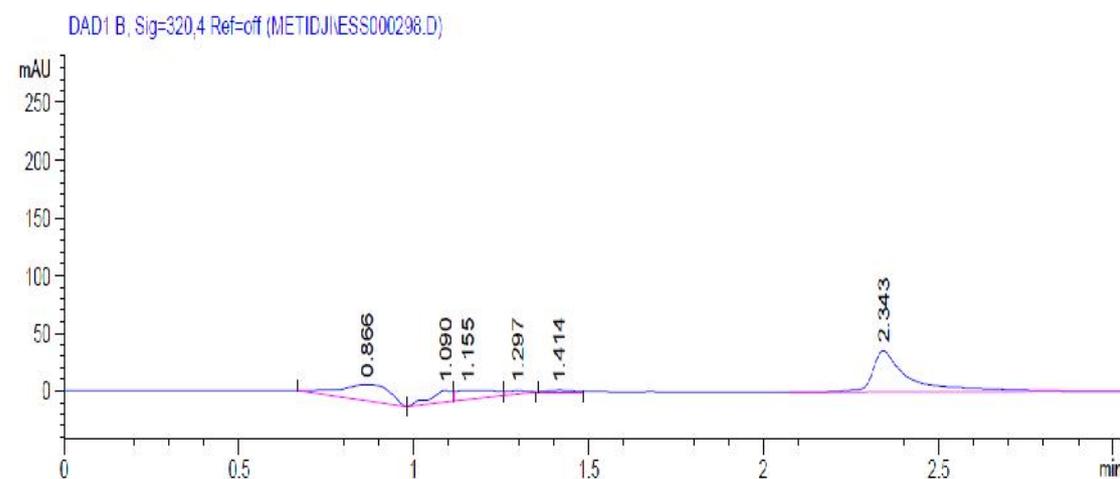
C

Figure 33 : Profil chromatographique d'acide ascorbique présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/ B: 320/C : 370 nm en mode d'élution

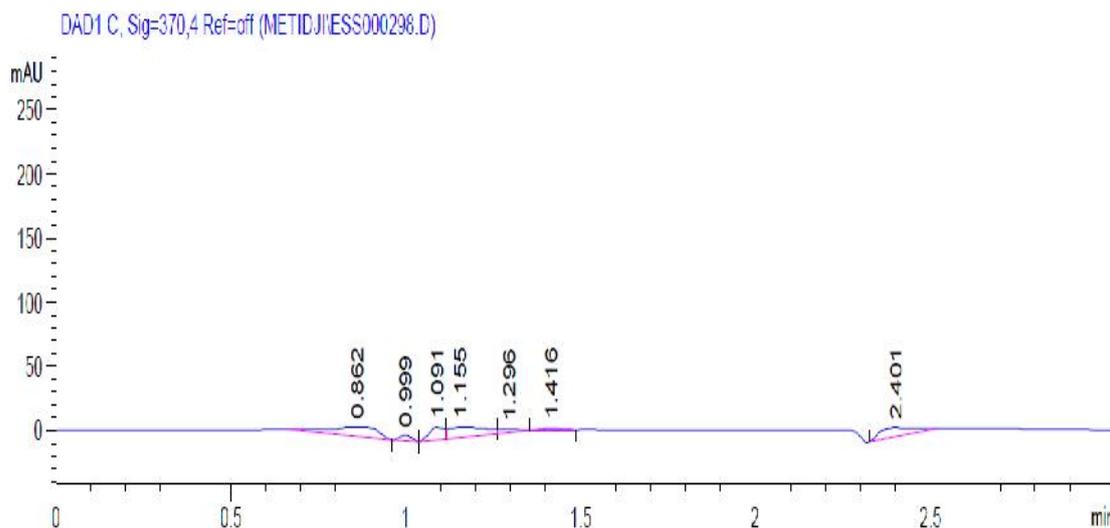
Annexe : 2



A



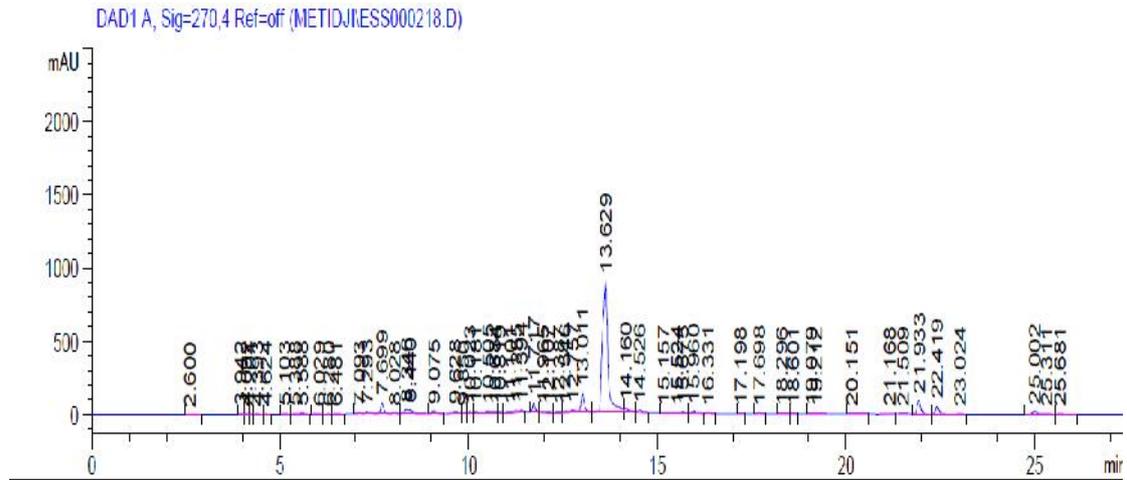
B



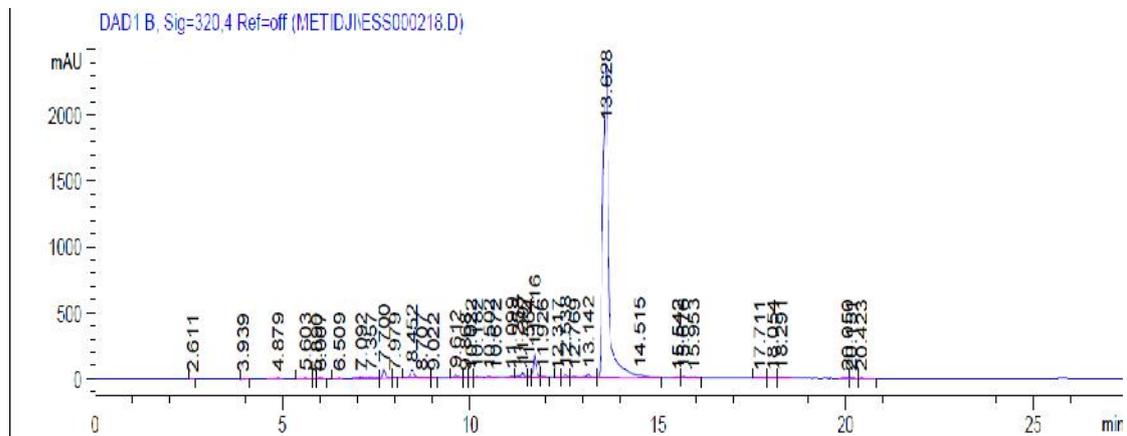
C

Figure 34 : Profil chromatographique d'acide tannique présent dans la plante détectée par HPLC À A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution

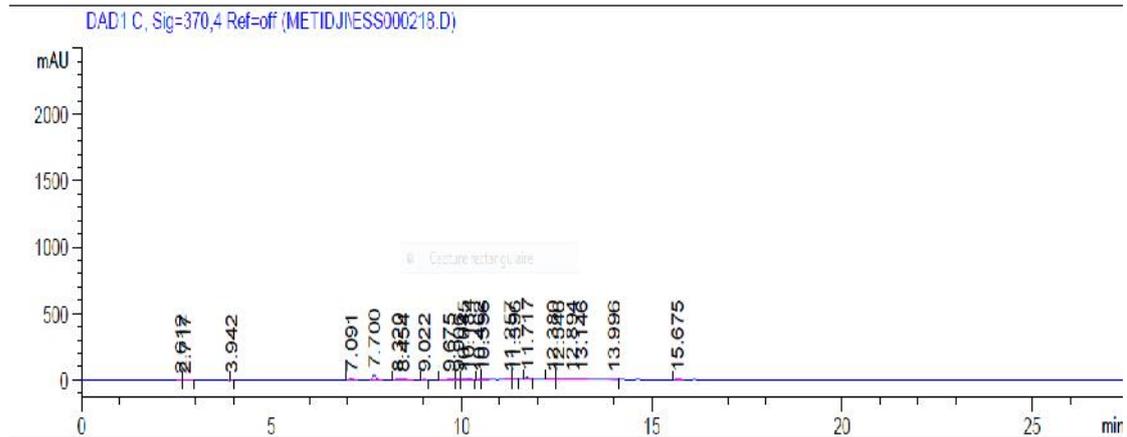
Annexe : 2



A



B



C

Figure 35 : Profil chromatographique d'acide tannique présent dans la plante détectée par HPLC À A : 270/B : 320/C : 370 nm en mode d'éluion

Annexe : 2

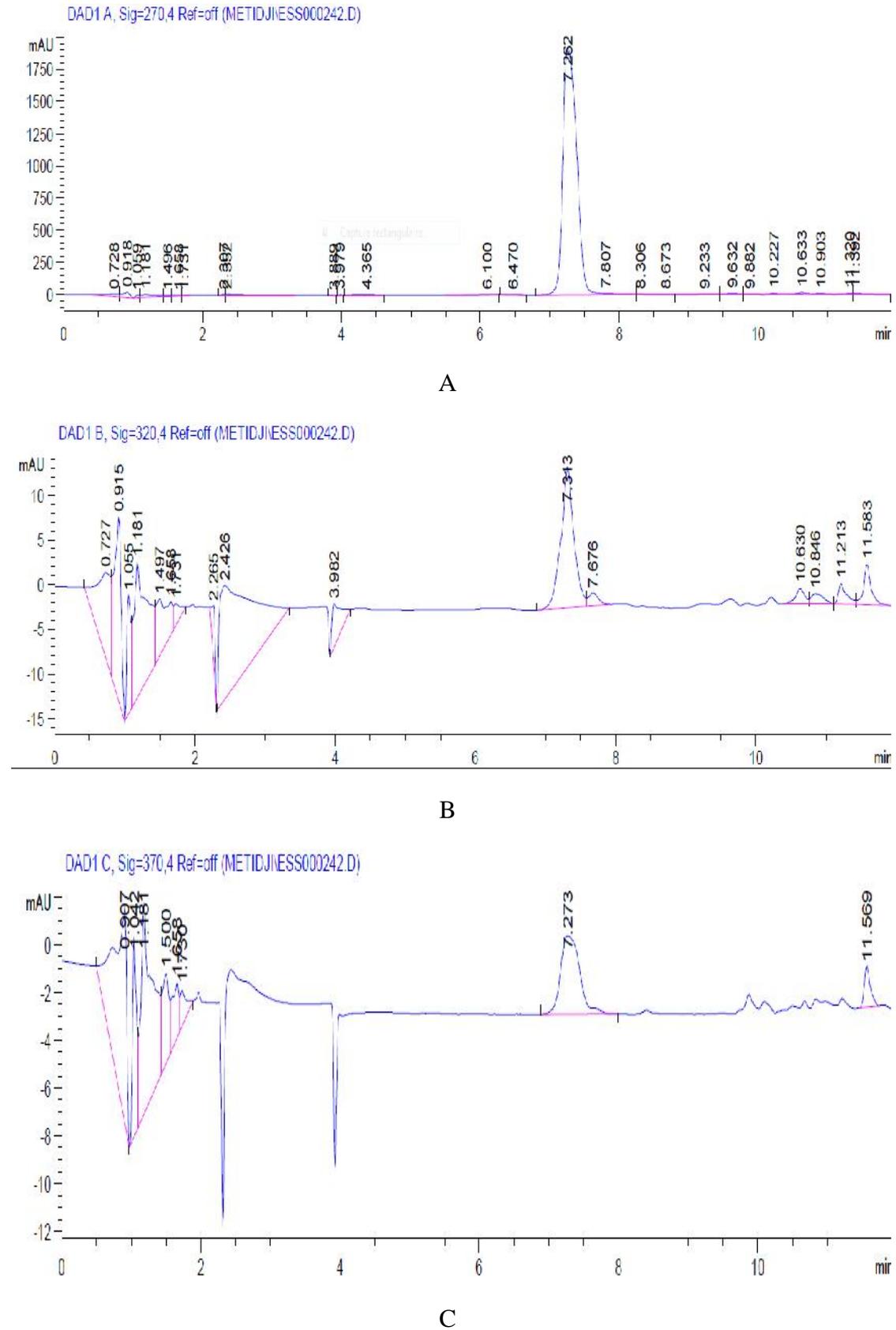


Figure 36 : Profil chromatographique de catéchine présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution

Annexe : 2

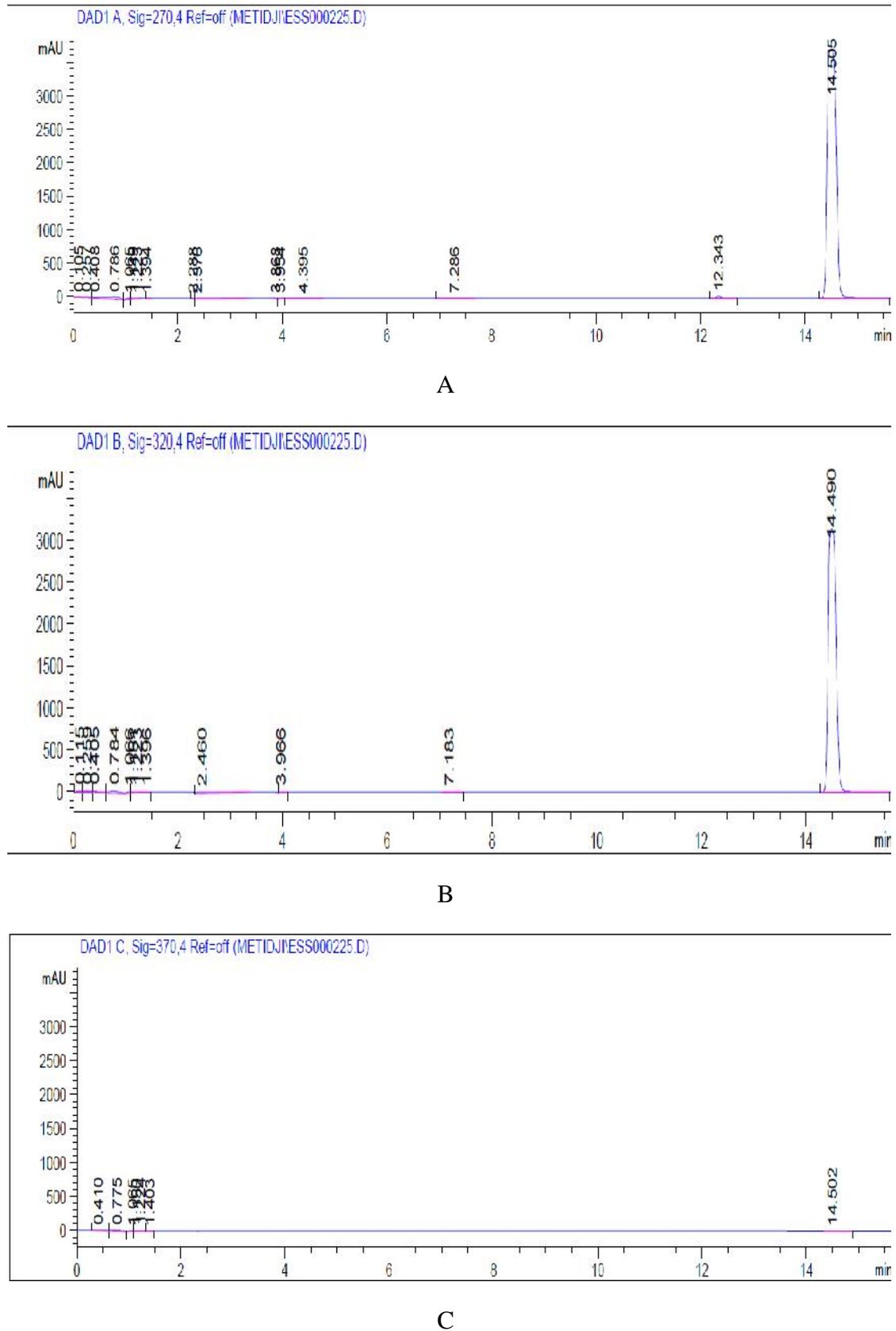


Figure 37 : Profil chromatographique d'acide coumarique présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/ B : 320/ C : 370 nm en mode d'élution

Annexe : 2

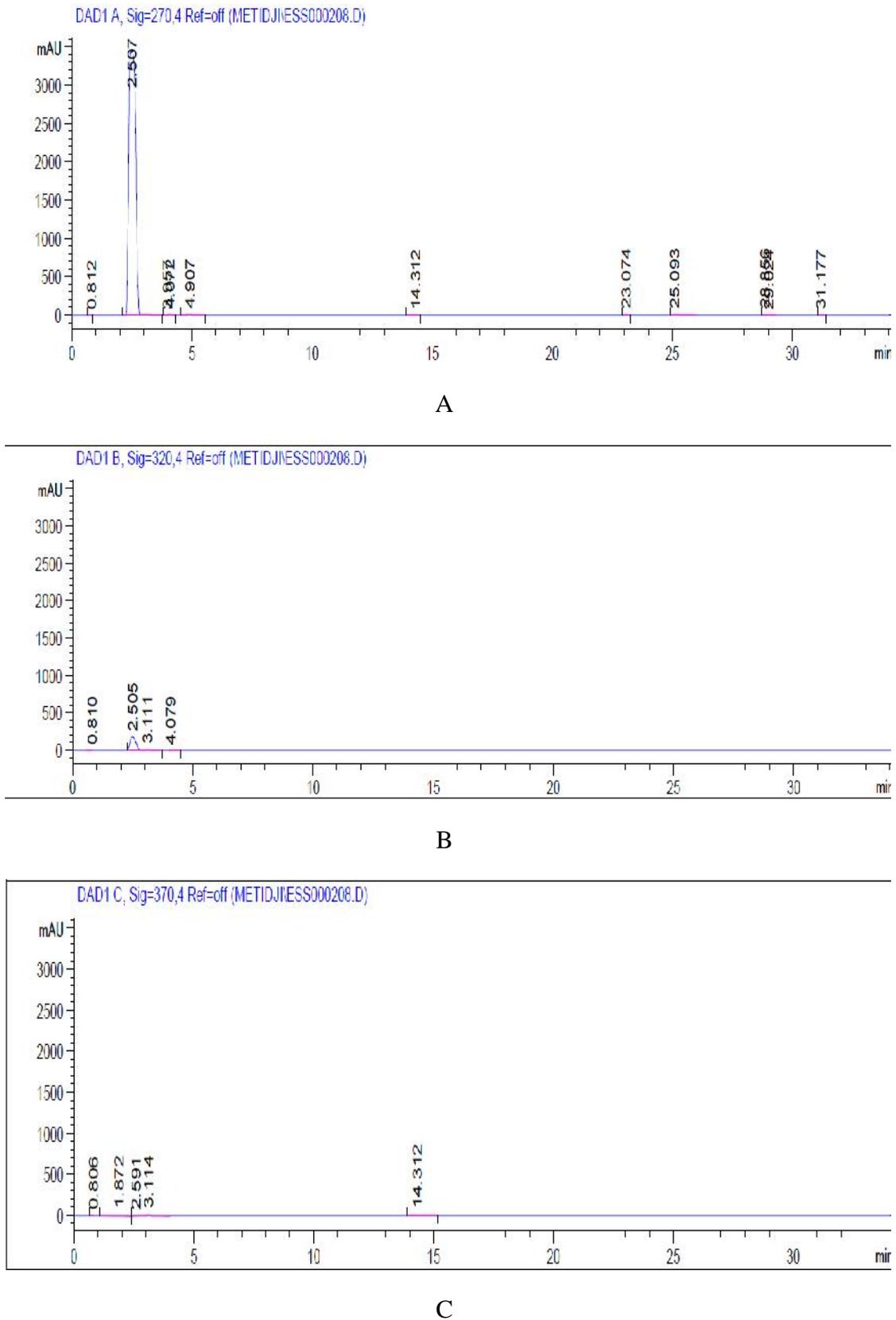


Figure 38 : Profil chromatographique d'acide gallique présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/ B: 320/ C : 370 nm en mode d'élution

Annexe : 2

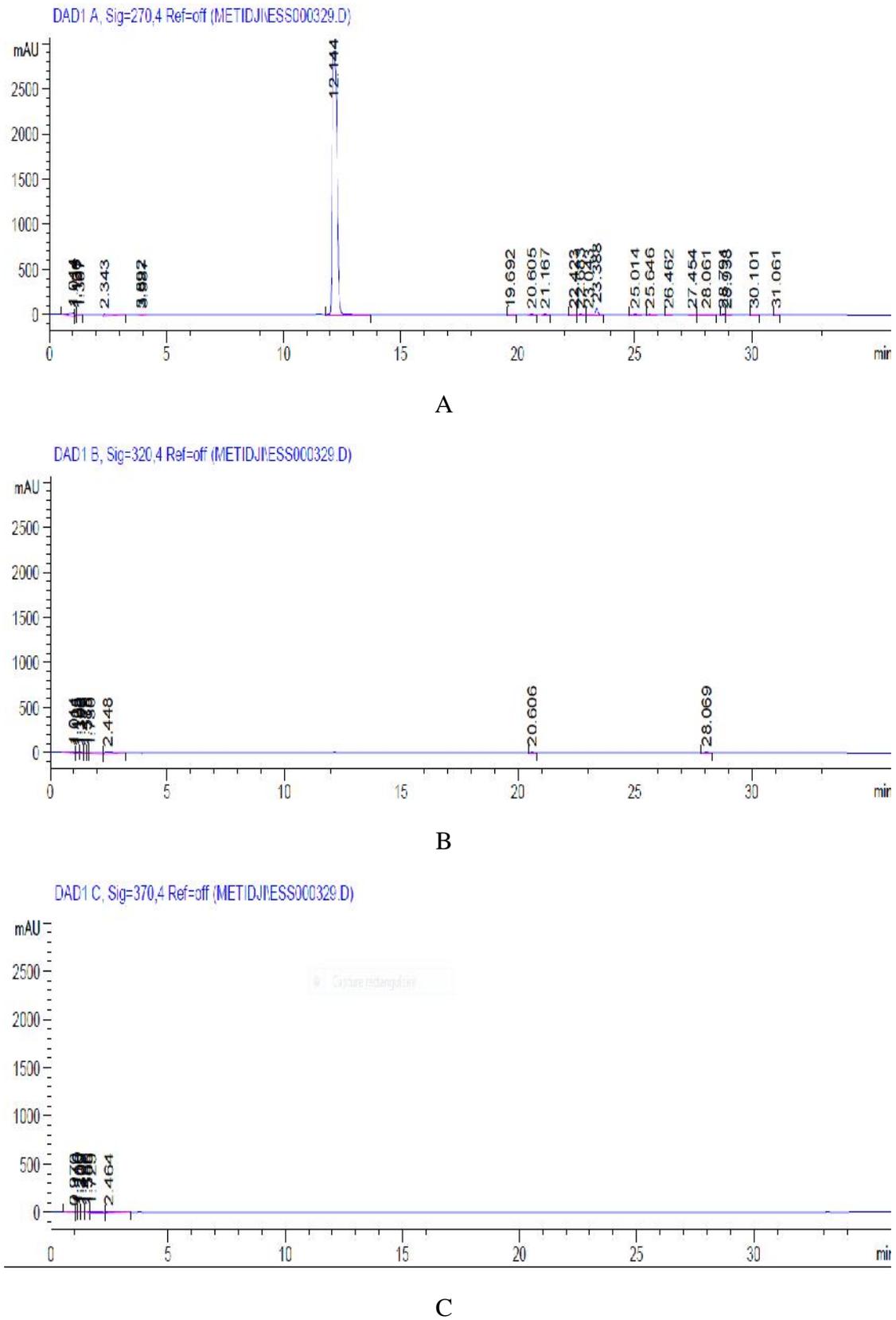
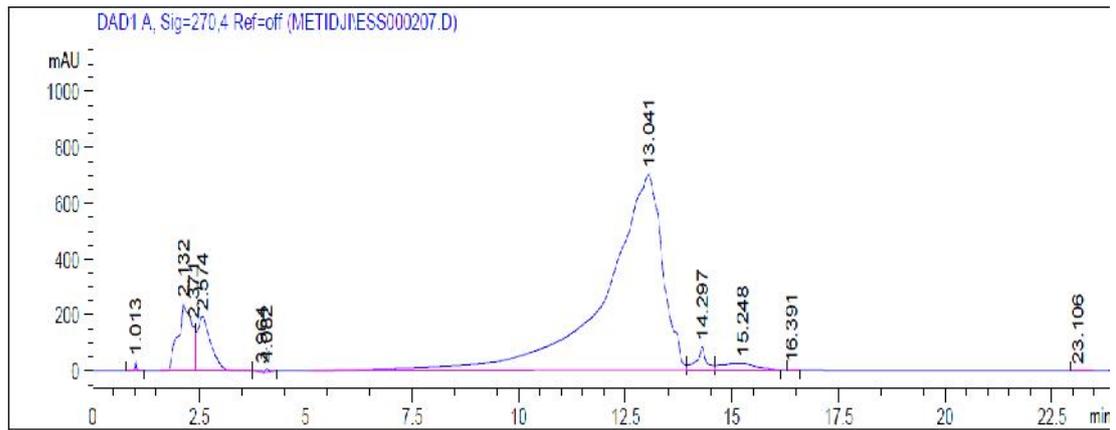
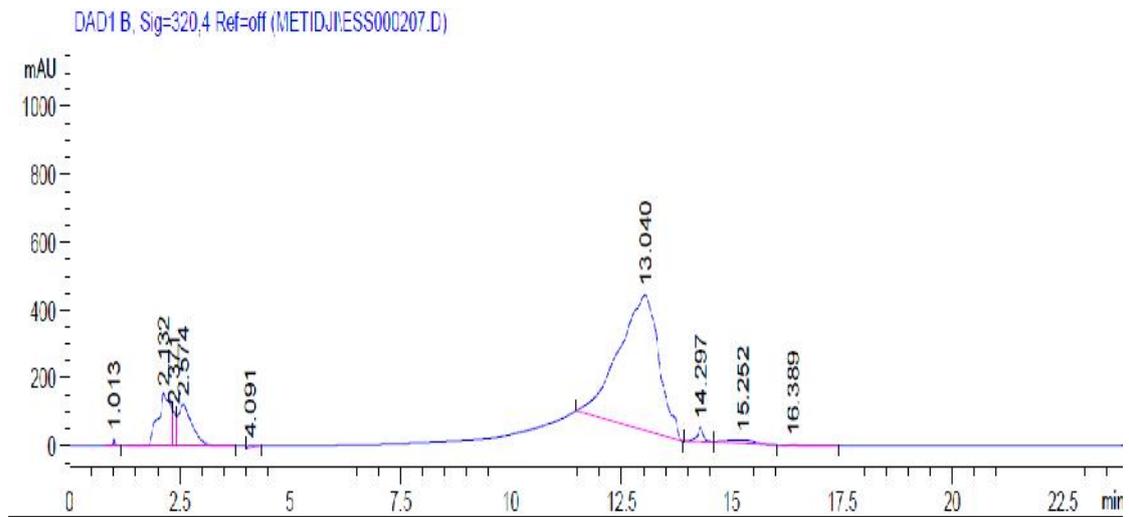


Figure 39 : Profil chromatographique de phenol présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/ B: 320/C : 370 nm en mode d'élution

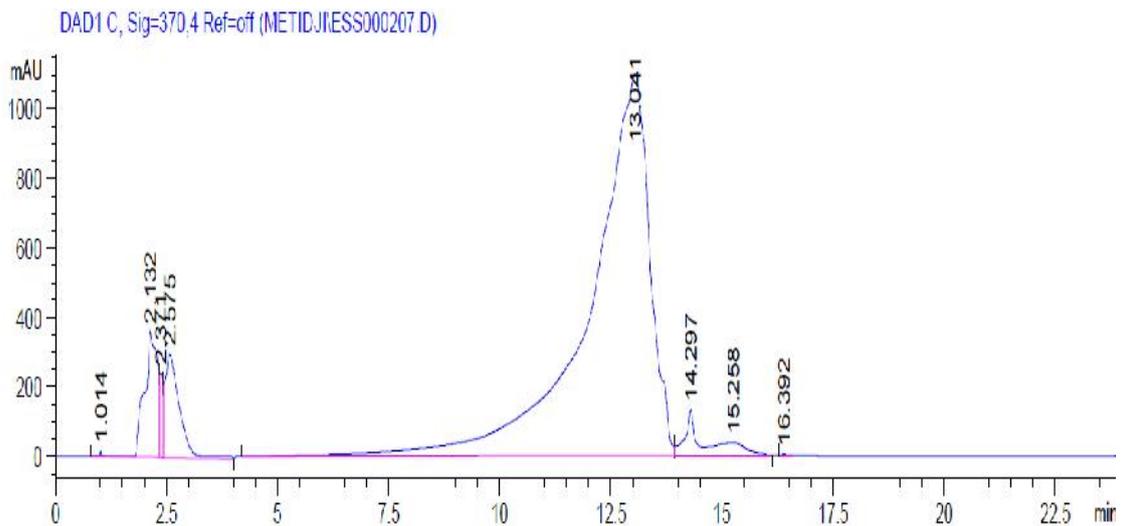
Annexe : 2



A



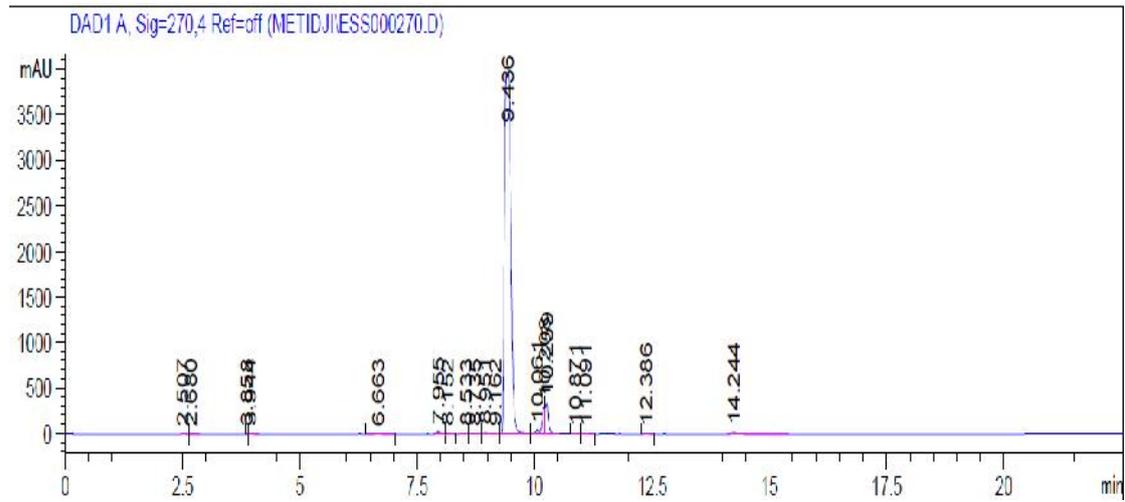
B



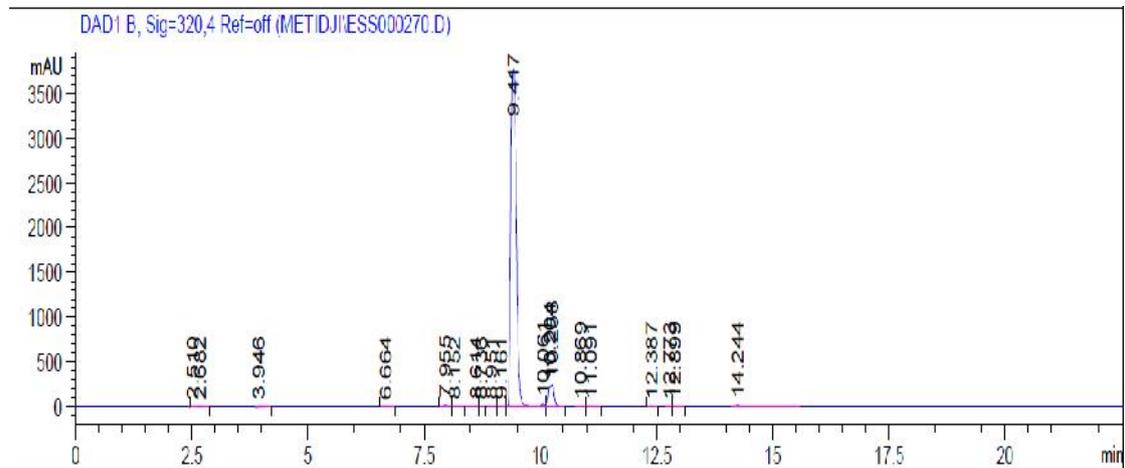
C

Figure 40 : Profil chromatographique de quercitine présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/ B : 320/ C : 370 nm en mode d'élution

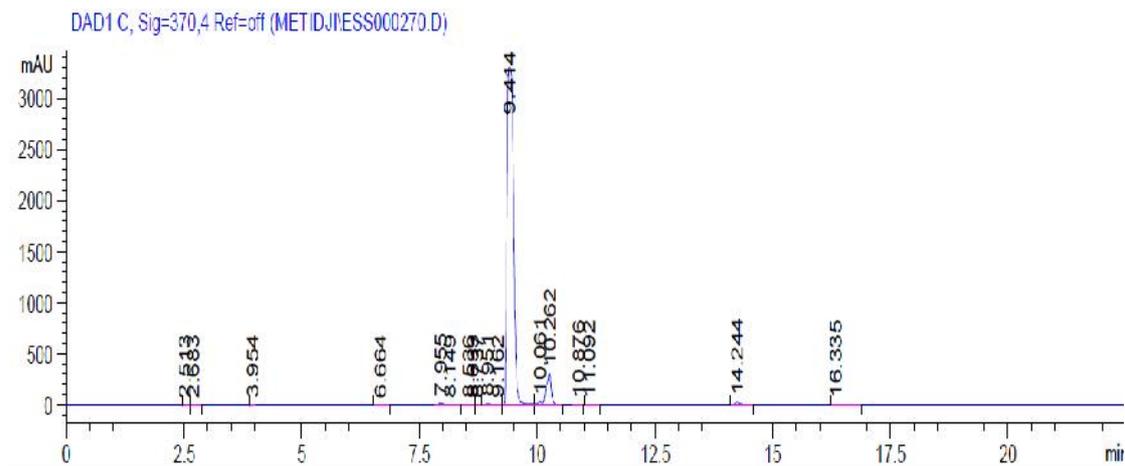
Annexe : 2



A



B



C

Figure 41 : Profil chromatographique de rutine présent dans la plante détectée par HPLC à A : 270/B: 320/C : 370 nm en mode d'élution

Annexe 3

Annexe des tableaux

Tableau 8 : Analyse de variance par le test GLM pour le l'humidité

GLM/ humidity : Analysis of Variance					
SOURCE	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
AGE DU VERGER	184.083	1	184.083	14.883	0.006
MATURITE de fruit	52.083	1	52.083	4.211	0.079
SANTE DE L'ARBRE	3.125	1	3.125	0.253	0.631
SANTE DU FRUIT	2.000	1	2.000	0.162	0.700

Tableau 10 : Rendements de quatre extrait (Flavonoïdes aglycones, Flavonoïdes mono glycosides, Flavonoïdes di et tri glycosides, Flavonoïdes très polaires) de 12 échantillons

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans			L'âge de l'arbre			Verger âgée 50 ans			L'âge de l'arbre		
La maturité de fruit	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
Echantillon	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté
Extrait de chloroforme (flavonoïdes aglycones)	0,7	2,9	3,43	1,56	2,73	2,26	0,33	1,06	3,2	3	2,46	1,33
Extrait d'acétate d'éthyle (Flavonoïdes mono glycoside)	3,53	2,93	3,56	2,7	1,36	5,53	1,7	1,3	2,96	2,76	5,63	3,96
Extrait n-butanol (Flavonoïdes di et tri glycosides)	2,73	0,03	8	3,36	4,66	7,3	8	10,26	9,83	8,26	6,23	4,96
Extrait aqueux (Flavonoïdes très polaires)	25,93	16,96	30,5	45	13,2	33,16	14,6	9,83	18,93	23,33	29,6	40,16

Annexe 3

Tableau 11 : Analyse de variance par le teste GLM pour le rendement des extraites

Analyse globale rendement: Analysis of Variance					
SOURCE	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
AGE DU VERGER	2.083	1	2.083	0.066	0.799
MATURITE	114.083	1	114.083	3.617	0.064
SANTE DE L'ARBRE	30.031	1	30.031	0.952	0.335
SANTE DU FRUIT	144.500	1	144.500	4.581	0.038
COMPOSÉ	4186.417	3	1395.472	44.238	0.000
Error	1261.792	40	31.545		

Tableaux 12: Les valeurs de Ph.

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			La maturité de fruit			Fruit non mature		
La maturité de fruit	Arbre non infesté fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté
Extrait de chloroforme (flavonoïdes aglycones)	5,43	5,75	5,43	5,9	5,30	6,36	6,56	6,15	6,3	4,54	5,19	5,89
Extrait d'acétate d'éthyle (Flavonoïdes mono glycoside)	21,9°C	21,9°C	21,9°C	21,9°C	21,9°C	23,4°C	21,7°C	23,5°C	22,3°C	22,5°C	22,3°C	22,9°C
Extrait n-butanol (Flavonoïdes di et tri glycosides)	5,91	5,33	5,75	5,34	5,95	5,41	5,70	5,35	5,63	5,55	5,48	5,56
Extrait aqueux (Flavonoïdes très polaires)	22,9°C	21, 8°C	21,9°C	22,9°C	23,2°C	23,5°C	21,7°C	23°C	23,7°C	22,7°C	22°C	23,5°C

Annexe 3

Tableau 13: Analyse de variance par le teste GLM de Ph

Ph :Analysis of Variance					
SOURCE	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
AGE DU VERGER	0.083	1	0.083	0.423	0.519
MATURITE de fruit	0.750	1	0.750	3.810	0.058
SANTE DE L'ARBRE	0.031	1	0.031	0.159	0.692
SANTE DU FRUIT	0.125	1	0.125	0.635	0.430
Compsé	0.417	3	0.139	0.705	0.554
Error	7.875	40	0.197		

Tableaux 14: Tenure en flavonoïdes

L'âge de l'arbre	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
La maturité de fruit	Arbre non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté
Echantillons	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	Arbre infesté fruit infesté
Extrait de chloroforme (flavonoïdes aglycones)	10,64 µg/ml	9,85 µg/ml	16,76 µg/ml	11,45 µg/ml	56,00 µg/ml	12,68 µg/ml	98,46 µg/ml	12,31 µg/ml	22,87 µg/ml	11,13 µg/ml	16,92 µg/ml	12,99 µg/ml
Extrait d'acétate d'éthyle (Flavonoïdes mono glycoside)	44,898 µg/ml	25,91 µg/ml	57,550 µg/ml	24,300 µg/ml	13,198 µg/ml	19,584 µg/ml	7,445 µg/ml	101,72 µg/ml	34,58 µg/ml	74,940 µg/ml	50,990 µg/ml	47,48 6 µg/ml
Extrait n-butanol (Flavonoïdes di et tri glycosides)	42,803 µg/ml	15,381 µg/ml	48,665 µg/ml	9,235 µg/ml	10,305 µg/ml	28,426 µg/ml	109,05 µg/ml	89,327 µg/ml	71,097 µg/ml	49,199 µg/ml	62,626 µg/ml	66,37 µg/ml
Extrait aqueux (Flavonoïdes très polaires)	21,701 µg/ml	7,216 µg/ml	24,321 µg/ml	12,455 µg/ml	10,305 µg/ml	4,356 µg/ml	6,626 µg/ml	21,745 µg/ml	16,058 µg/ml	46,285 µg/ml	18,350 µg/ml	16,71 3 µg/ml

Annexe 3

Tableau 23: Diamètres en millimètre des zones d'inhibition (*E. Coli*) obtenues par l'extrait de *Citrus Clementina*.

Echantillons	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté
Flavonoïdes aglycones)	14,2	11,6	14,6	13,4	17,4	Abs	Abs	Abs	13	17,8	20	15,8
Flavonoïdes mono glycoside	11,4	12,7	13,8	Abs	Abs	Abs	10,2	Abs	10,5	10,6	10,8	11,2
Flavonoïdes di et tri glycosides)	10,4	10	14	Abs	Abs	Abs	11	Abs	Abs	16,6	15,8	Abs
(Flavonoïdes très polaires)	Abs	Abs	Abs									

Tableau 24: Diamètres en millimètre des zones d'inhibition (*Staphylococcus aureus*) obtenues par l'extrait de *Citrus Clementina*

Echantillons	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infesté	arbre infesté fruit infesté
Flavonoïdes aglycones)	12	11	13,4	11,8	17,9	9,2	22,1	9,4	12,2	12	19,2	12,6
Flavonoïdes mono glycoside	12	12	13,8	11,2	18,1	12,1	10,1	9,6	10,2	11,4	12,2	12,4
Flavonoïdes di et tri glycosides)	10,1	Abs	14	11,2	Abs	Abs	10,1	9,2	20,4	29,6	17	21,2
(Flavonoïdes très polaires)	Abs	Abs	Abs	Abs	10,1	Abs	22,1	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs

Annexe 3

Tableau 25: Diamètres en millimètre des zones d'inhibition (*Sarcina lutea*) obtenues par l'extrait de *Citrus Clementina*.

Echantillons	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté
Flavonoïdes aglycones)	12,1	10,8	13,2	16	22,5	Abs	Abs	Abs	13,5	18,6	16,4	12,5
Flavonoïdes mono glycoside	11,2	12,5	12,4	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	11,9	11,8	17
Flavonoïdes di et tri glycosides)	Abs	Abs	12,9	Abs	Abs	10,2	Abs	24	14,2	18	22,9	Abs
(Flavonoïdes très polaires)	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	10,3	Abs	Abs	Abs

Tableau 26: Diamètres en millimètre des zones d'inhibition (*Bacillus subtilis*) obtenues par l'extrait de *Citrus Clementina*.

Echantillons	Verger âgée 50 ans						Verger jeune 6 ans					
	Fruit non mature			Fruit mature			Fruit non mature			Fruit mature		
	Arbre non infesté Fruit non infesté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté	Arbre non infesté Fruit non infecté	Arbre infesté fruit infecté	arbre infesté fruit infecté
Flavonoïdes aglycones)	19,8	10,8	14,6	14,2	12,4	9,3	Abs	10,2	12	14,8	16	11,8
Flavonoïdes mono glycoside	13,2	12,4	19	9,4	Abs	9,3	16	10,3	10	16,2	12,2	11,4
Flavonoïdes di et tri glycosides)	15,1	Abs	14,8	9,4	25	14	12,8	Abs	Abs	15,1	20	12
(Flavonoïdes très polaires)	19,8	10,8	14,6	14,2	12,4	9,3	Abs	10,2	12	14,8	16	11,8

