

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida -1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie
Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en
Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Thème :

**Evaluation de l'effet antimicrobien et insecticide des extraits
éthanoliques de quelques fruits en relation avec la maturité**

Présenté par :

SAIDANI Ryan et BENDIBA Lokmane

Devant le jury :

Mme GHENAI R.	MCB.	USDB	Présidente.
Mme FAIDI H.	MAA.	USDB	Examinatrice.
Mme ALLAL L.	Pr.	USDB	Promotrice.
Mme HAMEL A.	Doctorante	USDB	Co-promotrice.

Année 2021/2022

Remerciements

Nous rendons grâce à Dieu pour nous avoir donné la force, le courage et la persévérance de concevoir et d'accomplir ce modeste travail.

Nos vifs remerciements à notre Promotrice, Madame ALLAL pour avoir accepté de nous encadrer, mais également pour ses conseils pertinents et son aide tout au long de notre travail.

Nous tenons également à remercier chaleureusement Madame HAMEL pour sa disponibilité et ses orientations précieuses dans l'accomplissement de notre ouvrage.

De par leur disponibilité et leur patience, ils ont su être à l'écoute de nos préoccupations, nous enseigner et nous guider pour l'élaboration de ce mémoire.

Nous ne manquerons pas de remercier vivement les membres du Jury d'avoir accepté de siéger à notre soutenance, et nous nommons avec considération et respect, Mesdames GHENAI et FAIDI.

Nos remerciements vont également à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, en particulier Monsieur HAFSA Mohamed qui nous a été d'une aide inestimable.

Dédicace

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, en particulier ma tante qui m'a grandement aidé à la réalisation de ce travail.

À tous mes amis que j'ai rencontrés durant mon parcours universitaire pour tous les bons moments passés ensemble ainsi qu'à l'entraide permanente qui a régné tout au long du chemin qu'on a parcouru ensemble.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible.

Merci d'être toujours là pour moi.

Saidani Ryan

Evaluation de l'effet antimicrobien et insecticide des extraits éthanoliques de quelques fruits en relation avec la maturité

Résumé :

L'étude vise à évaluer les activités biologiques (antimicrobienne et insecticide) des extraits hydroéthanoliques du zest des fruits d'orange variété Valencia late, l'un mûr et l'autre non mûr, le rendement de l'extrait du zest mûr est de 39.19% et le non mure est de 23.76%. Ces extraits contiennent des métabolites secondaires (composés phénoliques) qui sont responsables des activités recherchées. Leurs teneurs ont été déterminées par des méthodes colorimétriques ou la teneur des polyphénols totaux chez l'extrait mure est de 52.128µg EAG/ml et celle du non mûr 70.617µg EAG/ml. Les flavonoïdes ont une teneur de 6.867µg EQ/ml pour le zest non mure et 4.596µg EQ/ml pour le mure et les tannins condensés ont 33.473µg EC/ml pour le zeste non mure et 25.94µg EC/ml pour le zest mur. Les résultats indiquent que la teneur en composés phénoliques de l'extrait non mûr est plus importante que l'extrait mûr, la différence est hautement significative selon l'analyse statistique.

L'activité antimicrobienne des deux extraits a démontré un effet modérément inhibiteur sur les souches bactériennes *Agrobacterium sp* avec un diamètre d'inhibition de 23 mm, et effet légèrement inhibitrice sur *Erwinia sp* avec un diamètre d'inhibition de 10.66 mm pour l'extrait mûr et 14 mm pour l'extrait non mûr. La différence entre l'effet des deux extraits n'est pas significative, cependant aucun effet inhibiteur n'a été enregistré pour les souches fongiques testées *Fusarium sp* et *Penicillium sp*.

Le test de toxicité a été fait avec des extraits à 3 différentes concentrations (500 mg/ml, 350 mg/ml, 150 mg/ml) sur les adultes d'*Aphis spirarcola* de 24 h à 48 h, Il montre que les extraits ont un effet insecticide et que le taux de mortalité augmente en fonction du temps et de la concentration. La CL50 de l'extrait mûr est 334.59 mg/ml et celle du non mûr est de 372.85 mg/ml. L'analyse statistique montre qu'aucune différence significative n'est enregistrée entre les deux extraits.

Mots clés : Valencia late, Composés phénoliques, Activités biologiques, Extraits hydroéthanoliques, Maturité.

Evaluation of the antimicrobial and insecticidal effect of ethanolic extracts of some fruits in relation to maturity

Abstract :

The study aims to evaluate the biological activities (antimicrobial and insecticidal) of hydroethanolic extracts of the zest of orange fruits from variety of Valencia late, one ripe and the other unripe, the yield of the extract of the ripe zest is 39.19% and the unripe is 23.76%. These extracts contain secondary metabolites (phenolic compounds) which are responsible for the desired activities. Their contents were determined by colorimetric methods where the content of total polyphenols in the mature extract is 52.128 μ g EAG/ml and non mature 70.617 μ g EAG/ml. The flavonoids have a content of 6.867 μ g EQ/ml for the unripe zest and 4.596 μ g EQ/ml for the ripe zest and the condensed tannins have 33.473 μ g EC/ml for the unripe zest and 25.94 μ g EC/ml for the ripe zest. The results indicate that the phenolic compound content of the unripe extract is higher than the ripe extract, the difference is highly significant according to statistical analysis.

The antimicrobial activity of both extracts showed an inhibitory effect on bacterial strains *Agrobacterium sp* with an inhibition diameter of 23 mm for both extracts so they are moderately inhibitory, and *Erwinia sp* with an inhibition diameter of 10, 66 mm for the mature extract and a diameter of 14 mm for the non mature one, So they are lightly inhibitory. The difference between the effects of the two extracts is not significant, however no inhibitory effect was recorded for the fungal strains tested *Fusarium sp* and *Penicillium sp*.

Toxicity test was done with extracts at 3 different concentrations (500 mg/ml, 350 mg/ml, 150 mg/ml) on *Aphis spirarcola* adults from 24 h to 48 h, It shows that the extracts have an insecticidal effect and that the mortality rate increases with time and concentration, The LC50 of the mature extract is 334.59 mg/ml and the non mature 372.85 mg/ml. Statistical analysis shows that no significant difference is recorded between the two extracts.

Keywords: Valencia late, Phenolic compounds, Biological activities, Hydroethanol extracts, Maturity.

تقييم التأثير المضاد للميكروبات والمبيدات الحشرية للمستخلصات الإيثانولية لبعض الثمار مقارنة مع

النضج

ملخص :

تهدف الدراسة إلى تقييم الأنشطة البيولوجية (مضادات الميكروبات والمبيدات الحشرية) للمستخلصات المائية الإيثانولية لقشر فاكهة Valencia late، أحدهما ناضج والآخر غير ناضج ، محصول مستخلص القشر الناضج 39.19% والمنتج غير الناضج 23.76% . تحتوي هذه المقتطفات على مستقلبات ثانوية (مركبات فينولية) مسؤولة عن الأنشطة المطلوبة. تم تحديد محتوياتها بالطرق اللونية حيث يكون محتو المركبات الفينولية الكلي في المستخلص الناضج 52.128 ميكروجرام / مل وغير ناضج 70.617 ميكروجرام / مل. للبشر غير الناضج و 25.94 ميكروجرام EC / مل للقشر الناضج. تشير النتائج إلى أن محتوى المركبات الفينولية للمستخلص غير الناضج أكثر أهمية من المستخلص الناضج ، والفرق ذو دلالة كبيرة وفقاً للتحليل الإحصائي.

أظهر النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصين تأثيراً مثبتاً على السلالات البكتيرية *Agrobacterium sp* بقطر تثبيط يبلغ 23 مم للمستخلصين بحيث يكونان مثبتين بشكل معتدل ، و *Erwinia sp* بقطر تثبيط يبلغ 10.66 مم للمستخلص الناضج و 14 مم للمستخلص غير الناضج لذا فهي مثبتة قليلاً. الفرق بين تأثير المستخلصين غير معنوي ، ولكن لم يتم تسجيل تأثير مثبت للسلالات الفطرية المختبرة *Fusarium sp* و *Penicillium sp*.

تم إجراء اختبار السمية باستخدام المستخلصات بتركيزات مختلفة (500 مجم / مل ، 350 مجم / مل ، 150 مجم / مل) على البالغين من *Aphis spirarcola* من 24 ساعة إلى 48 ساعة. اظهر أن معدل النفوق يزيد بدلالة الوقت والتركيز ، التركيز المميت النصفي (LC50) للمستخلص الناضج هو 334.59 مجم / مل وللنضج 372.85 مجم / مل. يظهر التحليل الإحصائي أنه لم يتم تسجيل فرق كبير بين المستخلصين.

الكلمات المفتاحية: Valencia late، المركبات الفينولية ، الأنشطة البيولوجية ، المستخلصات المائية الإيثانولية ، النضج.

Liste des figures

Figure 01 : Origine et diffusion des agrumes dans le monde entier.

Figure 02 : Développement de la production d'agrumes en Algérie de 2015 à 2019.

Figure 03 : Taxonomie des agrumes d'après Swingle.

Figure 04 : Anatomie d'une orange.

Figure 05 : La structure générique des flavonoïdes.

Figure 06 : La structure générique des non-flavonoïdes.

Figure 07 : Structure des tannins (**a** : tannins hydrolysables ; **b** : tannins condensés).

Figure 08 : Puceron des citrus (*Aphispiraecola*) observé avec une loupe binoculaire x56.

Figure 09 : *Aphispiraecola* sur feuilles d'oranger.

Figure 10 : Protocole d'extraction par macération.

Figure 11 : Méthode de diffusion sur gélose.

Figure 12 : Ensemencement de l'inoculum bactérien sur une boîte pétri contenant une gélose nutritive.

Figure 13 : Dépôt du disque mycélien sur la boîte pétri.

Figure 14 : Rendement des extraits hydro-éthanoliques du zeste mature et non mature.

Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Figure 16 : Teneur en polyphénols totaux des zestes de *Citrus sinensis* mature et non mature.

Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Figure 18 : Teneur en flavonoïdes des deux extraits du zeste de *C. sinensis* mature et non mature.

Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Figure 20 : Teneur en tanins condensé des deux extraits du zeste de *C. sinensis* mature et non mature.

Figure 21 : Absence de sensibilité de *Penicillium sp.* vis avis des des deux extraits.

Figure 22 : Absence de sensibilité de *Fusarium sp.* vis-à-vis des deux extraits.

Figure 23 : Sensibilité de *Agrobacterium sp.* vis-à-vis des deux extraits.

Figure 24 : Sensibilité de *Erwinia sp.* vis-à-vis des deux extraits.

Figure 25: Evolution de la mortalité corrigée chez les adultes d'*Aphis spiraecola* traité par les différentes concentrations des différents extraits hydroéthanolique du zeste mûr et non mûr.

Figure 26 : Courbe de régression du taux de mortalité accumulée de l'extrait ZM.

Figure 27 : Courbe de régression du taux de mortalité accumulée de l'extrait ZNM.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Production d'agrumes dans le monde en tonnes.

Tableau 02 : Classement des quatre meilleurs producteurs d'agrumes en Afrique, (année 2019).

Tableau03 : Composition chimique des parties consommables des agrumes en Afrique du nord.

Tableau 04 : Caractéristiques des souches microbiennes.

Tableau 05 : Résultats de l'activité antimicrobienne.

Tableau 06 : Concentration létale CL50 des deux extraits.

Liste des abréviations :

EAG : Equivalent Acide gallique.

EQ : Equivalent Quercetine.

EC : Equivalent Catéchine.

ZM : Zeste mûr.

ZNM : Zeste non mûr.

DPPH : Le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.

CL 50 : Concentration létale 50.

SOMMAIRE

-Résumé

-Liste des figures

-Liste des tableaux

-Liste des abréviations

Introduction :	1
Partie 01 : Recherche bibliographique Chapitre 01 : Les agrumes	3
1 Généralités et origine :	3
2 Importances économiques :	4
2.1 Importance mondiale :	4
2.2 Importance en Algérie :	5
3 Systématique :	6
3.1 Le genre Poncirus :	7
3.2 Le genre Fortunella :	7
3.3 Le genre Citrus :	7
4 Description et morphologie des fruits :	7
5 Le développement des fruits :	9
6 Composition chimique des agrumes implantés en Afrique du Nord :	10
Chapitre 2 : Les métabolites secondaires	11
1 Les métabolites secondaires :	11
2 Les polyphénols :	11
2.1 Les flavonoïdes :	11
2.2 Les non flavonoïdes :	13
3 Les Tannins :	15
3.1 Les tannins hydrolysables :	15

3.2	Les tannins condensés:.....	15
4	Facteurs influençant sur les métabolites secondaires :.....	16
4.1	Stade de développement :	16
4.2	Facteurs environnementaux:.....	16
4.3	Le génotype :	17
	Chapitre 3 : Généralité sur le matériel biologique testé.....	18
1	Matériel végétal :.....	18
2	Microorganisme :.....	18
3	Matériel animal (insecte) :.....	19

Partie 02 : Expérimentale

	Matériels et méthodes.....	21
1	L'échantillonnage :.....	21
2	Préparation des échantillons :.....	21
3	Extraction par macération :.....	22
3.1	Détermination du rendement :.....	23
4	Dosage des polyphénols totaux :.....	24
5	Dosage des flavonoïdes :.....	24
6	Dosage des tanins condensés :.....	25
7	Activité antimicrobienne :.....	25
7.1	Préparation de l'inoculum :.....	26
7.2	Test antimicrobien :.....	26
7.3	Lecture des résultats :.....	28
8	Test insecticide :.....	29
8.1	Détermination du taux de mortalité :.....	29
9	L'analyse statistique.....	30
10	La concentration létale 50.....	30

Résultats et discussions	31
1 Rendement des extraits hydroalcooliques :.....	31
2 Détermination de la teneur en polyphénols totaux :.....	31
3 Détermination de la teneur en flavonoïde :.....	33
4 Détermination de la teneur en tanins condensée :.....	35
5 Activité antimicrobienne :.....	36
6 Activité insecticide :.....	40
6.1 Détermination de la c50 :.....	41
Conclusion et Perspectives	
1 Conclusion :	44
2 Perspectives :	45
Références bibliographiques :.....	46

Introduction

Introduction :

Les agrumes sont l'une des cultures fruitières les plus populaires et les plus répandues dans le monde. Leurs produits sont une ressource de vitamines, de minéraux et de fibres alimentaires qui sont essentiels au bien-être nutritionnel général, (Imbert, 2007).

Les agrumes font partie des fruits les plus transformés industriellement, leurs jus détiennent une importante part du marché des boissons, la récupération des sous-produits issus de cette transformation, en particulier les écorces, représente un aspect économique important, (Teiko, 2001).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui sont synthétisés par les plantes, afin de résister au différent stress biotique et abiotique, on les trouve dans les différentes parties de la plante y compris les écorces des fruits, (Wojakowska et *al.*, 2013).

Les écorces d'agrumes sont riches en composés phénoliques, qui leur confèrent un large éventail d'activités biologiques dont l'activité antifongique, antibactérienne, et insecticide, (Bocco et *al.*, 1998 ; Kerdchoechuen et *al.*, 2010).

L'utilisation excessive des produits chimiques dans l'agriculture a causé de nombreux dégâts sur l'écosystème et sur la santé humaine, (Matson et *al.*, 1997). Suite aux retombées négatives, une prise de conscience a suscité un intérêt pour la lutte biologique et la recherche d'alternatives à base d'extraits de plantes, qui ne causent pas d'effet toxique majeur sur l'environnement, (Rahman, 2016).

Les extraits phénoliques des écorces d'agrumes ont un intérêt scientifique et économique qui touche à plusieurs domaines, dont le biocontrol, et pourrait être considéré comme une alternative aux produits chimiques utilisés en agriculture, (Kerdchoechuen et *al.*, 2010).

Le stade de développement des fruits influence grandement la composition des composés phénoliques. La teneur des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins diffèrent selon le stade de maturité du fruit, (Xinying et *al.*, 2019 ; Gupta et *al.*, 2012 ; Salvatore et *al.*, 2020).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude où nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités biologiques des zestes des fruits d'oranges, variété Valencia late, l'un mûr et l'autre non mûr, dans le domaine du biocontrol.

Notre travail a pour objectif :

- La détermination de la teneur en composés phénoliques des deux extraits hydroéthanolique des zestes des fruits d'oranges, l'un mûr et l'autre non mûr.
- L'évaluation des activités antimicrobienne et insecticide des deux extraits en rapport à leurs maturités.

Partie 01 :
Synthèse
bibliographique

Chapitre 01 : Les agrumes

1. Généralités et origine :

Le mot « agrumes » provient du latin *acrumen* (aigre) qui qualifiait les fruits acides dans l'antiquité. Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées et on compte plus de 900 variétés à ce jour, (Bachés et Bachés, 2002).

L'origine géographique exacte des agrumes n'est pas certaine d'après Loussert (1985), mais les experts s'accordent à dire qu'ils sont originaires des régions tropicales et subtropicales du Sud-est asiatique, plus précisément vers la partie basse de la chaîne de l'Himalaya. Sur certains textes religieux les chercheurs ont trouvé des mentions sur la culture des agrumes en Chine, donc on peut estimer leurs premières cultures vers 500 à 800 avant Jésus-Christ, (Bachés et Bachés, 2011). Pour leurs parfums et leurs fruits, les agrumes avaient une grande importance dans l'ancienne civilisation chinoise, (Loussert, 1985).

Bien après le voyage de Marco Polo en Chine, l'oranger fut introduit en Méditerranée par les Portugais en l'an 1400, et c'est à partir du bassin méditerranéen que les agrumes furent propagés dans le monde entier, (Loussert 1989).

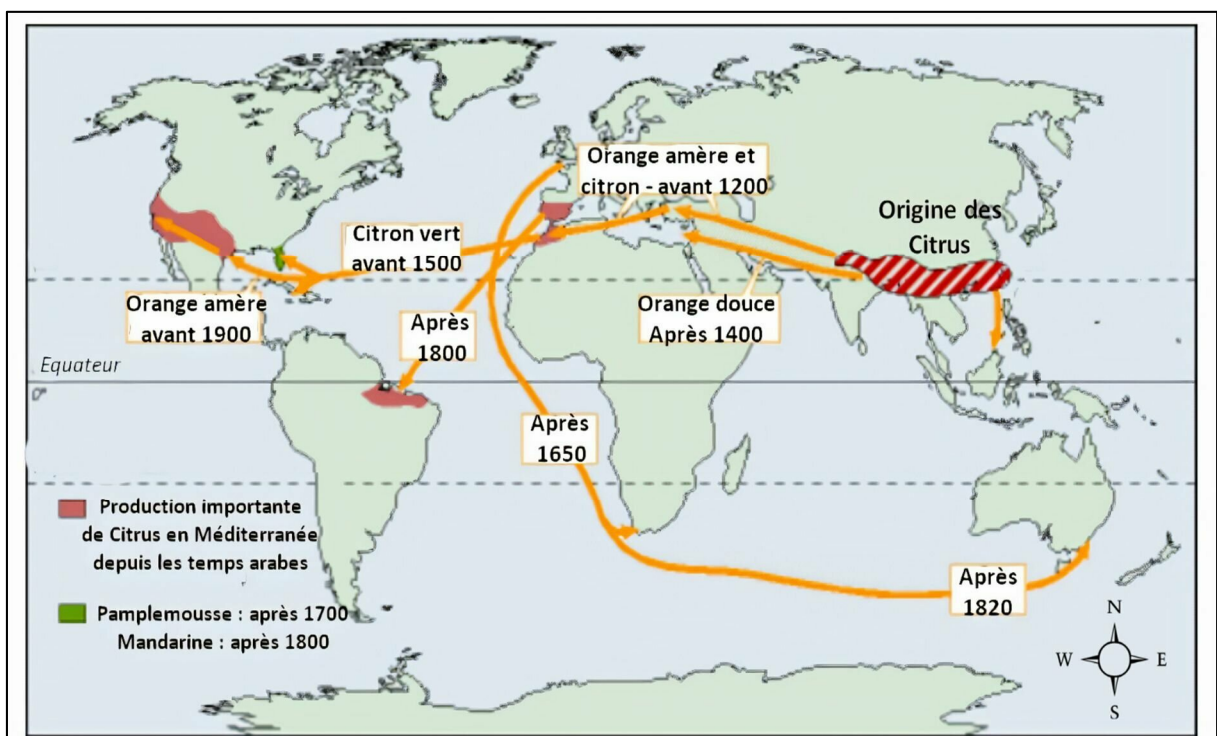


Figure 01 : Origine et propagation des agrumes dans le monde, (Davies et Albrigo ,1994).

2. Importances économiques :

2.1. Importance mondiale :

Les agrumes sont l'une des cultures fruitières les plus populaires et les plus répandues dans le monde. Leurs produits sont une riche source de vitamines, de minéraux et de fibres alimentaires qui sont essentiels au bien-être nutritionnel général. Parmi les types les plus couramment cultivés, les oranges qui représentent plus de la moitié de la production mondiale d'agrumes et les plus commercialisés, suivis des mandarines, des citrons et des pamplemousses. La production et les exportations mondiales d'agrumes ont connu une croissance constante au cours des trois dernières décennies, bien qu'à un rythme plus lent que les fruits concurrents tels que les mangues, les avocats et les melons, (FAO, 2021).

Tableau 01 : Production d'agrumes dans le monde en tonnes, (FAO, 2020).

Continent/Années	2016	2017	2018	2019
Afrique	14 112.7	14 531.9	14 813.5	15 579.3
Asie	61 751.3	63 911.7	65 335.0	71 887.8
Caraïbes	627.3	616.7	620.5	589.6
Amérique centrale	9 239.6	9 396.1	9 301.5	9 676.5
L'Europe	11 389.4	10 635.0	11 087.1	10 537.8
Amérique du Nord	14 034.5	13 994.5	14 744.8	15 043.4
Océanie	0.2	0.1	0.0	0.0
Amérique du Sud	26 436.3	27 037.1	26 502.4	27 736.3
MONDE	132 092.8	133 642.2	133 805.5	143 755.6

2.2. Importances en Algérie :

Comme pour de nombreux pays, la culture des agrumes a une grande importance économique en Algérie qui durant les années soixante exportait près de 25 % de sa production. Hélas, un arrêt de développement de cette culture fut observé suite à un délaissement des vergers au début des années 80. Ce qui a engendré de très faibles productions et un arrêt total d'exportation jusqu'à l'année 1995 où une tentative d'exportation fut enregistré avec seulement 12 000 tonnes, (M.A.D.R.P, 2013).

Avec l'avènement des différents programmes nationaux, dont le programme national du développement agricole en 1999, un regain d'intérêt de l'agrumiculture a été enregistré, particulièrement durant les dernières années (2010-2017) où la production des agrumes à augmenter de 91 % comparer aux années (2000-2009), (M.A.D.R.P, 2017).

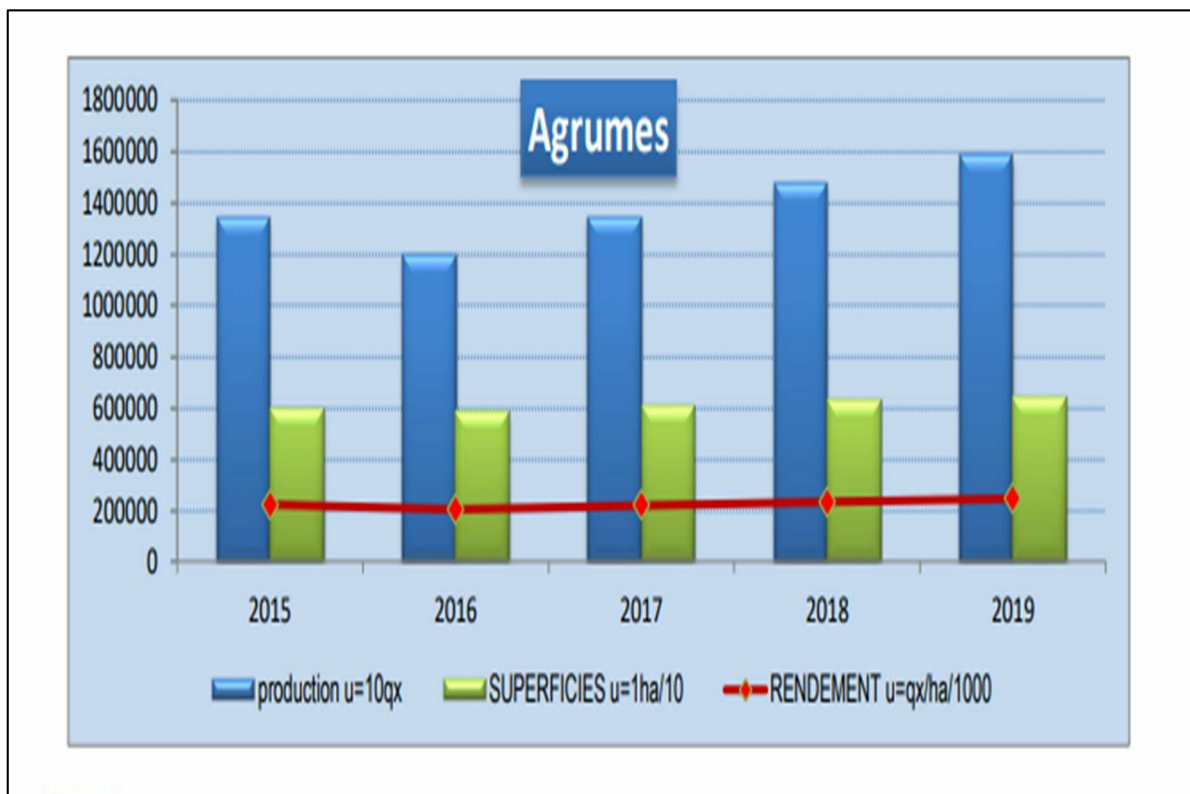


Figure 02 : Développement de la production d'agrumes en Algérie de 2015 à 2019, (MADR, 2019).

En Afrique, l'Algérie occupe la quatrième place en termes de production quantitative d'agrumes en 2019 juste après l'Égypte, l'Afrique du Sud et le Maroc.

Tableau 02 : Classement des quatre meilleurs producteurs d'agrumes en Afrique, (année 2019).

Pays	Production (tonnes)
Egypte	4 632.7
Afrique du sud	2 771.7
Maroc	2 604.3
Algérie	1 593.5

3. Systématique :

Les agrumes font partie de la famille des Rutacées et leurs taxonomies selon Swingle (1967), est celle indiquée sur la figure ci-dessous :

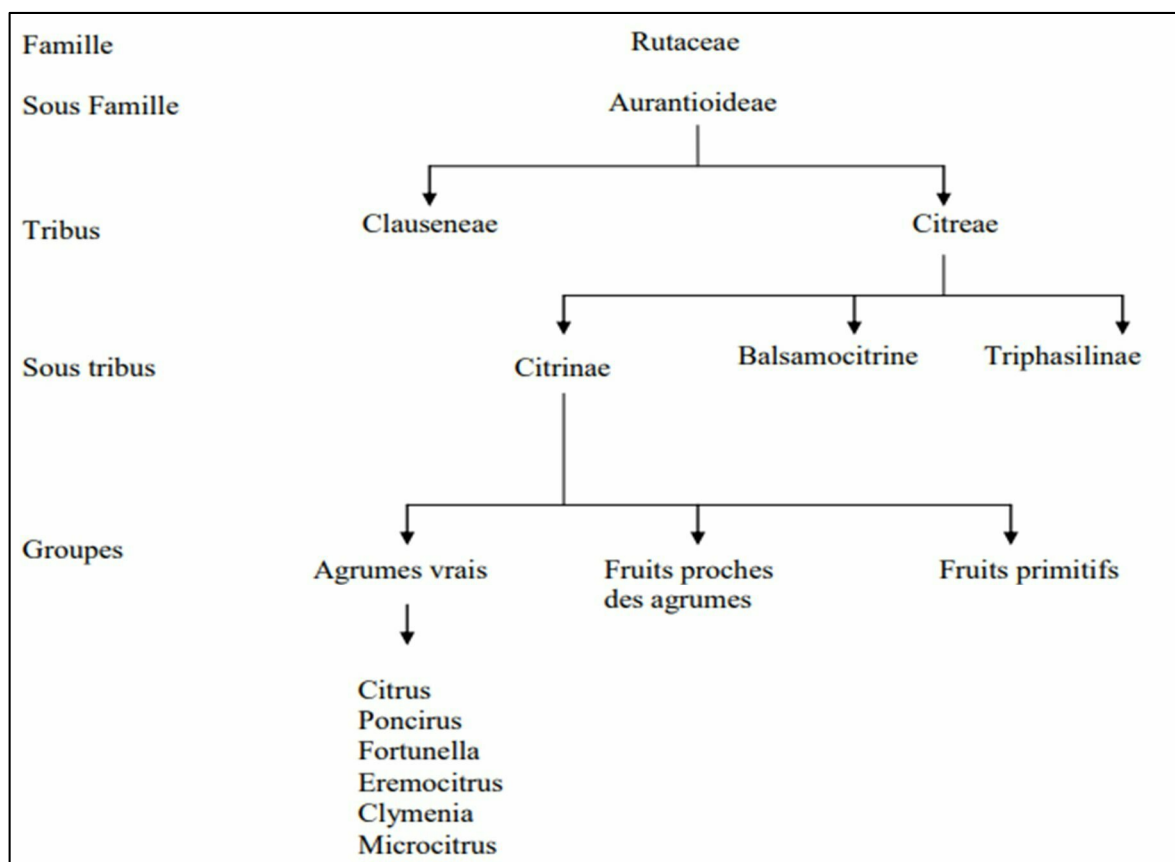


Figure 03 : Taxonomie des agrumes d'après Swingle, (1967).

Les agrumes comptent 3 principaux genres : *Fortunella* (Kumquat), *Poncirus* (Oranger trifolié) et le genre *Citrus*, (Bachés et Bachés, 2011).

3.1. Le genre *Poncirus* :

Ce genre ne renferme qu'une seule espèce *Poncirus trifoliata* qui est utilisé seulement comme porte-greffe, puisqu'elle offre une résistance au froid. Ses fruits ne sont pas comestibles, car leurs pulpes contiennent une huile à la saveur brûlante, (Barboni ,2006).

3.2. Le genre *Fortunella* :

Ce genre renferme six espèces dont deux seulement sont cultivables *Fortunella japonica* et *Fortunella margarita*, (Barboni, 2006).

- ***Fortunella jaoponica*** : Donne un fruit qu'on nomme kumquat rond, qui est un fruit exotique de forme plutôt ronde, (Virbel-Alonso, 2011).
- ***Fortunella margarita*** : Donne un fruit moins répandu qu'on nomme kumquat ovale, d'une forme ovale, il se mange entier avec la peau, car l'écorce ne contient pas d'huile brulante, (Virbel-Alonso, 2011).

3.3. Le genre *Citrus* :

Considérer comme le genre le plus important car il compte plus de 145 espèces, c'est au sein de ce genre que la majorité des espèces cultivées font partie : l'orange, la mandarine, le citron, etc., (Barboni, 2006). Elles sont très convoitées à cause de leurs bienfaits pour la santé par leur richesse en vitamine C ainsi qu'en acide folique, potassium et pectine. Leur extrait aussi contient un large éventail de produits biologiques leur conférant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, (Rafiq et *al.*, 2018).

4. Description et morphologie des fruits :

Généralement, les fruits des *Citrus* ont une structure anatomique similaire, (Ramful et *al.*, 2010), de forme oblongue (sphérique), de taille très variable selon l'espèce et la variété, vêtues d'écorce de couleur très variable selon le stade de maturité, (Praloran, 1971).

On distingue trois parties composant les fruits :

➤ **L'épicarpe :**

L'épicarpe ou flavedo est la partie extérieure de l'écorce, riche en substance aromatique, et de couleur généralement verte avant la maturité allant de l'orange au rouge à la maturité selon la variété et l'espèce, (El-Otmani et Ait-Oubahou, 2011).

➤ **Mésocarpe :**

La deuxième partie interne de l'écorce est l'albédo qu'on nomme aussi mésocarpe, elle est de couleur blanche et de texture spongieuse, riche en fibres (cellulose) et en pectine. Elle a tendance à mincir à mesure que le fruit pousse. L'écorce représente approximativement 8 % des fruits, (El-Otmani et Ait-Oubahou, 2011).

➤ **L'endocarpe :**

À l'intérieur, se trouvent des loges au nombre de 7 à 14 qu'on peut qualifier comme des tranches ou segments séparés par des septales minces appelées aussi membrane carpellaire, chaque segment contient les pulpes (vésicule à jus) qui sont colorées d'une couleur différente et ferment un jus acide ou sucré selon l'espèce et la variété du fruit, et on y trouve aussi des graines qu'on nomme les pépins, absents dans les variétés améliorées, (Purseglove, 1974).

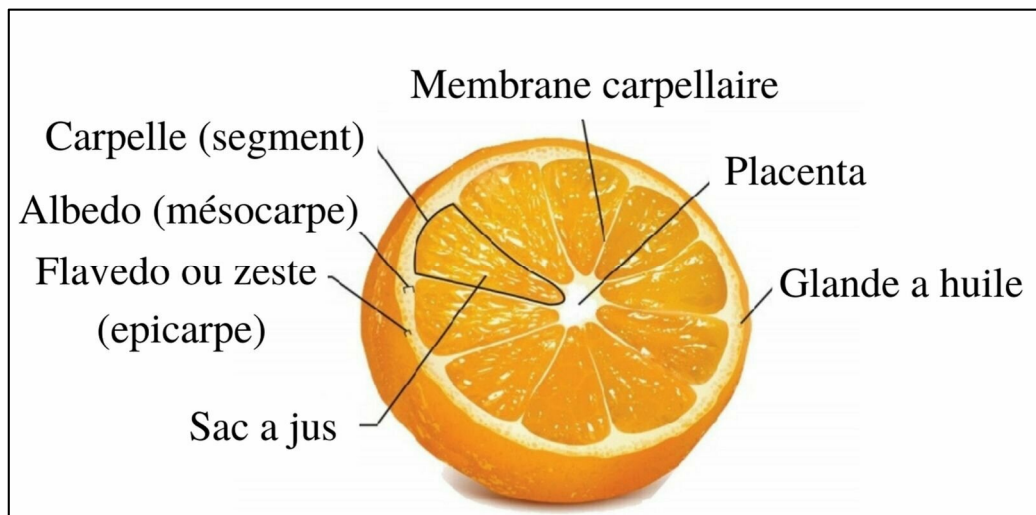


Figure 04 : Anatomie d'une orange, (Xingqian-Ye, 2017).

5. Le développement des fruits :

Selon Loussert, (1989), le développement des fruits d'agrumes se fait en 3 étapes :

a. La nouaison :

Première étape du développement du fruit juste après la fécondation, (Loussert, 1989).

b. Le grossissement :

Elle se passe généralement entre mai et juin, c'est la phase dans laquelle le fruit grossi, plus il aura accès à l'eau et aux éléments nutritifs, plus le fruit sera de bonne qualité et de bon calibre, (Loussert, 1989).

c. La maturation :

La maturation des fruits des citrus se manifeste par le changement de coloration de leur épiderme, et par la qualité de la teneur en jus de leur pulpe, ils ont tendance aussi à augmenter de volume et de poids atteignant leurs calibres maximums et définitifs, (Loussert, 1989).

Le stade de maturité peut influencer grandement la composition chimique des fruits d'agrumes. Chez la plupart des agrumes au cours de la maturation des fruits, le pourcentage des sucres, en particulier celui du saccharose augmente progressivement et régulièrement, suivi d'une diminution des acides organiques chez la plupart des espèces à l'exception des espèces dont les fruits sont acides comme les citrons, (Lado et *al.*, 2018).

Il convient de noter que l'accumulation des sucres ne se produit pas seulement au niveau des pulpes des fruits, mais également au niveau du flavedo qui ne cesse d'augmenter au cours de la croissance et de la maturation des fruits, (Shinha et *al.*, 2012).

Le rapport extrait soluble/acidité, ou simplement E/A, permet d'établir le critérium de maturité, il est utilisé dans tous les pays agrumicoles, (blondel, 1952).

Le stade de maturité influe aussi grandement sur les métabolites secondaires des agrumes. Chez la majorité des espèces, les teneurs en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols régressent à la maturation du fruit, (Chengying et *al.*, 2020).

6. Composition chimique des agrumes implantés en Afrique du Nord :

La composition chimique des citrus diffère d'une espèce à l'autre. Selon Sidana et *al.*, (2013), la composition chimique des agrumes de quelques fruits implanter en Afrique du nord est comme suite :

Tableau03 : Composition chimique des parties consommables des agrumes en Afrique du nord, (Sidana et *al.*, 2013).

Composition chimique dans 100g de la partie comestible	<i>Citrus sinensis</i> (orange)	<i>Citrus aurantifolia</i> (bigardier)	<i>Citrus aurantium</i> (orange amer)	<i>Citrus limon</i> (citronniers)	<i>Citrus reticulata</i> (mandarine)	<i>Citrus paradisi</i> (pamplemosse)
Teneur en eau (ml)	88,4	84,6	87,6	85.0	87.8	88.5
Protéine (g)	0,8	1,5	0.7	1.0	0.9	1.0
Matière grasse (g)	0,3	1,0	0.2	0.9	0.3	0.1
Fibre (g)	0,5	1,3	0.3	1.7	-	-
Carbohydrates (g)	9,3	10,9	10.9	11.1	10.6	10.0
Minéraux (g)	0,7	0,7	0.3	0.3	0.4	0.4
Calcium (mg)	40	90	26	70	50	30
Phosphore (mg)	30	20	20	10	20	30
Riboflavine (mg)	0,17	0,3	0.3	2.3	0.2	0.2
Thiamine (mg)	-	0,02	-	0.02 jus	40	0.12
Niacine (mg)	0	0,1	-	0.01 jus	-	0.3
Vitamine C (mg)	50	63	30	39 jus	68	-
Carotène (mg)	04	15	1004	0	350	-
Energie (kcal)	43	59	48	57	-	45

Chapitre 02 : Les métabolites secondaires

1. Les métabolites secondaires :

Les plantes peuvent produire des substances naturelles très diversifiées, à côté des métabolites primaires. Elles accumulent fréquemment ces molécules complexes appelées métabolites secondaires qui ont un rôle important dans leurs interactions avec leurs environnements, particulièrement pour la défense, (Gee et Johnson, 2001). Ils sont retrouvés dans tous les niveaux de la plante racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits..., ils jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits, (Amiot et *al.*, 1989). Plus de 200 000 structures de métabolites secondaires ont été identifiées, (Hartmann, 2007). Ils sont divisés principalement en trois grandes familles : les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes, (Lutge et *al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007).

2. Les Polyphénols :

Ils constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux avec plus de 8 000 structures connues, (Dacosta, 2003). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel il est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : Éther, ester, hétéroside, (Bruneton, 1999).

Selon Belitz et *al.*, (2009), les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes :

2.1 Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques végétaux, (Rice-Evans et Packer, 2003). Ils sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) correspondant à la structure du diphenylpropane, (Dacosta, 2003). Ils sont constitués de deux noyaux aromatiques (a,b) relié par un hétérocycle oxygéné (c), (Harborne et Williams, 2000). Quatorze groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines, (Heim et *al.*, 2002).

a. Les Flavanols :

Les flavanols sont des composés orthodiphénoliques qui comprennent les catéchines et les tanins. Ces composés sont présents en grande quantité dans les aliments, en particulier, dans les fruits, leur conférant des caractéristiques sensorielles telles que l'astringence causée par la précipitation des protéines en présence des tanins. Ils sont toujours hydrolysés en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle, (Degáspari et Waszczyński, 2004).

b. Les Isoflavones :

Les isoflavones se caractérisent par la fixation du cycle B en C3 plutôt qu'en C2. On les trouve presque exclusivement dans les légumineuses, les plus fortes concentrations se trouvant dans le soja, (D'Archivio et al., 2007).

c. Les Flavanones :

Les flavanones sont caractérisées par la présence d'un hétérocycle saturé à trois carbones en chaîne et un atome d'oxygène dans le C4. Ils sont présents en grande quantité dans les agrumes et les plantes aromatiques telles que la menthe, (Tapas et al., 2008).

d. Les Anthocyanes :

Les anthocyanidines se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle en C4, ils sont toujours hydrolysés en C3, (Mazza et Brouillard, 1990), ils sont responsables des couleurs rouges, violet, bleu dans les fruits. Il y a plus de 300 anthocyanes, les plus abondants sont la pelargonidine, cyanidine, peonidine, (Bakker et Timberlake, 1985).

e. Les flavones et flavonols :

Les flavones et les flavonols se présentent sous forme d'aglycones ou de glycosides. Ils ont une double liaison carbonée entre les carbones deux et trois. La différence entre ces composés est que les flavonols ont un groupe hydroxyle en position trois qui n'est pas présent pour les flavones, (Shahidi et Naczki, 2004).

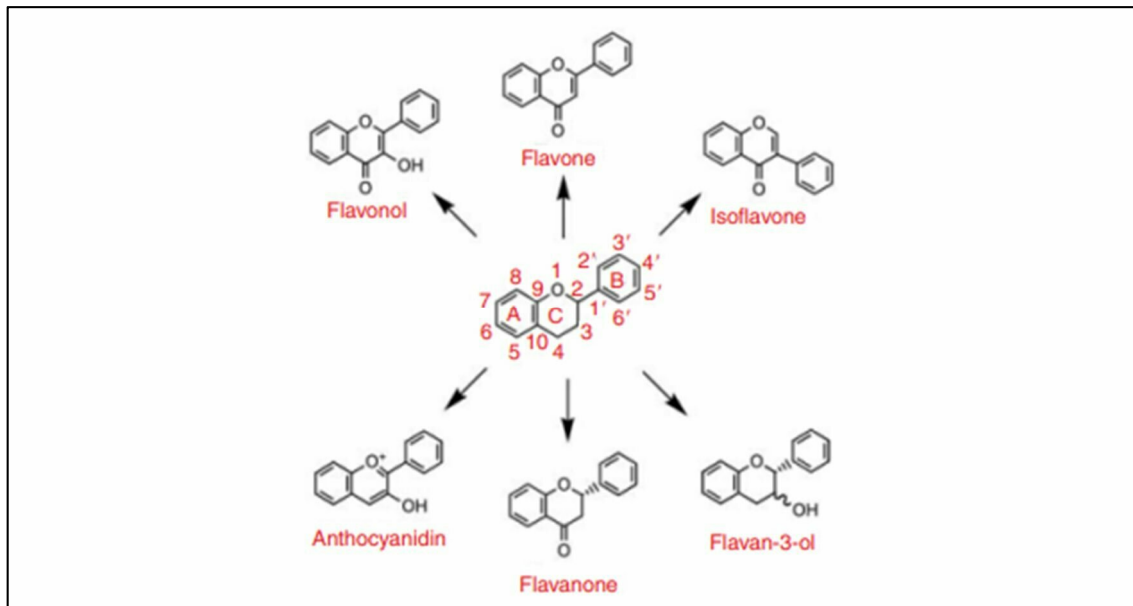


Figure 05 : La structure générique des flavonoïdes, (Crozier, 2006).

2.2. Les Non-flavonoïdes :

Bien que le squelette structurel des polyphénols contienne plusieurs groupes hydroxyle sur des anneaux aromatiques, la structure de base des non-flavonoïdes est un seul cycle aromatique. Les composés non-flavonoïdes comprennent les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes. La principale classe de ce groupe est représentée par les acides phénoliques, principalement les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ces molécules existent rarement sous leur forme libre mais sont le plus souvent conjuguées à d'autres polyphénols, au glucose, l'acide quinique, ou des composants structurels de la plante originale, (Chang et *al.*, 2005).

a. Les Acides phénolique :

Selon Liu et *al.*, (2015) le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, Il a deux sous-groupes :

➤ Les Acides hydro benzoïque :

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides, (Jimenez-Garcia et *al.*, 2013 ; Kong et Young, 1999).

➤ Les acide hydroxy cinnamique :

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques, (Jimenez-Garcia et *al.*, 2013).

b. Les Stilbènes :

Les Stilbènes sont des composés phénoliques naturels, contenant au minimum une molécule aromatique reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule, (Crouzet, 2011 ; Leray, 2010).

c. Les Coumarines :

Les Coumarines sont des composés aromatiques naturels, largement distribués dans le règne végétal, ils inhibent la croissance et la sporulation des champignons et autres microorganismes qui sont pathogènes pour les plantes. Les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides orthohydrocinnamiques, (Collin et Crouzet, 2011).

d. Les Lignanes :

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Ils sont liés par leur carbone 8. Leur distribution botanique est large, ils se trouvent dans la plupart des plantes riches en fibres, (Imran et *al.*, 2015).

e. Les Xanathones :

La structure chimique d'un Xanathone est constituée d'un système cyclique conjugué, composé de carbone 1-4 (cycle aromatique A) et de carbone 5-8 (cycle aromatique B) et d'un système à trois anneaux qui contiennent plusieurs groupes fonctionnels, (Kuete, 2013).

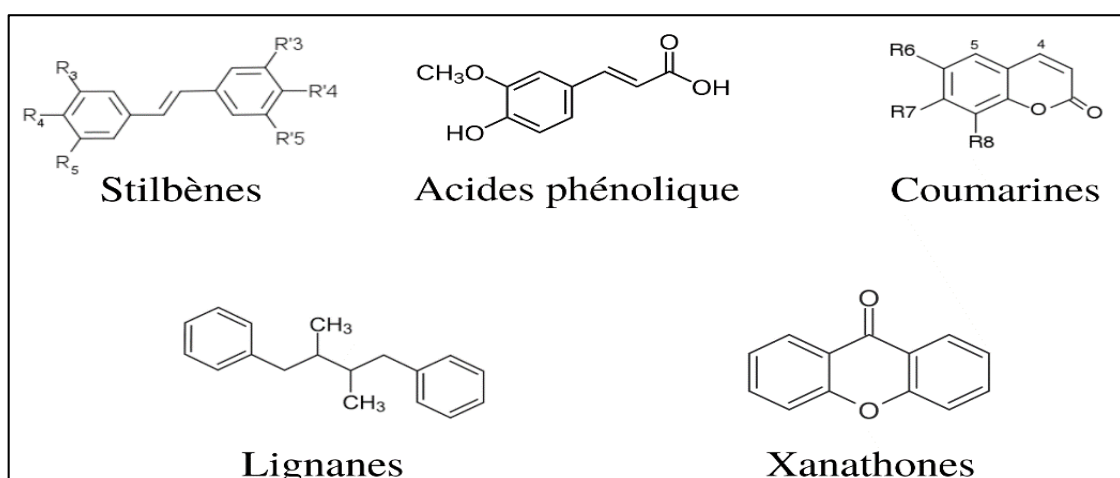


Figure 06 : La structure générale des non flavonoïdes.

3. Les Tanins :

Ces composés sont des polyphénols de haut poids moléculaire qui précipitent les protéines en solution, (Ghestern et *al.*, 2001). Les tanins ont été trouvés dans une multitude de plantes utilisées pour l'alimentation humaine et animale. Ils peuvent être divisés en deux groupes différents : les hydrolysables et les condensés.

3.1 Tanins Hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénoliques, ils sont facilement scindés par les tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci, il existe : les tanins galliques et les tanins ellagiques, (Hurabielle et Paris, 1981).

3.2 Tanins Condensés :

Ce sont des polymères flavaniques constitués d'unité flavan-3-ols, également appelée catéchine ou épicatechine. Ces unités sont liées entre elles par des liaisons carbone-carbone ou des liaisons carbone-oxygène, (Khanbabaea et Ree, 2001).

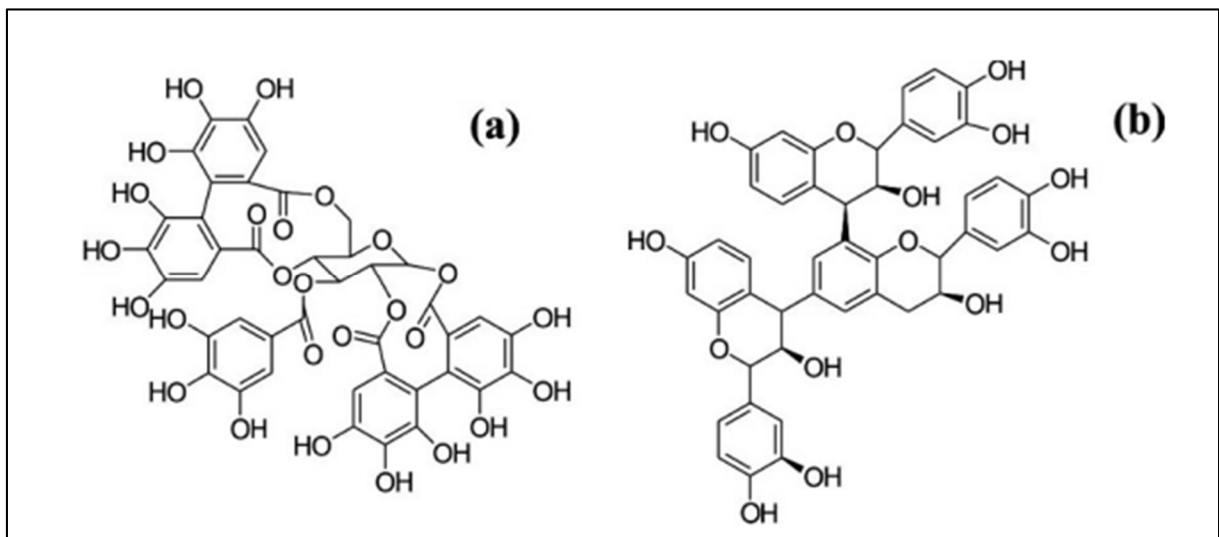


Figure 07 : structure chimique des tannins (**a** : tannins hydrolysables ; **b** : tannins condensés), (Raja et *al.*, 2014).

4. Facteurs influençant sur les métabolites secondaires :

Parmi les facteurs majeurs qui influencent la concentration des métabolites secondaires dans les fruits, on compte le stade de développement, le génotype et le climat, (Bowers et *al.*, 1992 ; Anntonnen 2005 ; Howard et *al.*, 2003), d'autres conditions peuvent avoir une influence, on peut mentionner la région géographique, la condition du sol, la saison, la date de récolte et le stockage, (Patil et *al.*, 2004).

4.1. Stade de développement :

Les différents stades de développement au cours du cycle de vie de la plante affectent son contenu en métabolites secondaires, comme les composés phénoliques, (Donaldson et *al.*, 2006 ; Neilson et *al.*, 2006 ; Elger et *al.*, 2009), les métabolites secondaires n'ont pas une concentration constante tout au long de la vie de la plante., ils changent plutôt dans différentes conditions environnementales en fonction de leurs besoins, (Verma et Shukla, 2015).

4.2. Facteurs environnementaux :

La croissance et le développement des plantes sont généralement déclenchées ou inhibés par différents facteurs environnementaux. Par conséquent, l'adaptation de la morphologie et des fonctions physiologiques aux changements des conditions biotiques et abiotiques influent sur l'accumulation des métabolites secondaires, (Yanqun et *al.*, 2020). Les plantes interagissent avec l'environnement pour leur survie, et sont donc influencées par plusieurs facteurs environnementaux biotiques et abiotiques qui régulent la biosynthèse des métabolites secondaires, (Zhi-lin et *al.*, 2007). Les plantes d'une même espèce cultivées dans des environnements différents peuvent présenter des différences dans la concentration des métabolites secondaires, (Radusiene et *al.*, 2012). Ces facteurs provoquent des stress chez les plantes, en raison de conditions défavorables. En réponse à ces stress, les plantes produisent des métabolites secondaires spécifiques pour les contrer, (Yerma et Shukla, 2015).

a. Facteurs biotiques :

Les plantes sont attaquées physiquement par de nombreux agents biologiques comme les champignons, les virus, les bactéries, les nématodes, etc... connus sous le nom de stress biotique. Les plantes montrent une résistance contre ces pathogènes grâce à des métabolites secondaires. Ces dernières ont des activités antimicrobiennes et insecticides qui fonctionnent

comme un système défensif contre ces pathogènes, (Taiz et Zeiger, 2006). La concentration des métabolites secondaires augmente en réponse à l'attaque des pathogènes pour protéger la plante, (Wojakowska et *al.*, 2013).

b. Facteurs abiotiques :

Les plantes interagissent avec l'environnement qui les entoure. Elles entrent en contact avec différents composants abiotiques tels que l'eau, la lumière, la température, le sol et les produits chimiques (minéraux/engrais), qui influencent la qualité et la productivité des plantes, (Radusiene et *al.*, 2012). Les plantes ont besoin de ces composants en quantités appropriées pour leurs développements, leurs croissances et leurs survies. Cependant, un manque de ces composants provoque un stress pour les plantes, ce qui conduit à une variation de la production ou de l'accumulation des métabolites secondaires, (Verma et Shukla, 2015).

4.3. Le génotype :

Les voies de biosynthèse des métabolites secondaires sont toujours le sujet de recherches, car très peu de connaissances sont disponibles à leur sujet. Cependant, certaines études génétiques ont montré que la production de métabolites secondaire chez les plantes se produit sous contrôle génétique, (Broun et *al.*, 2006). Les voies sont très sensibles aux variations environnementales parce que l'expression des gènes impliqués est modifiée par différents stress abiotiques, (Borges et *al.*, 2017 ; Sanchita and Sharma, 2018).

Chapitre 03 : Généralité sur le matériel biologique testé

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est le zeste d'orange *Citrus sinensis*, variété Valencia late. C'est une variété cultivée dans le monde entier, l'arbre est vigoureux, de croissance rapide et produit beaucoup de fruits, (Polese, 2008).

Elle est estimée à cause de sa particularité de murir tardivement, à une période où les prix sont les plus élevés. Elle est très connue aussi pour son utilisation industrielle, car elle fournit un jus de qualités, (Merle et *al.*, 1964).

2. Microorganismes :

Le matériel microbien qui a été utilisé pour le teste de l'activité antimicrobienne des deux extraits est représenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 04 : caractéristique des souches microbiennes

Nature du microorganisme	Souche	Origine
Champignons	<i>Fusarium sp.</i>	Laboratoire de mycologie (ENSA)
	<i>Penicillium sp.</i>	Isolement sur des citrus contaminés (LRPAM)
Bactéries	<i>Agrobacterium sp.</i>	Laboratoire de microbiologie (ENS Kouba)
	<i>Erwinia sp.</i>	Laboratoire de microbiologie université Médéa

Fusarium : Les espèces de *Fusarium* sont des champignons filamenteux cosmopolites, qui comptent parmi eux des pathogènes qui infectent les plantes provoquant diverses maladies connues sous le nom de fusariose, ils peuvent aussi contaminer les denrées alimentaires par leur

toxine provoquant des maladies chez les animaux et même les humains qui les consomment, (Chabasse et *al.*, 2002 ; Stepiefi et *al.*, 2019).

Penicillium : Le genre *Penicillium* est considéré comme un champignon de type moisissures qui fait partie du genre ascomycète. Il est très connu et utilisé dans le domaine pharmaceutique pour produire des drogues ainsi que la pénicilline un antibiotique très utilisé, (Harjunpaa, 1996). Cependant les *Penicilliums* comptent parmi eux des genres responsables de nombreuse dégradation particulièrement sur les denrées alimentaires et peuvent nuire à la conservation des aliments, (Pitt et Hoking, 1997).

Agrobacterium : Les *agrobacteriums* peuplent le sol naturellement, on les trouve dans les parties aérées du sol, (Tourte, 2001), les espèces phytopathogène sont responsables d'une maladie qui touche plus de 634 espèces de plantes qu'on nomme la maladie Crown Gall ou tumeur de Collet, (De-cleene et Delley, 1976).

Erwinia : *Erwinia* est une bactérie phytopathogène responsable de la maladie connue sous le nom de feu bactérien, c'est une maladie qui représente une grande menace pour les cultures fruitières dans de nombreuses régions du monde, (Megan, 2016 ; Vrancken et *al.*, 2013).

3 Matériel animal (insecte) :

Le puceron vert des *Citrus* (*Aphis spiraecola*) :

Les pucerons sont de petits insectes de taille qui varie entre 2 à 4 mm, à téguments mous et corps ovale peu aplati de l'ordre des Hemiptera, appartenant à la famille des Aphididae, (Fraval, 2006).

Leur capacité à causer d'énormes dégâts est due à leur fort potentiel reproductif, (Abanda, 2012). Leur présence est donc caractérisée par des colonies grégaires d'une dizaine voir d'une centaine d'individus serrés les uns les autres. Ils attaquent pratiquement tous les organes végétatifs, mais on les trouve généralement sur les feuilles et les tiges. Leurs dégâts sont dus principalement à leur mode d'alimentation, ce sont des piqueurs-suceur, ils absorbent massivement la sève de la partie où ils résident, les dommages dus aux piqûres diffèrent selon les organes touchés, sur les feuilles on remarque un recroquevillement et un enroulement, (Loussert, 1985).



Figure 08 : Puceron vert des citrus (*Aphis spiraecola*) observé avec une loupe binoculaire x56, (Original, 2022).

Les dégâts enregistrés des attaques de pucerons sont :

- Piqûres d'alimentation dans les vaisseaux conducteurs de la sève élaborée.
- Les pullulations provoquent une diminution de croissance, des malformations causées par l'injection de la salive et un dépérissement progressif de la plante.
- Le miellat produit se couvre généralement d'un complexe de champignons noirâtres, la fumagine, qui provoque une diminution de la photosynthèse.
- Boursouflures du bois dans le cas du puceron lanigère.
- Transmission possible d'autres parasites comme les virus, (anonymes 2006).



Figure 09 : *Aphis spiraecola* sur feuilles d'oranger, (Original, 2022).

Partie 02 : Expérimental

Matériels et méthodes

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité biologique des extraits hydroéthanoliques des fruits d'orange *Citrus sinensis* variété valencia late à deux niveaux de maturité.

Notre travail s'est déroulé en trois étapes :

- **Première étape** : Récolte des fruits d'orange et préparation des extraits hydroéthanoliques.
- **Deuxième étape** : Dosages des extraits hydroéthanoliques du zeste d'orange.
- **Troisième étape** : Activités biologiques (effet antimicrobien et insecticide) des extraits d'orange.

Le travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales (LRPAM), département Biotechnologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV) à l'université Saad Dahleb Blida 1.

1. L'échantillonnage :

Les fruits d'orange ont été cueillis à deux stades de maturité :

- **Première période** : Fin de mois de novembre 2020 lorsque les fruits n'étaient pas encore mûrs.
- **Deuxième période** : la deuxième récolte a été faite en mi-avril 2021 lorsque les fruits étaient mûrs.

Les fruits ont été récoltés sur 20 arbres choisis aléatoirement à raison de 2 fruits par arbres, (verger situé à Larebaâ dans la wilaya de Blida). Ils ont été ensuite transportés jusqu'au laboratoire de recherche pour le début des expériences.

2. Préparation des échantillons :

Les fruits d'oranges ont été bien nettoyés avec l'eau du robinet, puis essuyés avec un tissu absorbant propre, les fruits ont été ensuite épluchés de manière à séparer les différentes parties qui les constituent (zeste, albédo, pulpe).

Les différentes parties de l'orange ont été découpées en petits morceaux pour mieux être séchées. Ensuite, elles ont été placées dans une étuve à 40 degrés, La durée du séchage se termine lorsque le poids est stabilisé.

Le séchage permet de conserver la matière végétale, en d'autres mots évités les effets négatifs du surplus d'humidité qui favorise l'altération de la matière végétale par deux mécanismes, la fermentation des microorganismes et l'action des polyphénols-oxydases et des glycosidases qui dégradent les composés phénoliques, (Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003).

Après le séchage, les zeste de l'orange mûrs et non mûrs ont été récupérées et broyées en de fines particules à l'aide d'un broyeur électrique, ensuite, ils ont été tamisés jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Les poudres ont été ensuite conservées dans des boîtes étiquetées stériles et fermées hermétiquement.

3. Extraction par macération :

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide, qui consiste à tremper une matière solide (matière végétale) dans un solvant, afin d'extraire les substances naturelles qui se trouvaient dans la matière solide par leur dissolution dans le solvant, à température ambiante et par agitation ou pas, (Bellebcir, 2008).

Cette méthode a été effectuée selon le protocole de Hikmawanti *et al.*, (2021). Avec quelques modifications :

- Mettre 10 g de la matière végétale dans 100 ml d'éthanol (70:30).
- Agité à température ambiante.
- Laisser macérer pendant 24 h puis filtrer avec un papier filtre whatman.
- Récupérer le filtrat dans des flacons.
- Répéter la procédure 3 fois en récupérant le filtrat dans le même récipient que le premier.
- Séparer le solvant du soluté par la méthode d'évaporation sous vide à 40 degrés à l'aide d'un évaporateur rotatif.
- Conserver les extraits obtenus au frais à 4 degrés.

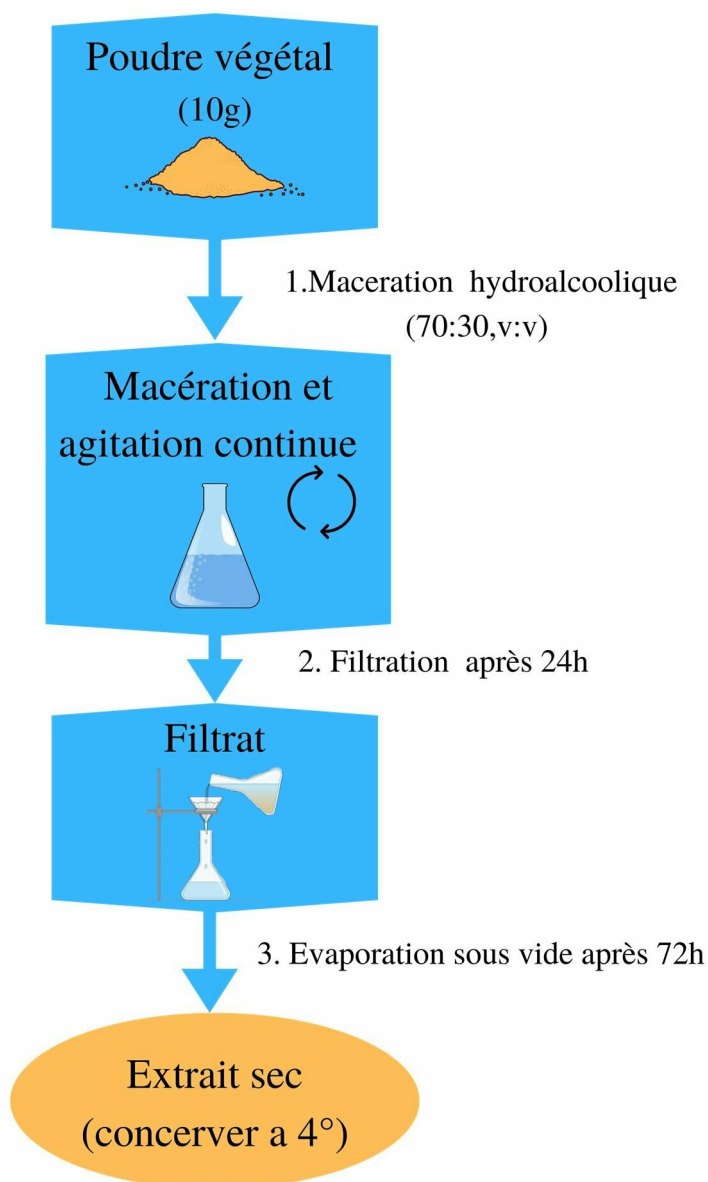


Figure 10 : Protocole d'extraction par macération.

3.1. Détermination du rendement :

Le rendement a été déterminé par la formule suivante :

$$R \% = (M/M_0) * 100$$

R% : Rendement de l'extraction.

M : Masse en gramme de l'extrait sec.

M₀ : Masse en gramme de la matière végétale. (Mohammedi ,2006)

4. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé avec la méthode du Folin-Ciocalteu préconisée par Grigoras, (2013), avec quelques modifications.

Lorsque les polyphénols s'oxydent, ils se transforment en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La densité de coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénol présent dans l'extrait végétal, (Singleton et *al.*, 1965).

Mode opératoire :

- À 250µl de l'extrait sont ajoutés 1250 µl de Folin-ciocalteu (10 %) et 1250 µl de sodium carbonate (7,5 %).
- Après agitation, le mélange est incubé à l'abri de la lumière à une température de 27 degrés pendant 30 min.
- L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Thermo Scientific-Genesys 150) à 765 nm contre un blanc constitué du même mélange contenant de l'eau distillée à la place de l'extrait.
- Une procédure similaire a été réalisée pour la solution de l'acide gallique, et la courbe d'étalonnage a été préparée à partir de plusieurs concentrations de l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent Acide gallique par millilitre (µg EAG/ ml).

5. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïde a été déterminée par la méthode de coloration au Trichlorure d'Aluminium (AlCl₃) qui colorie le mélange en jaune en présence de flavonoïdes, (Ismail et *al.*, 2010).

Mode opératoire :

- À 750 µl de l'extrait est ajouté 750 µl d'AlCl (2 %).
- Après agitation, le mélange est incubé à une température de 27 degrés pendant 10 min à l'abri de la lumière.
- L'absorbance est mesurée à 435 nm contre un blanc composé du même mélange avec de l'eau distillée à la place de l'extrait.

- Une procédure similaire a été réalisée pour la solution de quercétine, et la courbe d'étalonnage a été préparée à partir de plusieurs concentrations de quercétine. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent Quercitine par millilitre ($\mu\text{g EQ/ml}$).

6. Dosage des tanins condensés :

Nous avons adopté la méthode à la vanilline avec l'HCl. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des tanins condensés et la formation de complexes rouges. Cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline, (Schofield et *al.*, 2001).

Mode opératoire :

- À 500 μl de l'extrait sont ajoutés 1500 μl de vanilline (4 %) et 750 μl de HCl concentré.
- On mélange le tout puis on incube à une température de 27 degrés pendant 15 minutes à l'abri de la lumière.
- On mesure l'absorbance au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm contre un blanc constitué du même mélange contenant de l'eau distillée à la place de l'extrait.
- Une procédure similaire a été réalisée pour la solution de catéchine, et la courbe d'étalonnage a été préparée à partir de plusieurs concentrations de catéchine. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent Catéchine par millilitre ($\mu\text{g EC/ml}$).

7. Activités antimicrobienne :

La technique utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne est la méthode de diffusion sur milieu solide, (Sokmenet et *al.*, 2004) dont le principe est la détermination de la sensibilité ou la résistance des souches microbienne testée vis-à-vis des différents extraits.

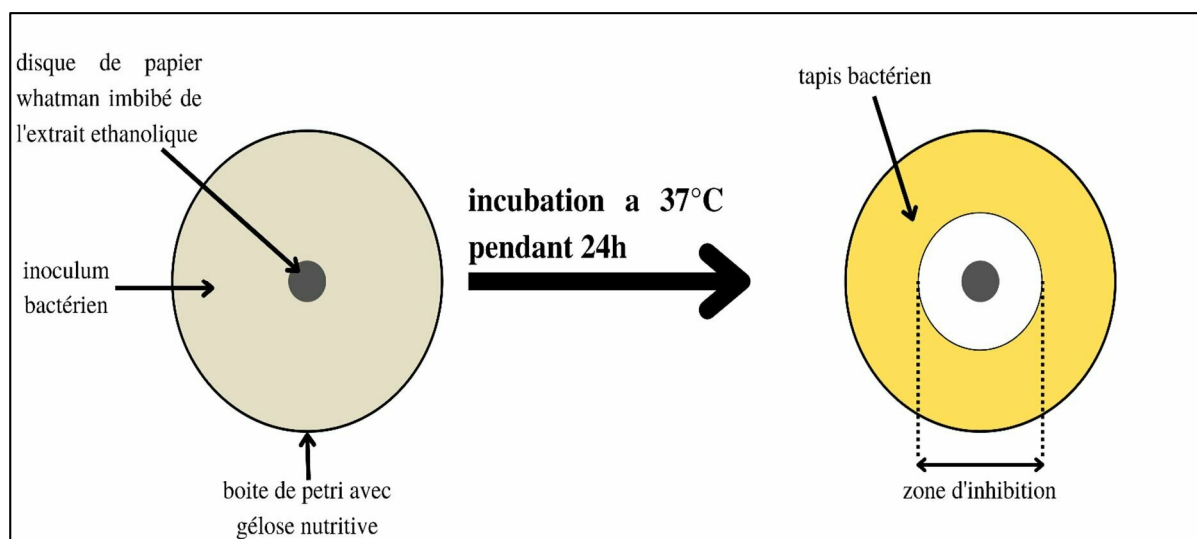


Figure 11 : méthode de diffusion sur gélose.

7.1. Préparation de l'inoculum :

Une suspension bactérienne a été préparée à partir d'une culture jeune de 24 h (repiquage) à une densité oculaire comprise entre 0,08 à 0.10 lue à 625 nm, cette absorbance équivaut à une concentration de 10^6 colonies par ml, (Abdellah, 2018).

Pour les souches fongiques, un disque mycélien est déposé à 1,5 cm de l'extrémité des boîtes Pétris dans lesquelles un milieu de culture PDA a été coulé au préalable. Après une incubation de 7 jours à une température de 37° que les souches fongiques jeunes sont prêtes à l'emploi.

7.2 Test antimicrobien :

Pour les souches bactériennes, la méthode d'écouvillonnage a été faite comme suit :

- Tromper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- Le pressé fermement contre les parois internes du tube afin de le décharger.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois en retournant la boîte de 60 degrés à chaque fois en pivotant l'écouvillon sur lui-même.
- Un disque whatman chargé de 20 μ l d'extrait à une concentration de 500 mg/ml est déposé au centre de la boîte Pétri contenant la gélose sur la quel l'ensemencement a été fait.
- Ensuite les boîtes sont incubées à une température de 37° pendant 3 jours.



Figure 12 : ensemencement de l'inoculum bactérien sur une boîte pétri contenant une gélose nutritive, (Original.2022).

Pour les souches fongiques un disque mycélien est prélevé des cultures jeunes et déposées à 1,5 cm de l'extrémité des boîtes Pétris, ensuite un disque whatman chargé de 20 μ l d'extrait à une concentration de 500 mg/ml est déposé à 1,5 cm de l'autre extrémité des boîtes à l'opposé du disque mycélien. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 27° pendant 7 jours.

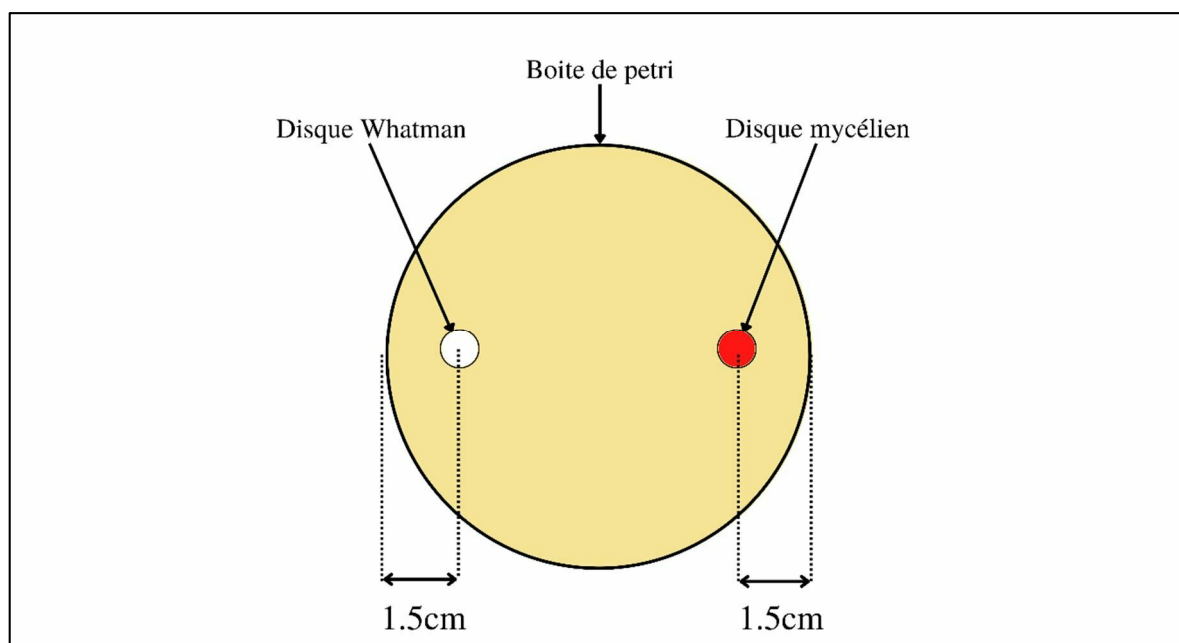


Figure 13 : dépôt du disque mycélien sur la boîte Pétri.

Stérilisation des extraits :

Les extraits sont stérilisés à l'aide d'un filtre à seringue 0.2 μm . Ces dernières sont fréquemment utilisés pour la fabrication des médicaments parentéraux et des gouttes ophtalmiques stériles, afin d'éliminer les contaminations microbiologiques. Les membranes de 0,2/0,22 μm sont le plus souvent utilisées pour l'élimination des bactéries, (microbiologie-clinique.com.2022).

7.3. Lecture des résultats :

La lecture se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse, qui se traduit par l'apparition d'un halo translucide autour du disque, (Chebaibi et *al.*, 2016). L'interprétation des résultats se fait selon l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par le fascicule de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, (6ème édition, 2011), le classement des diamètres d'inhibition est comme suite :

- Non inhibitrice : diamètre de la zone d'inhibition < 10 mm
- Légèrement inhibitrice : 10 mm < diamètre de la zone d'inhibition < 16 mm
- Modérément inhibitrice : 16 mm < diamètre de la zone d'inhibition < 28 mm
- Fortement inhibitrice : diamètre de la zone d'inhibition > 28 mm

8. Test insecticide :

L'expérimentation a été faite sur des pucerons verts des Citrus, prélevés sur des feuilles d'oranger à la parcelle expérimentale de l'université Saad Dahlab Blida en mai 2022. La méthode utilisée pour le test insecticide est le contact direct de l'extrait sur les insectes par pulvérisation préconisée par Larif et *al.*, (2012), avec quelques modifications :

- Des feuilles entières infestées ainsi que des feuilles saines issues de jeunes pousses ont été prélevées aléatoirement.
- Les feuilles saines issues de jeunes pousses ont été désinfectées par trempage dans de l'eau de javel à 2°, et ensuite rincées à l'eau distillée stérile.
- Les feuilles désinfectées précédemment sont déposées dans des boîtes percées à raison de 2 à 3 feuilles par boîte.
- Délicatement un nombre de 15 à 20 pucerons adultes sont déposés sur les feuilles saines à l'intérieur des boîtes percées.
- Du coton hydrophile mouillé avec de l'eau stérile est placé sur chaque boîte percée afin d'assurer un milieu humide favorable à la survie des pucerons.
- Un traitement par contact direct a été établi en pulvérisant deux fois une quantité d'environ 50 µl par pulvérisation, les boîtes témoins ont été pulvérisées avec de l'eau distillée stérile.
- Le test a été fait avec 3 concentrations de 500 mg/ml, 350 mg/ml et 150 mg/ml à raison de 5 répétitions pour chaque concentration.
- Les boîtes et leur contenu sont mis dans des conditions de laboratoire à une température ambiante.
- Un seul traitement a été établi, seulement le premier jour, l'observation a duré deux jours.

8.1. Détermination du taux de mortalité :

Afin de suivre chronologiquement l'évolution de la mortalité des pucerons soumis aux deux extraits à différentes concentrations, le dénombrement des individus morts a été réalisé successivement du premier au troisième jour depuis le début de l'expérimentation, à l'aide d'une loupe binoculaire.

Seules les adultes sont dénombrées, car un nombre important de natalités a été observé, mais cela n'influence en rien à l'expérience, car il est très facile de différencier les adultes des larves.

La mortalité corrigée qui est exprimée en pourcentage est calculé selon la formule d'Abbott, (1925) :

$$M_c = \frac{M_e - m_t}{100 - m_t} \times 100$$

M_c = mortalité corrigée en pourcentage.

M_e = mortalité de l'échantillon testé.

M_t = mortalité dans le témoin non traité.

9. L'analyse statistique :

L'analyse de la variance permet de déterminer si les deux extraits présentent une différence significative, en d'autres mots, savoir si les différents facteurs (extraits, temps, concentration) influent sur les variables étudiées, le test utilisé est ANOVA avec le logiciel Minitab 17 à un niveau de signification de 5%.

10. La concentration létale 50 :

La Cl 50 est définies comme étant les concentrations létales provoquant respectivement 50 % de mortalité dans la population des insectes traités. Ces valeurs ont été déterminées à partir d'une courbe expérimentale donnant les variations du pourcentage de mortalité, en fonction des concentrations croissantes des extraits, (El-Akhel et *al.*, 2015).

Résultats et discussions

1. Rendement des extraits hydroalcooliques :

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que le rendement de l'extraction hydroéthanoïque du zeste d'orange mûre (39,190 %) est plus important que le rendement du zeste d'orange non mûre (23,762 %), (figure 16).

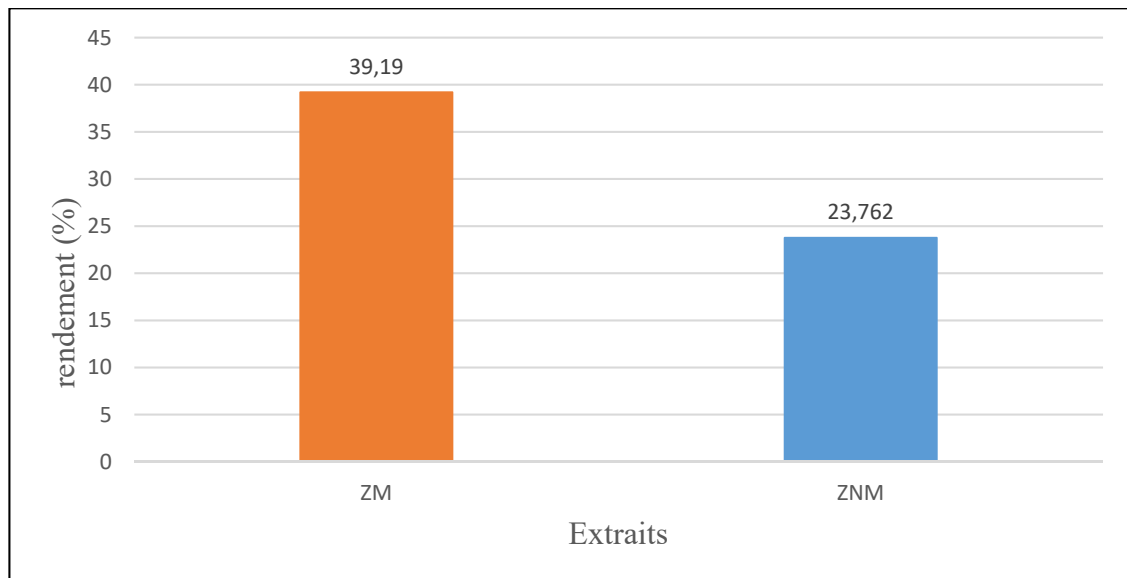


Figure 14 : Rendement des deux extraits hydroéthanoliques du zeste mûr et non mûr.

Parmi les paramètres affectant le rendement, on compte la composition chimique de l'échantillon, (Ajila *et al.*, 2010).

Irving et Walton, (1980), ont signalé durant leur étude que la teneur en sucre des zestes mûrs de *C.sinensis* variété Valencia late avait un taux de sucre plus élevé que les zestes non mûrs, on peut donc émettre l'hypothèse basée sur ces informations que la différence du rendement entre les deux extraits est due à la faible teneur en sucre du zeste non mûr comparé au zeste mûr.

2. Détermination des teneurs en polyphénols totaux :

Les teneurs en polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'Acide gallique ($y=0.0075x + 0.0215$; $R^2 = 0.9976$) exprimée en microgrammes équivalents acides galliques par millilitre ($\mu\text{g EAG/ml}$).

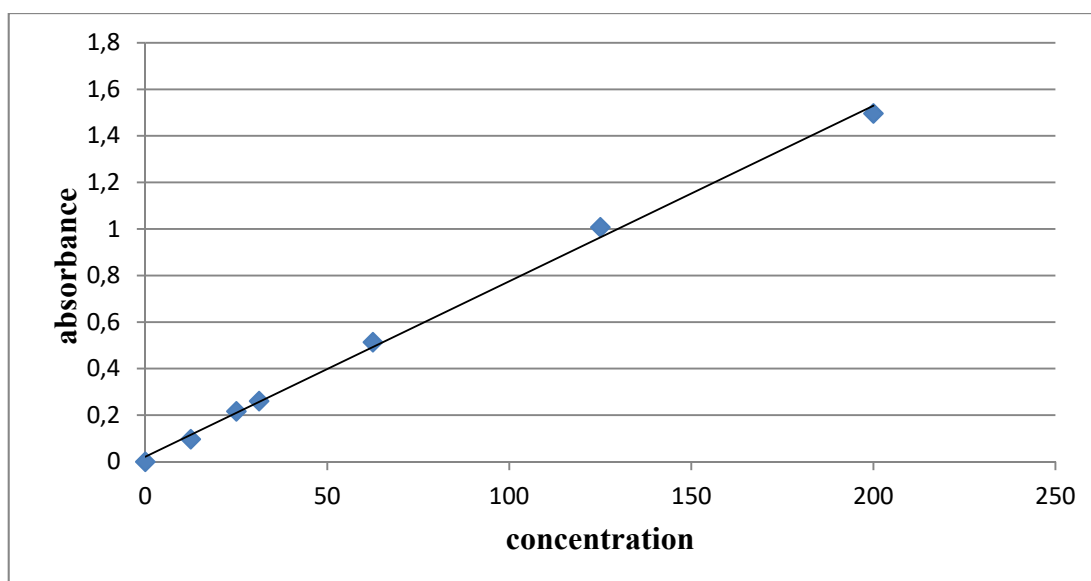


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats enregistrés ont montré une teneur en polyphénols totaux : de 70,617 μg EAG/ml pour le zeste de fruit non mûr, et de 52,128 μg EAG/ml pour le zeste de fruit mûr, (figure 18).

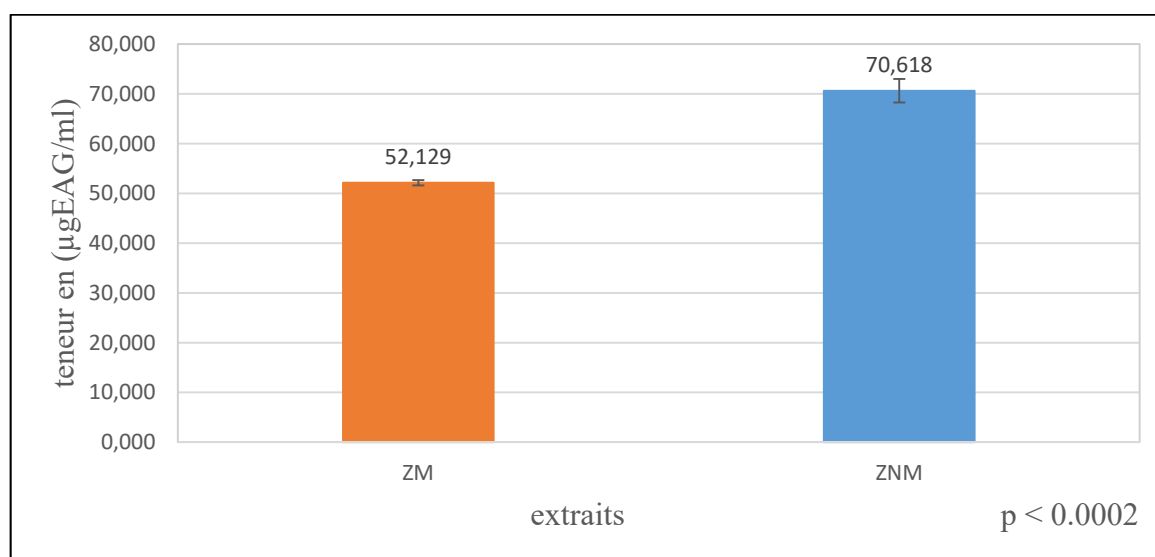


Figure 16 : Teneur en polyphénols totaux des zestes de *Citrus sinensis* mûr et non mûr.

Selon les résultats obtenus avec le logiciel Minitab 17. L'analyse statistique à montrer que la différence de la teneur en polyphénols des deux extraits est hautement significative ($P=0.0002$).

D'après les résultats obtenus, on constate que le zeste de *C. sinensis* non mature contient une teneur en polyphénol plus élevé que le zeste mature avec un taux d'augmentation

de 35,47 %. Nos résultats sont en accord avec Multari et *al.*, (2020) qui ont démontré que la teneur en polyphénol de 4 espèces du genre citrus (pamplemousse, citron et deux variétés d'oranges) diminue significativement tout au long de la croissance des fruits atteignant au stade de maturité une baisse de -60 % ($p < 0,0001$) pour le pamplemousse qui a montré la baisse la plus élevée, et de -44 % pour la variété d'oranges Washington navel.

Parmi les facteurs influençant la teneur en polyphénols, on compte les conditions climatiques et la présence de certains groupements chimique (l'acide ascorbique, l'acide organique, les sucres, les aminés aromatiques), (Gharfar et *al.*2010).

Donc la différence des teneurs en polyphénols chez le zeste mûr et le zeste non mûr est peut-être due à la différence des groupements chimiques entre les deux, comme démontrer dans l'étude menée par Salvatore et *al.*, (2020), les teneurs en acide organique diminuent et la teneur en sucre augmente chez les fruits d'agrumes mûrs.

3. Détermination de la teneur en flavonoïde :

La teneur en flavonoïdes des différents extraits sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la quercétine ($y=0.0415x + 0,0323$; $R^2 = 0,9975$), exprimée en microgrammes équivalents quercétine par millilitre ($\mu\text{g EQ/ml}$).

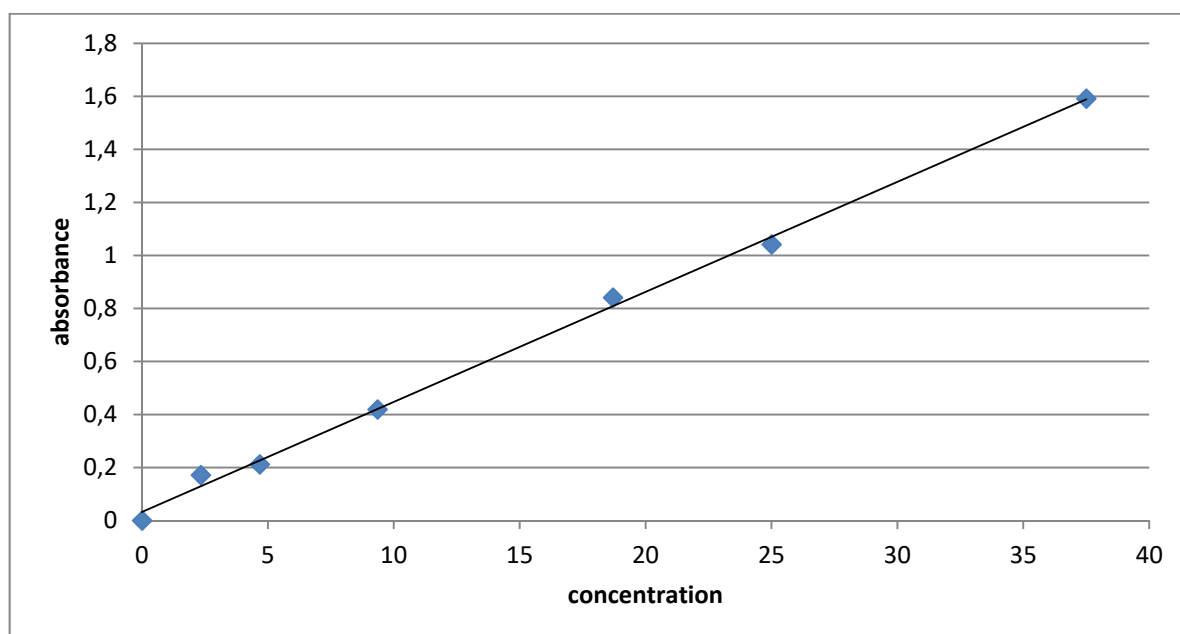


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats enregistrés ont montré une teneur en flavonoïde de 6,867 µg EQ/ml pour le zeste de fruit non mûr, et de 4,596 µg EQ/ml pour le zeste de fruit mûr, (Figure 19).

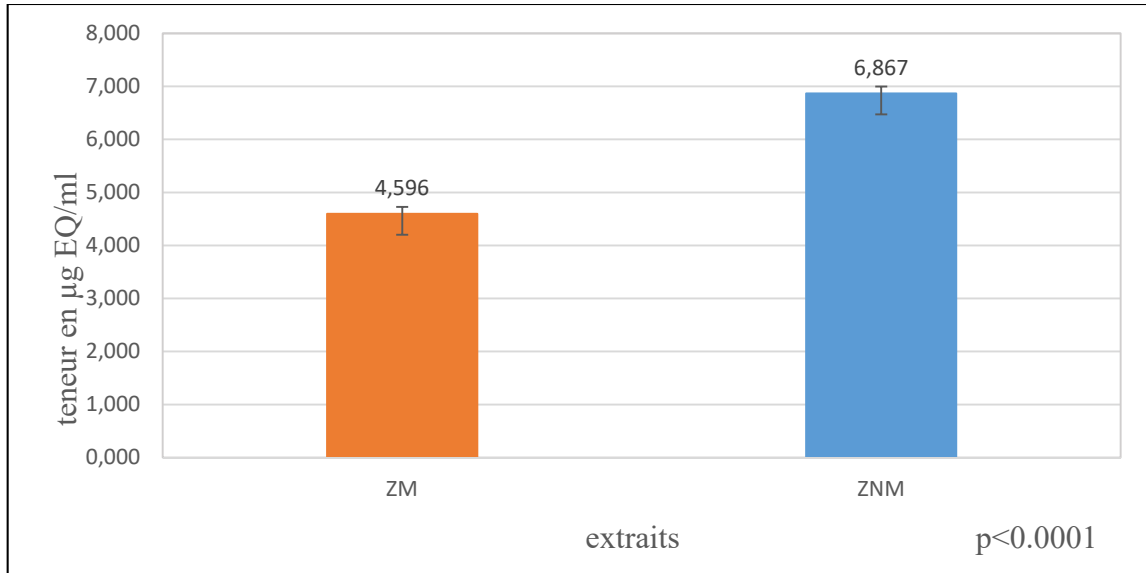


Figure 18 : Teneur en flavonoïdes des deux extraits du zeste de *C.sinensis* mûr et non mûr.

Selon les résultats obtenus avec le logiciel minitab 17, l'analyse statistique a montré que la différence de la teneur en flavonoïdes des deux extraits est très hautement significative ($P < 0.0001$).

Nous remarquons par ailleurs que la teneur en flavonoïdes du zeste de *C. sinensis* non mûr est plus élevée que le zeste mûr avec un taux d'augmentation de 33,07 %. Nos résultats sont en accord avec Dong et al., (2019), qui ont démontré que pendant la maturation du fruit de citron eureka, les flavonoïdes ont tendance à diminuer significativement ($p < 0.05$).

Nos résultats sont aussi en corrélation avec l'étude réalisée par Eun-AE et al. (2014) qui ont montré que les écorces du fruit *Citrus grandis* osbeck (dangyuja) non mûr possédaient une teneur en flavonoïde plus élevée avec un taux d'augmentation de 15 % à 20 % comparé au fruit mûr.

D'après l'explication fournie par Zhao et al., (2020), au cours de l'élongation cellulaire et de la maturation subséquente des feuilles et des fruits, la production de flavonoïdes s'avère être ralentie et parfois même à l'arrêt. Par conséquent, les concentrations des flavonoïdes sont faibles dans les organes matures en raison des effets de dilution.

4. Détermination de la teneur en tanins condensés :

Les teneurs en tanins condensés sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la catéchine ($y = 0,0005x + 0,0053$; $R^2 = 0,9976$) exprimée en microgrammes équivalents de catéchine par millilitre ($\mu\text{g EC/ml}$).

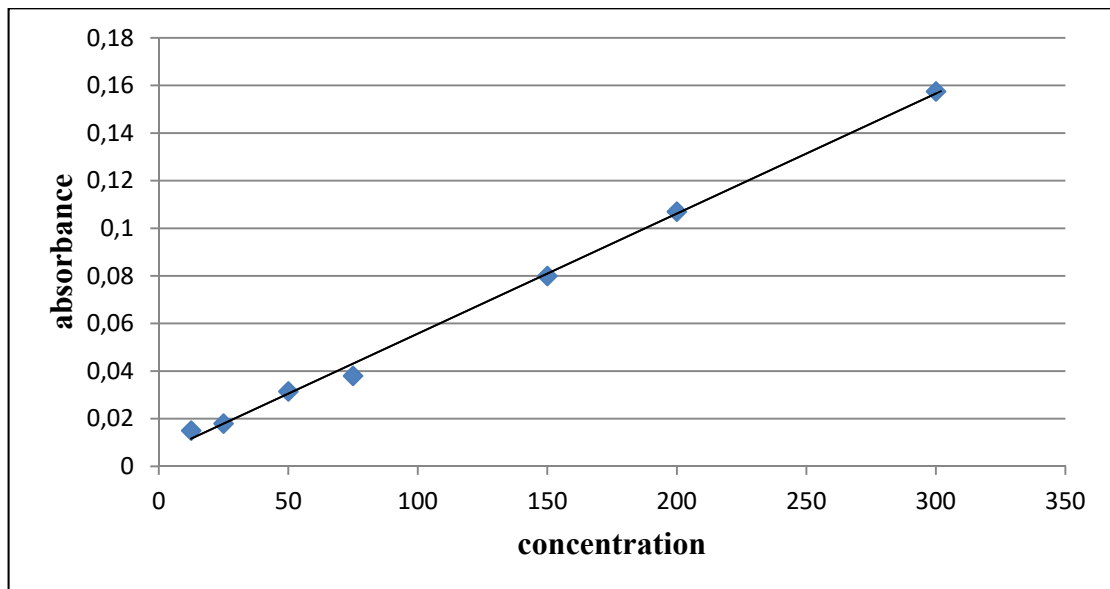


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Les résultats enregistrés ont montré une teneur en tanins condensés de l'ordre de $33,473 \mu\text{g EC/ml}$ pour le zeste de fruit non mûr, et de $25,94 \mu\text{g EC/ml}$ pour le zeste de fruit mûr. (Figure 21).

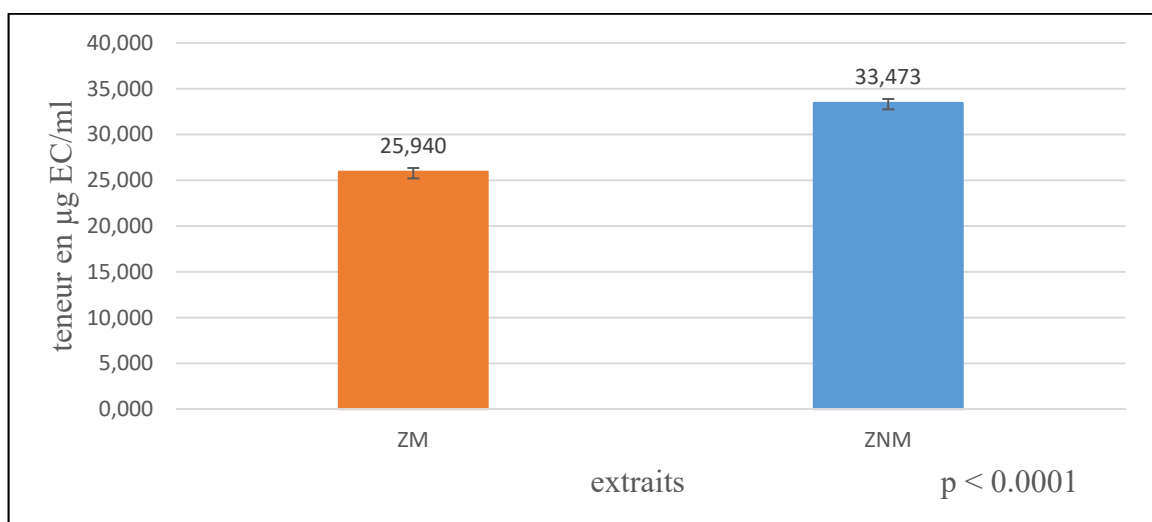


Figure 20 : Teneur en tanins condensés des deux extraits du zeste de *C. sinensis* mûr et non mûr.

L'analyse statistique a montré que la différence des teneurs en tanins des deux extraits est très hautement significative avec un $P < 0.0001$.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en tanins condensés du zeste d'orange non mûr est plus élevée que le zeste mûr avec un taux d'augmentation de 29,04 % ; ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Gupta et *al.*, (2021), qui a relevé que la teneur en tanins condensés des écorces de pamplemousse diminue significativement de 35 % au stade de maturité, ($p < 0.05$).

Les tanins ont des propriétés astringentes. Cela est dû au fait qu'ils se lient aux protéines salivaires, ce qui donne un goût que les humains perçoivent comme de l'astringence. L'astringence diminue avec la maturation, généralement accompagnée d'une baisse de la teneur en tanins ou d'une modification physico-chimique des molécules de plantes ; la maturation entraîne la polymérisation des tanins sous l'action de l'acétaldéhyde, qui est transformé en sucres ou consommé lors de la respiration, (Gupta et *al.*, 2012).

5. Activité antimicrobienne :

Nos résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 05 : résultats de l'activité antimicrobienne.

	ZM		ZNM	
	Diamètre d'inhibition (mm)	Diamètre ralentissement de croissance (mm)	Diamètre d'inhibition (mm)	Diamètre ralentissement de croissance (mm)
<i>Fusariumsp.</i>	-	-	-	-
<i>Penicilliumsp.</i>	-	-	-	-
<i>Agrobacteriumsp.</i>	23	16.66	23	23.33
<i>Erwiniasp.</i>	10.66	14	14	21

Pour ce qui est des souches fongiques, les résultats ne montrent aucune différence entre les traitements et les témoins ; cela signifie qu'aucun effet inhibiteur n'est enregistré. Nous avons relevé par contre qu'un halo translucide est apparu sur les deux souches bactériennes traitées, contrairement aux boîtes témoins qui présentent un tapis bactérien

homogène sur toute la surface de la boîte ; cela prouve un effet inhibiteur qui exprime une certaine sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des extraits testés.

En outre, nous observons un autre périmètre qui se dessine en dehors de la zone d'inhibition, que nous pourrions interpréter comme un ralentissement de la croissance bactérienne, car les colonies dans ce périmètre concerné ne sont pas homogènes comme sur les boîtes témoins.

L'analyse statistique a montré que la différence de l'effet inhibiteur entre les deux extraits sur la souche *Agrobacterium* sp. n'est pas significative ($P= 1$).

L'analyse statistique a montré que la différence de l'effet inhibiteur entre les deux extraits sur la souche *Erwinia* sp. n'est pas significative ($P= 0,067$).

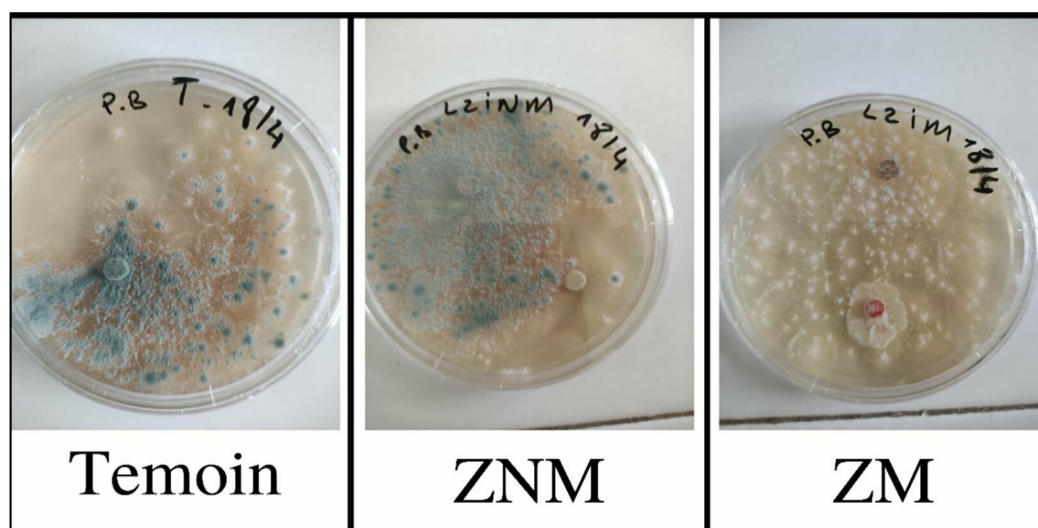


Figure 21 : Absence de sensibilité de *Penicillium* sp. vis avis des des deux extraits.

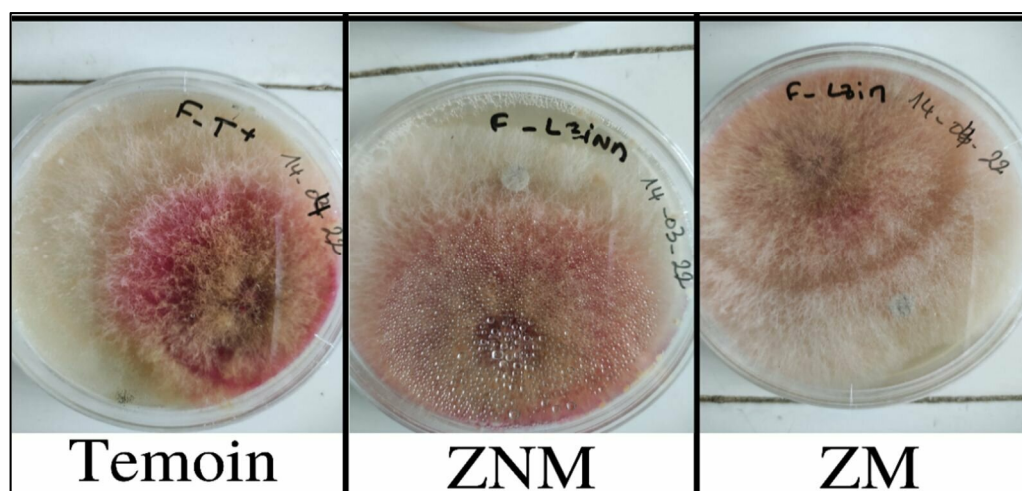


Figure 22 : Absence de sensibilité de *Fusarium* sp. vis-à-vis des deux extraits.

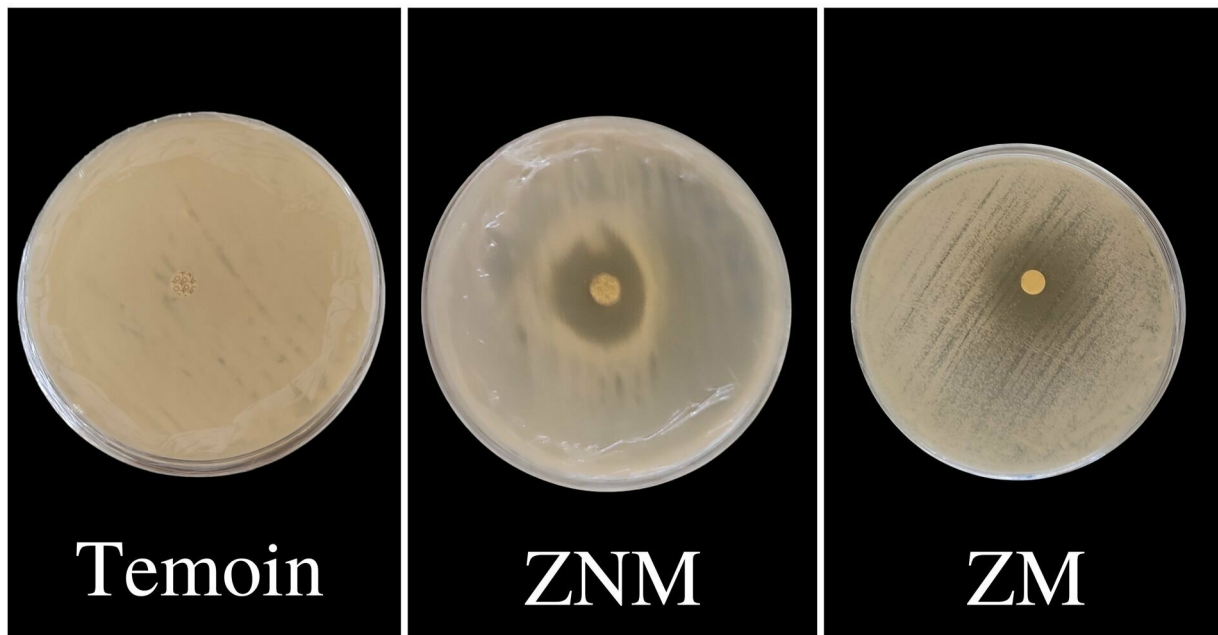


Figure 23 : sensibilité de *Agrobacterium sp.* vis-à-vis des deux extraits.

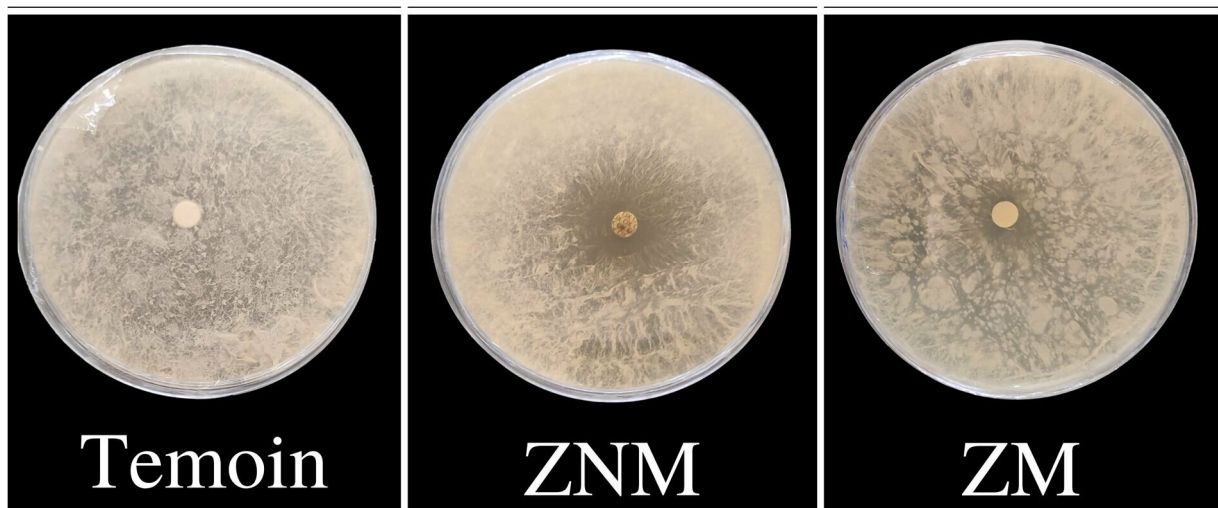


Figure 24 : sensibilité de *Erwinia sp.* vis-à-vis des deux extraits.

Pour ce qui est des souches bactériennes testées *Erwinia sp.* et *Agrobactérium sp.*, selon l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par le fascicule de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (6ème édition, 2011), l'inhibition des deux extraits est la suivante :

- Légèrement inhibitrice sur *Erwinia sp.* à une concentration de 500 mg/ml
- Modérément inhibitrice sur *Agrobactérium sp.* à une concentration de 500 mg/ml

Nous n'avons trouvé aucune étude correspondant aux souches microbiennes que nous avons testées ; cependant, de nombreuses études ont démontré que les extraits hydroéthanoïques des agrumes possèdent un effet antimicrobien sur un large éventail de souches pathogènes humaines. On cite parmi elles l'étude de Sapna et *al.*, (2016), qui a démontré que les extraits hydroéthanoliques des zestes d'agrumes à une concentration de 35 mg/ml inhibent la croissance des bactéries responsables des caries dentaires, avec un diamètre d'inhibition de 13,9 mm pour la bactérie *Lactobacillus acidophilus* et de 12,4 mm pour *Streptococcus mutans*.

Une autre étude menée par Anjali et *al.*, (2021), a démontré que l'extrait hydroalcoolique des écorces de *Citrus nobilis* possède un effet inhibiteur à une concentration de 200 mg/ml sur les souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, et *Pseudomonas aeruginosa*, atteignant un diamètre d'inhibition qui varie entre 23 et 29 mm, comparé à l'antibiotique streptomycine qui a été utilisée comme témoin positif et qui a présenté un diamètre d'inhibition qui varie entre 27 et 32 mm.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. À l'heure actuelle, cet effet est certain et a été démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des micro-organismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou à d'autres interactions générant l'inactivation des adhsines microbiennes, les protéines de transport et l'enveloppe cellulaire, (Cowan, 1999). On peut donc émettre l'hypothèse que l'activité antibactérienne des deux extraits est due aux composés phénoliques qu'ils détiennent.

6. Activité insecticide :

Les résultats du test de toxicité de l'extrait hydroéthanolique du zeste d'orange par contact direct à l'égard des adultes d'*Aphis spiraecola* sont consignés dans le tableau ci-après :

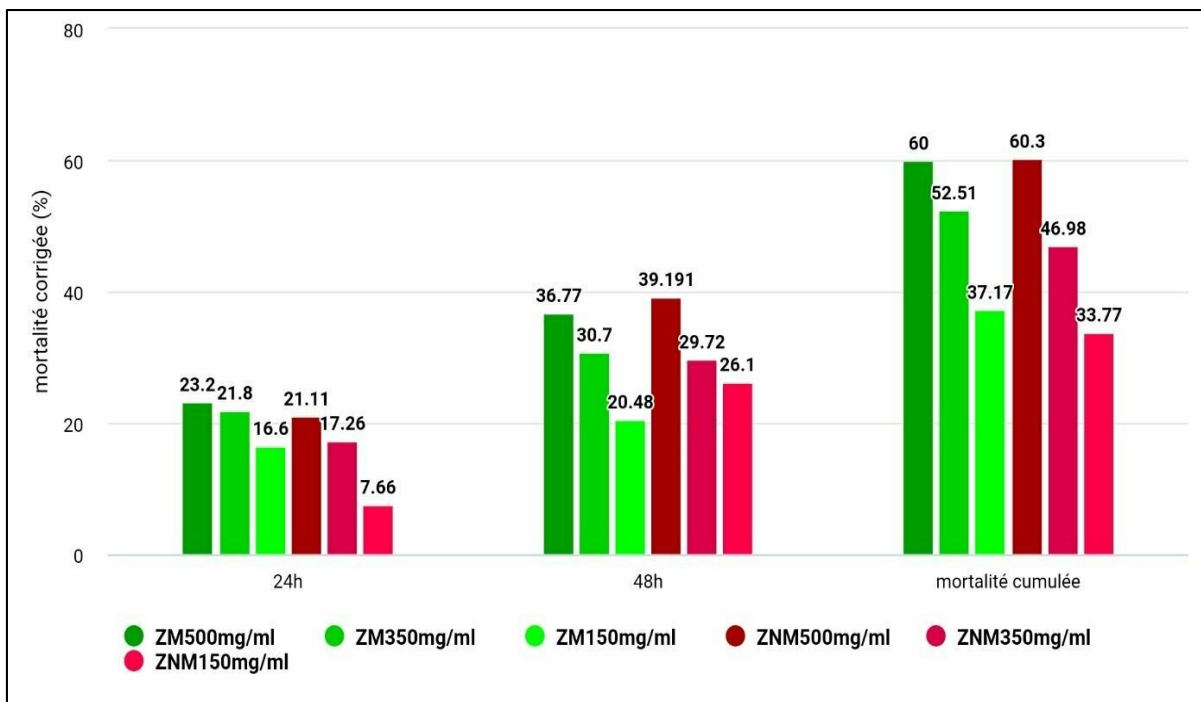


Figure 25 : Evolution de la mortalité corrigée chez les adultes d'*Aphis spiraecola* traité par les différentes concentrations des différents extraits hydroéthanolique du zeste mûr et non mûr.

Selon les résultats obtenus avec le logiciel Minitab 17, l'analyse statistique montre que les deux extraits ont un effet insecticide, mais la différence entre les deux est non significative $P=0,209$.

D'après la figure 26, on constate qu'en fonction de la durée du temps écoulé après le traitement (24 h, 48 h), une nette augmentation du taux de mortalité est observée sous l'effet des différentes concentrations du traitement. On note également que le pourcentage de la mortalité corrigée faiblit en fonction de la diminution de la concentration des deux extraits. À 48 h, le taux de mortalité corrigée cumulée a atteint 60 % pour l'extrait ZM et 60,3 % pour l'extrait ZNM, à une concentration de 500 mg/ml.

6.1. Détermination de la CL50 :

La détermination des concentrations létale CL50 des deux extraits hydroéthanoliques des zestes mûrs et non mûrs sur les pucerons verts par contact direct, est calculée à partir des équations de régression du taux de mortalité cumulé présenté sur la figure ci-dessous :

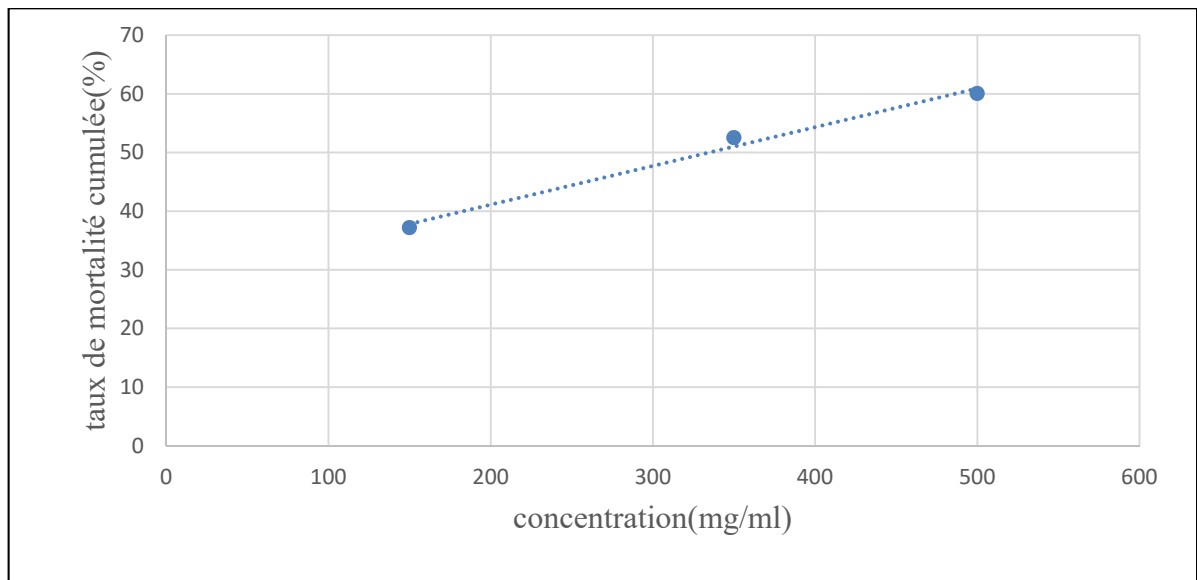


Figure 26 : Courbe de régression du taux de mortalité cumulée de l'extrait ZM.

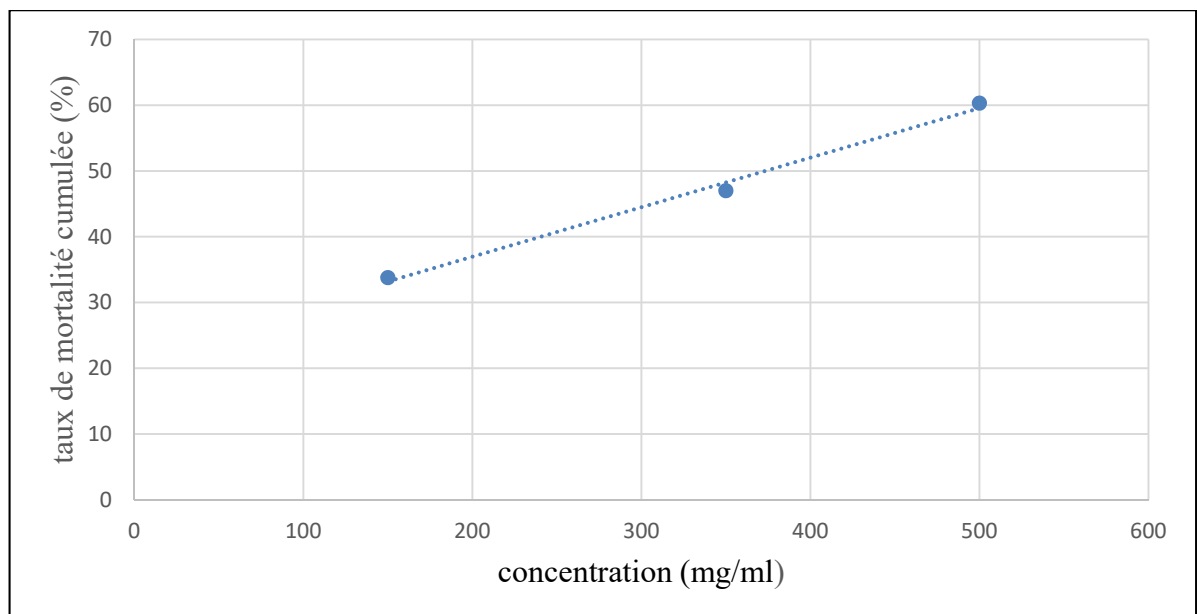


Figure 27 : Courbe de régression du taux de mortalité cumulée de l'extrait ZNM.

Les résultats obtenus montrent que la CL50 est de 334,59 mg/ml pour l'extrait ZM, et de 372,85 mg/ml pour l'extrait ZNM comme démontré sur le tableau ci-dessous :

Tableau 06 : Concentration létale CL50 des deux extraits.

Extrait	Equation	CL50 (mg/ml)
ZM	$Y = 0.066x + 27.917$ ($R^2=0.9876$)	334.59
ZNM	$Y = 0.0753x + 21.924$ ($R^2=0.9929$)	372.85

Nos résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Khan et *al.*, (2017) qui ont démontré que la plante *Boenninghausenia albiflora* qui fait partie de la famille des rutacées, a un effet insecticide très fort atteignant un taux de mortalité de 100 % pour le puceron vert au bout de 24 h.

Une autre étude menée par Sanches et *al.*, (2021) a montré que la plante *meteodorea flavida* qui fait partie de la famille des rutacées, a un pouvoir insecticide sur le puceron *Aphis craccivora* Koch ; à une dose de 150 mg/ml, les chercheurs ont enregistré un taux de mortalité qui augmente en fonction de la durée du traitement atteignant un pourcentage de 100 % à 48 h.

Le potentiel insecticide de *Metrodorea flavida* peut être attribué au fait que cette espèce appartient à la famille des Rutacées, communément appelée famille des agrumes dont l'espèce recèle principalement un taux important en phénols, en flavonoïdes et en tanins à fort pouvoir insecticide, (Loizzo et al. 2018).

La toxicité des composés phénoliques envers les insectes a été signalée par Raymond et *al.*, (2011). D'après ces derniers, les métabolites secondaires sont riches en groupements fonctionnels et provoquent le plus souvent une perturbation de la motricité naturelle de l'insecte. Selon Vanden-Borre et *al.*, (2011), les tanins présentent un effet toxique direct pour plusieurs insectes ravageurs, en agissant sur leur croissance, leur développement et leur fécondité.

Durant le dénombrement, nous avons remarqué que la mobilité des individus traités par les deux extraits était drastiquement réduite, suivie d'un taux de natalité très faible comparé au témoin. Nos remarques sont en corrélation avec les propos de Vanden Borre et *al.*, (2011) cités précédemment du fait que nous pouvons supposé que la mortalité des individus traités est due à la présence des composées phénoliques des deux extraits, en particulier les tanins.

À cause du manque de moyens, les résultats de l'activité insecticide sont a prendre avec des pincettes pour 2 raisons, la première est le fait que le dénombrement a été fait à l'œil nue, et donc l'erreur humaine est présente. La 2eme raison est que les pulvérisateurs ne sont pas précis sur la quantité pulvérisée à chaque pulvérisation. Il peut donc y avoir une différence minime de la quantité entre les pulvérisations.

Conclusion et perspectives

1. Conclusion :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes afin de faire face aux différents stress biotiques et abiotiques. Leur pouvoir protecteur agit contre les microorganismes pathogènes ainsi que les insectes ravageurs qui menacent la plante. Plus leur teneur est élevée, plus leurs pouvoirs protecteurs augmentent. Ces composés phénoliques sont retrouvés dans toutes les parties des végétaux y compris les écorces des fruits, leurs teneurs sont influencées par de nombreux facteurs dont le stade de développement du fruit, en d'autres mots, la maturation des fruits entraîne un changement de la teneur en composés phénoliques, et donc influence directement sur le pouvoir antimicrobien et insecticide de ces derniers, (Wojakowska et *al.*, 2013).

C'est dans ce contexte-là que s'inscrit notre étude qui a deux objectifs :

- Le premier est de comparer entre les teneurs des composés phénoliques de deux extraits hydroéthanolique issues de deux zestes d'orange l'un mûr et l'autre non mûr.
- Le second objectif est d'évaluer les activités antimicrobiennes et insecticides de ces extraits

Les résultats obtenus ont démontré que l'extrait du zeste d'orange Valencia late non mûr présente une meilleure teneur en composés phénoliques que le zeste mûr, avec un taux d'augmentation de 35,47 % pour les polyphénols, 33,07 % pour les flavonoïdes et de 29,04 % pour les tanins. Selon l'analyse statistique, la différence des teneurs entre les deux extraits est très hautement significative.

Les deux extraits à une concentration de 500 mg/ml ont montré une activité antibactérienne légèrement inhibitrice sur *Erwinia sp.* et modérément inhibitrice sur *Agrobacterium sp.* Cependant aucune différence significative n'est enregistrée entre l'extrait du fruit mûr et celui du fruit non mûr. D'autre part, aucun effet inhibiteur n'est constaté sur les souches fongiques testées (*Penicillium sp* et *Fusarium sp.*)

Les deux extraits ont démontré une action insecticide contre le puceron vert des citrus (*Aphis spiraecola*). Atteignant un taux de mortalité corrigé de 60 % accumulé au bout de 48 h. Cependant aucune différence significative n'est enregistrée entre les deux extraits.

Les fruits d'orange non mûrs en vue de leurs hautes teneurs en composés phénoliques peuvent être utilisés pour l'élaboration des produits cosmétiques ou pharmaceutiques ou même bio insecticides, (Brotons et *al.*, 2013 ; Obenland et *al.*, 2018).

2. Perspectives :

Comme perspective il serait intéressant de :

- Tester l'efficacité de deux extraits sur les œufs et sur les larves des pucerons.
- Tester les activités biologiques sur d'autres microorganismes pathogènes ainsi que d'autres insectes ravageurs.
- Il serait judicieux de faire des investigations sur le meilleur mode d'action du traitement sur le puceron.
- Comparé d'autres extraits hydroalcooliques et déterminés qui a la meilleure efficacité.
- définir à quel stade de développement les fruits d'oranges compte la meilleure teneur en composés phénoliques.
- La formulation de produits bio pesticides prêts à l'utilisation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

Agustí M., Mesejo C., Reig C., Martínez-Fuent A., (2014). Citrus production. In: Dixon G. R. and Al dous D. E. (eds.), Horticulture: plants for People and Place, Volume 1: Production Horticulture, Ed. S pringer (Dord recht), 159 - 195.

Anonyme., (2006). Les pucerons : Protection Biologique Intégrée (PBI) en cultures ornementales. Projet réalisé avec le soutien du FEDER dans le cadre du programme Intégré III, France.

Anonyme., (1995). Agrumiculture : création d'un verger d'agrumes. ITAF. 68 p.

Anonyme A., (2002). (Département américain de l'Agriculture Research Service, 2002). (D.A.A.R.S).

Abate, G., Vezzoli, M., Polito, L., Guaita, A., Albani, D., Marizzoni, M., Garrafa, E., Marengoni, A., Forloni, G., Frisoni, G.B. (2021). A Conformation Variant of p53 Combined with Machine Learning Identifies Alzheimer Disease in Preclinical and Prodromal Stages.

Abderrazak M., Joel R (2007). La botanique de A a Z ed. Dunod. Paris .p 177.

Anttonen J., and Karjalainen, R., (2005). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. J. Food Compos. 18:759-769.

Abanda N., Raphaël X., (2012). Régulation des bio-agresseurs dans les cultures associées de blé dur et de pois : impact de la diversité végétale sur la démographie des pucerons du pois. Thèse de doctorat en Écologie et biologie de l'évolution.

Abbott W., (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of the American mosquito control association.3 (2) 302.

Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., Tacchini, M., (1989). Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. Apidologie 20, 115–125.

Ajila M., Aalami M., Krishnarau L., Rao U., (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(1):219-224.

Anjali M.; Agnieska N.; Aarti B.; Nurzynska R, R; Prince C., (2021). Characterization of Citrus nobilis Peel Methanolic Extract for Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activity. *Molecules* 2021, 26, 4310.

B

Blonde L., (1959). La culture des agrumes en Algérie. Station expérimentale d'arboriculture de Boufarik. Bull, n°176,25p.

Barboni T., (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie ; Mém. de doctorat. Spécialité : Chimie théorique, physique et analytique, Université de Corsica – Pasquale Paoli, p 287.

Baché B., Baché M., (2011). Agrumes (comment les choisir et les cultiver facilement), édition Eugen Ulmer, Paris ; 6-11, 68-70.

Bocco A., Cuvelier M.E., Richard H., Berset C., (1998). Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem*, 46(6): 2123-23.

Bruneton J (1999). pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales 3eme édition. Paris.

Belitz., Grosch W., Schieberle P., (2009). Food chemistry fourth edition. Springer p 822.

Bakker J., Timberlake C., (1985). The distribution and content of anthocyanins in young port wines as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of Science of Food Agriculture* 36(12), 1325-1333.

Borges C.V., Minatel I.O., Gomez-Gomez H.A., Lima G.P.P., (2017). Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*. pp. 259–277.

Bowers, M. D., Collinge, S.K., Gamble, S.E., and Schmitt, J., (1992). Effect of genotype, habit, and seasonal variation on iridoid glycoside content of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and the implications for insect herbivores. *Oecologia* 91:201-207.

Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M.L., Leibman, M., (2006).

Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their re-levance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochem. Rev.* 5 (1), 27–38.

Bellebcir L., (2008). Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales.

Brotons, J.M., Manera, J., Conesa, A., Porras, I., (2013). A fuzzy approach to the loss of green colour in lemon (*Citrus lemon* L. Burm. f.) rind during ripening. *Comput. Electron. Agric.* 98, 222–232.

C

Cassin, (1983). Diversification agricole et travaux de la station de recherches agronomiques de son Guiliana en corse. Colloque agrumicole du. Italie. Citrus Edited by Giovanni Dugo University of Messina, Italy Angelo Di Giacomo Stazione Sperimentale per l'Industria delleEssenze edei Derivati Degli Agrumi, Italy.

Chebaibi A., Marouf Z. Rhazi-Filali F., Fahim M., (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc DOI 10.1007/s10298-015-0996-1 355-362.

Chabasse D., Bouchra J., De gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P., (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25, Biofarma, Paris, 160.

Crozier A., (2006). Plant secondary metabolites, occurrence, structure and role in the human diet by blackwell p 3.

Collin S., Crouzet J., (2011). Polyphénols et procédés, édition Lavoisier TEC&DOC, p 5, 13, 16,235.

Curk F., (2013). Les clémentiniers et autres petits agrumes / Camille Jacquemond, Franck Curk, Marion Heuzet, coord. ersailles : Éditions Quæ 1 vol. 363 p.

Chang, J., Reiner, J., & Xie, J. (2005). *Chem. Rev.* 105, 4581–4609. doi:10.1021/cr050531b

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

D

Davies, F.S., Albrigo, L.G., (1994). Citrus. Walling ford: CAB International, 254p.

Dacosta Y., (2003). Les phytonutriments bioactifs ed Yves dacosta Paris p 317.

Degaspari C., Wasznsnky N., (2004). Propriété anti-oxydants des composés phénoliques. visao acadimy 5(1) :33-40.

D'archivio M., Filesi C., Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R(2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann.Ist.Super Sanita, 43(4), 384-361.

Donaldson JR., Stevens MT., Bamhill HR., Lindroth RL., (2006). Age related shifts in leaf chemistry of clonal aspen (*Populus tremuloides*). J. Chem. Ecol. 32, 1415–1429.

De-Clenne M., Deley J., (1980). Feulgen DNA content and acid liability of nuclei from in vivo and in vitro normal, wound, and crown gall tissue of *Nicotiana Tabacum* L., *Caryologia*, 33:2, 141-176.

Donga X., Hua Y., Lia Y., Zhoua Z., (2019). The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. *Scientia Horticulturae* 243 (2019) 281–289.

E

El-Otmani M., (2005). Les agrumes et le maraîchage et le froid hivernal. Ed. Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (Maroc), 4 p.

Ernest S., (1987). arbres, arbustes et arbrisseaux en algérie - Publi Univ –Alger : Office des publications universitaires, 1987. 143 pages.

Erdman J., Balentine D., Arab L., Beecher G., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J., (2007). Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop May 31-June 1, Washington, DC 1–4. *Journal of Nutrition*, 137: 718-737.

Eaks I., Sinclair W (1980). Cellulose-Hemicellulose fractions, in the alcohols insoluble. Solids of Valencia orange peel. The Dept. of Biochemistry, Univ. of California, Riverside, CA 92521. 0022-1147.

Eddleman H., (1998). Making Bacteria Media from Potato Indiana Biolab, disknet.com.

Evans R. C.A., Miller N., Paganga G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 20:933–956.

Elger AD., Lemoine DG., Fenner M., Hanley ME., (2009). Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos* 118, 767–773.

Escribano-Bailon T., Santos-Buelga C., (2003). Polyphenol Extraction from Foods. In: Santos-Buelga, C., Ed., *Methods in Polyphenol Analysis*, Royal Society of Chemistry, London, 1-12.

Eun Ae Y., Gon-Sup K., Ji Eun L., Semin P., Song Y., Soo J L., Jae H K., Jong S J., Abd El-Atyf A., Jae-Han S., Sung C. S.,(2014). Flavonoid profiles of immature and mature fruit tissues of *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) and overall contribution to antioxidant effect.(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/bmc.3318.

F

Fadlinizal M., Nagendra K.,Weng K.,Ismail A (2010).Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species 1684–5315

Fraval A., (2006). Les pucerons. *Insectes*, 141: 3-8.

G

Gauthier F., et Perreault J., (2008). « Jeunes et religion dans la société de consommation : État des lieux et prospective », dans F. Gauthier et J.-P. Perreault, *Jeunes et religion au Québec*, Québec, Presses de l'Université Laval, pp. 9-28.

Grissa K.L., (2010). Etude de base sur les cultures d'agrumes et de tomates en tunisie. Consultation nationale. Pp 92.

Grigoras C., Destandaua E., Fougèrea L., Elfakir C., (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds a Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans – CNRS UMR 7311, rue de Chartres, BP 67059, 45067 Orléans Cedex 2, France b “Vasile Alecsandri” University of Bacau, Faculty of Engineering, 157 Calea Marasesti, 600115 Bacau, Romania 794-804.

Gee J., Johnson I., (2001). Polyphonic compounds: interactions with gut and implications for human health .current medicinal chemistry. 8: 1-182.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni M., (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2eme édition tec&doc .Paris. p 275.

Ghafar, M.F.A., Prasad, K.N., Weng, K.K. and Ismail, A. (2010). Flavonoid, Hesperidine, Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities from Citrus Species. African Journal of Biotechnology, 9, 326-330.

Gupta S., Acharya R., Gamit R., Shukla V., (2021). Quantitative analysis of tannins, alkaloids, phenols, and flavonoids in Ficus semicordata leaf, stem, stem bark, root, and fruit powder.Journal of Indian System of Medicine 9 (3), 171, 2021.

Gupta A., Naraniwal M., Kothari V., (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts.International journal of applied and natural sciences 1 (1), 8-26, 2012.

H

Hamia C,Guergab A.,Rennane N. Eih.,Birache M.,Haddad M., Saidi M.,Yousfi M (2014). Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du Rhanterium Adpressium/Laboratoire des Sciences Fondamentales, Université Amar Telidji Laghouat, Vol. 6, N° 1.

Harjunpaa V., Teleman A., Koivula A., Ruohonen L., Teeri T., Drakenberg T., (1996). Cello-oligosaccharide hydrolysis by cellobiohydrolase 2 from trichoderma reesei:association and rate of constants derived from an analysis of progress curves.Eur J biochem.(240) 549-591.

Hikmawanti L., Supandi., Dwita L., Yeni (2021). Chemical Component of Kencur (*Kaemferia galanga* L.) Ethanolic Extract Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Published under licence by IOP Publishing Ltd: Earth and Environmental Science 819 (2021) 012057.

Hartmann T., (2007). From waste products to eco chemicals: 50 years research of plant secondary metabolism .phytochemistry, 62, 2831 – 2846.

Harborne J., Williams A., (2000). Advances in flavonoid reaserch since 1992 phytochemistry 55:481-504.

Hurabielle M., Paris M., (1981). Abrege de matiere medicale. pharmacognosie.tome 1.Masson. Paris p 102-107.

Hikmawanti E., Fatmawati S., Asri A., (2021). IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 755012060.

Howard, L.R., Clark, J.R., and Brownmiller, C., (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. J. Sci. Food Agric. 83:1238-1247.p.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry, 13(10), 572-584.

I

Imbert., (2007). Agrumes. Les dossiers de fruitrop. n° 150.Ed science, 34p.

Imran M.,Ahmed N.,Anjum M.,Kamran M.,Mushtaq Z.,Nadeem M.,Hussain S., (2015). Potential proprieties of flax lignin sescoiso lariciresinol diglucoside.nutrition journal, 14 1-7.

Ismail H., Chanb K., Mariodb A., Ismail M., (2010).Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (cucumis melo) methanolic extracts. Food Chemistry 119(2):643-647.

Irving L. Eaksand Walton B. Sinclair., (1980). cellulose-hemicellulose fpa6t;ons, in the al&ohol-insoluble solids of valencia orange peel. Journal of Food Science, 45(4), 985–988.

J

Jacquemond C., Curk F., & Heuzet M., (2013). Les clémentiniers et autres petits agrumes. Editions Quae.

Jean-Marie Polese., (2008). La culture des agrumes Editions Artemis 95p.

Jerez M., Selga A., Sineiro J., Torres J.,José M (2007). A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Santiago de Compostela, Lope Gómez de Marzoa, 15782 Santiago de Compostela, Spain 439-444.

Jimenez N., Guevera G., Miranda R., Feregrino A., Toress I., Vasquez A., (2013). Functional proprieties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: biochemistry, biotechnology, and genomics .food research international, 54, 1195-1207.

K

Kerdchoechuen O., Laohakunjit N., Singkornard S., (2010). Essential Oils from Six Herbal Plants for Biocontrol of the Maize Weevil. Department of Plant and Soil Sciences, Mississippi State University, 117 Dorman Hall, P.O. Box 9555, Mississippi State, MS 39762, 592–598.

Khemies F., 2013. Inventaire des variétés locales d'arboriculture fruitière et leurs biotopes respectifs dans la wilaya de Tlemcen. Thèse pour l'obtention du diplôme de Magister en Agronomie. Université Tlemcen.

King A.,Young G(1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, journal of the American dietetic association 99,213-218.

Kuete V (2013). Medicinal plant research in Africa: pharmacology and chemistry. 1ere edition. Elsevier insights, p 393,394.

Khanbabae K.,Ree R(2001). Tannins: classification and definition. Journal of royal society of chemistry.18 641-649.

Khan S, Taning C, Bonneure E, Mangelinckx S, Smagghe G, Shah M., (2017). Insecticidal activity of plant-derived extracts against different economically important pest insects.Phytoparasitica 45 (1), 113-124, 2017.

L

Loussert R., 1985 - Les agrumes, Arboriculture. Ed. Bailliére, Paris, 136p.

Loussert R., 1989- Les agrumes, production. Ed. Sci. Univ., Vol.2, Liban, 280p

Lieutaghi Pierre., (2004) le livre des arbres, arbustes et arbrisseaux. Édité par actes Sud 1322 p. (ISBN 9782742747788)

Lebbal S., 2017. Etude bioécologique des pucerons inféodés aux agrumes dans la région de Skikda.Doctorat en sciences. Université Batna1 : Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques.

Lado J, Gambetta G, Zacarias L. 2018. Key determinants of citrus fruit quality: metabolites and main changes 4 during maturation. *Scientia horticulturae* .233: 238-248 .<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.055>

Larif M., Zarrouk A ., Soulaymani A., Elmidaoui A., (2012). New innovation in order to recover the polyphenols of olive mill wastewater extracts for use as a biopesticide against the *Euphyllura olivina* and *Aphis citricola* Springer Science+Business Media Dordrecht DOI 10.1007/s11164-012-0947-5.

Lutge U., Kluge M., Bauer G (2002). botanique 3eme edition: technique et documentation. Lavoisier .Paris.p 211.

Liu Y., Wang P., Chen F., Yuan Y., Zhu Y., Yan H., Hu X., (2015). Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination .*food chemistry*, 186, 46-53.

Leray C (2010). Les lipides dans le monde vivant .edition Lavoisier TEC&DOC,p5.

Loizzo R, Falco T, Bonesi M., Sicari V., Tundis R., Bruno M. (2018). *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) leaf extract: chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities. *Natural product research* 32 (5), 521-528, 2018.

M

M. El-Otmani and A. Ait-Oubahou., (2011) Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Edited by Elhadi M.Yahia ,515 p.

MADR (2019) République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information.

M.A.D.R.P., (2013). L'agriculture dans l'économie nationale, Ed. Ministère de l'agriculture, 48 p.

Mackee, H, S., (1985) : Les plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie. Supplément a la Flore de la Nouvelle-Calédonie et dépendances (volumes hors-série). Museum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Phanérogamie, Paris, France.

Mutin G., (1977) —La Mitidja Décolonisation et espaces géographiques. Ed. OPU. Alger, 607p.

Matson P.A, (1997). Agriculture intensification and ecosystem properties. *Sciences*, (277), 5325, 504-509.

Mazza G., Brouillard G., (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *phytochemistry* 29(4), 1097-1102.

Merle., Chapot L., Huet H., (1964). L'orange ksiri:une mutation de l'orange Valencia late, (12),51-59.

Mohammedi Z., (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UABB de Tlemcen.

Megan C., (2016). *Erwinia amylovora* ,agent pathogene du feu bacterien ,fredon ,p 1-2.

Multari S., Martensa S., (2020). Monitoring the changes in phenolic compounds and carotenoids occurring during fruit development in the tissues of four citrus fruits. *Food Research International*. Volume 134, August 2020, 109228.

N

Nahal I, (1998). Principe de l'agriculture durable. Paris : Editions ESTEM. 121p

Neilson EH, Goodger JQD, Woodrow IE, (2006). Novel aspects of cyanogenesis in *Eucalyptus camphora* subsp. *humeana*. *Funct. Plant Biol.* 33, 487–496.

P

Praloran J. C., (1971) : Les agrumes, techniques agricoles et productions tropicale. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 561 p.

Patil S.,Vanamala J.,Hallman G., (2004). Irradiation and storage influence on bioactive components and quality of early and late season "Rio red" grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Post harvest bio technol* 34:53-64

Polese J(2008). La culture des agrumes,éditions Artémis 2008,94 p.

Pitt J.,Hocking D., (1997). Fungi and food spoilage .2nd edition, Blackie Academic and professional, London.

Purseglove J. W., (1974). Tropical Crops: Dicotyledons ED New York, Wiley 719 p.

R

Ranjeva R., et al., (1977). "Metabolisme des composés phénoliques chez le *Petunia V.* Utilisation de la phénylalanine par des chloroplastes isolés." *Plant Science Letters*, 10(3): 225-234.

Rafiq S., Kaul R., Sofi S A., Bashir N., Nazir F, et Ahmad Nayik G., 2018- Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 17, 351-358.

Rebour H., 1950. Les agrumes en Afrique du Nord. Ed. Union des Syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, 502 pp

Ramful D., Bahorun, T., Bourdon E., Tarnus E, et Aruoma O.I., 2010- Bioactive phenolic and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits : Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*. 278.

Rahman S et al., (2016). Plant Extract as Selective Pesticide for Integrated Pest Management. *Biotechnologie Researches*, 2(1), 6-10.

Rice-Evans C., Parker L (2003). *Flavonoids in health and disease* second edition.

Radusiene J, Karpaviciene B, Stanius Z, (2012). Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in *St. John's wort*. *Bot. Lithuanica* 18,101–108

Raymond V., Barbehenn C., Constable P., (2011). Tannins in plant-herbivore interaction. *Phytochemistry* 72: 1551- 1565.

Raja P. B., A. A. Rahim, A. K. Qureshi, et K. Awang, « Green synthesis of silver nanoparticles using tannins », *Mater. Sci.-Pol.*, vol. 32, no 3, p. 408–413, 2014.

S

Sidana J., Saini V., Dahiya S., Nain P, et Bala S., (2013). A review on citrus, the boon of nature. *Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 18: 20–27.

Singh S. & Rajam M. V., (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15, 3 - 22.

Snousi H., (2013). Diversité génétique intra et interspécifique des portegreffes d'Agrumes utilisés en Tunisie. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Tunisie : Institut nationale agronomique de Tunisie.

Sinha N K,Sidhu J S,Barta J,Wu J S B and Cano M P.(2012). Handbook of fruit and fruit processing.Second edition.TP370.H .664-8-dc.Taylor & francis group, LLC

Schofield P.,Mbugua D., Pell A(2001).Analysis of condensed tannins, Vol. (91), page : 21

Singleton V L., Rossi J (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents Published **By** American Journal of Enology and Viticulture 144-158

Shahidi F., Nazk M (2004). phenolics in food and nutraceuticals .new York USA :CRC press

Sanchita, Sharma, A., (2018). Gene Expression Analysis in Medicinal Plants under Abiotic Stress Conditions. Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress. pp. 407–414.

Stepien L.,Gromadzka K.,Chelkowski J.,Basinka-Barczak A.,Lalak-Kanczugowska J (2019),Diversity and mycotoxin production by fusarium temperatum and fusarium subglutinans as casual agents of pre-harvest fusarium maize ear rot in Poland .J.Appl.Genet.60,113-122.

Salvatore M, Alves A, Andolfi A., (2020).Secondary Metabolites of Lasiodiplodia theobromae: Distribution, Chemical Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence.Toxins 12 (7), 457, 2020.

Sanches A., Oliveira S., Garlet J., Sasaya M., (2021). Extracts of native forest species of the southern amazon in the control of Aphis craccivora Koch (Hemiptera: Aphididae). Bioscience Journal. 2021, 37, e37018.

Sapna S, Prabu M, Varghese S, Bibin T, Pathinettam K., Deepak B, Shaista H, Sreeja S, Darshan D(2016). Antimicrobial effects of Citrus sinensis peel extracts against dental caries bacteria: An in vitro study.Journal of clinical and experimental dentistry 8 (1), e71, 2016.

T

Tapas R., Sakarkar M., Kakde B(2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review .tropical journal of pharmaceutical reaserch ,7(3),1089-1099.

Tourte Y (2001).Les ogm,la tranngense chez Les plantes. Dunod,144 p.

Taiz L, Zeiger E, (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. Plant Physiol, Fourth ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

V

Verma, N., Shukla, S., (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants 2 (4), 105–113.

Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R (2013). Pathogenicity and infection strategies of the fireblight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art. Microbiology (2013), 159, 823–832.

Vanden-borre G, Smagghe G, Van Damme V., (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochemistry 72 (13), 1538-1550.

W

Wojakowska A, Muth D, Narozna D, Madrzak C, Stobiecki M, Kachlicki P, (2013). Changes of phenolic secondary metabolite profile in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. Metabolomics 9, 575–589.

X

Xingqian Ye, Jianle Chen, Jianguo Xu., Jianchu Chen., (2017) Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods éditer par CRC Press, 2017 520 p.

Y

Yapo-Crezoit Chiayé Claire Antoinette., (2021). Évaluation de l'activité antifongique des extraits de zeste de Citrus limon sur une souche d'*Aspergillus fumigatus* responsable d'allergie respiratoire, Abidjan (côte d'ivoire).

Yanqun L, Dexin K, Ying F., Sussmand M., Hong W., (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. Plant Physiology and Biochemistry 148 (2020) 80–89.

Z

Zhi-lin Y, Chuan-chao D, Lian-qing C, (2007). Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 1266–1271.

Zhao C., Wang F., Lian Y., Xiao H., Zheng J., (2020). Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:4, 566-583, DOI: 10.1080/10408398.2018.1544885.

Site internet:

<https://microbiologie-clinique.com/filtres-seringue-choisir-acheter.html> consulter le 22/06/2022.