

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

N⁰ Ref :.....



Centre universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences de la Nature et de la Vie Département Biotechnologie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie végétal

Thème :

Activité biologiques de Bigaradier

Présenté par :

***Boutouatou Mohammed El Hadi**

***Boumlih Asma**

Devant le jury composé de

Président	Pr. YAHIA A.	Prof	Centre Universitaire de Mila.
Examinatrice	Dr. BELDI H.	MAA	Centre Universitaire de Mila.
Encadreur	Dr. Himour S.	MCB	Centre Universitaire de Mila.

Année Universitaire : 2023/2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail. Au terme de ce travail, nous avons le plaisir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail.

En premier lieu, nous voudrions remercier notre promotrice Mme Himour Sara. D'avoir acceptée d'encadrer notre travail, ainsi pour tous ses : orientations scientifiques, sa patience, ses précieux conseils et notamment son bon cœur.

Nous remercions également le président et les membres du jury d'avoir accepté d'enrichir par leur jugement notre travail.

Nous remercions également tous nos enseignants, nos collègues et les administrateurs du département des Sciences de la Nature et de la Vie.

Nous ajoutons des remerciements groupés à tous les techniciens des laboratoires de centre universitaire de Mila.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

*A mon cher père **Azzedine** et ma mère, tous les deux êtres les plus chers dans le monde pour leur soutien, encouragements, tendresse et les sacrifices depuis nous naissance et leur patience pendant nous années d'études, qui n'ont d'égal que le témoignage de profonde reconnaissance, que Dieu leurs accorde une longue vie.*

*A mon oncle **Abdelmadjid***

A Mes sœurs, A Ma femme,

A mes amis

Et A toute ma famille

A tout ce qui a contribues à la réalisation de ce travail.

Et pour tout qui me connais de près ou de loin.

Mohammed El Hadi

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail en reconnaissance, respect, gratitude et vénération :

À Dieu Tout-Puissant qui m'a accordé le courage, la force, la santé et le soutien pour réaliser ce travail.

À ceux qui sont les plus chers à mes yeux,

*À ma petite famille, à mon cher père « **El Hachemi Abdelmalek** » et à ma précieuse mère « **Samira** » pour qui j'ai tout l'amour et la gratitude, qui m'ont toujours aidée dans ma vie, n'ont jamais cessé de prier pour moi et m'ont soutenue tout au long de mes études. Que Dieu leur accorde santé et bien-être.*

*À mes frères pour leur tendresse et leur présence constante à mes côtés : « Oussama », « **TakjEddine** », « **Aymen** » et « **Iheb** », ainsi qu'à l'épouse de mon frère « **Nessrine** » et à mon cher neveu « **Ayane Rissal** ».*

Sans oublier mes grands-parents, que Dieu ait leur âme, pour leur soutien et leurs encouragements.

*À toute la grande famille **Boumelih** : mes tantes maternelles, mes tantes paternelles, mes oncles maternels, mes oncles paternels, leurs enfants, les épouses de mes oncles maternels et les épouses de mes oncles paternels... et à tous ceux pour qui j'ai de l'amour et du respect au sein de la grande famille.*

Je la dédie également à tous les enseignants, professeurs et docteurs qui m'ont toujours guidée tout au long de mon parcours éducatif, du niveau primaire au niveau universitaire, et aujourd'hui je suis diplômée.

À mes amis qui m'ont soutenue, et à mes amies qui ont cru en moi et m'ont toujours encouragée, avec qui j'ai passé des années inoubliables :

Ryane, Aya, Marwa, Nourhan, salsabil, Anaghem, fatima, Sabrina, Fatima Zahra, Karima(koki), Fayrouz, Chaima, Lamis, Ikram, Nariman, Yasmin, Racha, Amira, Rahma, Racha, Omnia...

À tous ceux qui ont contribué à ce travail, directement ou indirectement.

Asma

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et l'évaluation des activités (antioxydantes, antibactériennes) des feuilles, rameaux et épluchure de l'orange amère.

Le rendement le plus important est signalé avec les épluchures de la variété de Sidi Merpuane avec une teneur de (39.12%).

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des polyphénols, tanine, triterpène et stéroïde, glycoside, quinone libre, anthraquinones et flavonoïdes.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par la méthode de la neutralisation de radical DPPH. L'ensemble des extraits présentent différentes activités. Les fractions éthanolique des trois organes de la variété VM étaient les plus efficaces pour le temps d'incubation 45 min IC_{50} (0.02g/ml ,0.11g/ml,0.20g/ml) respectivement

Alors que les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de l'orange amère montrent que ce fruit peut inhiber la croissance de quatre germes microbiens à savoir : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*, la meilleure activité est enregistrée par l'extrait des rameaux contre *P .aeruginosa* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 12.95 ± 1.75 mm, pour la variété de Mila.

Mots clés : Bigarade, *Citrus aurantium*, Screening phytochimique, Polyphénols, ,
Activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

The objective of our work is the phytochemical study and the evaluation of the activities (antioxidant, antibacterial) of the leaves, branches and peel of the bitter orange.

The highest yield is with peels of the Sidi Merouane variety with a content of (39.12%). Phytochemical screening revealed the presence of polyphenols, tannins, triterpenes and steroids, glycoside, free quinone, anthraquinones and flavonoids.

The antioxidant activity of the various extracts was evaluated using the DPPH radical neutralization method. All the excerpts present different activities. Ethanol fractions of the three organs of the VM variety were most effective for the 45 min incubation attempt IC_{50} (0.02g/ml, 0.11 g/ml, 0.20g/mL) repeatedly.

While the results of the antimicrobial activity of the different extracts of the bitter orange show that this fruit can inhibit the growth of four microbial germs namely : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus subtilis*, the best activity is recorded by the extract of the branches against *P.aeruginosa* with a diameter of the inhibition area of 12.95 ± 1.75 mm, for the Mila variety.

Keywords : Bigarade, *Citrus aurantium*, Phytochemical Screening, Polyphenols, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity.

ملخص

يهدف عملنا دراسة الـبيوكيميائية وتقييم الأنشطة (المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا) لأوراق وفروع وقشور البرتقال المر .

بحيث تم الحصول على أعلى نسبة مردود في القشور من صنف سيدي مروان بمحتوى قدره 39.12%.

أظهر المسح الكيميائي النباتي وجود البوليفينولات، التانينات، التريتربينات والستيريدات، الـجليكوسيدات، الكينونات الحرة، الأنثراكينونات والفلافونويدات . تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المختلفة باستخدام طريقة تحييد جذر DPPH جميع المستخلصات أظهرت أنشطة مختلفة. كانت الأجزاء الإيثانولية من الأعضاء الثلاثة لصنف VM هي الأكثر فعالية لوقت حضانة 45 دقيقة (0.02 جرام/مل، 0.11 جرام/مل، 0.20 جرام/مل) على التوالي. في حين أن نتائج النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات المختلفة للبرتقال المر تظهر أن هذا الفاكهة يمكن أن تمنع نمو أربعة ميكروبات وهي : الإشريكية القولونية، الزائفة الزنجارية، الكلبسيلا الرئوية والعصوية الرقيقة. تم تسجيل أفضل نشاط بواسطة مستخلص الفروع ضد الزائفة الزنجارية بقطر منطقة تثبيط 12.95 ± 1.75 ملم، لصنف ميلة.

الكلمات المفتاحية : البرتقال المر ، *Citrus aurantium* ، المسح الفيتوكيميائي، البوليفينولات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا

Sommaire

Sommaire

Remerciement	
Dedicace	
Dedicace	
Resume	
Sommaire	
Liste Des Abreviations	
Liste Des Figures	
Liste Des Tableaux	
Introduction.....	2
Premiere Partie: Synthese bibliographique	
Chapitre I Generalite sur le bigaradier	
Historique des agrumes.....	6
1.Generalite sur le bigaradier.....	6
2.Description botanique.....	7
3.Classification botanique.....	9
4.L'origine et l'habitat de l'orange amere.....	9
5.Utilisation therapeutique.....	10
Chapitre II Composition biochimique du bigaradier	
1. Generalites.....	12
2. Definition des metabolites secondaires.....	12
2.1 Polyphénols.....	12
2.2 Terpènes et stéroïdes.....	19
2.3 Alcaloïdes.....	20
2.4 Saponosides.....	20
2.5 Composés réducteurs (les glycosides).....	20

Chapitre III Activite biologique d'orange amere

1. Activite antioxydant du bigaradier.....	22
1.1 Radicaux libres.....	22
1.2 Sources des radicaux libre.....	22
1.3 Stress oxydatif.....	23
1.4 Antioxydants.....	23
1.5 Antioxydants de la bigarade.....	23
2. Activite antibactérienne.....	24
2.1. Bacteries.....	24
2.2. Structure des bactériennes.....	24
2.3. Normes de classification.....	25
3. Activite antivirale.....	27
4. Activite anti-inflammatoire.....	27
5. Activite antiallergique.....	27
6. Activite anti-cancer.....	27

Deuxieme Partie

Chapitre I Materiel et methodes

1. Presentation de la zone de prelevement.....	31
2. Materiel.....	32
2.1 Materiel végétal	32
2.2 Souches microbiennes	32
3. Methodes	32
3.1 Etude phytochimique	32
3.1.1 Préparation des echantillons (les rameaux et feuilles et l'épluchure du bigaradier)	32
3.2 Extraction des polyphénols.....	33
3.3 Screening phytochimique.....	35
3.4 Activité antibactérienne.....	37

3.4.1 Préparation des milieux.....	37
3.4.2 Préparation des disques d'aromatogramme.....	38
3.4.3 Stérilisation du matériel.....	38
3.4.4 Dilution d'extraits.....	38
3.4.5 Préparation des suspensions bactériennes	38
3.4.6 Ensemencement bactérienne.....	39
3.4.7 Dépôts des disques et l'injection des extraits.....	39
3.4.8 Préparation des témoins (positif et négatif).....	40
3.4.9 Incubation et lecture.....	41
3.5 Activite antioxydant des extraits des feuilles, rameaux et epluchure de bigaradier	41
3.5.1 Neutralisation du radical dpph.....	41
3.5.2 Préparation de la solution dpph.....	42
3.5.3 Solution d'extrait.....	42
3.5.4 Expression des résultats.....	43

ChapitreII Resultats et discussion

1. Resultat et discussion de rendement d'extraction.....	45
2. Resultats et discussions des analyses qualitatives des composees phytochimiques (screening phytochimique).....	46
3. Activite antibacterienne.....	53
3.1. Activité antibactérienne des feuilles.....	53
4. Activite antioxydante.....	63
4.1 Neutralisationdu radical dpph.....	63
Conclusion.....	69

Reference bibliographie

Annexe



Liste des abréviations

Liste des abréviations

AA : Absence d'activité

ADN :acide désoxyribonucléique

Am : Amoxicilline

Cm: Centimètre.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

E. coli: Escherichia coli.

FeCl₃ : Chlorure ferrique

g: Gramme.

Gn : Gentamicine

h : Heure.

HCl : Acide chlorhydrique

IC₅₀ :Concentration inhibitrice médiane

L : Litre

EtOH : éthanol

mg : Milli gramme.

MH: Mueller Hinton.

min : Minute

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

nm : Nanomètre.

OH :Hydroxyde

T- : Témoin négatif

T+ ;Témoin positif

T° : Température.

T0 : Dilution 100%.

T¹/₄ : Dilution de 25%

T¹/₂ : Dilution de 50%

UV: Ultra-Violet.

VM : Variété de Mila

VS : Variété de Sidi Merouane

% : Pourcentage.

.L: Linné

°C : Celsius.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Bigaradier (orange amer).....	7
Figure 2 : Caractéristiques morphologique du fruit de l'orange amer.....	8
Figure 3 : Répartition géographique de l'oranger amer et l'oranger doux.....	9
Figure 4 : Structure du noyau phénol.....	13
Figure 5 : structure de base des flavonoïdes.....	15
Figure 6: Structure des différentes classes de flavonoïdes.....	16
Figure 7 : Structure générale des anthocyanes.....	17
Figure 8 : Structure des tanins hydrolysables.....	17
Figure 9 : Structure des tanins condensés.....	18
Figure 10 : Structure de 1,4-benzoquinone (A) et 9,10-antraquinone (B).....	18
Figure 11 : Structure de l'isoprène.....	19
Figure 12 : Exemples des dérivés d'alcaloïdes.....	20
Figure 13 : Structure et morphologie bactériennes.....	25
Figure 14 : Situation géographique de la zone de prélèvement.....	31
Figure 15 : Séchage des échantillons.....	33
Figure 16 : Echantillons de broyage.....	33
Figure 17 : Protocole d'extraction des polyphénols.....	34
Figure 18 : Préparation de milieu MH.....	37
Figure 19 : Préparation de de l'eau physiologique.....	38
Figure 20 : Etapes de réactivation des bactéries.....	39
Figure 21 : Etapes d'ensemencement (écouvillonnage).....	39
Figure 22 : Dépôts des disques et l'injection des extraits.....	40
Figure 23 : Dépôts des disques et l'injection des extraits.....	40
Figure 24 : Lecture par le pied coulisse.....	41
Figure 25 : Réaction de test DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl).....	42
Figure 26 : Résultats de test des substances phénoliques des feuilles rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	47
Figure 27 : Résultats de test des saponines des feuilles, rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	48
Figure 28 : Résultats de test des tanins des feuilles, rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	48
Figure 29 : Résultats de test des anthocyanes des feuilles, rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	49
Figure 30 : Résultats de test des Triterpènes et stéroïdes des feuilles, rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	49
Figure 31 : Résultats de test des Alcaloïdes des feuilles, rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	50
Figure 32 : Résultats de test des glycosides des feuilles, rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	50

Figure 33 : Résultats de test des quinones libres des feuilles, rameaux et épluchures de <i>Citrus aurantium</i> L.....	51
Figure 34 : Résultats de test des Anthraquinones libres des feuilles rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	52
Figure 35 : Résultats de test des flavonoïdes des feuilles rameaux et épluchure de <i>Citrus aurantium</i> L.....	52
Figure 36 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figure 37 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
Figure 38 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Escherichia coli</i>	55
Figure 39 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Bacillus subtilis</i>	56
Figure 40 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Figure 41 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
Figure 42 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Bacillus subtilis</i>	58
Figure 43 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Escherichia coli</i>	58
Figure 44 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Figure 45 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Klebsiella. Pneumoniae</i>	60
Figure 46 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Bacillus subtilis</i>	60
Figure 47 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec <i>Escherichia coli</i>	61
Figure 48 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des différents extraits en fonction de concentration des deux variétés VS et VM.	63
Figure 49 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits en fonction de concentration des deux variétés (VS et VM).....	64



Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1. Position Systematique Du Bigaradier.	9
Tableau 2: Principaux Acides Hydroxycinnamiques.....	14
Tableau 3 : Principaux Acides Hydroxybenzoïques.....	14
Tableau 4 : Different Concentrations Utilisées.....	42
Tableaux 5 : Resultats De Rendement Des Extraits Des Feuilles, Fruits Et Rameaux Des Deux Varietes De <i>Citrus Aurantium</i> L.	45
Tableau 6 : Diametres Des Zones D'inhibition Des Extraits Ethanolique Des Feuilles Des Deux Varietes D'orange Amere.....	54
Tableau 7 : Diametres Des Zones D'inhibition Des Extraits Ethanolique Des Rameaux Des Deux Varietes D'orange Amere, (Vs Et Vm).....	56
Tableau 8 : Diametres Des Zones D'inhibition Des Extraits Ethanolique Des Epluchures Des Varietes D'orange Amere, (Vs Et Vm).....	59
Tableau 9 : Pourcentages D'inhibition Ic50% Des Extraits Apres 30 Et 45 Min D'incubation (Feuilles, Rameaux Et Epluchures).....	65

Introduction

INTRODUCTION

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gens apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (**Iserin, 2001**).

Chez l'homme, des études ont montré l'importance bénéfique de la consommation de polyphénols sur la santé grâce à leurs propriétés antioxydant et anti inflammatoire antibactérienne. Ils jouent, entre autres, un rôle protecteur contre des maladies cardiovasculaires (**Corder et al., 2006 ; Quiñones et al., 2013**).

Pour éviter les conséquences du stress oxydatif, il est nécessaire de maintenir l'équilibre entre oxydants et antioxydants, afin de préserver les performances physiologiques optimales de l'organisme ; une consommation suffisante d'antioxydants est obligatoire. (**Rapisarda et al., 2008; Khan et al., 2010**).

La Bigarade *Citrus aurantium* L. est l'une des espèces des agrumes qui sont considérés comme les fruits les plus importants dans le monde ; ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus. La consommation des agrumes est associée à la réduction de l'apparition de plusieurs maladies. Les effets bénéfiques de ces fruits sont souvent attribués à la présence des composés bioactifs (la vitamine C, les composés phénoliques...) (**Abeyasinghe et al., 2007**).

Pour cela un grand nombre de recherches ont démontré que les polyphénols des agrumes disposent de plusieurs applications thérapeutiques, les études épidémiologiques prouvent que la consommation de l'orange et des produits à base d'orange peuvent protéger la santé contre différentes maladies à cause de sa richesse en diverses molécules antioxydants dont l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les polyphénols (**Kim et al, 2002**).

Cette étude est une tentative d'explorer les différentes parties de l'orange amère (feuilles, rameaux et épiluchures) comme une source naturelle d'antioxydants et antibiotique, ainsi, les objectifs de cette étude sont de déterminer ses teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes, d'évaluer les activités antioxydantes de ses extraits éthanoliques par le testes DPPH, et d'estimer également leur activité antibactérienne vis-à-vis certains

INTRODUCTION

germes pathogènes tels que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Bacillus subtilis*.

Cette étude est divisée en deux parties principales. La première partie comprend une synthèse bibliographique dans laquelle nous abordons un premier chapitre consacré à l'étude de la biologie de *Citrus aurantium* L., un deuxième chapitre traitant la biochimie de la plante, et un troisième chapitre portant sur l'étude des différentes activités biologiques de cette plante. La deuxième partie, expérimentale, est divisée en deux chapitres. Le premier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés (extraction des extraits (feuilles, fruits et épluchure), évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante de la plante), tandis que le deuxième chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion. Enfin, nous concluons par une conclusion.

Première partie
Synthèse
bibliographique

CHAPITRE I

Généralité sur le bigaradier

- **Historique des Agrumes**

Le terme d'agrumes provient du latin *acrumen* qui signifiait, dans l'antiquité, arbres à fruits acides. Les agrumes englobent plusieurs variétés (**Ladaniya, 2008**). Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique (Chine, Nord-Est de l'Inde, la Malaisie, la Thaïlande) où ils étaient cultivés depuis au moins 3000 ans (**Calabrese, 2002**). Ce sont des arbres fruitiers d'importance majeure et qui ont voyagé au gré des invasions et des grandes conquêtes du monde (**Jean, 2008**).

Plus tard, les agrumes ont été développés au Maghreb et en Espagne par les Arabes, qui ont introduit le bigaradier dans l'empire des Almohades. L'oranger a été importé, quelques siècles après, par les Maures d'Andalousie. En Algérie, le bigaradier était déjà présent dans les jardins des Beys pendant la période ottomane (du 16 au 18 siècle), les jardins des Beys (Casbah, Hauteurs d'Alger et Constantine) (**Hadj Sahraoui, 2007**). Au début de la colonisation en 1850, le Mandarinier fut introduit en Algérie par M. Hardy. Au dix-neuvième siècle, le père Clément de l'orphelinat agricole de Misserghin (W. d'Oran), effectuant un croisement de mandarinier avec l'oranger, découvrit la Clémentine qui s'est avérée une variété précoce parmi le groupe des mandarines. (**Hadj Sahraoui, 2007**). Les oranges représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes au monde (**Li et al., 2009**).

1. Généralité sur le bigaradier

Le bigaradier est un arbre de 3 à 10 mètres, très ramifié avec une couronne arrondie ; feuilles simples, elliptiques, à pétiole ailé, brillant, alterné, garnies de glandes aromatiques et persistantes, avec une épine à l'aisselle des feuilles inférieures, pétiole de 2 à 3 cm de long ; fleurs axillaires, très parfumées, blanchâtres ou rose, plus grandes que celles de l'oranger doux et très odorant, elles fleurissent au début du printemps, fruit de forme ronde, de 5 à 8 cm de diamètre, avec 8 à 12 segments, peau rugueuse, vert ou jaune, très parfumé, pulpe acide et amère. (**Manner et al., 2006**).

L'orange aigre (*Citrus aurantium* L.) se distingue en tant qu'espèce unique, trouvant des applications dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques.

Les oranges amères ne servent pas de fruits comestibles ; elles sont plutôt exploitées dans la production de jus et de marmelades (confitures d'orange).

Les orangers aigres entrent en floraison généralement au milieu du printemps, et après un certain temps, leurs fleurs tombent. (Zadi *et al.*, 2012). (Figure 1)



Figure 2 : Bigaradier (orange amer) (Ghédira et Goetz, 2015).

2. Description botanique

2.1. Famille des Rutaceae

La famille des Rutaceae regroupe environ 900 espèces réparties en 150 genres, présentes dans les régions tropicales et tempérées de l'hémisphère sud. Ces plantes se présentent sous forme d'arbres, d'arbustes, parfois de vignes ligneuses ou d'herbes, souvent pourvus d'épines sur leurs troncs. Elles produisent la plupart des huiles essentielles, dégageant ainsi des odeurs agréables et souvent reconnaissables. (Baladehi *et al.*, 2013)

2.2. Bigaradier

Le bigaradier est un arbre qui peut atteindre une hauteur de 5 à 10 mètres, sempervirent (toujours vert). Il a été introduit en Inde au début de l'ère chrétienne et a été introduit dans le sud de la France par les croisades. Les Maures le cultivèrent intensivement près de Séville en Espagne, ce qui valut au fruit son surnom d'orange de Séville (Teuscher *et al.*, 2005). Son tronc se ramifie et ses feuilles brillantes sont d'un vert vif. Les fleurs blanches, pourprées et odorantes ajoutent à son attrait. Le fruit, de taille plus petite que l'orange, est ovoïde et de couleur jaune foncé. (Hadrich *et al.*, 2009).

a. Fruit

L'orange est une grosse baie cortiqueuse, multiloculaire et à peu près sphérique. L'écorce de fruit, ou péricarpe, comprend dans sa partie la plus externe un épicarpe, communément

appelé « zeste ». Ce dernier, de couleur verte avant la maturité puis jaunâtre jusqu'à orangé-rouge selon les variétés, présente une surface chagrinée.

La partie plus interne du péricarpe inclut un mésocarpe, constitué d'une couche externe fine formant avec l'épicarpe le « flavébo », et d'une couche interne cellulosique de couleur blanche, nommée « albédo ». Ainsi, le mésocarpe enveloppe les loges du fruit, remplies de poils succulents représentant les cellules de l'endocarpe ou épiderme interne.

Cela correspond à la partie comestible du fruit ; chaque carpelle représente un « quartier », en nombre variable selon les agrumes, séparés les uns des autres par une cloison pectocellulosique, renfermant éventuellement des graines ou « pépins » et gorgés d'un suc acidulé et sucré, de saveur variable selon les Citrus. (Teuscher *et al.*, 2005).(Figure 3).

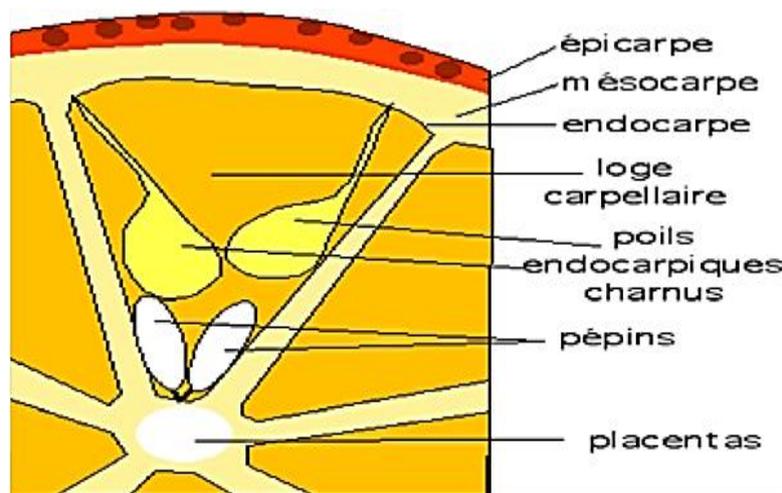


Figure 4 : Caractéristiques morphologiques du fruit de l'orange amer. (Duan *et al.*,2014).

b. Feuilles :

Les Feuilles vert-brillant ont une odeur faible et une saveur amère. Elles sont ovales, avec une extrémité subaiguë, un pétiole articulé et plus ou moins ailé. Leur longueur est d'environ 8 cm pour une largeur de 4 cm. (Esabelle., 2011).

c. Rameaux :

Les rameaux, parfois épineux, connaissent plusieurs vagues de croissance, la plus important étant celle du printemps(Virbei-Alonso., 2011).

3. Classification botanique

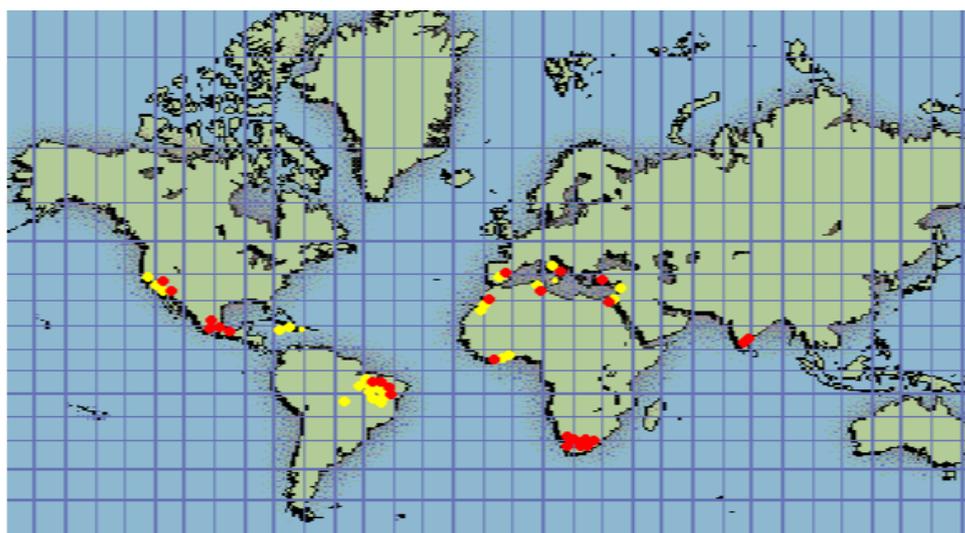
D'après la position systématique du bigaradier est comme suite :

Tableau 1. Position systématique du bigaradier.(Ghedira ., 2015).

Règne	Plantae
Super division	Embryophyta
Division	Magnyolophita
Subdivision	Spermatophytina
Classe	Magnyolopsida
Super ordre	Rosanae
Ordre	Sapindales
Famille	Rutaceae
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus aurantium L.</i>

4. Origine et l'habitat de l'orange amère

L'orange amère s'est propagée de la Chine à l'Inde, à l'Arabie, puis finalement à l'Égypte. Son introduction en Europe n'a eu lieu qu'au XI^e siècle, lorsque les Arabes l'ont apportée en Sicile. Depuis, elle est cultivée en Amérique centrale et du Sud, ainsi que dans le bassin méditerranéen. (Figure 5)



● Principaux pays producteurs d'oranger amer
● Principaux pays producteurs d'oranger doux

Figure 6 : Répartition géographique de l'oranger amer et l'oranger doux. (Audry., 2008)

5. Utilisation thérapeutique :

Cet agrume est très prisé en phytothérapie, pour ses multiples utilisations, telles que sédatif, anxiolytique, hypotenseur, anticancéreux, hypolipémiant, anti-inflammatoire, somnifère léger, spasmolytique, anti-infectieux léger, tonique digestif et hémostatique. Ceci est rendu possible grâce à sa composition riche en flavonoïdes, synéphrine (un alcaloïde stimulant le système nerveux central), pectines, huiles essentielles, limonènes, coumarines, vitamine C et carotènes. **(Kim et al., 2003; Fugh et Myers, 2004; Morley et al., 2007; Espina et al., 2011).**

CHAPITRE II

Composition biochimique du bigaradier

1. Généralités

Les plantes jouent un rôle essentiel dans la survie de l'humanité et des divers écosystèmes. Elles renferment des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme (**Hartmann, 2007**).

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas encore parfaitement élucidé (**Merghem, 2009**).

Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent chez toutes les espèces montrent qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général : ce sont des métabolites secondaires, qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétal lui-même, rôle de défense ou de résistance (**Merghem, 2009**).

2. Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007**). Ce sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les prédateurs et les pathogènes comme les agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou la propagation des fruits. (**Judd et al., 2002**).

2.1 Polyphénols

Les composés phénoliques ou polyphénols forment une grande famille des composés chimiques très divers depuis les simples acides des phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes que sont par exemples, les tanins et la lignine. La structure de base est le phénol un cycle aromatique hydroxylé (**Hopkins, 2003**).

En effet les composés phénoliques constituent le groupe le plus nombreux et le plus distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi et al., 2003**).

Les principales classes des composants phénoliques sont : les acides phénoliques, (acide hydroxycinnamique, acide hydroxybenzoïque), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**Tapiero et al., 2002**).

Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes, mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus (Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011). (Figure 7).

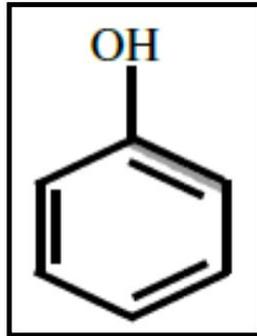


Figure 8 : Structure du noyau phénol(Achat, 2014).

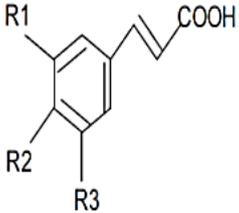
2.1.1. Acides phénoliques

a. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dans la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides féruliques ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Tableau 2). (Macheix et al., 2005).

Ces acides sont retrouvés dans tous les fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr. Les laitues, les carottes, les myrtilles, les patates douces (entières, cuites, et crues), les pommes de terre, les pêches, le jus d'orange, les pommes, les tomates et le raisin sont les sources les plus riches en acides hydroxycinnamiques (De la Rosa et al., 2009).

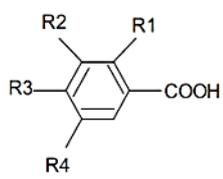
Tableau 2: Principaux Acides Hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

b. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques (p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, un particulier de la lignine et de certains tannins (Tableau 3). (Macheix et al., 2005).

Tableau 3 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

c. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont perçus comme des pigments presque universels des plantes. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or (**Figure 5**). Ils sont stockés sous une forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique (**Lillo et al., 2008**).

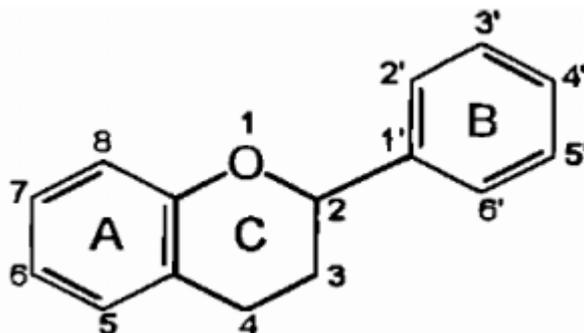


Figure 9 : structure de base des flavonoïdes (**Krishna et al., 2001**).

Selon leurs structures moléculaires, les flavonoïdes sont répartis en différentes classes : flavanones, flavones, flavonols, flavanes, isoflavones et anthocyanines (**Figure 6**) (**Benbrook, 2005**).

Les flavonoïdes sont tous issus d'une biosynthèse commune et ont donc le même élément structural de base. On peut les classer en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B qui est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2,3.

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane.
- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, la flavane est appelé Flavanone.
- L'insaturée de la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone donne son nom de Flavone.
- En cas de substitution du squelette en position 3 par un groupement hydroxyle, on le nomme Flavonol.
- Dans la troisième position, on appelle le flavonoïde Isoflavane. (**Bouakaz, 2006**).

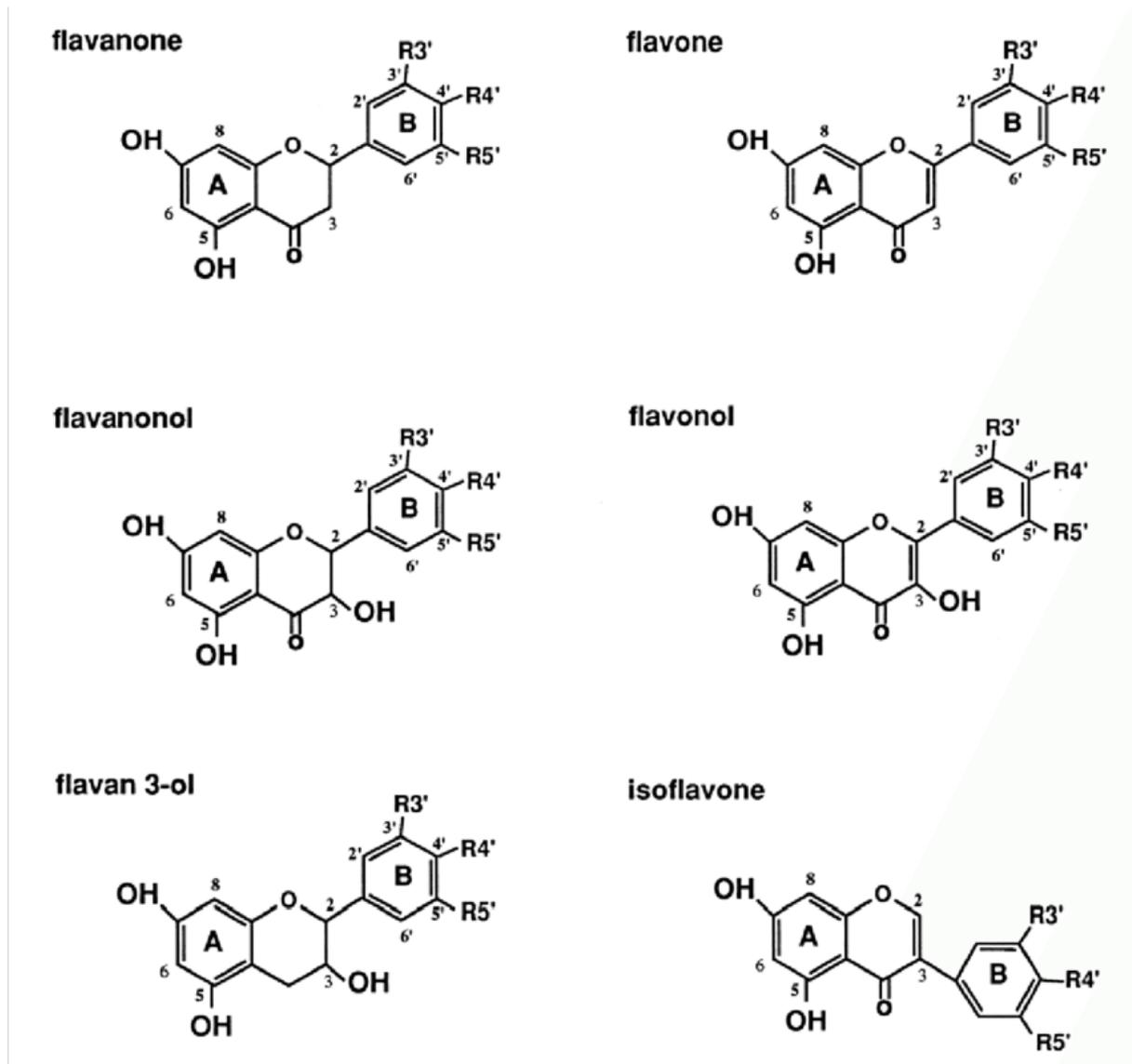


Figure 10: Structure des différentes classes de flavonoïdes (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999).

2.1.2. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs et fruits. Leurs génines (anthocyanidols), des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium (cation flavylum). Une propriété importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques en témoignent (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). (Figure 11)

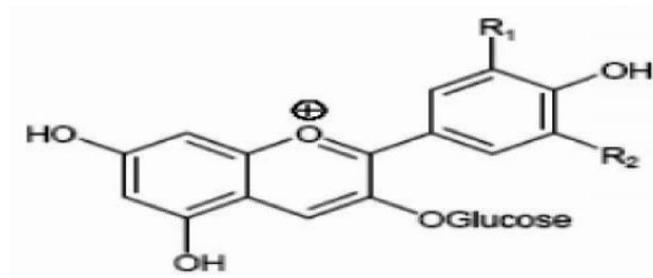


Figure 12 : Structure générale des anthocyanes (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

2.1.3. Tanins

Le mot Tanin est un terme provenant d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (Hopkins, 2003). Les tanins naturels sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 300 et, qui outre les réactions habituelles des phénols, provoquent la précipitation des protéines (ou autres polymères) (Merghem, 2009).

Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique : tanins hydrolysables et condensés (Charnay et Tourmeau, 2007).

➤ Tanins hydrolysables

Ils se distinguent par la capacité à être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être un acide gallique, c'est le cas des gallotannins (Figure 8) ou un dimère de ce même acide, l'acide ellagique, c'est le cas de tannins ellagique et une partie non phénolique souvent du glucose ou de l'acide quinique (Macheix *et al.*, 2006).

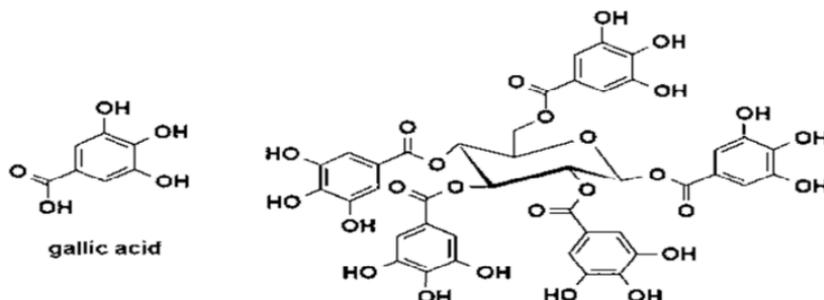


Figure 13 : Structure des tanins hydrolysables (Macheix *et al.*, 2005).

➤ **Tanins condensées (tanins vrais ou tannoïdes)**

Résultent de la condensation de molécules élémentaires de types flavane 3 ol (catéchines) ou flavane 3-4 diols (leucoanthocyanidines). Les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables. Les tanins condensés sont également appelés proanthocyanidines ; en effet leur oxydation en milieu alcool –acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que cyanidine et delphinidine (Merghem, 2009) (Figure 9).

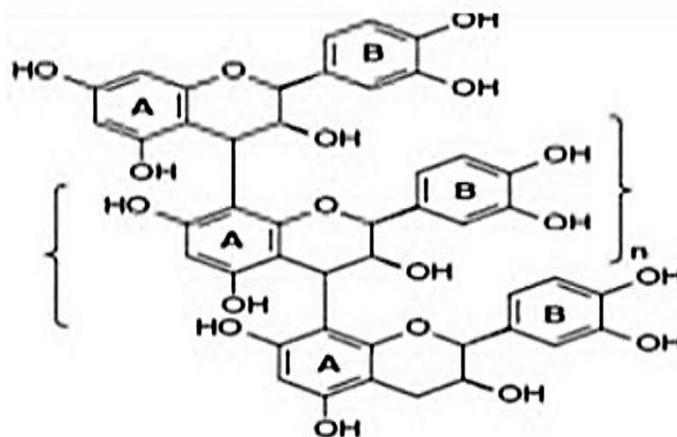


Figure 14 : Structure des tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005).

2.1.4. Quinones

Les quinones sont des composés intéressants qui ont des caractéristiques uniques et plusieurs rôles importants. Ils sont largement distribués dans la nature, y compris dans les tissus végétaux. Ils ont un rôle important dans la chaîne de transport d'électrons pour maintenir les fonctions biologiques des plantes. En plus ces fonctions biologiques, les quinones ont été employées dans de nombreuses pratiques cliniques. Par exemple, la doxorubicine (DXR) est une anthraquinone (AQ) antibiotique qui a été employée dans le traitement des tumeurs malignes (Figure 10)(Naoya et Naotaka, 2014).

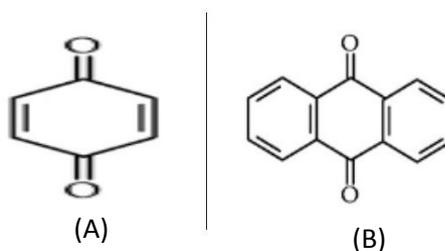


Figure 15 : Structure de 1,4-benzoquinone (A) et 9,10-antraquinone (B) (Socaciu, 2007).

2.2 Terpènes et stéroïdes

Les terpènes est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène de formule C₅H₈ (**Figure 11**). Ces composés, en majorités sont d'origine végétale.

Les isoprénoïdes ou Les terpénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpénoïdes. L'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes (**Gravot, 2008**).

En fonction du nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue :

- Les monoterpènes (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), triterpènes (C₃₀), tetraterpènes (C₄₀), polyterpènes (C₄₀₀₀) (**Merghem, 2009**).
 - **Triterpène** est un composé naturel très répandu, composé de 30 atomes de carbone. Les triterpènes sont principalement des alcools, sous forme libres ou glycosides (les saponines) ou esters. Les stérols (cholestérol, squalène...) sont des dérivés de triterpènes.
 - **Stéroïdes** : sont des triterpènes tétracycliques, qui ont moins de 30 atomes de carbone, Ils sont fabriqués à partir d'un triterpène acyclique (**Hopkins, 2003**).

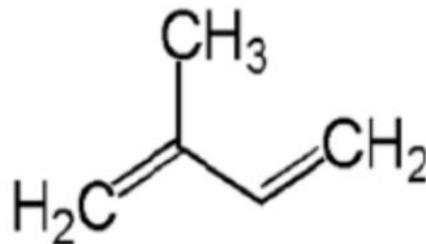


Figure 16 : Structure de l'isoprène (**Hininger, 2011**).

2.3 Alcaloïdes

Ce sont des composés organiques azotés d'origine végétale, alcalins et structure complexes (noyau hétérocyclique). On les retrouve dans diverses familles de plantes. La plupart des alcaloïdes sont soluble dans l'eau et d'alcool, avec un goût amer, certains étant très toxiques. (Wichtl et Anton, 2009) (Figure 12).



Figure 17 : Exemples des dérivés d'alcaloïdes (Badiaga, 2011).

2.4 Saponosides

Saponine est un mot dérivé du latin « sapo », qui signifie savon car ses composés moussent une fois agités avec de l'eau. Les saponines sont des métabolites secondaires avec un vaste groupe de glycosides à poids moléculaire allant de 600 à 2000 Da.

Elles sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur squelette aglycone : Le premier groupe est constitué de saponines stéroïdiennes et le deuxième groupe est constitué de saponines triterpénoïdes. Les saponines brutes se présentent en poudre blanche, avec une saveur amère (Bogtter et Melzig, 2011).

Il semble que les saponosides jouent un rôle de défense du végétal contre les pathogènes microbiens. Leur activité hormonale est plus faible et leur activité hémolytique favorise l'absorption des aliments, mais ils peuvent parfois être toxiques pour les animaux à sang froid (Iserin, 2001).

2.5 Composés réducteurs (Les glycosides)

Selon Charles (2006), le terme glycoside désigne le nom général d'un aglycone (partie non sucre) lié de manière covalente à un hydrate de carbone par un lien Oglycosidique, C-glycosidique ou N-glycosidique selon le type d'atome impliqué dans la liaison. Il est généralement accepté que les glycosides présentent une plus grande hydro solubilité que leurs aglycones respectifs (Kren et al., 2001). C'est pourquoi, dans la plante, les glycosides jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'accumulation, d'entreposage et de transport des substances hydrophobiques. En effet, l'attachement d'une partie de saccharide à une molécule spécifique accroît considérablement sa capacité à être hydrophile. (De Roode et al., 2003).

Chapitre III

Activité Biologique d'orange amère

1. Activité antioxydant du bigaradier

1.1 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes, ou un groupe d'atomes, avec un nombre impair d'électrons sur l'orbite extérieure, et ils peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules (**Pelli et Lyly, 2003**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être des radicaux libres : anions superoxydes (O_2^-), radical hydroxyle (OH), ou des molécules non radicalaires mais hautement instables (O_2 singulet, H_2O_2) ; la plupart des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire (**Berger, 2006**). Les radicaux libres sont plus souvent instables ; de ce fait ils sont réactifs et leurs durées de vie est faible (**Houee-Levin et al., 2005**).

Afin de se stabiliser, les espèces chimiques radicalaires vont interagir très rapidement avec les molécules environnantes afin de se séparer de leur électron célibataire (radicaux réducteurs) ou d'acquérir un électron supplémentaire (radicaux oxydants). Il se crée ainsi des réactions en chaîne d'échange d'électrons célibataire aboutissant à une production en cascade de nouvelles espèces radicalaires (**Constantin, 2008**).

1.2 Sources des radicaux libre

Les radicaux libres sont en permanence et en faible quantité dans l'organisme (**Favier, 2003**) et selon leurs origines, on distingue deux catégories :

- **Endogène** : les radicaux libres se produisent spontanément et d'une manière continue au sein de l'organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques, soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, soit au cours d'une réaction redox avec un composé non radicalaire, lors de la respiration cellulaire (**Kœchlin-Ramonatxo, 2006**).
- **Exogène** : les radicaux libres peuvent être d'origine environnementale suite à une exposition prolongée au soleil, pollution atmosphérique, ozone, radiation (**Lee et al., 2004**).

1.3 Stress oxydatif

Le stress oxydatif implique toute condition dans laquelle les métabolismes oxydants peuvent exercer leurs effets toxiques à cause d'une production élevée ou d'altération des mécanismes cellulaires de protection (**Pelli et Lyly, 2003 ; Valko et al., 2007**).

1.4 Antioxydants

Sont définie comme toute substance, qui en faible concentration par rapport au substrat, susceptible d'être oxydée, ainsi elle prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (**Pastre et Prymenko, 2007**). Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (**Tanguy et Begué-Simon, 2009**). Les antioxydants sont des composés qui peuvent atténuer, inhiber ou prévenir l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (**Kim et Lee., 2004**).

Le système endogène est formé par les enzymes à savoir le superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase, alors que le système exogène est représenté par la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les composés phénoliques (**Gilca et al., 2007 ; Valko et al., 2007**).

1.5 Antioxydants de la bigarade

Les agrumes dont la bigarade sont importants en raison de leurs propriétés nutritionnelles et antioxydantes. Ils contiennent une multitude de composés phytochimiques actifs qui contribuent à la santé. Plus de 170 composés phytochimiques ont été identifiées chez les oranges (**Betoret et al., 2008**).

Il est bien connu que les agrumes sont riches en vitamine C et en caroténoïdes, tout comme d'autres molécules bioactives (les acides phénoliques, les flavonoïdes, etc.) (**Cheik Traore, 2006 ; Klimczak et al., 2007 ; Rapisadra et al., 2008**).

Les oranges amères sont riches en flavanones glycosylés dont l'héspéridine, et la naringine (**Ortuno et al., 2006 ; Betoret et al., 2008 ; Xu et al., 2008**) et en flavones polyméthoxylés particulièrement la sinensétine et la nobilétine (**Del Caro et al., 2004**).

L'écorce de l'orange amère contient plus de 15% de composés phénoliques que les fruits épluchés (**Balasundram et al., 2005**). Cette partie non comestible du fruit est une bonne

source de flavonones (néoériocitrine, naringine et néohespéridine), de flavone glycosilés (diosmétine) (Wang et al., 2008) et de caroténoïdes dont la lutéine, la zéaxanthine et la cryptoxanthine (Goodner et al., 2001).

2. Activité antibactérienne

2.1. Bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire, elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les Bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Nauciel et Vildé., 2005).

2.2. Structure des bactériennes

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau, beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autre organite dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. À l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi. Aussi bien les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif ont une membrane cytoplasmique formée d'une bicouche lipidique associée à des protéines. Dans les deux cas, le composant principal de structure de la paroi est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel de chaînes polysaccharidiques (composées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique) et d'acides aminés. (Figure 13). (Hart et Shears, 2006).

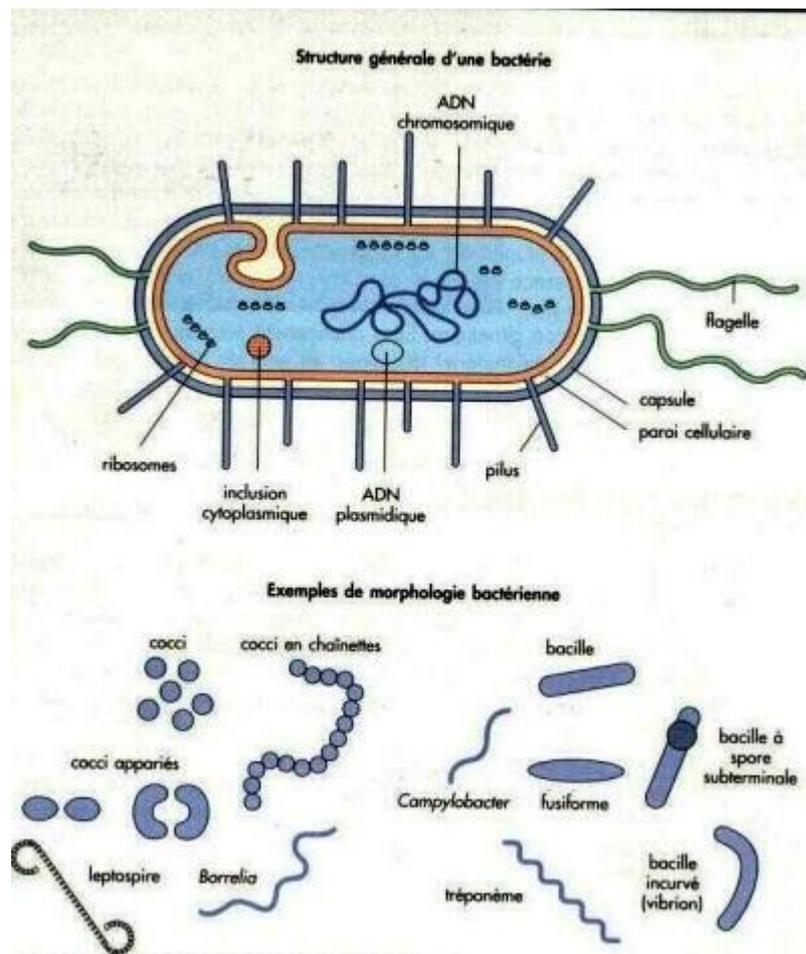


Figure 18 : Structure et morphologie bactériennes (Hart et Shears, 2006).

2.3. Normes de classification

2.3.1 Noms scientifiques

Les bactéries tout comme les autres êtres vivants, sont classées par genre (en se basant sur la présence d'une ou plusieurs caractéristiques identiques) et, à l'intérieur du genre, en espèces. Le nom scientifique est composé du genre suivi par l'espèce (par exemple, *Clostridium botulinum*). À l'intérieur d'une espèce, il peut exister différents types appelés des souches. Les souches diffèrent au niveau de leur matériel génétique et des composants chimiques. Quelquefois, certains médicaments et vaccins sont actifs uniquement contre certaines souches (Larry et Charles, 2018).

2.3.2 Coloration

Une autre classification, fréquemment utilisée, correspond à leur réaction au contact de la coloration de Gram. Il s'agit d'une méthode permettant de différencier les bactéries en fonction de leur capacité de coloration variant selon la composition de leur paroi (Heart et Shears, 2006).

Le colorant le plus utilisé est le colorant de Gram. Certaines bactéries sont colorées en bleu. Elles sont dites Gram positives. D'autres sont colorées en rouge. Elles sont dites Gram négatives. La différence de coloration entre des bactéries Gram positives et des bactéries Gram négatives est due à des différences au niveau de leurs parois cellulaires. Elles sont responsables également de différents types d'infection et différents types d'antibiotiques sont efficaces contre elles (**Larry et Charles, 2018**).

2.3.3 Formes

Il existe trois formes de base permettant de classer les bactéries : forme sphérique (coques), forme de bâtonnets (bacilles) et forme de spirale ou d'hélice (spirochètes) (**Larry et Charles, 2018**).

2.3.4 Besoin en oxygène

Les bactéries peuvent être classées en fonction de leur besoin d'oxygène pour survivre en bactéries aérobies ou en bactéries anaérobies (**Flandrois, 2000**).

Lorsque l'environnement leur est favorable, en termes de nutriments, température, pH, oxygène. Les bactéries pourront alors survivre et se multiplier. Dans certaines circonstances, les bactéries peuvent avoir un pouvoir pathogène important et être responsables de maladies bénignes ou graves (**Flandrois, 2000**).

2.3.5 Activité antibactérienne de la bigarade

Les extraits et l'essence de *Citrus aurantium* ont des effets plus sur les bactéries Gram-positives que les bactéries Gram-négatives, l'essence et l'extrait de *Citrus aurantium* pourraient être utilisés en complément des médicaments dans le traitement des maladies des voies urinaires causées par des bactéries gram positives. (**Dadashi et al., 2015**).

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les tanins, sont connus pour leur toxicité vis-à-vis des micro-organismes. Les mécanismes de toxicité peuvent être liés à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et hydrolases glucidiques) ou à d'autres interactions qui inactivent l'adénosine neutre microbienne, les transporteurs et les protéines de l'enveloppe cellulaire. (**Cowan, 1999**).

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* etc...) avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve (**Akroum, 2011**).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention dû à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols (**Daglia, 2011**).

Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique (**Ulanowska et al., 2008**).

Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

3. Activité antivirale

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes des agrumes ont une activité antivirale très importante. La quercétine et l'héspéridine inhibent l'infectiosité et la réplication d'herpès simplex, le poliovirus, le virus parainfluenza et le virus syncytial (**Tripoli et al., 2007**).

4. Activité anti-inflammatoire

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

5. Activité antiallergique

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

6. Activité anti-cancer

De nombreuses études ont montré que les polyphénols parviennent à exercer des effets antiprolifératifs des cellules cancéreuses. Ils arrivent à bloquer la réplication de

l'ADN en piégeant l'hydroxyle OH de l'amorce (brin court de l'ADN qui comporte une extrémité 3OH libre et sert comme point de départ à la synthèse de l'ADN). Ils sont actifs contre de nombreux cancers du colon, estom, foie, sein, prostate, poumon, peau et vessie, à tous les stades de la cancérogenèse (**percival et al., 2004**).

Deuxième partie

Chapitre I

Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein de laboratoires pédagogique du Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila.

1. Présentation de la zone de prélèvement

L'échantillonnage a été récolté au début de février 2024 de deux région situé dans la wilaya de Mila, Commune de Sidi Mérouane, et Mila. **(Figure 19)**

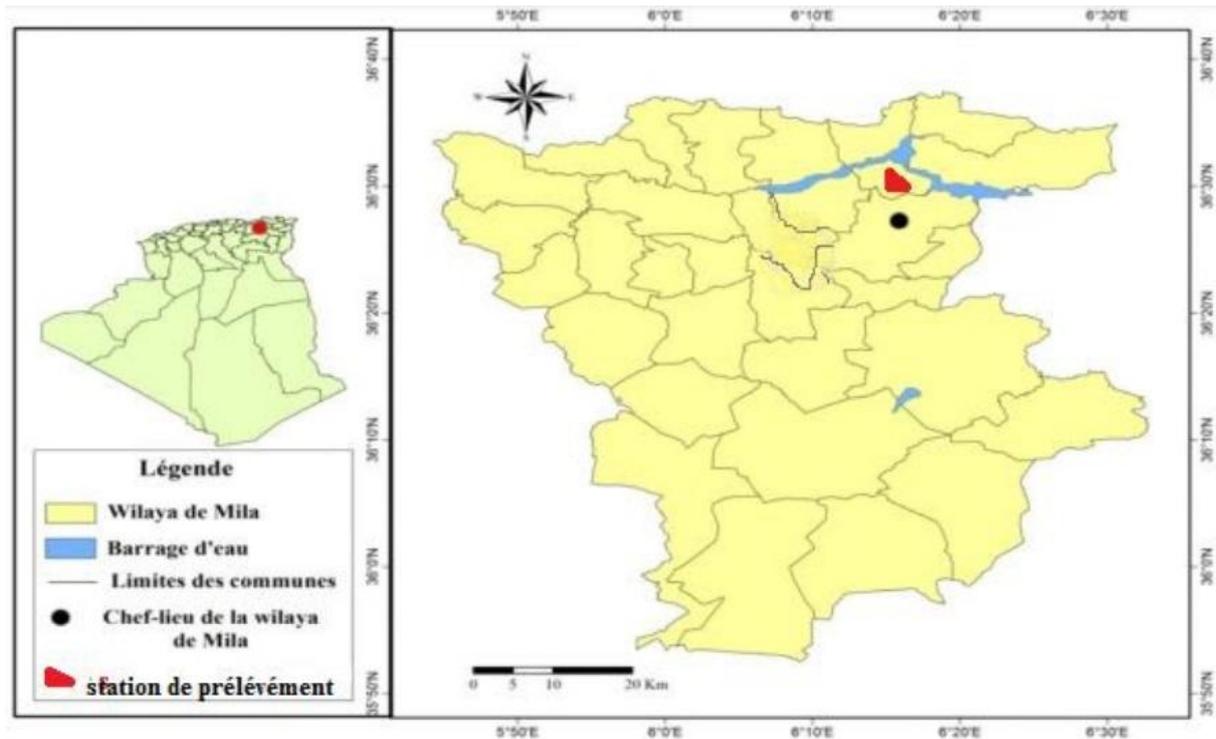


Figure 20 : Situation géographique de la zone de prélèvement .

La commune de Sidi Merouane se localise au niveau de 36.46186° de latitude Nord et 6.26111° de longitude ouest, avec une altitude moyenne de 359 m. Elle est située à 18 Km au nord du chef lieu de la wilaya de Mila **(figure 14)**.

La commune de Mila se localise au niveau de 36.462877° de latitude Nord et 6.218784° de longitude est, avec une altitude moyenne de 521 m. Elle est située à 6 Km au ouest du chef lieu de la wilaya de Mila.

1.1. Conditions climatiques des stations de récolte

La commune de Sidi Mérouane et Mila, possèdent un climat tempéré méditerranéen à été chaud et sec (Csa) selon la classification de Köppen-Geiger. Sur l'année, la température moyenne à Sidi Mérouane est de 15.3°C et les précipitations sont en moyenne de 501.7mm.

2. Matériel

2.1 Matériel végétal

Notre travail est réalisé sur l'espèce orange amère dont les fruits (éplucheur), feuilles et rameaux ont été récoltés au début de février 2024 dans deux régions (région de Sidi Merouane et région de Mila).

2.2 Souches microbiennes

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance trois souches à gram négatif sont :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.
- *Escherichia coli* ATCC25922.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Et une souche à gram positif :

- *Bacillus subtilis* ATCC6633.

3. Méthodes

3.1 Etude phytochimique

3.1.1 Préparation des échantillons (rameaux et feuilles et l'épluchure du bigaradier)

Pour faciliter l'extraction des composés phénoliques à partir des rameaux et feuilles et éplucheur du bigaradier deux opérations de prétraitement de ce matériel ont été effectuées : séchage et broyage.

- ❖ **Séchage** : Le séchage des feuilles, rameaux et éplucheur de bigaradier, est effectué à l'aire libre à température ambiante puis dans une étuve portée une température voisine de 45°C pendant trois jours. (**Figure 15**)



Figure 21 : Séchage des échantillons.

- ❖ **Broyage :** Les rameaux et feuilles et l'épluchure séchées sont ensuite broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à devenir une poudre. Ce dernier a été conservé dans un Récipients en verre qui sert ultérieurement à l'extraction des polyphénols. (**Figure 16**)



Figure 22 : Echantillons de broyage.

3.2 Extraction des polyphénols

La macération consiste à laisser tremper une plante sèche dans un solvant approprié pendant plusieurs heures, jours, voire semaines. L'intérêt de la macération est généralement la conservation des principes actifs durant le procédé (**Sophie et Eherhart, 2003**).

Les polyphénols sont extraites par la méthode de macération prolongée (5 jours) à température ambiante par l'éthanol selon la méthode décrit par (**Abaza et al., (2007)**) l'extraction est représentée dans le schéma suivants (**figure 17**).

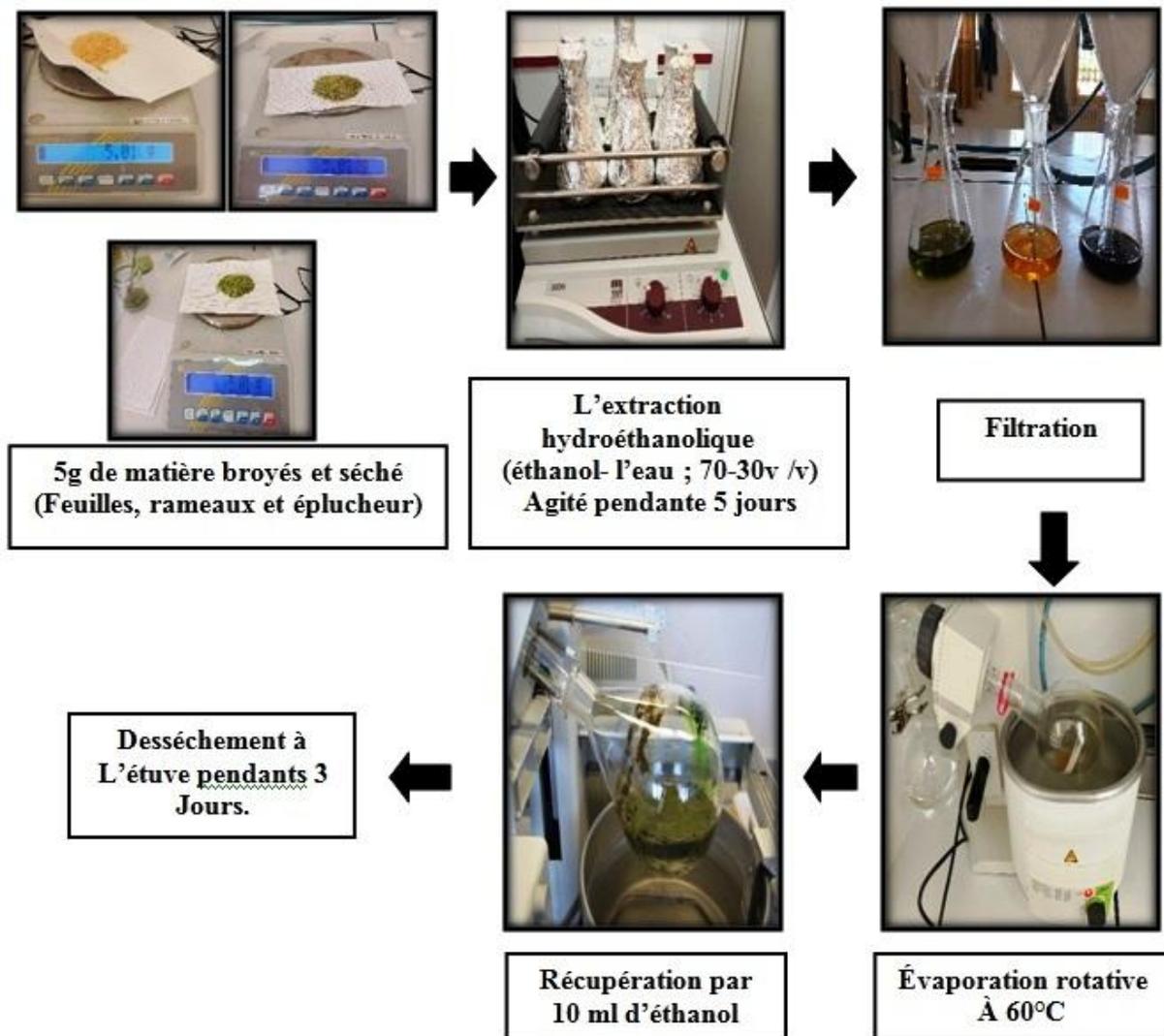


Figure 23 : Protocole d'extraction des polyphénols.

Après filtration (**figure 17**) le résidu subit un séchage dans une étuve à 60°C durant 24 h ; en suite on a calculé la teneur en matière extraite ou rendement d'extraction selon la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M1-M2}{M1} \times 100$$

R (%) : Le rendement en %.

M1 : La Masse sèche de la plante en gramme.

M2 : La Masse de résidu après séchage en gramme.

3.3 Screening phytochimique

Le screening phytochimique met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits. Elle est basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation, des observations sous lampe UV peuvent être aussi utiles. Les résultats ont été évalués comme suit : +++ : Fortement positif / ++ : Moyennement positif / + : Faiblement positif / - : Négatif / ND : non déterminé.

➤ Recherche des substances polyphénoliques

La caractérisation des polyphénols est basée sur une réaction au chlorure ferrique (FeCl_3), à 2 ml de l'extrait, une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols (**Békro et al., 2007**).

➤ Recherche des saponines : test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 2ml de l'extrait à analyser, ajouter 2ml d'eau distillée chaude, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm d'une mousse indique la présence des saponines (**Harborne, 1998**).

➤ Recherche des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 ml de l'extrait éthanolique, 1ml d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleu-vert indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

➤ Recherche des anthocyanes

La présence des anthocyanes dans un décocté ou un infusé est indiquée par une coloration rouge qui s'accroît par l'addition de HCl dilué et vire au bleu-violet-vertâtre par l'ajout d'ammoniaque (**Wagner, 1984**).

➤ Recherche des triterpènes et stéroïdes

On agite le filtrat obtenu par macération de 5 g de la poudre dans 20 ml de chloroforme pendant quelques minutes. On ajoute 1 ml d'acide sulfurique sur les parois du ballon. L'apparition d'une couleur verte qui se transforme au fur et à mesure au rouge sur les points de contact de l'acide sulfurique avec la solution prouve la présence des stéroïdes et triterpènes (**Kalla, 2012**).

➤ Recherche des alcaloïdes

On prend 1 ml de l'extrait à analyser dans un tube à essai et ajouter 5 gouttes de réactif de Wagner, l'apparition d'un précipité orange révèle la présence des alcaloïdes (**Trease et Evans, 1989 ; Harborne, 1998**).

➤ Recherche des composés réducteurs (les glycosides)

Pour détecter ces molécules, un mélange constitué de 1 ml d'extrait, 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling est chauffé à 90°C dans un bain marie, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

➤ Recherche des coumarines

Le résidu de chaque extrait est dissout dans 2 ml d'eau distillée chaude. Le mélange est partagé dans deux tubes. On ajoute à un des tubes 0.5 ml de NH₄OH 25 %, ensuite, une goutte de chaque tube est prélevée puis déposée sur un papier filtre qui sera observé sous U.V. à 366 nm (**Bruneton, 1999**). Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH₄OH.

➤ Recherche des quinones libres

Sur un volume de chacun de nos extraits, on ajoute quelques gouttes de NaOH 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (**Oloyde, 2005**).

➤ Recherche des anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones, à 10 ml d'extrait sont ajoutés 5 ml de NH₄OH à (10%). Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinones (**Oloyede, 2005**).

➤ Flavonoïdes

On dissout 0.5g de NaOH dans 5ml d'eau (NaOH diluée), puis on dissout 1ml d'HCl dans 2ml d'eau (HCl diluée).

Le test de l'hydroxyde de sodium pour les flavonoïdes : 2ml de l'extrait + 0.5 ml NaOH diluée suivie par l'addition de 0.5 ml HCl diluée. La formation d'une solution jaune avec le NaOH diluée qui se décolore avec l'HCl diluée est une indication de la présence de flavonoïdes (**Usman et al., 2009**)

3.4 Activité antibactérienne

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne nécessitent un travail dans des conditions d'asepsie rigoureuses afin d'éviter les problèmes de contamination. En outre, le matériel,

Solutions et les milieux de cultures doivent être stérilisés par autoclavage. L'inhibition de la croissance bactérienne *in vitro* a été étudiée par la méthode de diffusion par disque (l'aromatogramme) sur gélose telle que décrite par (**Bauer et al., 1966**). Le test a porté sur tous les extraits de le bigaradier préparés précédemment et s'est déroulé selon les étapes suivantes :

3.4.1 Préparation des milieux

Selon **Baur et al., (1966)**. La préparation des milieux effectués par les méthodes suivantes :

✓ Préparation de milieu MH (Mueller Hinton)

Pour la préparation de la gélose Mueller Hinton on introduit 38g de MH dans une erlenmeyer auquel est ajoutée 1L d'eau distillé, le mélange obtenu semis sous agitation continue à une température élevée sur une plaque chauffante jusqu'à le bouillage, le milieu sera divisée dans des flacons en verre. (**Figure 18**)

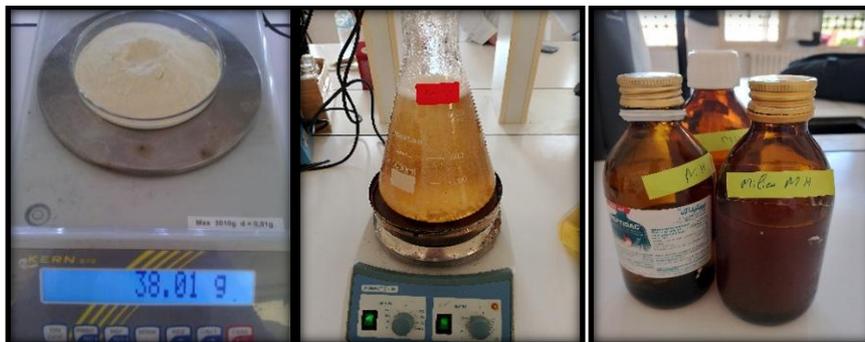


Figure 24 : Préparation de milieu MH.

✓ Préparation de l'eau physiologique

L'eau physiologique est préparée par solubilisation de 0.9g de NaCl dans 100ml d'eau distillée avec agitation pendant quelques minutes et divisée dans des tubes en verre à vis. (**Figure 19**)



Figure 25 : Préparation de de l'eau physiologique

3.4.2 Préparation des disques d'aromatogramme

Une feuille de papier Wattman N °3 est coupée en disques de 6 mm de diamètre. Ces disques sont ensuite mis dans un tube à essai.

3.4.3 Stérilisation du matériel

Le milieu de culture MH, l'eau physiologie, les tubes à essai, les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre), les emboles, les pinces enrobées dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3.4.4 Dilution d'extraits

Les extraits éthanoliques des feuilles, épluchure et rameaux de 2 variété d'orange amère (région de sidi merouane, et Mila) sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) selon la méthode suivante :

- ❖ T₀ : 0.2g d'extrait avec 1ml de DMSO (100%).
- ❖ T_{1/2} : 0,5ml d'extrait de T₀ avec 0.5ml de DMSO (50%).
- ❖ T_{1/4} : 0.5ml d'extrait de T_{1/2} avec 0.5ml de DMSO (25%).

3.4.5 Préparation des suspensions bactériennes :

➤ Après la stérilisation de zone de travail avec l'eau de javel. Les souches bactériennes conservées sur gélose incliné sont tout d'abord ensemencées sur gélose nutritive. (**Figure 20**)

➤ Les souches bactériennes ont été repiquées sur gélose nutritive en boîte de pétri et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. A l'aide d'une anse de platine stérile pour optimiser leur croissance, quelques colonies bien isolées et identiques de chaque souche bactérienne à tester sont alors raclées, déchargées dans un tube contenant 5ml de l'eau physiologique puis homogénéisées à l'aide d'un vortex.

➤ Nous avons fait la lecture de la suspension bactérienne à une densité optique de 0.08 à 0.10, lue à la longueur d'onde 625 nm. afin d'obtenir des colonies confluentes suffisamment denses (Younsi *et al.*, 2010).

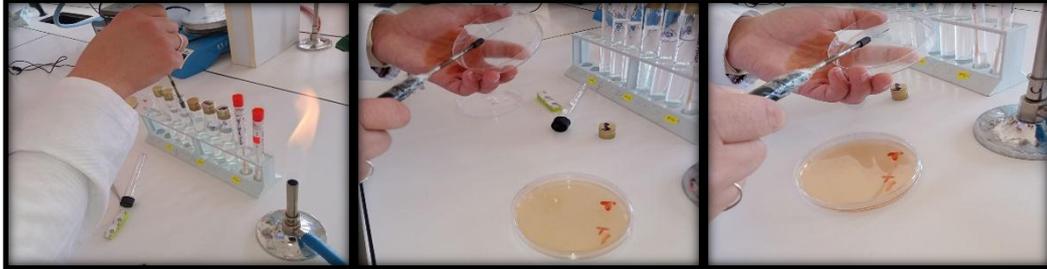


Figure 26 : Etapes de réactivation des bactéries.

3.4.6 Ensemencement bactérienne

Après la préparation et l'identification des boîtes de pétri nous avons fait l'ensemencement des bactéries :

L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage sur les boîtes de Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération a été répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, l'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon a été rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. (Figure 21)

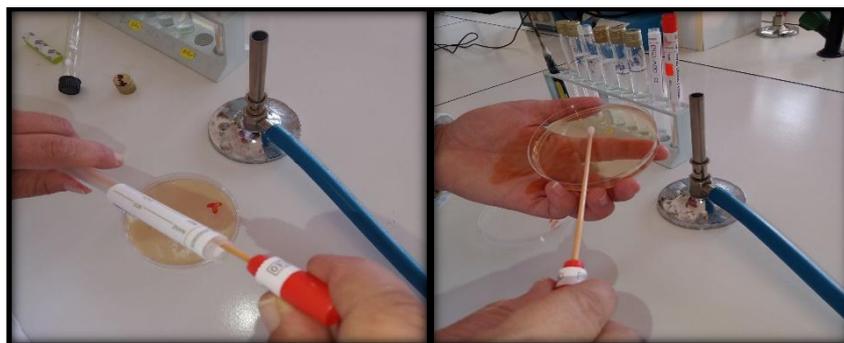


Figure 27 : Etapes d'ensemencement (écouvillonnage).

3.4.7 Dépôts des disques et l'injection des extraits

➤ Les disques ont été déposés délicatement sur la surface de la gélose MH inoculée à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen.

- À l'aide d'une micro pipette on a ajouté 5µl de chaque dilution des extrais (T0 / T¹/₂ / T¹/₄) sur les disques. (**Figure 22**)

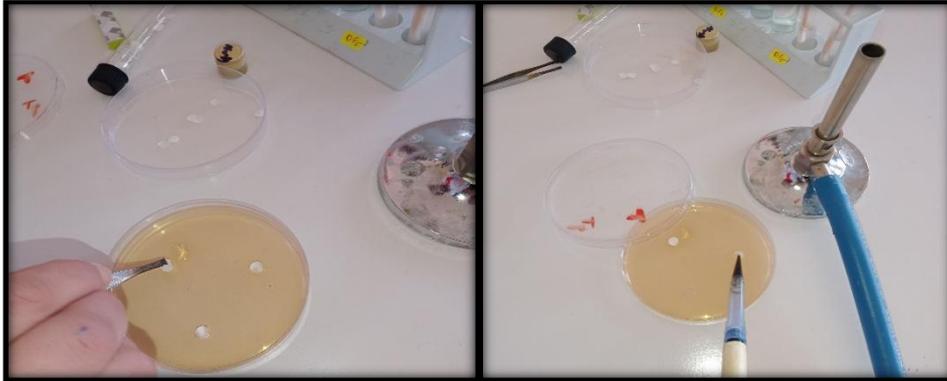


Figure 28 : Dépôts des disques et l'injection des extraits

3.4.8 Préparation des témoins (Positif et négatif)

Ce test a été réalisé pour étudier l'effet des antibiotiques et de DMSO sur les différentes souches utilisées et le comparer avec l'effet de nos extraits, comme des témoins positif (T+) et (T-) respectivement.

Les disques d'antibiotiques et de DMSO sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture de la souche à étudier. (**Figure 23**)

La sensibilité des bactéries à un antibiotique et DMSO est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait. On a utilisé deux antibiotiques (Gentamycine et Amoxicilline).



Figure 29 : Dépôts des disques et l'injection des extraits.

3.4.9 Incubation et lecture

Après dépôt des extraits, les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 h. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse en (mm) (**Figure 24**). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des polyphénols (**Hamidi, 2013**).

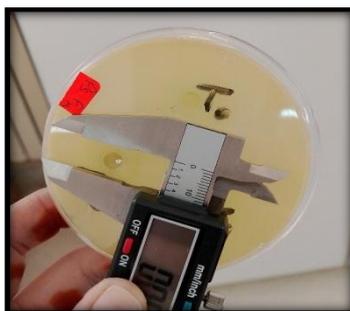


Figure 30 : Lecture par le pied coulisse.

Après l'incubation, l'effet des extraits et de l'antibiotique se traduit par l'apparition d'une zone transparente autour de disque correspondant à l'absence de la croissance bactérienne. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (**Choi et al., 2006**). Si le diamètre est égal à 6 mm : la bactérie est résistante. Si le diamètre plus de 6,2 mm : la bactérie est sensible.

3.5 Activité antioxydant des extraits des feuilles, rameaux et épluchure de bigaradier

3.5.1 Neutralisation du radical DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyl) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH° (**Figure 25**), mesurable par spectrophotométrie à 515-517 nm (**Cristina et al., 2009**). Le mécanisme est récapitulé dans la réaction suivante (**Guimarães et al., 2010**).

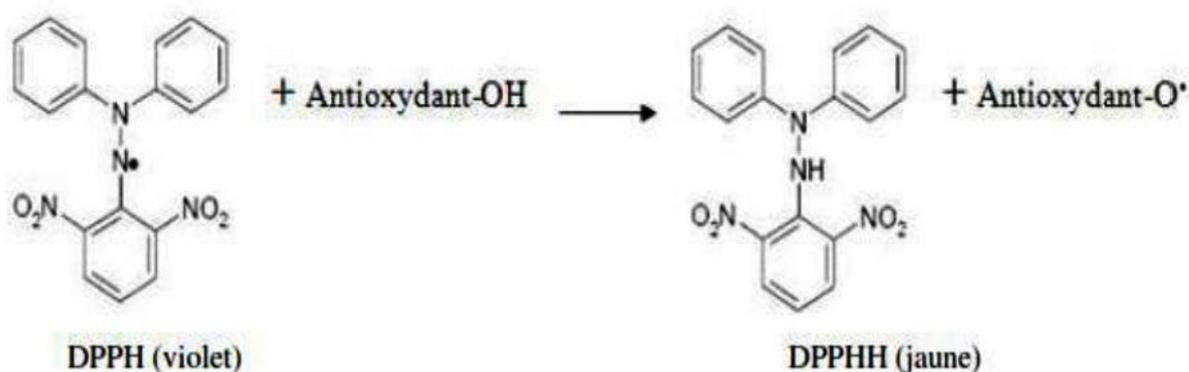


Figure 31 : Réaction de test DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl) (Guimarães *et al.*, 2010).

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH (Lei tão *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2004). Ce radical libre stable, possède une coloration violet foncé, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.

3.5.2 Préparation de la solution DPPH

0,008g de poudre de DPPH, ont été dissous dans 150 ml Ethanol/eau (30% eau, 70%éthanol). Cette solution a été mise en agitation pendant 24h à l'obscurité.

3.5.3 Solution d'extrait

Plusieurs dilutions ont été effectués pour réaliser cette technique on utilisant Ethanol/eau. Essai au DPPH Dans des tubes, on prélève par micropipette (extraits + solvant + DPPH) des différentes concentrations (Tableaux 4). Et après agitation, les tubes sont placés dans l'obscurité, à une température ambiante pendant 30 min et 45 minutes.

Tableau 4 : Different concentrations utilisées

	Extrait (ml)	Solvant (ml)	DPPH (ml)
Solution1	0,1	2,9	1
Solution2	0,2	2,8	1
Solution3	0,3	2,7	1
Solution4	0,4	2,6	1

- La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (517 nm).

3.5.4 Expression des résultats

L'expression des résultats a été faite selon la formule suivant :

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

Tels que :

- Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

- **Analyses statistiques**

Les résultats, présentés sous forme des courbes ou des histogrammes ou des tableau ces demiers ont été réalisés par le logiciel Excel 2010.

CHAPITRE II

Résultats et discussion

1. Résultat et discussion de rendement d'extraction

Nous avons préparé les extraits des feuilles épiluchures et rameaux de la plante *Citrus aurantium* L. par une macération hydro-éthanolique durant (cinq jours) à l'obscurité et une température ambiante.

Le rendement d'extraction des extraits des feuilles, rameaux et épiluchure de *Citrus aurantium* L a été calculé, les résultats obtenus sont illustrés dans le Tableaux suivant :

Tableau 5 : Résultats de rendement des extraits des feuilles, fruits et rameaux des deux variétés de *Citrus aurantium* L.

Organes	Rendement d'extraction (%) V.S	Rendement d'extraction (%) V.M
Feuilles	26.67	24.33
Rameaux	17.70	19.97
Epluchure	39.12	37.20

Selon les résultats de rendement d'extraction on peut dire que les épiluchures ont des teneurs élève en polyphénols (39.12% / 37.20%) respectivement pour les bigaradier prélevé des deux station sidi Merouan et Mila suivie par les feuilles avec les teneurs (26.67% / 24.33%) respectivement pour les bigaradier prélevé des deux station sidi Merouan et Mila finalement les rameaux qui contient (17.70% et 19.97 %) respectivement pour les bigaradier prélevé des deux station sidi Merouan et Mila.

- **Discussion**

En comparant les résultats obtenus des rendements par celle obtenu par , **Muthiah(2012)**, le taux d'extraction des feuilles du *Citrus aurantium* L. trouvé est 17.5% ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par notre étude des deux variétés VS et VM.

Cependant, le taux de rendement d'extraction de l'extrait des feuilles obtenu par **Meziani et Saidoune, (2017)** est 30,3% ce résultat est supérieur à celui obtenu dans notre travail pour les deux variétés VS et VM.

Concernant le rendement d'extraction des rameaux, l'étude d'**Aazza et al. (2022)** a donné un rendement d'extraction de 9,5% du poids sec des rameaux, ces résultats sont effectivement inférieurs à ceux obtenus par notre étude pour les deux variétés VS et VM.

En revanche, notre résultat d'extraction d'épluchure des deux variété VS et VM est supérieur de celui obtenu par (Muthiah et al., 2012), ils ont enregistré un pourcentage de 22,12%.

Cette différence dans les rendements peut s'expliquer par l'influence de plusieurs facteurs tels que : les méthodes d'extraction et les solvants utilisés, ainsi que par des facteurs génétiques, climatiques et pédologiques dans la région de récolte (Lagha-benamrouche et al., 2017).

Une étude récente menée par Mahdavi et al. (2021) a examiné ces facteurs en détail. Ils ont constaté que le séchage à basse température préserve mieux les composés phénoliques et flavonoïdes, augmentant ainsi le rendement d'extraction. De plus, l'utilisation de solvants polaires comme l'éthanol à des concentrations optimisées (70-80%) a montré des résultats supérieurs en termes de rendement par rapport à d'autres solvants. La durée d'extraction et la température jouent également un rôle crucial : une extraction prolongée à des températures modérées (40-50°C) améliore significativement le rendement sans dégrader les composés thermosensibles.

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la recherche bibliographique car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (Escribano-bailon et Santos-buelga, 2003).

2. Résultats et discussions des analyses qualitatives des composés phytochimiques (Screening phytochimique)

La réalisation des tests a pour but de révéler les différentes familles bios actives de substances existantes dans les feuilles, épluchure et rameaux de *Citrus aurantium* (polyphénols, saponosides, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, coumarines...) en se servant sur des réactions qualitatives de caractérisation. Ces dernières reposent sur des phénomènes de précipitation ou de complication avec formation des complexes insolubles ou des colorations par des réactifs spécifiques à chaque catégorie de composés.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les feuilles, épluchure fruits et rameaux de *Citrus aurantium* L.

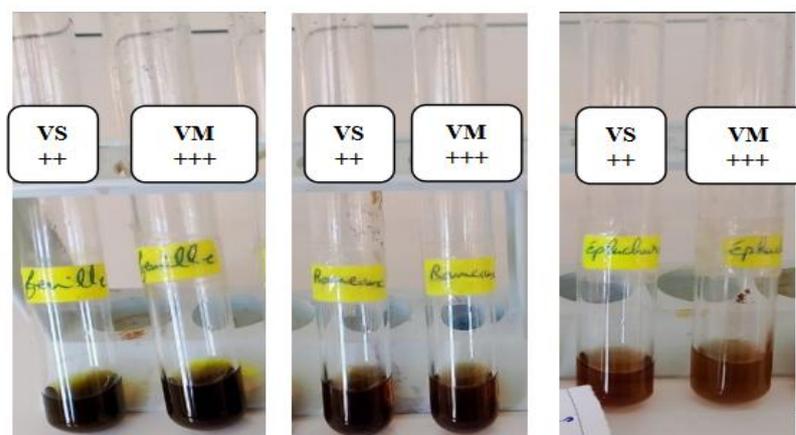
- **Substances polyphénoliques**

Nous avons remarqué la présence d'une couleur verte foncée, qui indique la présence des substances phénoliques dans l'extrait des trois organes des deux variétés.

Les résultats de test des substances phénoliques dans les feuilles et rameaux ont montré que ces composés sont très élevés dans les deux variétés.

Dans l'épluchure nous avons noté que les deux variétés possèdent une moyenne teneur.

En comparant les feuilles et les rameaux avec l'épluchure, la teneur des substances phénoliques est plus élevée dans les feuilles et rameaux que l'épluchure. Les résultats de test des composés phénoliques sont représentés dans la **(figure 26)**.

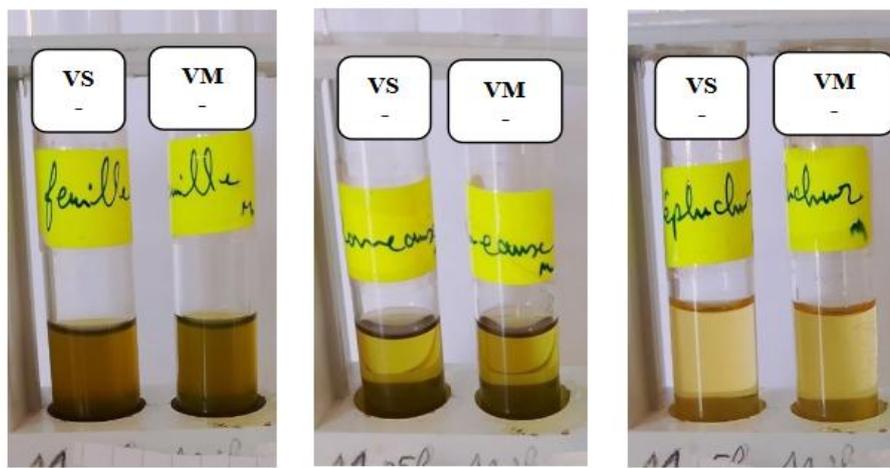


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 32 : Résultats de test des substances phénoliques des feuilles rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

- **Saponines**

Les résultats de la composition phytochimique ont montré l'absence totale des saponosides dans tous les organes d'études (feuilles les rameaux et l'épluchure) chez les deux variétés de *Citrus aurantium* L. Les résultats sont présentés dans la **figure 27**.

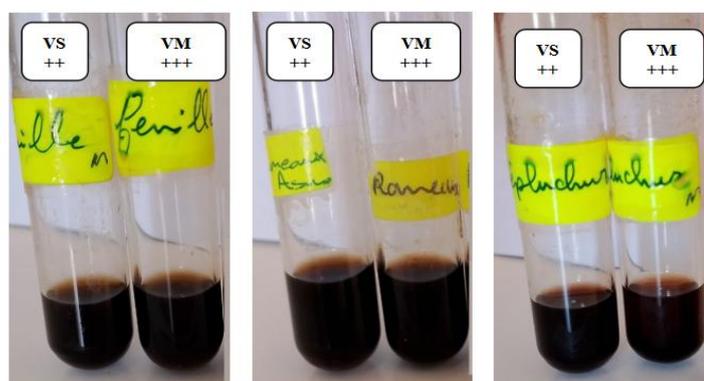


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 33 : Résultats de test des saponines des feuilles, rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

• **Tanins**

L'apparition d'une couleur verte foncée, indique la présence des tanins d'une manière très abondant dans les trois organes feuilles rameaux et épluchure des deux variétés de *Citrus aurantium* L .Les résultats sont présentés dans la figure suivante (**Figure28**).



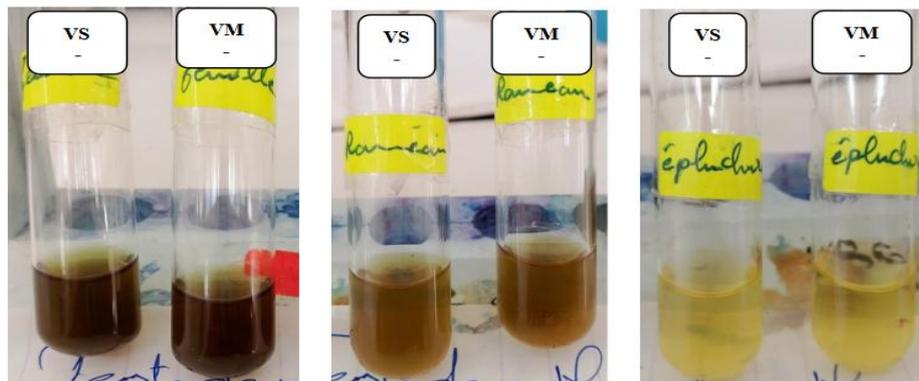
(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 34 : Résultats de test des tanins des feuilles, rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

• **Anthocyanes**

On remarque l'absence des anthocyanes dans les deux variétés de *Citrus aurantium* L (feuilles, rameaux et épluchure).Les résultats sont présentés dans la figure suivante (**Figure**

30).

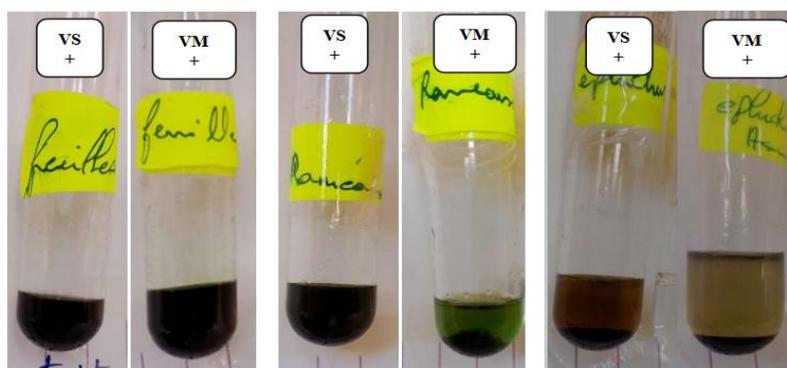


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 35 : Résultats de test des anthocyanes des feuilles, rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

- **Triterpènes et stéroïdes**

L'apparition d'une couleur verte qui se transforme au fur et à mesure au rouge sur les points de contact de l'acide sulfurique dans les extraits des feuilles, rameaux et épluchure des deux variétés de *Citrus aurantium* L. avec une teneur moyenne dans les trois organes feuilles rameaux et épluchures des deux variétés de *Citrus aurantium* L. Les résultats sont présentés dans la figure suivante (**Figure 30**)

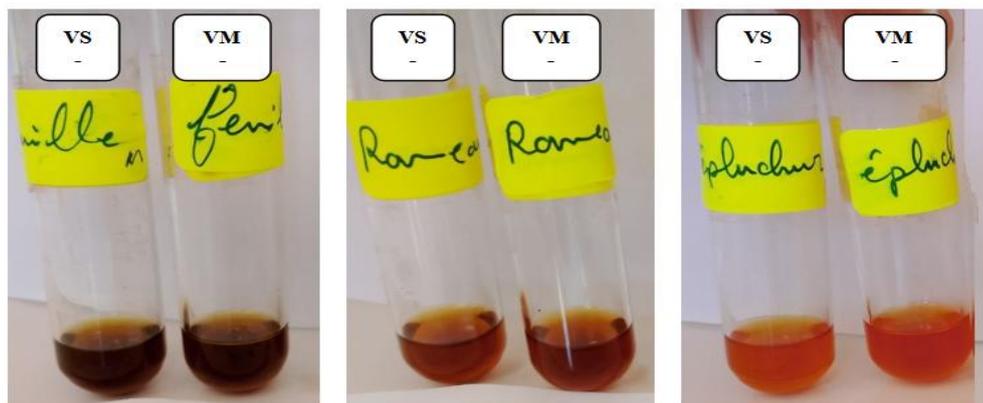


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 36 : Résultats de test des Triterpènes et stéroïdes des feuilles, rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

- **Alcaloïdes**

Nous avons remarqué l'absence des alcaloïdes dans les trois organes feuilles, rameaux et épluchures des deux variétés de *Citrus aurantium* L. Les résultats sont présentés dans la figure suivante (**Figure 31**).

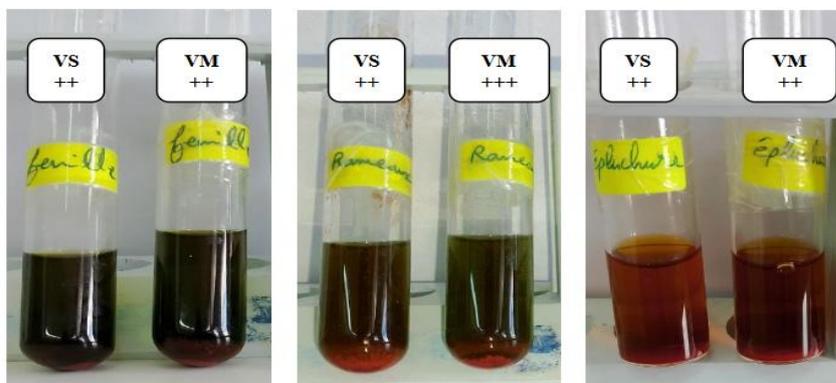


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négati

Figure 37 : Résultats de test des Alcaloïdes des feuilles, rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

- **Glycosides**

L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des glycosides. Nous avons noté que les rameaux de notre plante sont très abondants en glycosides, et une teneur moyenne de ces composantes signalées dans les feuilles et l'épluchure. Les résultats de ce test sont représentés dans la (**Figure 32**).



(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 38 : Résultats de test des glycosides des feuilles, rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

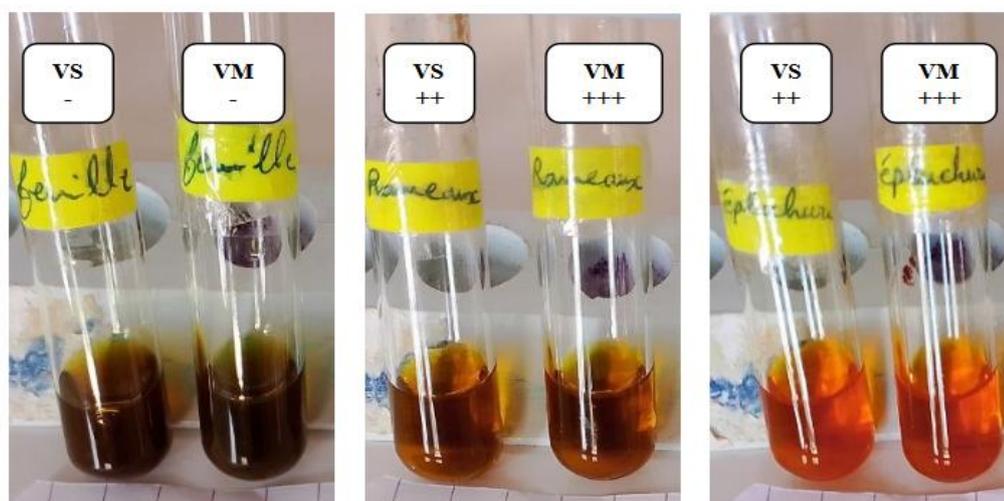
- **Coumarines**

On a remarqué l'absence des fluorescences dans les deux variétés (feuilles, rameaux et épluchures) ce révéle que le teste de coumarines est négatif.

- **Quinones libres**

Nous avons remarqué la présence de la couleur jaune juste dans l'épluchure et les rameaux des deux variétés étudiées, et l'absence de la couleur jaune dans les feuilles des deux variétés de *Citrus aurantium* L.

Donc Nous avons noté que les rameaux et l'épluchure de notre plante est riche en quinones libres, et l'absence des quinones libre dans les feuilles des deux variétés de *Citrus aurantium* L. Les résultats de ce test sont représentés dans la (**Figure 33**).

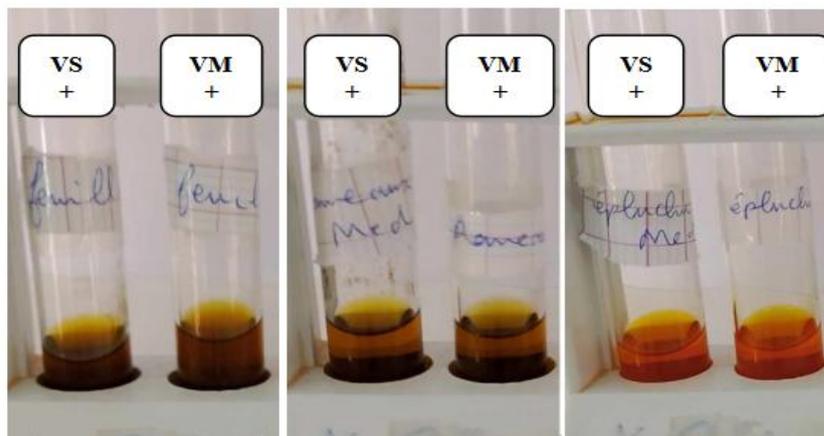


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+): Faiblement présent ; (-): test négatif

Figure 39 : Résultats de test des quinones libres des feuilles, rameaux et épluchures de *Citrus aurantium* L.

- **Anthraquinones**

Nous avons remarqué la présence d'un anneau rouge dans les extraits des feuilles, rameaux et épluchures des deux variétés de *Citrus aurantium* L. Indique la présence de Anthraquinones dans les trois organes (feuilles, rameaux et épluchures). Ces résultats sont présentés dans la (**figure 34**).

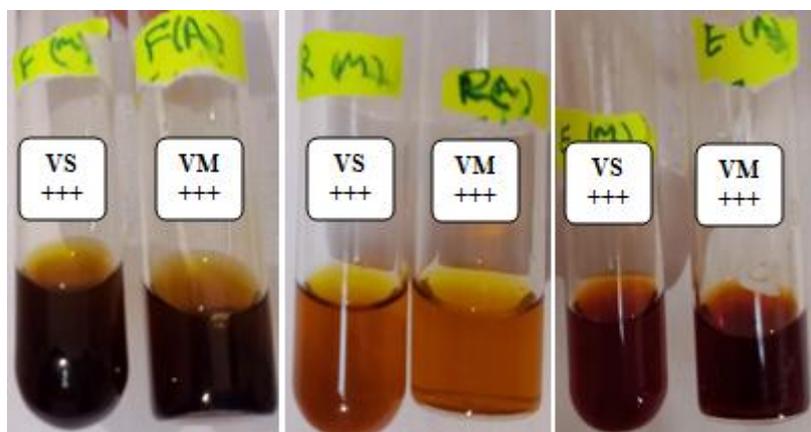


(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 40 : Résultats de test des Anthraquinones libres des feuilles rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

- **Flavonoïdes**

L'apparition d'une couleur jaune dans les extraits des feuille rameaux et épluchure des deux variétés, après l'ajoute de NaOH diluée qui se décolore avec l'ajoute de l'HCl diluée, est une indication de la présence de flavonoïdes. Ces résultats sont présentés dans la (**figure 35**).



(+++): Fortement présent ;(++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Figure 41 : Résultats de test des flavonoïdes des feuilles rameaux et épluchure de *Citrus aurantium* L.

- **Discussion**

L'examen phytochimique réalisé sur les feuilles des deux variétés de bigaradier a montré la présence des composés suivants : Les polyphénols, tanins, triterpènes et stérols, glycosides, anthraquinones, quinones libres pour les deux variétés VS et VM. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par (**Khamis et al., 2021; Zhang et al. 2021; Ali et al.,**

2022), mais ils ont révélé la présence de coumarine absente dans notre extrait des feuilles des deux variétés.

Selon les résultats de (Garcia et al. (2021) ; Sayed et al., (2021) et Tounsi et al. (2022) les rameaux du bigradier ont montré la présence des composés suivants : polyphénol, tanins, triterpène et stérol, glycoside, quinones libres, anthraquinone. Ces résultats sont accord avec nos résultats. En ce qui concerne les épluchures de cette plante (Almeida et al., 2022 ; Santos et al. 2023) ont montré la richesse en polyphénol, tanins, triterpène et stérol, glycoside, quinones libres, anthraquinone.

D'après ces résultats, la richesse des feuilles, rameaux et épluchures de *Citrus aurantium* en certains principes bioactifs, pourrait déduire qu'ils ont des activités bénéfiques sur la santé tels que : antibactérienne, antioxydants, anti-tumoral et prévention des maladies cardiovasculaires.

3. Activité antibactérienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits de différentes parties : feuilles, rameaux et épluchures de *Citrus aurantium* par la méthode de diffusion des extraits dans des puits sur un milieu gélosé solide (Mueller-Hinton), avec l'utilisation des antibiotiques Amoxicilline et Gentamicine comme témoin positif et le DMSO comme témoin négatif.

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis quatre bactéries , trois Gram⁻(*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*)et des Gram⁺ *Bacillus subtilis* .

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux et les figures, photographiées au laboratoire après incubation, suivants, ils représentent les diamètres des zones d'inhibitions des extraits tester vis-à-vis les germes à étudier.

3.1. Activité antibactérienne des feuilles

Les extraits éthanolique des feuilles de *Citrus aurantium*. (Variété SM et M), sont testés sur quatre souches bactériennes : E. coli, P .aeruginosa, K. pneumoniae et B. sybtilis . Nous

avons observé que les différents types de souches réagissent différemment aux extraits étudiés (Tableau 6).

Tableau 6 : Diamètres des zones d’inhibition des extraits éthanolique des feuilles des deux variétés d’orange amère.

Les Souches	Extrait feuille VS			Extrait feuille VM			Témoin		
	Concentration			Concentration			Am	Gn	DMSO
	T0	T1/2	T1/4	T0	T1/2	T1/4	7 µl		
<i>P. A mm</i>	AA	AA	AA	9.52 ± 0.62	9.06 ± 1.54	8.28 ± 1.40	13.23 ± 0.78	25.60 ± 0.67	AA
<i>K. P mm</i>	8.80 ± 0.20	8.59 ± 0.55	7.85 ± 0.20	7.45 ± 0.88	7.24 ± 0.81	7.17 ± 1.03	8.04 ± 1.11	33.65 ± 0.51	AA
<i>B. S mm</i>	8.76 ± 0.88	8.74 ± 2.12	7.74 ± 1.79	9.34 ± 1.09	9.33 ± 1.40	8.46 ± 2.37	22.21 ± 1.93	34.16 ± 2.72	AA
<i>E. Coli mm</i>	AA	AA	AA	AA	AA	AA	18.60 ± 2.43	34.95 ± 1.42	AA

Concernant les *P. aeruginosa*, elles s’avèrent sensible à l’extraits et dilutions de la variété prélevé de Mila, et résistant pour la variété SM, les feuilles de la variété M montre le pouvoire antimicrobien le plus important, avec une zone de (9.52± 0.62mm dilution 100%), tandis que les dilutions 50% et 25% ont donné des zones moins importantes, avec des diamètres 9.06 ± 1.54 et 8.28± 1.40 mm respectivement. Également des fortes zones d’inhibition de 13.23 ± 0.78 et 25.60± 0.67mm sont enregistrés avec les deux témoins positifs GN et AM respectivement Les différentes zones sont claires dans la figure 36

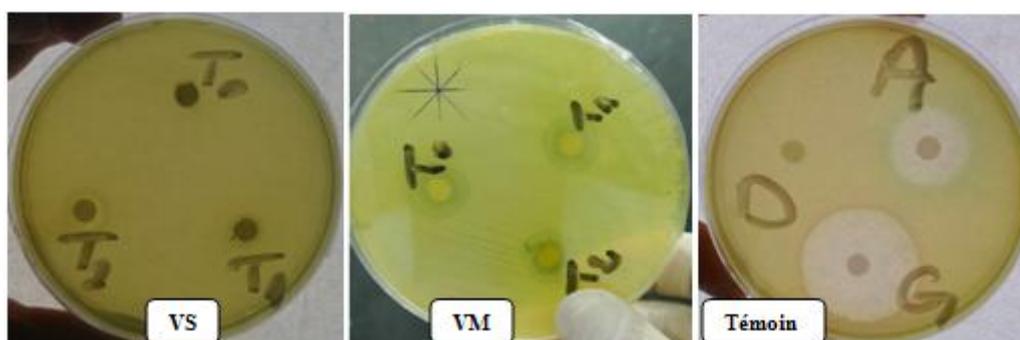


Figure 42 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d’orange amère et le témoin avec *Pseudomonas aeruginosa*

Klebsiella. Pneumoniae a montré une sensibilité aux différents extraits et concentrations, et la zone d’inhibition la plus importante est enregistrée avec l’extract éthanolique de la VS avec une zone de 8.80± 0.20 mm, pour le reste des extraits, la

sensibilité de cette souche est moins importante avec des zones qui varient entre 7.24 ± 0.81 et 8.59 mm. Les différentes zones sont claires dans **la figure 37**

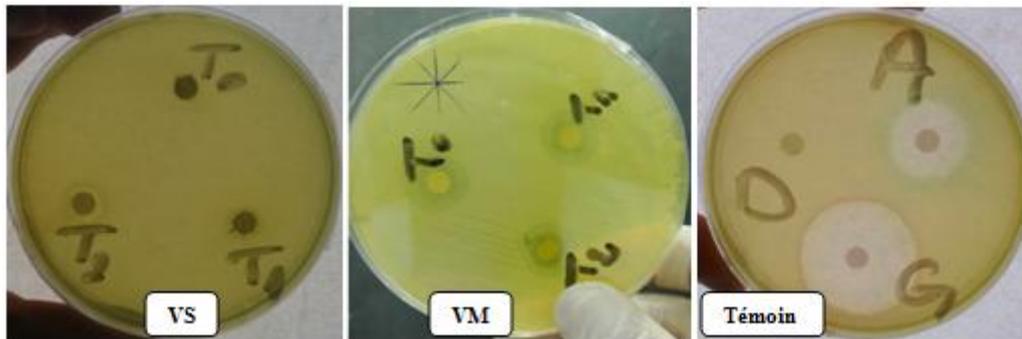


Figure 43 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d’orange amère et le témoin avec *Klebsiella pneumoniae*

En effet, *E. Coli* est totalement résistant aux extraits des deux variétés (VS ET VM), quel que soit la concentration appliquée. Les différentes zones sont claires dans **la figure 38**



Figure 44 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d’orange amère et le témoin avec *Escherichia coli*

B. subtilis a montré une sensibilité aux différents extraits et concentrations, et la zone d’inhibition la plus importante est enregistrée avec l’extrait éthanolique de la VM avec une zone de 9.34 ± 1.09 mm, pour le reste des extraits, la sensibilité de cette souche est moins importante avec des zones qui varient entre 7.74 et 9.33 mm. Les différentes zones sont claires dans **la figure 39**

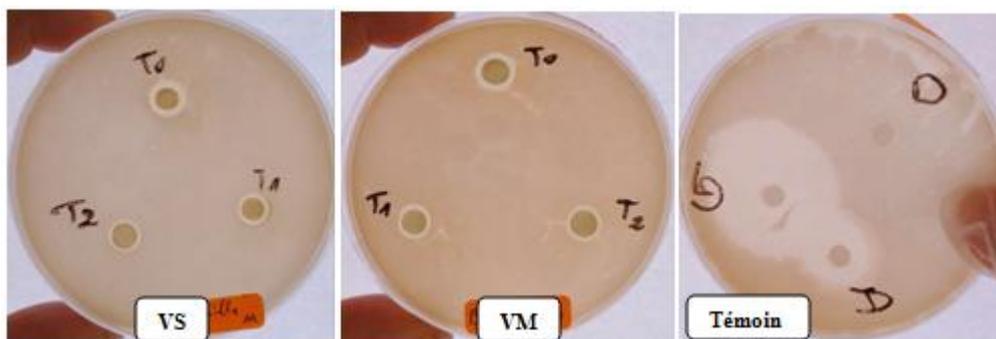


Figure 45 : Pouvoir antibactérien des extraits des feuilles des deux variétés d’orange amère et le témoin avec *Bacillus subtilis*

Si on compare les zones inhibitrices des différents extraits éthanolique des feuilles des deux variétés d’étude, on peut classer les deux variétés (VS ET VM) comme des antibiotiques alimentaires contre les souches étudié.

1.1. Activité antibactérienne des rameaux

Les résultats de l’activité antibactérienne des extraits des rameaux des deux variétés d’orange amère, (VS et VM). Vis-à-vis les quatre souches pathogènes *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *B. sybtilis* est résumé dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Diamètres des zones d’inhibition des extraits éthanolique des rameaux des deux variétés d’orange amère, (VS et VM)

Les Souches	Extrait rameaux V S			Extrait rameaux V M			Témoin		
	Concentration			Concentration			Am	Gn	DMSO
	T0	T1/2	T1/4	T0	T1/2	T1/4			7 µl
<i>P. A mm</i>	AA	AA	AA	12.95 ± 1.75	11.31 ± 1.02	10.40 ± 1.45	13.23 ± 0.78	25.60 ± 0.67	AA
<i>K. P mm</i>	8.85 ± 0.68	8.53 ± 0.71	8.33 ± 0.50	8.07 ± 0.55	8.00 ± 0.49	7.07 ± 0.82	8.04 ± 1.11	33.65 ± 0.51	AA
<i>B. S mm</i>	10.09 ± 0.91	9.45 ± 1.74	7.99 ± 1.27	10.10 ± 0.05	9.33 ± 0.60	9.13 ± 0.36	22.21 ± 1.93	34.16 ± 2.72	AA
<i>E. Coli mm</i>	AA	AA	AA	AA	AA	AA	18.60 ± 2.43	34.95 ± 1.42	AA

L’activité antibactérienne de l’extrait des rameaux de la variété VM testée sur *P. aeruginosa*, a montré un pouvoir antibactérien important. Les dilutions 100%, 50% et 25% ont montré des zones d’inhibitions avec des diamètres de (12.95 ; 11.31 ; 10.40mm)

respectivement, Alors que les dilutions 100%,50% et 25% de la variétés VS, n'a aucun pouvoir antibactérienne contre *P.aeruginosa*. (Figure 40).

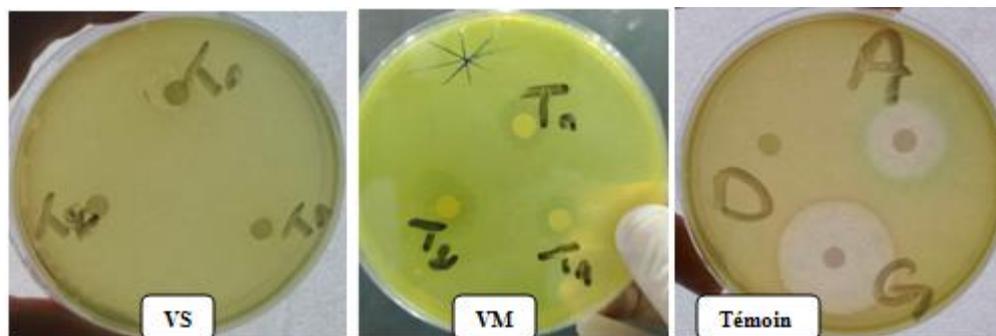


Figure 46 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Pseudomonas aeruginosa*

Pour la souche de *K. pneumoniae* l'extrait des rameaux de la variété VS a marqué un pouvoir antibactérien important avec des zones d'inhibition variant entre (8.85 ; 8.33 mm) respectivement pour les dilutions 100%, 50% et 25%. Pour la variété VM nous avons remarqué que les dilutions 100% et 50% ont un bon pouvoir antibactérien contre *K. pneumoniae* avec des zones d'inhibitions variant entre (8.07 ; 8.00 mm) respectivement, suivie par un faible pouvoir pour la dilution 25% avec un diamètre d'inhibition de (7.07mm). Les différentes zones sont claires dans la figure 41.

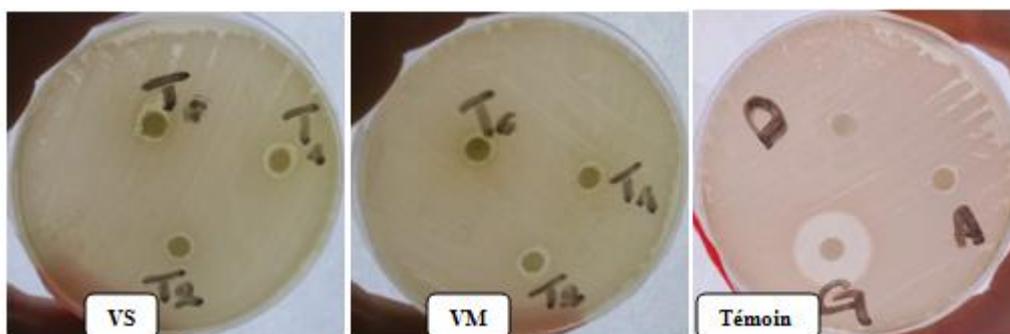


Figure 47 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Klebsiella pneumoniae*

Pour la souche bactérienne *B. subtilis* nous avons remarqué un bon pouvoir antibactérien des deux dilutions 100% et 50% de l'extrait des rameaux de la VS contre cette souche avec des zones d'inhibitions de (10.09mm ; 9.45 mm) respectivement, suivie par un moyen pouvoir antibactérien pour la dilution 25% avec un diamètre d'inhibition de (7.99 mm), et pour les variétés VM, nous remarquons un bon pouvoir pour les trois dilutions avec

des diamètres d'inhibition de (10.10 mm; 9.33mm ; 9.13mm) respectivement pour les dilutions 100%,50% et 25 % contre *B. subtilis*. **Figure 42.**

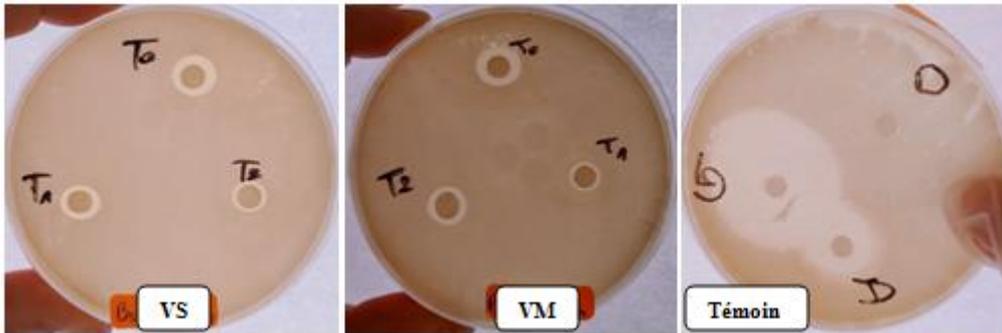


Figure 48 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Bacillus subtilis*

Pour la souche de *E. coli*, les trois concentrations des extraits des rameaux des deux variétés (VS et VM), n'ont aucun pouvoir antibactérienne (**Figure 43**).

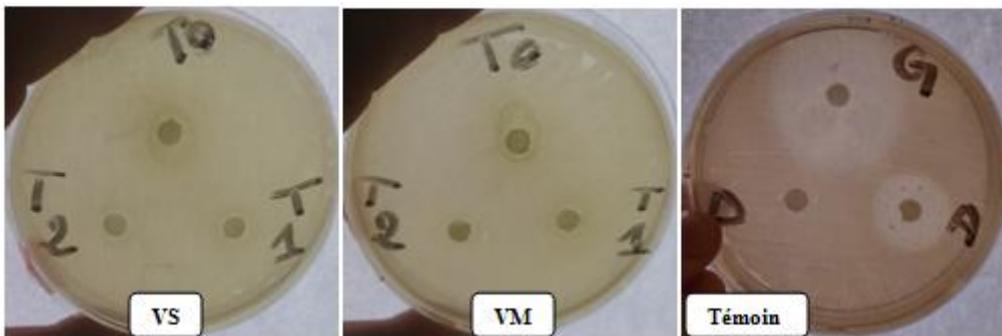


Figure 49 : Pouvoir antibactérien des extraits des rameaux des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Escherichia coli*

1.2. Activité antibactérienne des épiluchures

Les extraits éthanolique des épiluchures de *Citrus aurantium*. (Variété VS et VM), sont testés sur quatre souches bactériennes : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *B. sybtilis* . Nous avons observé que les différents types de souches réagissent différemment aux extraits étudiés Tableaux 8.

Tableaux 8 : Diamètres des zones d’inhibition des extraits éthanolique des épiluchures des variétés d’orange amère, (VS et VM)

Les Souches	Extrait épiluchures V S			Extrait épiluchures V M			Témoin		
	Concentration			Concentration			Am	Gn	DMSO
	T0	T1/2	T1/4	T0	T1/2	T1/4			7 µl
<i>P. A mm</i>	AA	AA	AA	7.85 ± 1.26	7.84 ± 1.12	AA	13.23 ± 0.78	25.60 ± 0.67	AA
<i>K. P mm</i>	6.75 ± 0.11	6.71 ± 0.54	6.43 ± 0.40	7.11 ± 0.22	6.84 ± 0.67	6.79 ± 0.37	8.04 ± 1.11	33.65 ± 0.51	AA
<i>B. S mm</i>	AA	AA	AA	8.48 ± 1.04	AA	AA	22.21 ± 1.93	34.16 ± 2.72	AA
<i>E. Coli mm</i>	AA	AA	AA	AA	AA	AA	18.60 ± 2.43	34.95 ± 1.42	AA

Pour la souche *P. aeruginosa*, nous avons remarqué une résistance contre tous les dilutions de l’extrait VS et la concentration 25% de l’extrait VM. Une sensibilité de la souche est signalée contre les concentrations 100% et 50% de l’extrait VM, avec des zones de (7.85±1.26mm et 7.84±1.12 mm) respectivement (Figure 44)

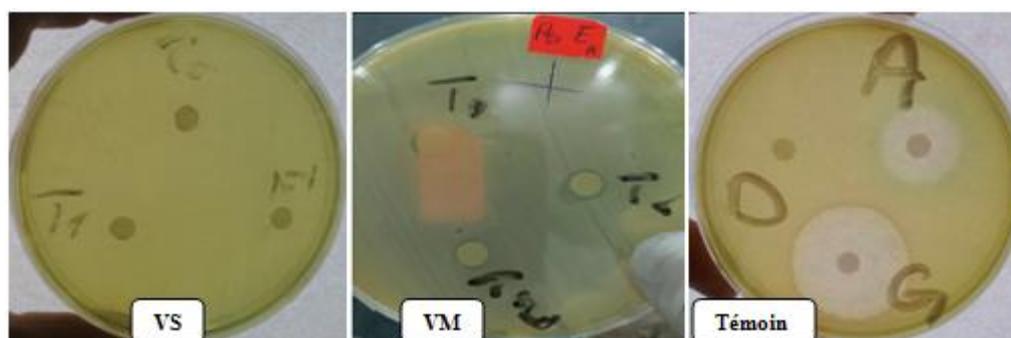


Figure 50 : Pouvoir antibactérien des extraits d’épiluchures des deux variétés d’orange amère et le témoin avec *Pseudomonas aeruginosa*

Concernant *Klebsiella. pneumoniae* elle a montré une sensibilité aux différents concentrations des deux extraits des épiluchures. La zone d’inhibition la plus importante est

enregistrée avec l'extrait éthanolique de la variété SM 100% avec une zone de 7.11 ± 0.22 mm, pour le reste des extraits, la sensibilité de cette souche est moins importante avec des zones qui varient entre 6.43 ± 0.40 mm et 6.84 mm. Les différentes zones sont claires dans la **figure 45**

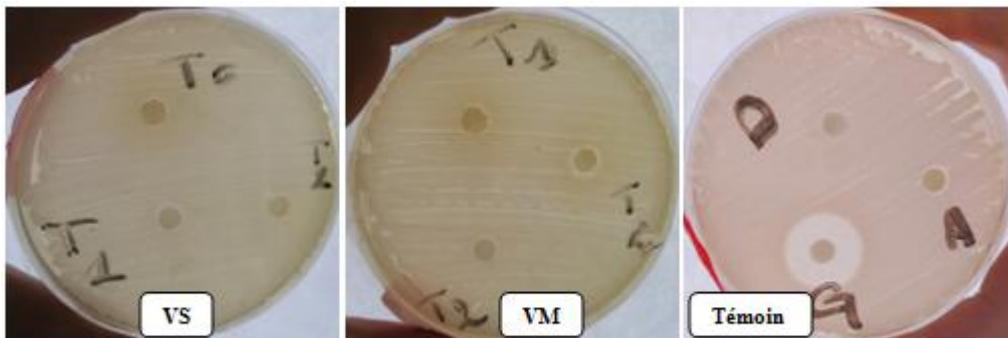


Figure 51 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Klebsiella pneumoniae*

B. subtilis a montré une sensibilité aux extraits des épluchures de la variété VM avec la concentration 100%. La zone d'inhibition la plus importante est enregistrée avec la concentration 100% VM avec une zone de 8.48 ± 1.04 mm, une résistance est signalée avec le reste des extraits **Figure 46**.

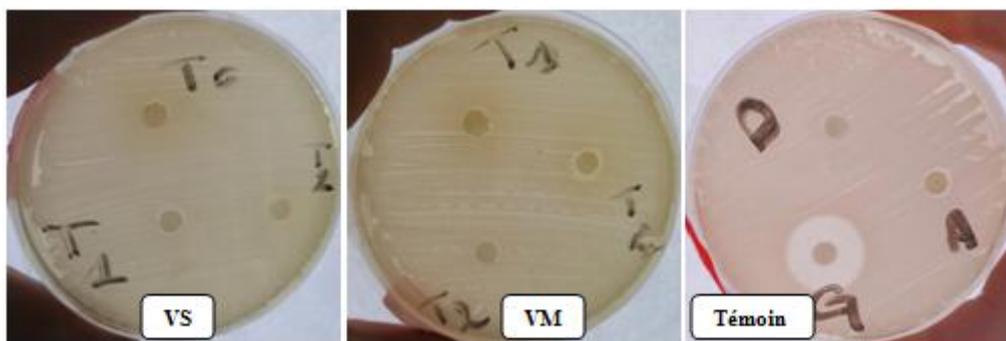


Figure 52 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Bacillus subtilis*

Pour la souche de *E. coli*, les trois concentrations des extraits des épluchures des deux variétés (VS et VM), n'ont aucun pouvoir antibactérien (**Figure 47**).

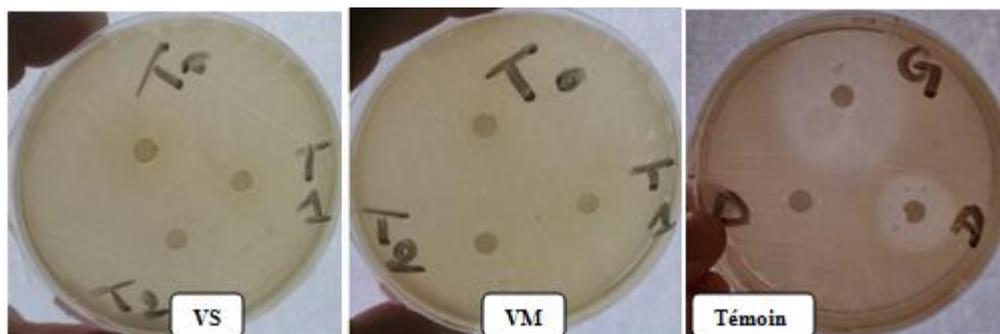


Figure 53 : Pouvoir antibactérien des extraits d'épluchures des deux variétés d'orange amère et le témoin avec *Escherichia coli*

- **Discussion**

L'action antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour de disque. On remarque que le diamètre de la zone d'inhibition diffère selon les organes de *Citrus aurantium*(feuilles, rameaux ou épluchure) la concentration appliquée et le type de bactérie testée.

Une étude réalisée par **Boukef et al. (2022)** sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'orange amère contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*, les résultats des tests de diffusion sur disque ont révélé des zones d'inhibition mesurant respectivement 18 mm, 15 mm, 17 mm et 20 mm pour les extraits éthanoliques. Ces résultats mettent en évidence une forte activité antibactérienne des extraits, Nos extraits ont montre une zone d'inhibition moins importante à celle de (**Boukef et al., 2022**) pour les deux variétés VS et VM. Dans autres études effectuées par **Boukhris et al., (2023)**, les extraits des rameaux d'orange amère ont produit des zones d'inhibition significatives contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*. les résultats ont révélé des diamètres d'inhibition respectifs de 18 mm, 16 mm, 17 mm et 19 mm pour les extraits éthanoliques, démontrant une efficacité notable contre ces pathogènes. Ces résultats sont supérieur à nos résultats

Pour l'effet antibactérien des épluchures, l'étude réalisée par **Zhang et al. (2023)** a examiné l'activité antibactérienne des extraits d'épluchures d'orange amère contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*. Les tests de diffusion sur disque ont révélé des zones d'inhibition de 10 mm pour *Escherichia coli*, 9 mm pour *Pseudomonas aeruginosa*, 11 mm pour *Klebsiella pneumoniae* et 8 mm pour *Bacillus subtilis*. Ces résultats sont proches a nos résultats des deux variétés VS et VM.

Néanmoins, il est toujours possible que l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue l'activité intrinsèque de telle manière que dans ce cas le résultat n'a qu'une valeur relative (**Balansard, 2007**).

Les composés phénoliques issus de l'orange amère (*Citrus aurantium*) ont démontré des effets antimicrobiens significatifs. Ces composés bioactifs, incluant principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques, possèdent des propriétés antibactériennes notables. Ces effets sont principalement attribués à la capacité des composés phénoliques à perturber les membranes cellulaires des bactéries et à inhiber la synthèse des protéines et des acides nucléiques (**Ghasemi et al. 2020**).

Les effets antimicrobiens de l'orange amère (*Citrus aurantium*) ont été largement étudiés en raison de la présence de divers composés bioactifs dans ses différentes parties, y compris les épiluchures, les feuilles et les rameaux. Une étude récente de **Boukhris et al. (2020)** a démontré que les extraits d'orange amère possèdent des propriétés antibactériennes significatives contre plusieurs souches de bactéries pathogènes, y compris *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces propriétés sont attribuées principalement aux flavonoïdes présents dans l'orange amère. De plus, les flavonoïdes tels que la naringénine et l'hespéridine contribuent à cette activité en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec la synthèse des acides nucléiques.

La raison de la sensibilité et de la résistance des bactéries est liée à la nature de leur membrane externe. Les bactéries à Gram⁻ possèdent une membrane externe composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, qui forme une barrière sélective contre les solutions lipophiles. En revanche, les bactéries à Gram⁺, n'ayant qu'une seule couche externe de peptidoglycane, sont généralement plus sensibles car cette couche ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace (**Nikaido, 2003**).

4. Activité antioxydante

4.1 Neutralisation du radical DPPH

Le test au 2,2-diphényle-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est l'un des substrats les plus couramment utilisés pour l'évaluation rapide de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité et la simplicité du dosage (Bozin et al., 2008).

L'activité anti-radicalaire des extraits du *Citrus aurantium* (Feuilles, rameaux et épluchure) vis-à-vis de ce radical a été évaluée par spectrophotomètre à 517 nm après 30 min et 45 min d'incubation à l'obscurité. Et nous avons testé une gamme de concentrations pour chaque échantillon.

Les résultats obtenus (Annexe III) ont permis de tracer des courbes qui expriment le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de nos extraits après incubation 30 et 40 min à l'obscurité, et qui sont représentées dans les Figures 48 et 49.

a) Détermination du pourcentage d'inhibition après 30min d'incubation

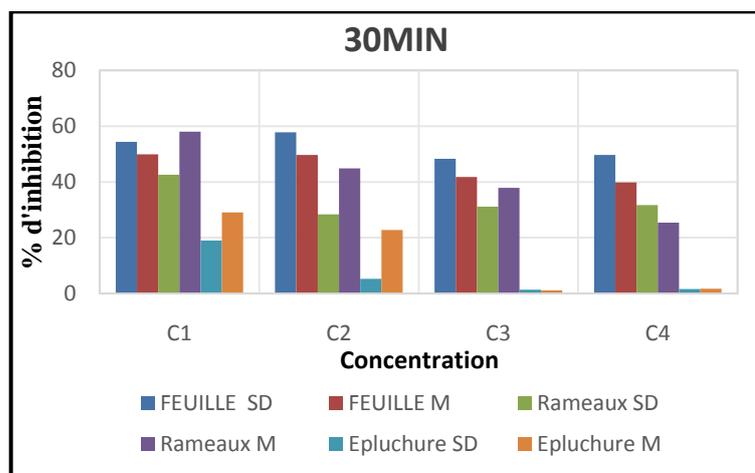


Figure 54 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des différents extraits en fonction de concentration des deux variétés VS et VM.

Tout d'abord, concernant les feuilles, nous remarquons que le pourcentage de l'activité inhibitrice du radical libre DPPH le plus élevée est signalé avec la concentration C2 de la variété VS avec une valeur de $57,82 \pm 0,08$ %, tandis que le reste des valeurs de l'activité inhibitrice de radical libre DPPH des deux variétés. Les concentrations C1 C3 et C4 varient entre $39,89 \pm 0,05$ et $54,37 \pm 0,06$ % respectivement.

Pour les rameaux le pourcentage de l'activité inhibitrice du radical libre DPPH la plus élevée est signalé avec la concentration C₁ de la variété VM et avec une valeur de $58,05 \pm 0,14$

%, pour le reste des concentrations nous avons enregistré des pourcentages d'activités inhibitrices entre $25,40 \pm 0,02$ et $44,83 \pm 0,06\%$, pour les deux variétés.

Concernant l'épluchure, elles s'avèrent que le pourcentage de l'activité inhibitrice du radical libre DPPH la plus important est signalé avec la C₁ de la variété VM avec une valeur de $29,08 \pm 0,02$. En ce qui concerne le reste des valeurs le pourcentage de l'activité inhibitrice des deux variétés varient entre $1,15 \pm 0,01$ et $22,76 \pm 0,04 \%$.

b) Détermination du pourcentage d'inhibition après 45 min

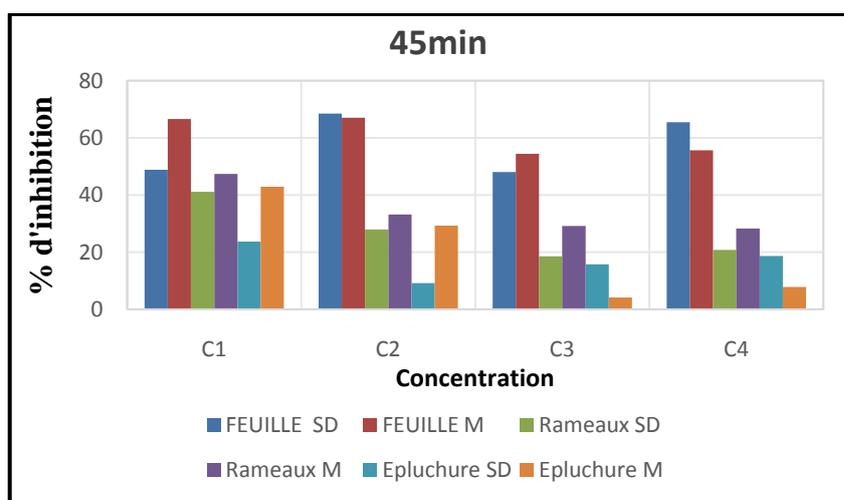


Figure 55 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits en fonction de concentration des deux variétés (VS et VM).

Après 45 min d'incubation, l'extrait des feuilles a montré l'activité inhibitrice du radical libre DPPH la plus élevée avec la VS la concentration C₂avec une valeur de $68,51 \pm 0,06 \%$, et pour les autres valeurs d'activité inhibitrice de radial libre DPPH des deux variétés varient entre $48,05 \pm 0,06$ et $67,01 \pm 0,07 \%$.

Concernant les rameaux, elles s'avèrent que l'activité inhibitrice du radical libre DPPH la plus important avec la concentration C₁de la VM après 45 min d'incubation avec une valeur de $47,36 \pm 0,06$, et En ce qui concerne le reste des valeurs d'inhibition des deux variétés, et elles varient entre $18,51 \pm 0,02$ et $41,15 \pm 0,05 \%$.

L'épluchure a montré, une activité inhibitrice du radical libre DPPH, la plus importante est de la VM avec la concentration C₁ avec la valeur de $42,87 \pm 0,02$.

c) Détermination de la moyenne concentration inhibitrice

Nous avons déterminé pour chaque extrait la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH (la valeur IC_{50}). Selon **Mezouar et al. (2014)** et **Lagha-Benamrouche (2018)**, la capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC_{50} est petite.

À partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans **Annexe VI**, nous avons calculé les IC_{50} des extraits du *Citrus aurantium* (feuilles, rameaux et épluchures) après 30 min et 45 min d'incubation à l'obscurité, qui sont représentées dans le **Tableau 9**

Tableau 9 : Pourcentages d'inhibition IC_{50} % des extraits après 30 et 45 min d'incubation (feuilles, rameaux et épluchures)

		IC50% de la VS (mg/ml)	IC50% de la VM (mg/ml)	BHA
30min	Feuilles	3.56	1.26	0,36
	Rameaux	3.08	1.69	
	Epluchures	8.43	1.00	
45 min	Feuilles	4.89	0.11	
	Rameaux	0.75	0.02	
	Epluchures	3.60	0.20	

On remarque que presque la plupart des extraits éthanolique des échantillons étudiés possèdent une activité antioxydante et ils sont capables de piéger le radical DPPH. La valeur d' IC_{50} est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, comme elle exprime la quantité de l'antioxydant nécessaire pour diminuer 50% de la concentration du radical. Plus IC_{50} est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (**Villaño et al., 2007**). Comme le montre le Tableaux (**08**), les valeurs de IC_{50} sont extrêmement diverses, Les extraits éthanolique les moins efficaces sont ceux des valeurs d' IC_{50} , qui sont plus élevées chez VS avec les trois organes et les deux temps d'incubation, elles varient de (4.89 g/ml à 0.75 g/ml). Les fractions éthanolique des trois organes de la variété VM étaient les plus efficaces pour le temp d'incubation 45 min (0.02g/ml ,0.11g/ml,0.20g/ml) respectivement pour les rameaux feuilles et épluchures. En comparant le pouvoir antioxydant des deux variétés avec

BHA on peut classer les organes de la variété VM parmi les antioxydants les plus importants vus que l'IC₅₀ de BHA (0,36 g/ml).

- **Discussion**

Lagha-Benamrouche et Madani, (2013) ont montré que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH des épiluchures du bigaradier est de 88% et celui de ces feuilles est de 99,5%. Ces résultats sont nettement supérieurs à celle obtenue dans la présente étude. En comparant les résultats obtenus à partir des extraits des feuilles de notre étude à ceux obtenus par d'autres espèces de Citrus, comme le *Citrus limettioides* (Limbanimbu) (59,85 %) **Janoti et al. (2014)**, il est évident presque le même résultat avec l'activité inhibitrice du radical libre DPPH des feuilles de la variété de Sidi Merouane avec une valeur de 57,82 ± 0,08 %.

Par ailleurs, l'étude d'**Al-Juhaimi, (2014)** réalisée sur les extraits d'épluchure des différents agrumes, présentait un potentiel antioxydant modéré à savoir 46,98% ; 67,58% ; 68,57% pour le citron, oranges, mandarines respectivement restent relativement supérieurs à nos résultats.

Une étude menée par **Boukef et al. (2014)** a évalué l'activité inhibitrice du radical libre DPPH des rameaux, avec un pourcentage d'inhibition du radical DPPH atteignant 85%. Cette haute capacité d'inhibition est nettement élevée de nos résultats.

La neutralisation du radical DPPH par les extraits des différentes parties d'agrumes a été attribuée, par plusieurs auteurs, à la présence de composés phénoliques qui cèdent facilement des protons pour le réduire (**Tepe et al., 2007 ; Li et al., 2009 ; Nisha et al., 2009**).

L'étude de **Khettal et al., (2017)** réalisée sur l'extrait des feuilles du *C. aurantium* ont rapporté une valeur d'IC₅₀ (0,068 mg/ml), donc une activité antioxydant plus élevé que celle obtenue dans la présente étude pour les deux variétés VS et VM.

D'un autre côté, l'étude menée par **Sulaiman et al. (2020)** a déterminé que l'extrait éthanolique des rameaux d'orange amère avait une IC₅₀ de 0.15 µg/mL. Ces résultats sont inférieur à nos résultats 0.02mg/ml

Par ailleurs une étude récente menée par **Boukhatem et al. (2020)** a déterminé que l'extrait éthanolique des épluchures d'orange amère avait une IC_{50} de 0.045 mg/mL. Cette valeur révèle une activité antioxydante élevée, par contre les résultats obtenus de l'activité antioxydante d'épluchure des deux variétés VS VM sont plus faible.

On peut dire que, l'effet antioxydant d'un extrait se diffère aussi selon les différentes concentrations des extraits (**Wang et Mazza., 2002**), Ce mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydante (**Kouri et al., 2007**). En rapport avec la richesse de l'extrait en composés polaires comportant, dans leur structure, des groupements OH qui jouent un rôle primordial dans l'activité antioxydant en tant que donneur d'hydrogène (**Rincon et al., 2005**).

En plus, la variation dans les résultats pourrait s'expliquer par la différence de réactivité des extraits due à leur complexité chimique, la variation des polarités des extraits étroitement liées aux différentes procédures adoptées pour l'extraction du matériel végétal, les conditions expérimentales et le protocole expérimental utilisé ainsi que les facteurs liés à la croissance de l'espèce végétale elle-même (région de récolte, climat et stade de maturité) (**Mouffouk, 2019**) ou biologiques tels que : la lumière, les précipitations, la saison, type de sols, le patrimoine génétique (**El-Haoud et al., 2018**).

Conclusion

Conclusion

La présente étude est consacrée aux analyse phytochimiques, et à l'évaluation de l'activité antioxydante (Neutralisation du radical DPPH) et l'activité antibactérienne des extraits de différentes parties (feuilles, rameaux et épluchures) des deux variétés de *Citrus aurantium* cultivée dans deux région (Sidi Merouane et Mila), en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

Le rendement le plus important est signalé chez les épluchures, des teneurs élève en polyphénols (39.12% / 37.20%) respectivement pour le bigaradier VS et VM.

L'analyse qualitative des extraits, réalisée à l'aide de tests phytochimiques, a révélé la présence de plusieurs familles de composés naturelles à savoir les substances phénoliques et les flavonoïdes, les tanins, les triterpènes et stéroïdes, les glycosides, les quinones libres les anthraquinones et l'absence des saponines, les alcaloïdes et les anthocyanes. Ces substances sont généralement responsables de l'activité biologique des extraits.

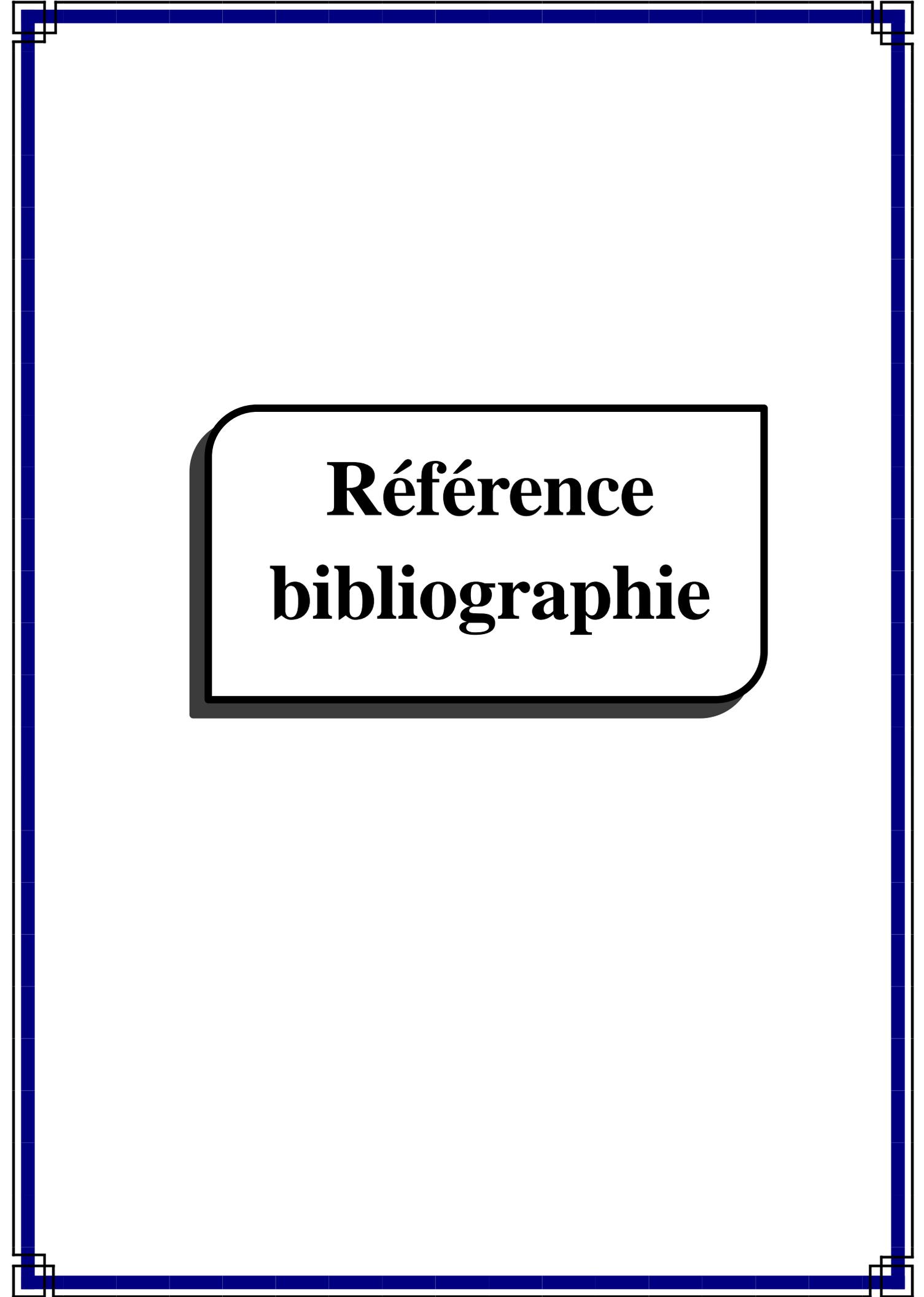
Les différents extraits des différentes parties de l'orange amère étudiée présentent différents pouvoir réducteur. L'activité inhibitrice du radical libre DPPH la plus élevée et pour les feuilles de la variété VS avec une valeur de $57,82 \pm 0,08$ % à la concentration C_2 après 30 min d'incubation. Nous avons déterminé pour chaque extrait la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH, les valeurs de EC_{50} sont extrêmement diverses, Les extraits éthanolique les moins efficaces sont ceux des valeurs d' EC_{50} , qui sont plus élevées chez VS avec les trois organes et les deux temps d'incubation, elles varient de (4.89 g/ml à 0.75 g/ml). Les fractions éthanolique des trois organes de la variété VM étaient les plus efficaces pour le temp d'incubation 45 min (0.02g/ml ,0.11g/ml,0.20g/ml) respectivement

L'activité antibactérienne des extraits étudiés ont montré que les bactéries : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis* présentent une sensibilité vis-à-vis des extraits des deux variétés VS et VM, les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 6.43 mm et 12.95mm, sachant que la meilleure activité est présentée par l'extrait des rameaux contre *Pseudomonas aeruginosa*, alors que *E.coli* et présente une résistance avec tous les extraits étudiés des deux variétés

L'orange amère (*Citrus aurantium*) présente des activités biologiques et thérapeutiques variables selon la nature des substances renfermées, pour cela il est intéressant de compléter cette étude par :

Conclusion

- Analyser l'impact d'autres techniques d'extraction des polyphénols et d'autres types de solvants.
- Utiliser des techniques chromatographiques, pour identifier les principes actifs de cette espèce.
- Evaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de cette plante.
- Tester d'autre activités biologiques.



**Référence
bibliographie**

Reference bibliographie

A

Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, et al., 2007. Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 71 .P 1306-1312.

Abderrazak M et Joël R, 2007. La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. P177.

Abeyasinghe D.C., Li X., Sun Ch.D. Zhang W.S., Zhou Ch. H. et Chen K.S. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4) : 1338-1344.

Achat, S., 2014. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia, Algérie. p. 17, 22.

Akroum S. 2011. Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.

Ali, S., Khan, M. A., & Ahmad, M. 2022. "Phytochemical Composition and Biological Activities of *Citrus aurantium* L. Leaves : A Comprehensive Study". *Journal of Herbal Medicine*, 30, 100510, 78-80

Al-Juhaimi, F. Y. 2014. Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pak. J. Bot.*, 2014. 46(4) : 1459-1462.

Almeida, J. R. G. S., Silva, J. R. A., & Araújo, E. D. 2022. "Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of *Citrus aurantium* L. Peel Extract" *.Journal of Food Science and Technology*, 59(2), 210-220.

B

Badiaga M, 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activité biologique de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale Africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat en chimie organique. Univ. Bamako (Mali) : P13.

Balasundram, N., Sundram, K., et Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1) : 191-203.

Bauer A. W, Kirby W. M, Sheris J. C. an Turck M., 1966 .Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disc method." *AM. J. Clin. Pathol* Vol 45.P493-496.

Reference bibliographie

Békro Y.A, Békroj A.M, Bouab.B, Trab F.H and Ehilé E.E., 2007. Etude ethnobotanique et Screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana*. (Bai) Herend et Zarucchi (caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat*, 4 (2) : P 217-225.

Benbrook C. M., 2005. Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *The organic center*, 6-8.

Benwqhi K, 2001. Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante *Cynodon Dactylon* L chiendent, mémoire de magister. Université d'Ouargla. P15– 17.

Berger M.M. 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydatif état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 48-53.

Betoret E., Betoret N., Carbonell J.V. et Fito P. 2008. Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of food Engineering*. Sous press. 92(1):18-23.

Böttger, S., & Melzig, M. F. 2011. Triterpenoidsaponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, 4(2) : 59-68.

Bouakaz I., 2006. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna. P 124 .

Boukef, K., Kilani-Jaziri, S., Marzouk, Z., & Bouhlel, I. 2014. Phenolic profile and biological activities of different extracts of *Citrus aurantium* L. leaves and twigs. *International Journal of Food Properties*, 17(9), 2086-2098.

Boukef, S., Landoulsi, A., & Haouari, L. 2022. Antibacterial activity of *Citrus aurantium* L. leaves extracts against clinical and foodborne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 133(2), 756-767.

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. 2020. "Phenolic content and antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. peel extracts : Evaluation of different extraction méthodes". *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 10(3), 222-232.

Boukhris, M., Jemai, H., Touati, K., & Miled, K. 2023. Antibacterial activity of *Citrus aurantium* L. twig extracts against pathogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114971.

Boukhris, T., Regane, G., Yangui, T., Sayadi, S., & Bouaziz, M. 2012. Chemical composition and biological potential of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species : Evidence for new insights in the management of oral infection. *Industrial Crops and Products*, 39, 203-208.

Reference bibliographie

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.

Bruneton J, 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3^{ème} Edition. Lavoisier, Paris, p : 199- 915-388.

C

Calabrese F, 2002. Origin and history. In : Dugo G. et Di Giacomo A. (eds.). *Citrus. The Genus Citrus*. Taylor and Francis Group, London, pp. 1-15.

Castaneda-ovando A., Pacheco-Hernández M.L., Elena Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A., Carlos Andrés Galán-Vida C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins : à review. *Food Chemistry*, 113(4) : 859–871.

Chaouch N, 2001. Etude des Alcaloïdes dans la coloquinte *colocynthisvulgaris* (L)Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (wilaya de Ouargla), mémoire de magister; Université de Ouargla. P 44.

Charles Gauthier, 2006. Glycosidation de triterpènes penta cycliques de type lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux. P21.

Charnay P, Tourmeau J. 2007. Petit Futé Guide pratique de la Dégustation. Ed. PGA, Paris. 235.

Cheik Traore M., 2006. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 72.

Chen, C-N ; Weng, M.S , WU ,C-L; Lin ,J-K. 2004. Comparison of radical scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Introduction in Human Melanoma Cells by Tawansa Propolis from Different Sources. *Ecamm*. 2:175-185.

Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M et Kim J.M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39:756-761.

Constantin P. J. 2008. Pathologies vasculaires oculaires. Rapport SFO, édition Elsevier Masson, (22) : 181.

Corder R., Mullen W., Khan N. Q., Marks S. C., Wood E. G., Carrier M. J. and Crozier A. 2006. "Oenology : Red wine procyanidins and vascular health", *Nature*, Vol.444 p. 566. Cotty J.P. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79:808-814.

Reference bibliographie

Cowan M. . 1999,"Plant products as antimicrobial agents. Chemical microbiology reviews,12(4)",P 564-582.

Cristina P., Ilonka S. et Bartek T. 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de Génie Industriel, 4 : 25-39

D

Dadashi M., Eslami G., Goudarzi H., Hashemi A., Fallah F., Dabiri H., Taheri S., Ardeshiri N.2015.Antibacterial Effects of Citrus aurantium on Bacteria Isolated from Urinary Tract Infection : 50

Daglia, M. 2011. Polyphenols as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology, 23(2), 174-181.

De la Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E.et Gonzalez-Aguilar G.A. 2009. Fruit and vegetable phytochemicals : chemistry, Nutritional value and stability .Edition John Wiley and Sons, p73.

De Rood B. M, 2003. Franssen M .C; Vander padt, A, boom, R.M. perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides. Biotechnology. Pro. p19

Del Caro A., Piga A., Vacca V. et Agabbio M. 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. Food Chemistry. 84 (1) : 99-105.

Derbel S. et Ghedira K. 2005. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Phétothérapie. 3(1) : 28-34.

E

Eberhard Teuscher ,Robert Anton ;Annelise Lobstein 2005 ;Plantes aromatique; épices ,aromates ,condiments et huiles essentielles

El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R. 2018. Screening phytochimique d'une plante médicinale :Mentha spicata L. American journal of Innovative Research and Applied Sciences, 266-233.

El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R. 2018. Screening phytochimique d'une plante médicinale :Mentha spicata L. American journal of Innovative Research and Applied Sciences, 266-233.

Reference bibliographie

El-Sayed, M., Khamis, Y., & El-Hadidy, W. 2021. "Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Citrus aurantium L. Twigs". *Journal of Medicinal Plants Studies*, 9(5), 85-90.

F. González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A. et García-Viguera, C. 2010. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 51 : 327–345.

Favier A. 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques* : 108

Flandrois, JP., 2000. Bactériologie Médicale. Coll Azay : 108.

G

Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Gratacap, M. P., Tulliez, J., Chap, H., Payraastre, B., 1999. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3-kinase. *General Pharmacology*. Volume 32. p. p. : 279-286.

Garcia, R., Martin, L., & Lopez, M. 2021. "Phytochemical Screening and Biological Activities of Citrus aurantium L. Twigs". *Journal of Plant Research*, 134(2), 240-250.

Ghasemi, K., Ghasemi, Y., & Ehteshamnia, A. 2020. Antimicrobial activity of phenolic compounds from Citrus aurantium. *Journal of Food Science and Technology*, 57(3), 973-982.

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques. Rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4) : 162-169.

Ghédira, K., & Goetz, P. 2015. Citrus aurantium L. var. amara Link. *Phytothérapie*, 13(5), 320-327.

Goodner K.L., Rouseff R.L. et Hofsommer H.J. 2001. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49 (3) : 1146-1150.

Gravot, A. 2008. Support de cours sur le métabolisme secondaire (Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV) Université de Rennes 1 – L2 UE PHR.

Guimarães R., Barros L., Barreira J. C., Sousa M. J., Carvalho A. M., et Ferreira, I. C. 2010. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits : grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1): 99-106.

Reference bibliographique

H

Hadj Sahraoui M.K. 2007. Mesures de développement des agrumes. Agriculture et développement rural durable. :70

Hamidi A, 2013. Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrumguyonianum*. Diplôme de Magister en chimie organique université kasdimerbah Ouargla.P 63-64.

Harborne J.B, 1998. *Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plantanalysis* 3e ed : Chapman and hill. P 303.

Hartmann T, 2007. From waste products to ecochemicals : Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. P2831 - 2846.

Heart T. Shears P. 2006. Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences Flammarion. :71-75.

Hininger-Favier I,2011. Biochimie, les lipides et dérivés ; Partie 4 : les composées à caractère lipidique (lipoïde). Josef Fourier (France) : P 23.

Hopkins. W.G,2003. *Physiologie végétale*. Traduction de la 2e édition, par Serge Rambour Révision scientifique de Charles-Marie Evrard, Américain p 267-283.

Houée-Levin C., Sicard-Roselli C., Bergès J. 2005. *Chimie et biochimie radicalaires*. Paris : Belin, 160.

Iserin, P.2001. Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, DorlingKindersiey Limited, Londres. 335p.

Janoti, D. S., Rana, M., & Rawat, A. K. S. 2014. Comparative antioxidant activity of essential oil of leaves of *Citrus limettioides* and *Citrus pseudolimon* of Nainital District. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 24-26.

Jean A., Jacques P. et Regine F. 2003. *La science alimentaire de A à Z* (chaire de biochimie industrielle et agroalimentaire conservatoire National des Arts et Métiers). Lavoisier, 3ème édition, 57-58.

Jean-Marie P., 2008. *La culture des agrumes*. Éd ARTEMIS, pp : 19 – 20

Judd W.S, Campbell C.S, Kellogg E.A Et Stevens P., 2002. *Botanique Systématique : une perspective phylogénétique*; Ed 1 : DEBOECK; P 84-336.

K

Reference bibliographie

Kalla A, 2012. Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sudalgérien :Pituranthosscoparius, Rantheriumadpressum et Traganumnudatum . Thèse dedoctorat en phytochimie université de Constantine .P86-87.

Khamis, Y., El-Sayed, M., & El-Hadidy, W. 2021. "Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Citrus aurantium L. Leaves".*Journal of Medicinal Plants Studies*, 9(5), 242-249.

Khan I., Shan Z.A., Saeed M. et Shan H.U. 2010. Physicochemical analysis of citrus sinensis, citrus Reticulate and citrus paradise. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 32(6) : 774-780

Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., & Maiza-Benabdeslam, F. 2017. Phenolic compounds from Citrus leaves : antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1). DOI : 10.1515/jcim-2016-0030.

Kim E.K., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.

Kim, D. k., Lee, C.Y. 2004. Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 : 253–273.

Klimczak I., Malecka M., Szlachta M. et Gliszczynska- Swiglo A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (3) : 313-322

Koehlin-Ramonotxo C. 2006. Oxygène, stress oxydant et supplimentationsantioxydantes ou un aspect different de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 (4) : 165-177.

Kouri G.,Tsimogiannis D.,Bardouki H.,etOreopoulou V.2007.Extraction and analysis of antioxidant compounds from Origanum dictamnus .*Innovative Food Science andEmergingTechnologies*8:155-162.

Kren V,2001. Martinkova, L.glycosides in medicine : “the rol of glycoside residue in biological activity”. *Curr-Med. chem.* P 1313-1338.

Reference bibliographie

Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. et Sripal R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol*, 33 (1) : 2-16.

L

Ladaniya M. S., 2008. Citrus fruit : biology, technology and evaluation. San Diego Academic, p : 198.

Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria : Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.

Lagha-Benamrouche, S., Addar, L., Boudershem, H., Tani, S., & Madani, K. 2018. Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Revue Nature et Technologie*, 10(1), 112-115.

Larry M. Bush, Charles E. 2018. Généralités sur les bactéries. LE MANUEL MSD. Version pour le grand public. (<https://www.msmanuals.com/fr>) .

Lee J., Koo N. et Min D.B. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1) : 21-33.

Leitao, G.G; Leitao,S.G ; Vilegac, W. 2002. Quick preparative separation of Natural Naphthopyranones with antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Z.Natuforsch.* 57:1051-1055.

Li H., Wang X., Li Y., Li P. et Wang H. 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112 (2) : 454-460.

Lillo C. Uunis and Peter. 2008. Nutrient depletion as key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31:787-601.

Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica. szegediensis.* 47 (1-4):119-125.(Cited in Mohammedi Z, 2005)

Lutge U, Kluge M, Bauer G., 2002. Botanique 3^{ème} Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. p 211.

M

Reference bibliographique

Macheix J. J., Fleuriet A., et Jay-Allemand C.2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques.84-86

Macheix J. J., Fleuriet A., et Sarni-Manchado P.2006. Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : « Les polyphénols en agroalimentaire ». Ed. Tec &Doc. Lavoisier : 1-26.

Manner H.I., Buker R.S., Smith.V.E., Ward .D ., et Elevitch .C.R., 2006. Citrus species (citrus), ver.2.1.In Elevitch, C.R (Ed) . Species profiles for Pacific Island Agroforestry . Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawaii150p

Manthey J.A., Guthrie N., ET Grohmann K. 2001.Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medicinal Chemistry, 8, 135-153.

Merghem, R., 2009. Elément de biochimie végétale. Bahaeddine. Constantine, Algérie. p. 171

Mezouar, D., Lahfa, F. B., Djaziri, R., &Boucherit-Otmani, Z. 2014. Évaluation de l'activité antioxydante de *Berberis vulgaris* L. Phytothérapie, 12(5), 297-301.

Mouffouk, C. 2019. Evaluation des activités biologiques et étude de la composition chimique de la plante *Scabiosas tellata* L (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).

N

Naoya K, Naotaka K.2014. Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 87, 261–270.

Nauciel. C., et Vildé J.L. 2005. Bactériologie médicale, 2èmeEd. Masson . Paris. pp : 5-10.

Nikaido, H. 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656.

Nisha P., Nazar P.A. et Jayamurthy P. 2009. A comparative study on antioxidant activities of defferent varieties of *Solanum melongena*. Food and Chemical Toxicology, 47 (10) : 2640- 2644.

O

Oloyede OI, 2005. Chemical profile of UnripePulp of Caricapapaya. Pak J Nutr; 4.P379 - 381.

Reference bibliographie

Ortuno A., Baidez A., Gomez P., Arcas M.C., Porrás I., Garcia-Lidon A. et Del Rio J.A. 2006. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids. Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*. 98 (2) : 351-358.

P

Pastre J., Priymenko N. 2007. Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Médecine Vétérinaire* 1(4) :180-189.

Pelli K. et Lyly M. 2003. Les antioxydants dans l'alimentation. Ed. INRA, 4-17.

Percival S.L. 2004. Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston : 480.

Q

Quiñones M., Miguel M. and Aleixandre A. 2013. "Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease", *Pharmacological Research*, Vol.68 n°1, p. 125-131.

R

Rapisarda P., Lo Bianco M., Pannuzzo P. et Timpanaro N. 2008. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* L. Osbeck]. *Postharvest Biology and Technology*, 49 (3) : 348-354.

Rincon A.M., Vasquez A.M., Sadille F.C. 2005. Chemical composition and bioactive compounds of peel of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela; *Arch Latinoam Nutr*; 55(3) : 305-310.

S

Santos, M. C., Silva, E. M., & Pereira, A. 2023. "Phytochemical Composition and Biological Activities of *Citrus aurantium* L. Peels". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(2), 75-85.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier Tec et Doc (ed). Sciences et techniques agro-al .61-377.

Socaciu, C. (Ed.). 2007. Food colorants : chemical and functional properties. CRC Press.

Sophie, A., Eherhart, N. 2003. La phytothérapie et soigner par les plantes. Ed. Eyrolles.

Soualeh, N., & Soulimani, R. 2016. Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1), 44-57.

Reference bibliographie

Stahl W. et Sies H. 2003.Antioxydant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (6) : 345-351.

Sulaiman, C. T., Balachandran, I., & George, S. 2020. "Evaluation of antioxidant properties of Citrus aurantium twig extracts". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(3), 1150-1154.

T

Tanguy M. et Begué-Simon A.M. 2009.Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation .*Médecine*, 5 (6):256-260.

Tapiero H, Tew K.D, Nguyen B.G et Mathé G., 2002. Polyphenol do they play a rôle in the prevention, of the human pathologies, *Biomed.pharmacother*, 56 : p200- 207. (cited in Djemai Zoueglache S., *Techniques et documentations*. Paris . P 227-494.

Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat H.A. et Aydin E. 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *Verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *Amaciaca* (Freyen & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100 (3) : 985-989.

Tounsi, M. S., Ouerghemmi, I., & Zarrad, K. (2022). "Phytochemical Composition and Biological Activities of Citrus aurantium L. Twigs". *Journal of Natural Products*, 85(2), 195-205.

Trease E et Evans W.C, 1987. *PharmacognosyBilliaire*. Ed. Tindall London. 13 : P61-62.

Trease G.E et Evans W.C, 1989. A textbook of Pharmacognosy (13th edition) BacilluereTinal Ltd, London.

Tripoli E., La Gardia M., Giammanco S., Di Majo D. et Giammanco M. 2007.Citrus flavonoids : Molecular structure, biological activity and nutritional proprieties. A review. *Food Chemistry*, 104 (2) : 466-479.

U

Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G., et Wegrzyn, G. 2008.Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol*, 184 (5), 271 –278.

Usman, H., Abdulrahman, F. I., & Usman, A. (2009). Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 6(3);112.

Reference bibliographie

Virbei-Alonso C., 2011. Citron et autre agrumes ; un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé, votre beauté. Groupe Eyrolles, paris, 220p.

W

Wagner H et Bladt S, 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas EdSpringer, New-York. P 320.

Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. 2011. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. CRC Press.

Wang J., Mazza G 2002 .Effect of Anthcyanins and other phenolic compounds on the production of Tumor Necrosis Factors α in LPS/IFN- γ -Activated RAW.264.7.Macrophages. *J. Agric.Food. Chem.*50.4183-4189.

Wang Y.C., Chuang Y.C. et Hsu H.W. 2008.The flavonoid,, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106 (1) : 277-284.

Wichtl M et Anton R.2009. Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, Systematics and Ecology 3, 255-260

X

Xu G., Liu D., Chen J., Ye X., Ma Y. et Shi J. 2008.Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106 (2) : 545-551.

Y

Younsi Y, Meledjem S, Naidja K., 2010.Extraction et évaluation expérimentale in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de quelques plantes médicinales. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme des Etudes supérieures en Biologie. Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Jijel, P29.

Z

Zhang, L., Cheng, Y., & He, W. 2021. "Phytochemical Analysis and Biological Activities of Citrus aurantium L. Leaves". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 192, 113675, 120-130.

Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., & Chen, Y. 2023.Antibacterial activity of Citrus aurantium peel extracts against common bacterial pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 60(2), 398-405.

ANNEXE

Annexe

Annexe I : Matériel de laboratoire

Tableaux I : le matériel de laboratoire

Les verreries	solvants
<ul style="list-style-type: none">- Pipettes- Micro pipette- Boites de pétries- Tubes à visse- Flacons (250 ml)- Erlenmeyer- Bécher- Spatule- Pipettes pasteur- Anse de platine- Entonnoir- Papier Whatmann	<ul style="list-style-type: none">- Ethanol (EtOH)- diméthyl sulfoxyde (DMSO)- L'eau distillée- Acide chlorhydrique(HCl)- Hydroxyde de sodium (NaOH)- Chloroforme- Chlorure de fer (FeCl₃)- Hydroxyde l'ammonium (NH₄OH)- Acide sulfurique (H₂SO₄)

➤ Réactifs utilisé

- Réactif de Wagner

Ce réactif est composé d'un mélange de 1.27 g d'Iode et 2.0 g d'Iodure de potassium dissout dans 75 ml d'eau distillée. Ce mélange est jaugé jusqu'à l'obtention de 100 ml de la solution.

- Réactif de Liqueur de Fehling

- ✓ **Solution A :** CuSO₄, 5H₂O 35g puis ajouter H₂SO₄ 5ml et compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée
- ✓ **Solution B :** Tartrate double de Na et K 200g, les dissoudre dans de la Lessive de soude 375ml, et compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée.

Annexe

➤ Les Appareillage



Autoclave



Spectrophotomètre



Etuve



Micro onde



Bac benzène



Plaque chauffante avec
Agitation



Rotavapeur



vortex



Bain marie

Annexe



PH mètre



Agitateur



Balance de précision



Chambre UV

Annex

Annexe III : Résultats

Tableau 2 : Résultats des tests phytochimiques effectués sur les extraits hydro-éthanolique des fruits feuilles et rameaux de *Citrus aurantium* .L pour la variété de Sidi Merouane.

Organes tests	Feuilles	Rameaux	Epluchure
Substances polyphénoliques	++	++	++
Saponines	-	-	-
Tanins	++	++	++
Anthocyanes	-	-	-
Triterpènes et stéroïdes	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-
Glycosides	++	++	++
Coumarines	-	-	-
Quinones libres	-	++	++
Anthraquinones	+	+	+
Flavonoïdes	+++	+++	+++

Tableau 3 : Résultats des tests phytochimiques effectués sur les extraits hydro-éthanolique des fruits feuilles et rameaux de *Citrus aurantium* .L pour la variété de Mila.

Organes tests	Feuilles	Rameaux	Epluchure
Substances polyphénoliques	+++	+++	++
Saponines	-	-	-
Tanins	+++	+++	+++
Anthocyanes	-	-	-
Triterpènes et stéroïdes	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-
Glycosides	++	+++	++
Coumarines	-	-	-
Quinones libres	-	+++	+++
Anthraquinones	+	+	+
Flavonoïdes	+++	+++	+++

Annex

Tableau 4 : Résultats de l'activité antioxydante du radical DPPH des extraits étudiés après incubation 30 min (extraits des feuilles, épluchure et rameaux) de *Citrus aurantium* .L des deux variétés (Sidi Merouane et Mila).

	C1	C2	C3	C4
Feuille SD	54,37 ± 0,06	57,82 ± 0,08	48,28 ± 0,08	49,66 ± 0,10
Feuille M	49,89 ± 0,04	49,66 ± 0,03	41,72 ± 0,01	39,89 ± 0,05
Rameaux SD	42,53 ± 0,04	28,39 ± 0,05	31,15 ± 0,02	31,72 ± 0,04
Rameaux M	58,05 ± 0,14	44,83 ± 0,06	37,93 ± 0,02	25,40 ± 0,02
Epluchure SD	18,97 ± 0,07	5,29 ± 0,05	1,38 ± 0,03	1,61 ± 0,03
Epluchure M	29,08 ± 0,02	22,76 ± 0,04	1,15 ± 0,01	1,72 ± 0,01

Tableau 5 : Résultats de l'activité antioxydante du radical DPPH des extraits étudiés après incubation 45 min (extraits des feuilles, épluchure et rameaux) de *Citrus aurantium* .L des deux variétés (Sidi Merouane et Mila).

	C1	C2	C3	C4
Feuille SD	48,85 ± 0,04	68,51 ± 0,06	48,05 ± 0,06	65,52 ± 0,04
Feuille M	66,55 ± 0,07	67,01 ± 0,07	54,37 ± 0,03	55,63 ± 0,04
Rameaux SD	41,15 ± 0,05	27,93 ± 0,03	18,51 ± 0,02	20,80 ± 0,02
Rameaux M	47,36 ± 0,06	33,22 ± 0,02	29,20 ± 0,02	28,28 ± 0,01
Epluchure SD	23,68 ± 0,06	9,20 ± 0,02	15,75 ± 0,04	18,62 ± 0,03
Epluchure M	42,87 ± 0,02	29,31 ± 0,05	4,14 ± 0,02	7,82 ± 0,05

Annex

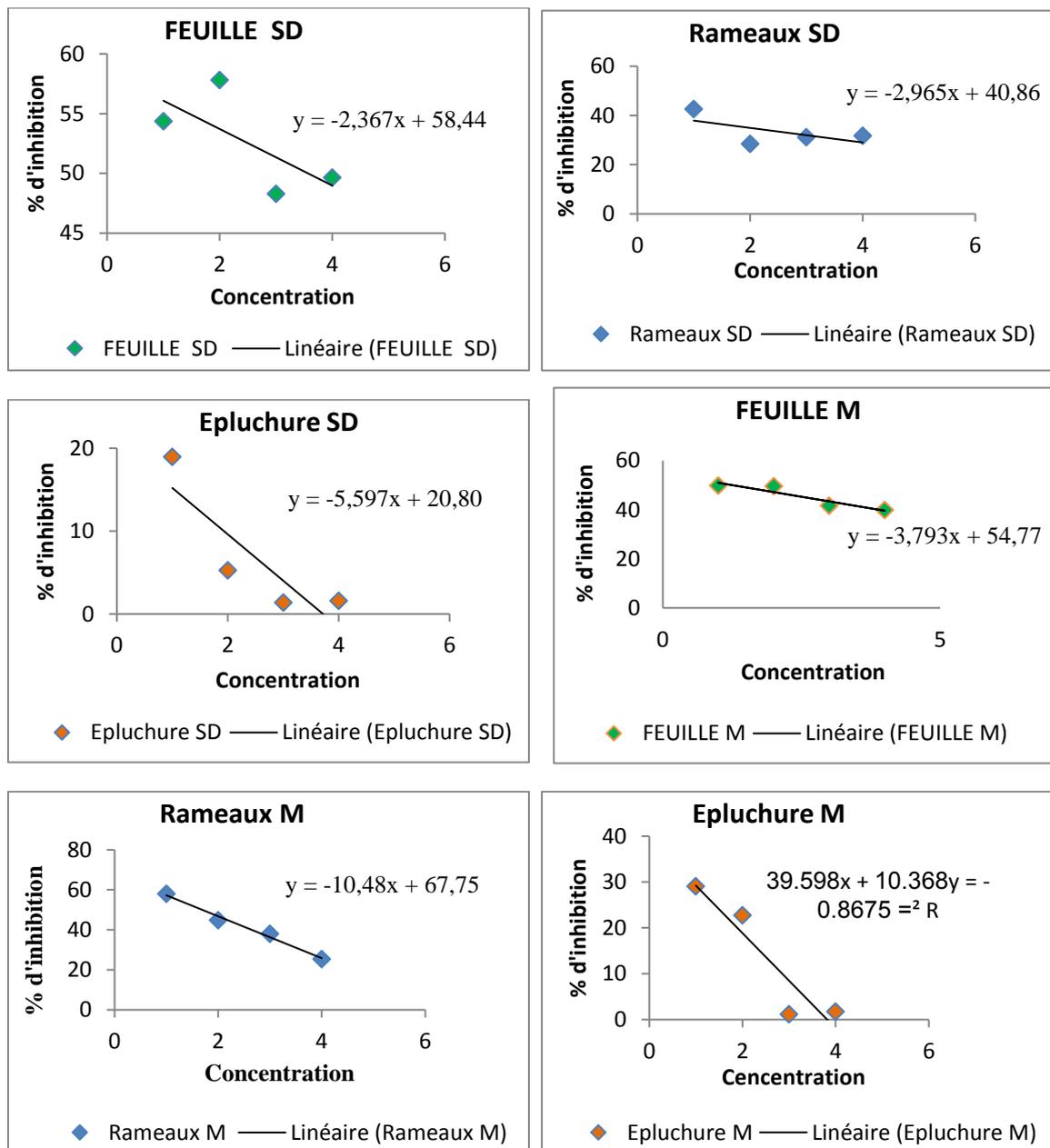


Figure 01 : Courbes étalonnage des pourcentages d'inhibition pour la variété de Sidi Merouane et de Mila, après 30 min d'incubation.

Annex

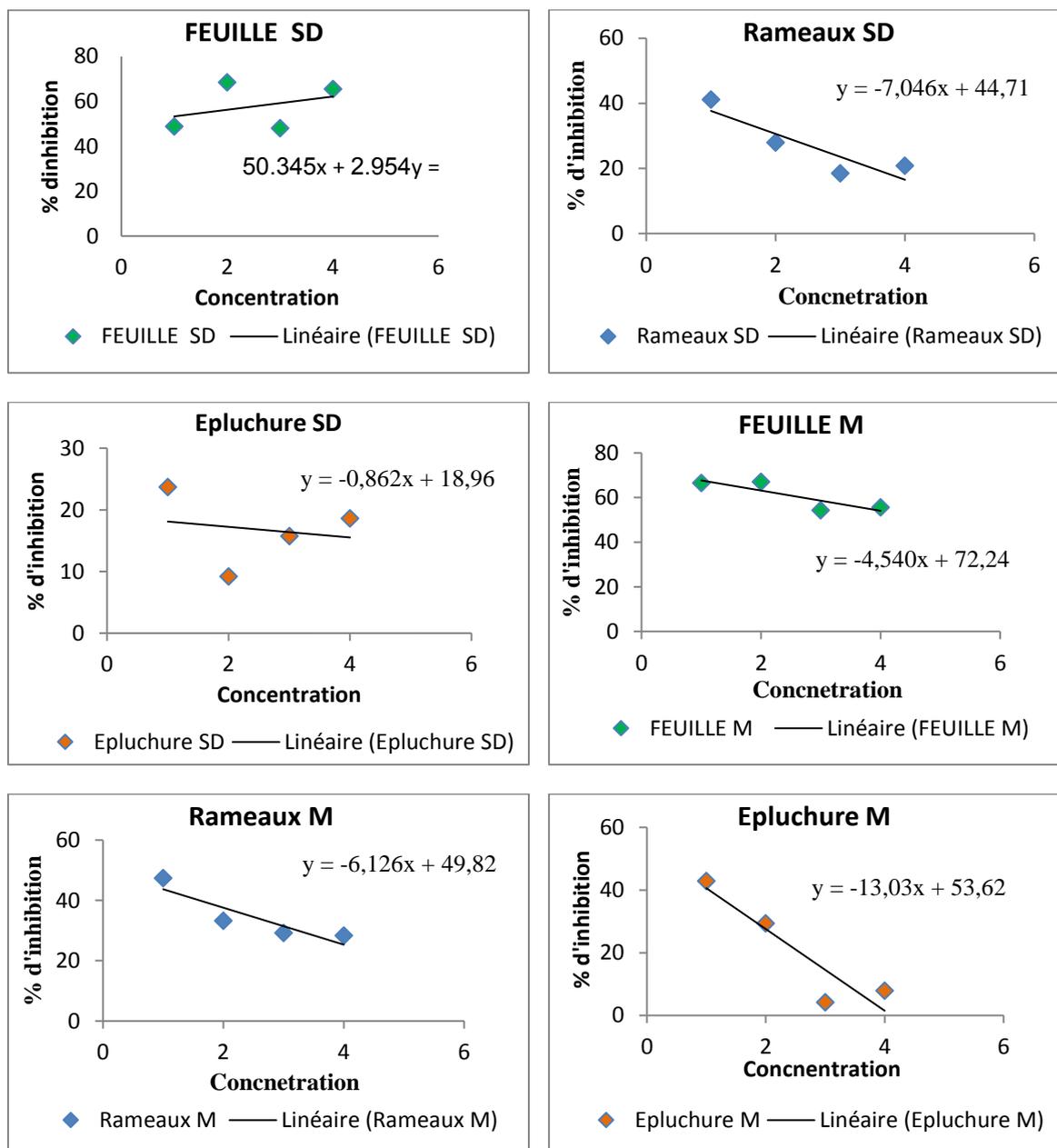


Figure 02 : Courbes étalonnage des pourcentages d'inhibition pour la variété de Sidi Merouane et de Mila, après 45 min d'incubation.

Année Universitaire : 2023/2024

Boutouatou Mohammed El Hadi,
Boumlih Asma

Activité biologique de Bigaradier

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et l'évaluation des activités (antioxydantes, antibactériennes) des feuilles, rameaux et épluchure de l'orange amère.

Le rendement le plus important est signalé avec les épluchures de la variété VS avec une teneur de (39.12%) .

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des polyphénols, tanine, triterpène et stéroïde, sucres réducteurs, quinone libre, anthraquinones et flavonoïdes.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par la méthode de la neutralisation de radical DPPH. L'ensemble des extraits présentent différentes activités. Les fractions éthanolique des trois organes de la variété VM étaient les plus efficaces pour le temps d'incubation 45 min IC_{50} (0.02g/ml ,0.11g/ml,0.20g/ml) respectivement

Alors que les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de l'orange amère montrent que ce fruit peut inhiber la croissance de quatre germes microbiens à savoir : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus subtilis*, la meilleure activité est enregistrée par l'extrait des rameaux contre *P .aeruginosa* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 12.95 ± 1.75 mm.

Mots clés : Bigarade, *Citrus aurantium*, Screening phytochimique, Polyphénols, , Activité antioxydante, activité antibactérienne

Devant le jury:

Président

Pr. YAHIA A.

Prof

Centre Universitaire de Mila.

Examinatrice

Dr. BELDI H.

MAA

Centre Universitaire de Mila.

Encadreur

Dr. Himour S.

MCB

Centre Universitaire de Mila.