



République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de  
l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique Université

ABDERRAHMANE MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

## *Mémoire de Master*

**Filière :** Biologie

**Option :** Pharmacologie moléculaire

### *Thème*

*Activités antioxydant et antibactérienne  
des polyphenols des feuilles de Citrus  
reticulata blanco (mandarine)*

*Présente par :*

*M<sup>elle</sup> : HACHEMAOUI Kamila*

*M<sup>elle</sup> : OUMBICHE Nadia*

*Membre de jury :*

*Président : M<sup>me</sup> KHAMTACHE S. M.A.A. (UAMB)*

*Promotrice : M<sup>me</sup> BEDJOU F. M.C.A. (UAMB)*

*Examinatrice : M<sup>lle</sup> ADRAR S. M.A.B. (UAMB)*

*Examineur : M<sup>r</sup> HARFI TS. M.A.B. (UAMB)*

*Année : 2012/2013*





## *Remerciements*



*Nous remercions Dieu, le tout puissant de nous avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre gratitude et remerciement à notre promotrice M<sup>m</sup> BEDJOU F. pour avoir accepté de nous encadrer, pour orientation et ces conseil qu'elle nous a prodigué tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à présenter nos remerciements à M<sup>lle</sup> MENACERI Mariam, pour son aide, ces encouragements et ces conseils. Nous remercions chaleureusement les membres de jury :*

*M<sup>me</sup> KHAMTACHE S., M<sup>lle</sup> ADRAR S. et M<sup>r</sup> HARFI J.S. Pour l'intérêt qu'ils ont manifesté envers notre travail en acceptant de l'évaluer.*

*Nos profonds remerciements s'adressent également a tous ceux travaillent au laboratoire de biologie moléculaire en particulier:*

*M<sup>lle</sup> ADRRAR, M<sup>r</sup> BRJBI qui nous on tendus la main.*

*Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.*



## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir ou tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur port : mes très chère parents qui m'ont soutenu et encouragé durant tout le long de ma vie.*

*Mes très chère sœurs Ouahiba, Khalida et mon petit frère Mourad que j'adore.*

*Mes chères amies : Siham, Katia, Razika*

*A toute la promotion de MASFER en Pharmacologie moléculaire.*

*A ma chère binôme, copine et amie avec qui j'ai partagé le travail, ainsi pour tous les membres de sa famille.*

*Nadia*





## *Dédicaces*

*Avant tout je remercie Dieu tout puissant, qui m'a donné, la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.*

*A mes chers parents, merci de m'avoir toujours soutenu durant tout le long de ma vie, pendant les bons moments et les plus difficiles, merci de m'avoir toujours encouragé et cru en moi et merci pour tout ce que vous m'avez appris et apporté.*

*A ma chère Sœur Sabrina*

*A mes chères frères : Achour, Abderahim, Sid-Ali et aux autres membres de ma famille.*

*A Ma cher binôme Nadia et tous les membres de sa famille.*

*A tous mes amis et à toute la promotion de MASTER en Pharmacologie moléculaire.*

*Enfin le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui ont participé à sa réalisation et aux quelles j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements.*

*Kamila*



# SOMMAIRE

Liste des figures Liste  
des tableaux Liste des  
abréviations

Introduction.....1

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Généralités sur les agrumes

1. Généralités .....	3
2. Le genre <i>Citrus</i> .....	3
3. Origine des fruits du genre <i>Citrus</i> .....	4
4. Propriétés thérapeutiques des fruits du genre <i>Citrus</i> .....	4
5. <i>Citrus reticulata blanco</i> .....	5
5.1. Classification botanique.....	5
5.2. Composition chimique de la mandarine.....	5

### Chapitre II : Activité antioxydant des composés phénoliques

1. Définition.....	7
2. Mécanisme d'action.....	7
3. Systèmes de défenses antioxydants.....	7
3.1. Système enzymatique.....	7
3.2. Système non enzymatique.....	7
3.2.1. Les composés phénoliques comme antioxydant .....	8
a. Les principales classes de composés phénoliques.....	8
b. Les activités antioxydants des composés phénoliques.....	9

### Chapitre III : Activité antibactérienne des composés phénoliques

1. Activité antibactérienne .....	12
2. Les principales substances antibactériennes.....	12

2.1. Les antibiotiques.....	12
2.2. Les composés phénoliques .....	12
<b>3. L'aromatogramme et son interprétation .....</b>	<b>13</b>

## Partie pratique

### Chapitre IV : Matériels et méthodes

<b>I. Préparation de matériel végétal.....</b>	<b>14</b>
I.1. La récolte.....	14
I.2. Séchage .....	14
I.3. Broyage et Tamisage.....	14
<b>II. Méthode d'extraction.....</b>	<b>15</b>
II.1. La macération.....	15
II.2. Protocole d'extraction.....	16
II.2.1. La macération par les solvants.....	16
II.2.2. La technique d'épuisement.....	17
II.3. Détermination du rendement d'extraction.....	17
<b>III. Analyses chimiques .....</b>	<b>19</b>
III.1. Dosage des polyphénols totaux .....	19
III.2. Dosage des flavonoïdes.....	19
<b>IV. Pouvoir antioxydant.....</b>	<b>20</b>
IV.1. Méthode de réduction du DPPH° .....	21
IV.2. Teste ABTS.....	22
IV.3. Détermination du pouvoir réducteur des composés phénoliques.....	24
<b>V. L'évaluation de l'activité antibactérienne.....</b>	<b>25</b>
V.1. Préparation des dilutions d'extraits de <i>Citrus reticulata blanco</i> .....	25
V.2. Souches bactériennes et milieux de culture.....	26
V.3. Standardisation.....	27
V.4. Isolement des souches.....	27
V.5. L'inoculum.....	27

V.6. Préparation des disques.....	27
V.7. L'ensemencement.....	27
V.8. Incubation et Lecture.....	28
V.9. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	28
V.10. Evaluation de l'activité bactériostatique ou bactéricide.....	28

## **Chapitre V : Résultats et discussions**

<b>1. Détermination du rendement d'extraction des composés phénoliques.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits de <i>Citrus reticulata</i> blanco.....</b>	<b>30</b>
2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	30
2.2. Teneur en flavonoïdes .....	32
<b>3. Evaluation de l'activité antioxydant et antiradicalaire.....</b>	<b>33</b>
3.1. Activité scavenging du radical DPPH°.....	33
3.2. Activité scavenging du radical ABTS <sup>+o</sup> .....	35
3.3. Activité réductrice (FRAP).....	37
<b>4. L'activité antimicrobienne.....</b>	<b>38</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>42</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Glossaire**

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les fruits et les feuilles de la mandarine.....	5
<b>Figure 2</b> : La structure de base des acides hydroxybenzoïques (1) et acides hydroxycinnamiques (2).....	8
<b>Figure 3</b> : Structure de base des flavonoïdes.....	9
<b>Figure 4</b> : Réaction des flavonoïdes avec les EOR.....	10
<b>Figure 5</b> : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour l'activité antioxydant comme la chélation des ions métalliques.....	10
<b>Figure 6</b> : Tamiseur électrique.....	15
<b>Figure 7</b> : Protocole de macération par différents solvants d'extraction.....	16
<b>Figure 8</b> : Protocole d'extraction par épuisement.....	18
<b>Figure 9</b> : Protocole de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	20
<b>Figure 10</b> : Structure chimique du radical libre DPPH°.....	21
<b>Figure 11</b> : Réaction DPPH° avec un antioxydant .....	21
<b>Figure 12</b> : Les étapes de formation du radical ABTS.....	23
<b>Figure 13</b> : Protocole de réduction du radical ABTS.....	24
<b>Figure 14</b> : Protocole de détermination du pouvoir réducteur.....	25
<b>Figure 15</b> : Préparation des dilutions des extraits de <i>Citrus reticulata Blanco</i> .....	26
<b>Figure 16</b> : Comparaison des rendements d'extraction des quatre extraits de <i>C. reticulata Blanco</i> .....	29
<b>Figure 17</b> : Teneurs en polyphénols des quatre extraits de <i>C. reticulata Blanco</i> .....	31
<b>Figure 18</b> : Teneurs en flavonoïdes des quatre extraits de <i>C. reticulata Blanco</i> .....	32
<b>Figure 19</b> : Variation de l'inhibition de DPPH° en fonction des concentrations des extraits.....	33
<b>Figure 20</b> : Activité anti-radicalaire des extraits de <i>C. reticulata Blanco</i> et les standards.....	34
<b>Figure 21</b> : Variation de l'inhibition de l'ABTS <sup>o+</sup> en fonction des concentrations des extraits.....	35

<b>Figure 22:</b> Activité anti-radicalaire des extraits de <i>C. rediculata Blanco</i> et les standards.....	36
<b>Figure 23:</b> Comparaison entre les pouvoirs réducteurs des extraits de <i>Citrus rediculata Blanco</i> .....	37
<b>Figure 24:</b> Comparaison entre les pouvoirs réducteurs des extraits de <i>Citrus rediculata Blanco</i> et le standard BHA à 100 µg / ml.....	38
<b>Figure 25:</b> Effet inhibiteur de l'extrait pur (brut) sur les quatre souches bactériennes.....	40
<b>Figure 26:</b> Photographie de quelques zones d'inhibitions obtenues pour les différents extraits.....	42

# Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les différents genres d'agrumes.....	3
<b>Tableau II</b> : La composition chimique de la mandarine.....	6
<b>Tableau III</b> : Souches bactériennes testées.....	26
<b>Tableau IV</b> : Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	30
<b>Tableau V</b> : Résultats du dosage des flavonoïdes.....	32
<b>Tableau VI</b> : Activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH.....	34
<b>Tableau VII</b> : Pourcentages d'inhibition de l'ABTS.....	35
<b>Tableau VIII</b> : Activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical ABTS <sup>+</sup> .....	36
<b>Tableau IX</b> : Activité antimicrobienne des extraits de <i>C. reticulata Blanco</i> .....	39
<b>Tableau X</b> : Les CMI des extraits phénoliques de <i>C. reticulata Blanco</i> .....	41

# Liste des abréviations

**Abs:** Absorption

**ABTS :** Acide 2,2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**AG:** Acide gras

**AH:** antioxydant

**AlCl<sub>3</sub>:** Chlorure d'aluminium

**AND :** Acide désoxy-ribonucléique

**ARN:** Acide ribo-nucleique

**ATCC:** American type culture collection (collection Américaine de culture type)

**BHA:** Butylhydroxyanisole

**C :** *Citrus*

**Cat :** Catalase

**C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>:** Acétate de sodium

**CI<sub>50</sub> :** Concentration inhibitrice de 50%

**CMB :** Concentration minimal bactéricide

**CMI :** Concentration minimal inhibitrice

**Co :** Monoxyde de carbone

**Cu<sup>+2</sup> :** Ion cuivre

**DO :** Densité optique

**DPPH :** 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**EAG :** Equivalent en acide gallique

***E. coli* :** *Escherichia coli*

**EQ :** Equivalent en Quercétine

**Fe<sup>+2</sup> :** Fer ferreux (ion de fer)

**Fe<sup>+3</sup>:** Fer ferrique

**FeCl<sub>2</sub>:** Chlorure ferreux

**FeCl<sub>3</sub>:** Chlorure ferrique

**Fl-O:** Radical flavonoxy

**Fl-OH:** Flavonoids

**FRAP:** Ferric reducing antioxidant power

**GR:** Glutathion réductase

**GSH:** Glutathion réduit

**GSSG:** Glutathion disulfide

**H<sub>2</sub>O :** Radical hydroperoxyde

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> :** Ferricyanure de potassium

**N<sub>2</sub> :** Diazote

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :** Carbonate de sodium

**NADH :** Nicotinamide Adénine di-nucléotide

**NADPH :** Nicotinamide Adénine di-nucléotide phosphate

**O<sub>2</sub> :** Oxygène

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup> :** Ion radicalaire super oxyde

**OH :** Radical hydroxyle

**R<sup>2</sup> :** Coefficient de corrélation

**RO<sup>•</sup> :** Alkoxyde

**ROO<sup>•</sup> :** Radical peroxyde

**ROS :** Reactive oxygen species (espèce réactive de l'oxygène)

***S. aureus* :** *Staphylococcus aureus*

**SOD :** Super oxyde dismutase

**TAC :** Acide trichloracétique

**TEAC :** Trolox equivalent antioxidant capacity

**UFC :** Unité formant cloné

# *Introduction*

# INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'avoir une diversité structurale et qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Zeghad, 2009; Maurice, 1997**).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (**Bruneton, 1999; Bahorun et al., 1996**).

Un grand nombre d'études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, antioxydants ou autres, qui pourraient être efficace pour la santé (**Tumbas et al., 2010**). Des études épidémiologiques et expérimentales récentes sur l'homme et l'animal suggèrent que les composés phénoliques très abondants dans les plantes médicinales et alimentaires pourraient jouer un rôle dans la prévention de certaines maladies (**Treki et al., 2009 ; Hammoudi et al., 2012**).

En général, les agrumes occupe une place unique dans le règne végétal et ont une position importante vue leur grande consommation, car ils contiennent des composés bioactifs ayant des propriétés liées à la santé humaine (**Tripoli et al., 2007; N'dri Séraphin et al., 2011**). Parmi toutes les espèces d'agrumes, la mandarine « *Citrus reticulata Blanco* » est très populaire (**Mukhar et al., 2005; Li et al., 2006**). Les différentes variétés de *Citrus reticulata Blanco* ont été largement utilisées comme médicament par les chinois pendant une longue période en raison de leur activité pharmacologique, une faible toxicité et des faibles couts (**Yu et al., 2009**).

Dans ce mémoire, nous avons étudié les composés phenoliques des feuilles de *Citrus reticulata Blanco*, une plante très utilisée en pharmacopée traditionnelle, pour ses vertus thérapeutiques. Malgré son importance biologique et médicinale, cette espèce a été très peu

étudiée en Algérie. C'est pourquoi notre étude est destinée à étudier les métabolites secondaires et plus précisément les polyphénols et flavonoïdes des feuilles de *Citrus reticulata Blanco* afin de prouver l'intérêt biologique de cette plante et évaluer l'importance de la flore de notre pays.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité antioxydant et l'activité antibactérienne de *Citrus reticulata Blanco*. Pour cela notre travail est structuré comme suit :

- ❖ Une synthèse bibliographique comportant un chapitre consacré à la présentation générale sur les agrumes dont notre plante, un deuxième chapitre présentant l'activité antioxydant et un dernier chapitre présentent l'activité antibactérienne.
- ❖ Une partie pratique consacrée à l'extraction des substances active de *Citrus reticulata Blanco* par quatre méthodes : une méthode utilisant le méthanol à 80%, une méthode utilisant l'éthanol à 80%, une méthode utilisant l'eau bouillante et une méthode par épuisement de la poudre utilisent le méthanol à 80%, suivie d'un dosage spectral des composés actifs, ainsi que l'évaluation de leur activité antibactérienne.
- ❖ Une troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

# *Partie théorique*

# *Chapitre I: Généralités sur les agrumes*

## 1- Généralités

Le mot « agrume » provient du latin « *acrumen* », qui désignait dans l'Antiquité des arbres à fruit acide. Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées. On ne dénombre pas moins de 900 variétés à ce jour, pouvant mesurer de 2 à 10 m. leur tronc est assez court, leur feuillage dense, et persistant sauf pour le genre *Poncirus* où il est caduque (**Barboni, 2006; Ramful et al., 2011**).

Les agrumes comprennent trois genres principaux : le genre *Citrus*, le genre *Fortunella* et le genre *Poncirus*. La majorité des agrumes appartiennent au genre *Citrus* (**Benedicte et Michel, 2011**).

## 2- Le genre *Citrus*

Le genre « *Citrus* » est composé de nombreuses espèces comestibles, dont les oranges, les citrons verts, les pomelos et les mandarines (Tableau I).

**Tableau I** : Les différentes espèces du genre *Citrus* (**Milind et Dev, 2012**).

Nom commun	Nom scientifique
Les mandarines	<i>Citrus reticulata</i>
Les clémentines	<i>Citrus clementina</i>
Les oranges	<i>Citrus sinensis</i>
Les citronniers	<i>Citrus limon</i>
Les pomelos	<i>Citrus paradisi</i>

La plupart des espèces de ce genre sont compatibles avec une pollinisation croisée et peuvent être greffés les uns sur les autres (**Benedicte et Michel, 2011**). Les espèces du genre *Citrus* sont des arbres ou des arbustes de moins de 4 m à 12 m de haut. Les feuilles sont généralement persistantes sauf chez les hybrides de *Poncirus*. Beaucoup portent des épines axillaires. Les inflorescences sont des cymes de feuillés.

Les fleurs ont généralement 5 sépales et 5 pétales elles sont blanches, teintées en pourpre chez les citronniers. Le fruit, très caractéristique est une baie enveloppée d'une écorce parfois très épaisse. La pulpe est formée de « poils » devenant juteux à maturation, souvent plus ou moins acide ou sucrée ou amère (pamplemousse). Ces baies se nomment hespéridés. Les graines sont souvent polyembryoniques. Les feuilles et les fleurs portent des glandes produisant une huile essentielle (**Dorji et Yapwattanaphun, 2011**).

### 3- Origine des fruits du genre *Citrus*

L'origine du genre *Citrus* semble être le sud-ouest asiatique et la région indienne. Les Européens ont découvert, la première fois les agrumes à l'occasion de l'expédition d'Alexandre en Médie (IRAN) au 3<sup>ème</sup> siècle avant J-C.

Les premières orangeries ont été mises en place en Espagne en 1792, en Italie en 1870 et au Maroc en 1922 (**Lim, 2012**).

Traditionnellement, en médecine arabe classique, les fleurs servent à préparer une huile carminative, alors que les écorces des fruits sont utilisées contre les coliques. En Europe les feuilles et les fleurs sont réputées antispasmodiques, stomachiques et sédatives.

En médecine chinoise les zestes sont préconisés dans les troubles digestifs et les douleurs thoraciques et abdominales (**Yu et al., 2009**).

### 4- Propriétés thérapeutiques des fruits du genre *Citrus*

De nombreuses études ont montré que les espèces du genre *Citrus* sont riches en principes actifs tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, utilisés à des fins thérapeutiques ou dans les domaines cosmétiques ou alimentaires (**Shahaib et al., 2011; Kahkonen et al., 1999**).

Parmi les propriétés thérapeutiques de ces principes actifs citons :

- ◆ Effet veinotonique, facilitant la circulation sanguine (flavonoïdes)
- ◆ Effet antispasmodique (extrait d'écorce)
- ◆ Effet hypocholestérolémiant (naringine, hétéroside flavonique)
- ◆ Effet antibactérien (surtout l'huile essentielle)
- ◆ Effet antiviral (flavonoïdes)
- ◆ Effet anti-tumoral (limonène, tangéretine, nobilétine)
- ◆ Traitement des insomnies et de la nervosité (feuilles et fleurs)
- ◆ Stimulation de l'appétit (zestes) (**Santo et al., 2011; Karimi et al., 2012**)
- ◆ Effet antioxydant et antiradicalaire (flavonoïdes)
- ◆ Effet antiallergique (flavonoïdes)
- ◆ Effet antidépresseur (polyphénols) (**Li, 2006; Khizar et al., 2010; Madani et al., 2012**).

### 5- *Citrus reticulata blanco*

*Citrus reticulata blanco* communément « mandarine » est largement cultivé dans les régions subtropicales. Elle est beaucoup plus résistante au froid que l'orange douce et l'arbre est plus tolérant à la sécheresse (Lim, 2012).

Les mandarines sont cultivées dans les pays méditerranéens, le Japon le Brésil, l'Argentine, les États-Unis et l'Australie. Les cultivars de mandarine sont nombreux et présentent une grande diversité des caractères morphologiques et horticoles (forme, volume, couleur du fruit, adhésion de l'écorce) (Figure 1) (Mukhtar et al., 2005).



Figure 1 : Les fruits et les feuilles de la mandarine. (Lim, 2012).

#### 5-1- Classification botanique (Hallal, 2011)

- ◆ Règne : Plantae
- ◆ Sous-règne : Magnoliophyta
- ◆ Classe : Magnoliopsida
- ◆ Sous-classe : Rosidae
- ◆ Ordre : Sapindales
- ◆ Famille : Rutaceae
- ◆ Genre : *Citrus L.*
- ◆ Espèce : *Citrus reticulata blanco*

#### 5-2- Composition chimique de la mandarine

Le tableau II donne une composition chimique en métabolites primaires et secondaires de la mandarine.

**Tableau II** : La composition chimique de la mandarine.

<b>Composants</b>	<b>Localisation</b>	<b>Références</b>
Les sucres : Fructose, Glucose, Saccharose.	Fruit, feuilles, écorce.	<b>Tripoli et al., 2007</b>
Protéines et les fibres.	Fruit, écorce, feuilles.	<b>Diankov et al., 2001</b>
Sels minéraux : Calcium, Fer, Mg, Phosphore, sodium, Zinc, Cuivre, Mn, Se.	Fruit, feuille, écorce	<b>Ma et al., 2008</b> <b>Rashid et al., 2013</b>
Les vitamines : Thiamine (B1), Riboflavine (B2), B3, Pyridoxine (B6), Acide ascorbique (C), Vitamine A, Vitamine E.	Fruit, feuilles	<b>Rapisarda et al., 2009</b> <b>Boudries et al., 2012</b> <b>Vinson et al., 2002</b>
Acides aminés : Tryptophane, Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Valine, Arginine, Histamine, Alanine, Acide Aspartique, Acide Glutamique, Glycine, Proline et Serine.	Fruit	<b>Rincon et al., 2005</b> <b>Tumbas et al., 2010</b> <b>Lianfang et al., 2009</b> <b>Mukhtar et al., 2005</b> <b>Lim, 2012</b>
Les métabolites Secondaires : Acide Phénoliques, Flavonoïdes (Flavanone, Flavone, Flavonol, Hespéridine), Huiles essentielles, limonoïdes incluant : obacumone 17 beta D- glucopyranoside, acide momilinique 17 beta-D glucopyranoside, limonemi, monilline.	Fruit, Feuilles, Ecorce	<b>Menichini et al., 2011</b> <b>Lourdes Mata Bilbao et al., 2007</b>

## *Chapitre I.I: Activité antioxydant des composés phénoliques*

## 1- Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Meziti, 2009; Rezaie et al., 2007).

Les antioxydants sont des composés naturels ou synthétiques, capables de piéger les radicaux libres et d'inhiber les processus d'oxydation (Khizar et al., 2010). Les antioxydants de sources naturelles peuvent être utilisés pour augmenter la stabilité des aliments en empêchant la peroxydation lipidique (Droji et Yapwattanaphun, 2011; Nève, 2002; Akowuah et al., 2005).

## 2- Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'une autre substance en s'oxydant lui-même plus rapidement que celle-ci.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison. Ils sont capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, et agissent en formant des produits finis non radicalaires (Hellal, 2011; Akman et al., 2012).

## 3- Systèmes de défenses antioxydants

**3-1- Système enzymatique :** Il s'agit principalement de trois enzymes.

- La super oxyde dismutase (SOD) : Elle accélère la dismutation de l'anion super oxyde en peroxyde d'hydrogène.
- La catalase : présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.
- La glutathion peroxydase et réductase : Elles sont localisées dans le cytosol et les mitochondries. La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène et d'autre hydro peroxydes résultant de l'oxydation du cholestérol et des acides gras (AG). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH (glutathion réduit) à partir du GSSG (glutathion oxyde) tout en utilisant le NADPH comme cofacteur. (Meziti, 2009).

**3-2- Système non enzymatique**

Ce groupe de système renferme de nombreuses substances endogènes (glutathion, acide urique, la mélatonine, bilirubine...) et d'autres substances exogènes apportées par l'alimentation (le tocophérol, acide ascorbique,...) agissant en piégeant les radicaux et en

neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables. Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols, huiles essentielles ; flavonoïdes apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Meziti, 2009).

### 3-2-1- Les composés phénoliques comme antioxydant

Les agrumes ont reçu beaucoup d'attention, en raison de leur composition chimique, contenant une quantité élevée des composés bioactifs, en particulier les polyphénols, les vitamines C, les caroténoïdes et les fibres alimentaires. Les composés phénoliques sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire (Camille, 2009; Atanasova, 2009). Ils sont classés en deux grandes catégories: Flavonoïdes et non Flavonoïdes (Acide phénolique) (Kmrn khan et al., 2010). Ce sont des composés qui contiennent un groupe phénol et peuvent avoir différents substituants.

Ils forment un groupe de composés très divers (Barboni, 2006). Sont considérés comme des composés quasi universels des végétaux (Nkhili, 2009; Galvan d'alessandro et al., 2012). Ils sont répartis principalement dans les vacuoles et la paroi, sont synthétisés également dans le cytosol, au sein d'une même feuille la répartition des composés est variable, certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis (Morel, 2011; Camille, 2009).

#### 3-2-1-1- Les principales classes de composés phénoliques

Les métabolites secondaires peuvent être classés en fonction de leur origine: les terpénoïdes ou isoprénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Bellow, 2012; Duda-chodak et al., 2011). Ils sont divisés en plusieurs catégories:

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques) : font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes : les acides Hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (figure 2) (Michel, 2011; Nkhili, 2009).

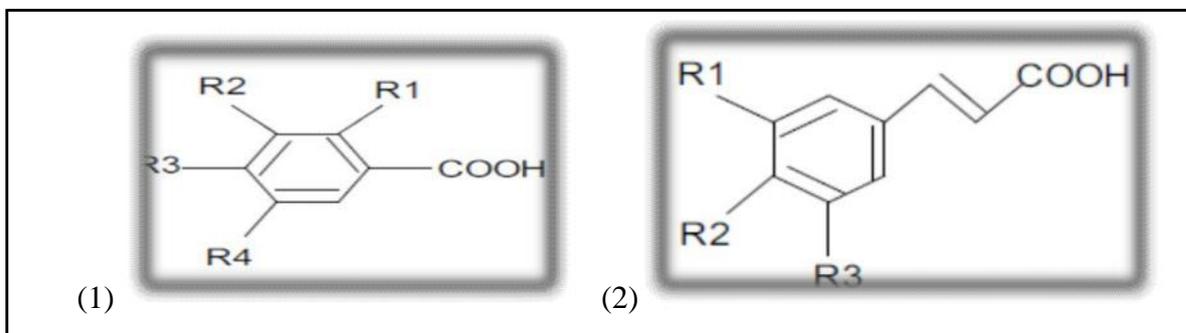


Figure 2 : structure de base des acides hydroxybenzoïques (1) et acides hydroxycinnamiques (2) (Zeghad, 2009).

- les flavonoïdes : Ce sont des pigments hydrosolubles responsables de la couleur des végétaux (Ojeil et al., 2010). Ils sont présents dans presque tous les organes de la plante (racines, fleurs, tiges...) et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants (Harkati, 2011; Isory, 2007; Lourdes Mata Bilbao et al., 2007).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C (figure 3) (Ghedira, 2005).

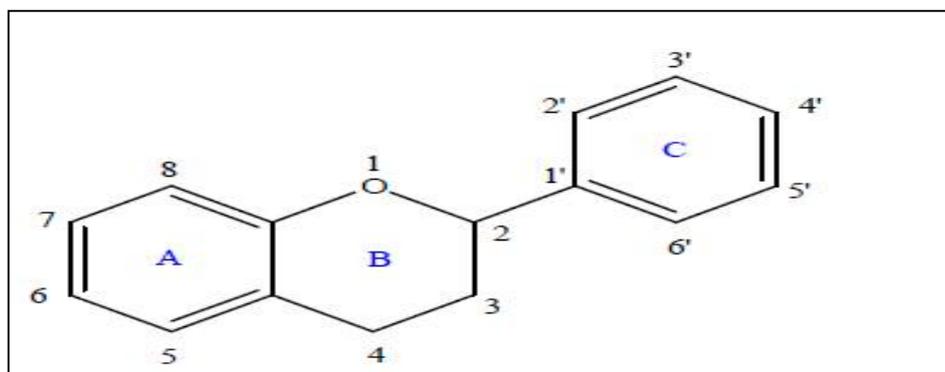


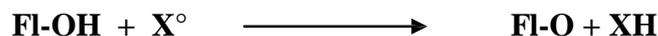
Figure 3: Structure de base des flavonoïdes (Mouffok, 2011; Barreca et al., 2011).

- les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes (Bellebcir, 2008).

### 3-2-1-2- Les activités antioxydants des composées phénoliques

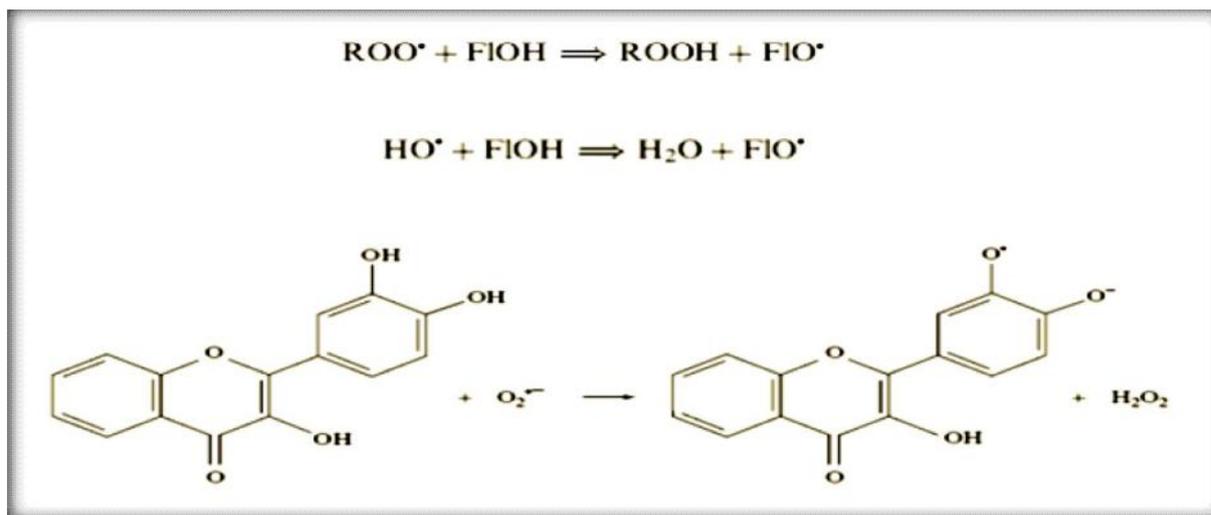
#### ◆ Piégeage direct des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydant. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes (FI-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO°), alkoxydes (RO°) et hydroxyle par transfert d'hydrogène selon la formule suivante :



Où X° représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus (Meziti, 2009 ; Nkhili, 2009).

Le radical carboxyle résultant (FI-O•) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (figure 4).

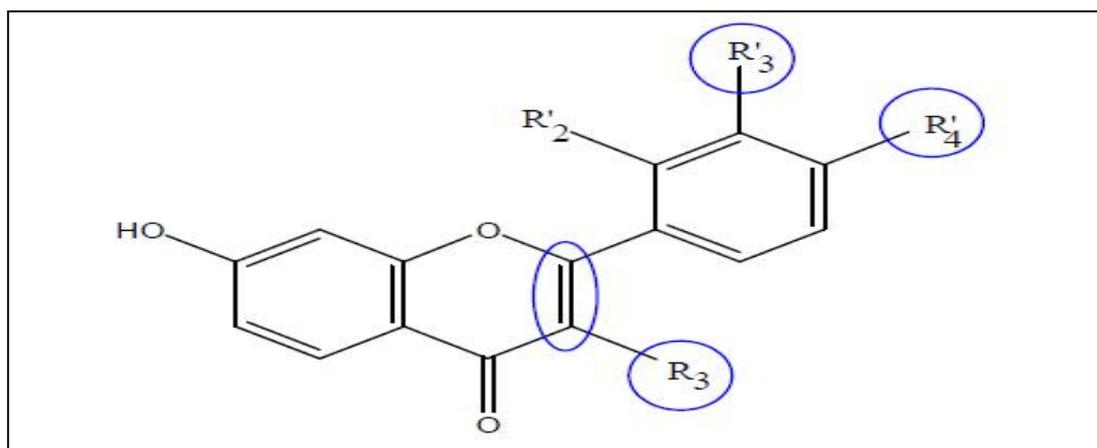


**Figure 4:** Réaction des flavonoïdes avec les EOR. (Meziti, 2009)

#### ◆ Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (Meziti, 2009). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène.

Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques (Nkhili, 2009). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (figure 5).



**Figure 5 :** Flavonoïdes et leurs sites proposés pour l'activité antioxydant comme la chélation des ions métalliques (Chabil, 2006).

◆ **Inhibition enzymatique**

L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR (Nkhili, 2009).

Les polyphénols sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du  $O_2^-$  et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipooxygénase, et la glutathion S-Transférerase (Meziti, 2009).

# *Chapitre I.I.I: Activité antibi. ctérienne*

## 1- Activité antibactérienne

Les activités antibactériennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XX<sup>e</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Benarous, 2006**).

## 2- les principales substances antibactériennes

### 2-1- Les antibiotiques

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries (**Van Bambeke et Tulkens, 2008**). Les antibiotiques actuels peuvent se diviser en 5 groupes, en fonction de leur cible pharmacologique : antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne et membrane cytoplasmique, antibiotiques actifs sur la synthèse protéique, antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs Précurseurs, antibiotiques inhibiteurs de voies métaboliques (**Lavigne, 2007**).

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries Gram positives, mais demeurent peu actifs contre les bactéries Gram négatives et les levures (**Guinoiseau, 2010**).

### 2-2- Les composés phénoliques

Les actions des polyphénols peuvent être distinguées sur la base du type d'activité qu'ils exercent. Un extrait bactériostatique arrête la croissance des bactéries en évitant sa prolifération, il facilite la destruction des germes par le biais des défenses de l'hôte et l'extrait bactéricide tue les bactéries (**Van Bambeke et Tulkens, 2008**).

#### ❖ Mécanisme de l'effet antibactérien

Le mécanisme de l'effet antibactérien des composés phénoliques est très complexe, et implique multiples modes d'actions tels que :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires bactériennes, la séquestration des substrats nécessaires à la croissance bactérienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- l'inhibition du métabolisme microbien, dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires.
- Interaction avec la synthèse de l'ADN et l'ARN, des protéines, des lipides et de la fonction mitochondriale ainsi que la formation des complexes avec la paroi. Le mode d'action des agents antibactériens dépend également du type de micro-organismes. Les composés phénoliques ont une action antibactérienne surtout contre les Gram- dont les groupes C=O réagissent avec les S-H et empêchent la croissance bactérienne, ils ont aussi une activité fongicide parfois vermifuge et cytotoxique (**Mouffok, 2011**).

### **3- L'aromatogramme et son interprétation**

L'aromatogramme est un examen de routine qui permet de mesurer et de déterminer la capacité d'un des extraits à base des plantes à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Il renseigne, par conséquent, sur la sensibilité des germes vis-à-vis des agents anti-infectieux (**Benouda et Tagajdid, 2008**). A part les techniques automatisées, le test de diffusion et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sont les méthodes les plus fréquemment utilisées (**Gennéa et Siegristb, 2003**).

*Partie pratique*

# *Chapitre IV: Matériels et méthodes*

## I- Préparation de matériel végétal

### I-1-La récolte

Le matériel végétal est constitué par les feuilles de *Citrus reticulata blanco*. Elles ont été récoltées à la fin du mois de Janvier 2013 dans la région d'Oued Ghir de la Wilaya de Bejaia (Algérie), dans les meilleures conditions possibles en évitant la rosée, la pluie ou une humidité excessive.

Le site de la récolte est une zone boisée montagneuse, éloignée de toutes sources de pollution. Le choix du matériel végétal utilisé dans notre étude est principalement basé sur :

- ◆ L'abondance de l'espèce *Citrus réticulata blanco* dans la région de Bejaia en particulier et en Algérie en général.
- ◆ La richesse de ces variétés en composés phénoliques notamment en flavonoïdes.

### I-2-Séchage

Les feuilles fraîchement récoltées ont été lavées afin d'enlever la poussière et d'autres polluants. Elles ont été mises à sécher dans une étuve à la température de 37 °C (pour éviter toute sorte de dénaturation de ces constituants) pendant une semaine.

L'intérêt du séchage est d'éviter tout effet nocif dû à l'excès d'humidité qui favorise la fermentation microbienne de feuillage et le développement des moisissures. Il empêche aussi l'action de polyphénols-oxydases et de glycosidases qui dégraderaient les composés phénoliques (**Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003**).

### I-3- Broyage et Tamisage

Le matériel végétal séché a été broyé par un broyeur électrique puis tamisé à l'aide d'un tamiseur à une vitesse de vibration de 1.60 mm/g.

Une poudre très fine de diamètre 250 µm a été récupérée à la fin du tamisage et préservée dans des flacons en verre étiquetés et fermés hermétiquement pour protéger la poudre contre l'humidité et l'attaque par les moisissures.



**Figure 6 :** Tamiseur électrique.

## **II- Méthode d'extraction**

L'extraction des polyphénols à partir du feuilles de *Citrus reticulata blanco* est effectuée par :

- Macération par les solvants d'extraction : Méthanol, Ethanol.
- Infusion avec l'eau distillée bouillante.
- La technique d'épuisement de la poudre en utilise le méthanol à 80 % comme solvant d'extraction.

### **II-1- La macération**

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide qui consiste à faire tremper une substance (matière végétale) dans un solvant froid ou chaud en extraire les espèces (molécules) solides ou liquides présentes dans une substance naturelle par sa dissolution dans ce solvant à température ambiante (Bellebcir, 2008).

#### • **Avantages et inconvénients**

##### **Avantage**

- De faibles quantités de matériel végétal sont utilisées ;
- Procédé simple pour l'application ;
- Extraction efficace.

##### **Inconvénients**

- Méthodes d'extraction longue ;
- Utilisation d'un volume considérable de solvant ;
- Le risque de destruction (dénaturation) des composés thermolabiles en cas de chauffage (extraction par le soxhlet).

## II-2- Protocoles d'extraction

### II-2-1- Extractions par les solvants

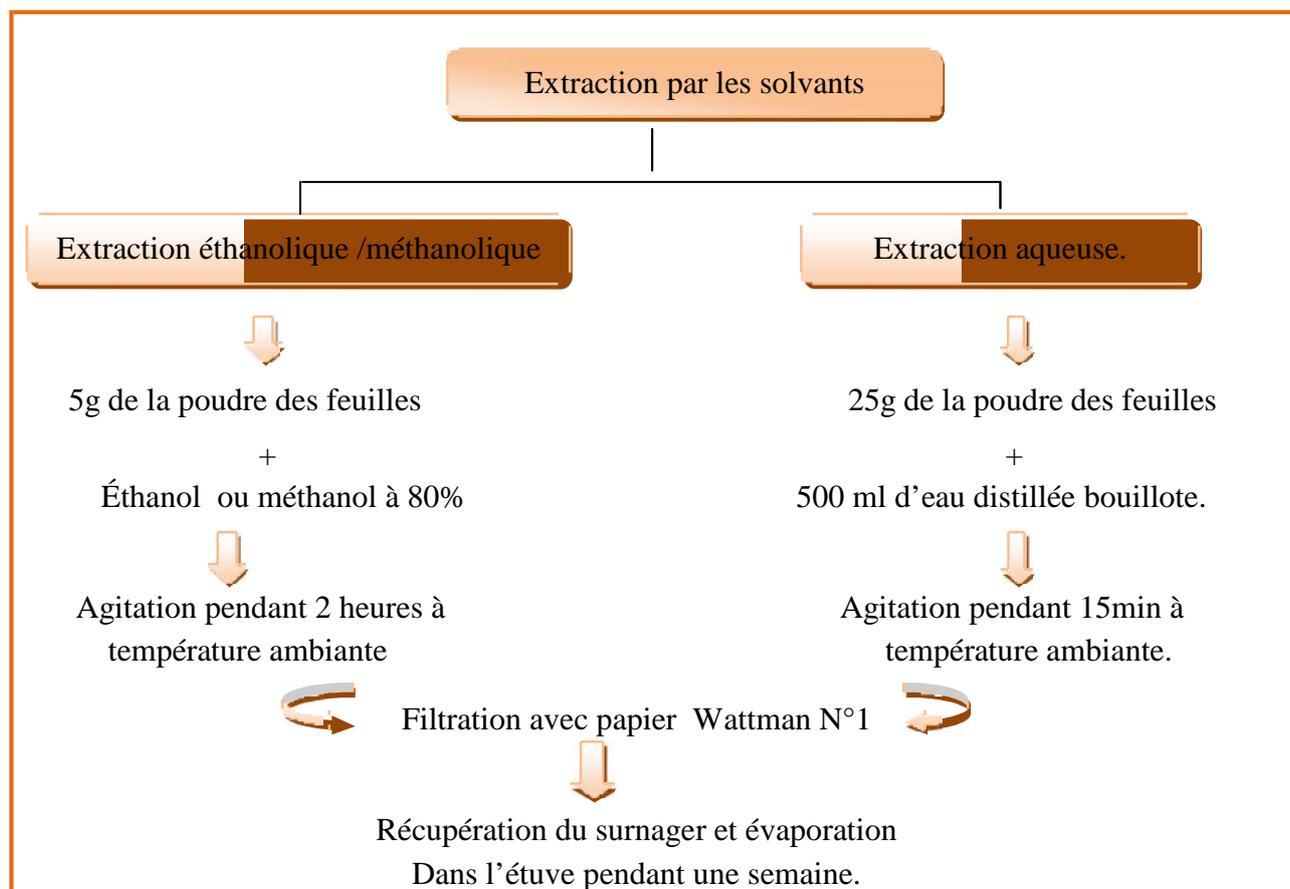
Les polyphénols de *Citrus reticulata blanco* ont été extraits en utilisant trois solvants différents: l'éthanol, le méthanol et l'eau distillée bouillante (**Figure 7**) (**Karimi et al., 2012**).

#### ◆ **Extrait Méthanolique / Ethanolique**

La poudre des feuilles de citrus (5 g) est pesée et placée dans un bécher et traitée avec 320 ml d'éthanol ou du méthanol à 80% suivie par une addition de 80 ml d'eau distillé. Le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante. L'extrait est ensuite obtenu après filtration avec du papier Wattman N °1 puis mis dans l'étuve à 40°C pendant une semaine pour évaporer les solvants.

#### ◆ **Extrait aqueux**

25 g de la poudre de citrus sont placés dans un bécher et mélangé avec 500 ml l'eau distillé bouillante, suivie par agitation magnétique pendant 15 min. L'extrait est ensuite filtré (papier filtre Wattman N°1) et évaporé dans l'étuve à 40°C pendant une semaine.



**Figure 7** : Protocole de macération par différentes solvants d'extraction (**Karimi et al., 2012**).

### II-2-2-La technique d'épuisement

La méthode d'extraction utilisée a été adaptée par **Ramful et al. (2011)**, 1.5 g de la poudre des feuilles de citrus sont pesés et placés dans un bécher avec 15 ml de méthanol à 80 %. Le contenu du bécher est laissé à macérer pendant une nuit à 4° C. La filtration est ensuite réalisée par le papier de wattman N°1 et le surnageant clair obtenu est transverse dans un flacon propre et stocké à - 20°C.

La même procédure est répétée : deux macérations successives dans 15 ml de méthanol à 80 %, puis 6 ml de méthanol à 80 % qui sont ensuite ajoutés au résidu pour obtenir un volume final de 36 ml. Les sur nageant de ces trois extractions ont été réunies et stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour le dosage des phénols et flavonoïdes total et pour les activités antioxydants et antibactériennes (**Figure 8**)

### II-3- Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre le poids d'extraction obtenue après l'extraction et le poids de la poudre utilisé.

Il est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$

Avec : **P<sub>1</sub>** : poids de l'extrait sec après l'extraction.

**P<sub>0</sub>** : poids de la poudre avant l'extraction.

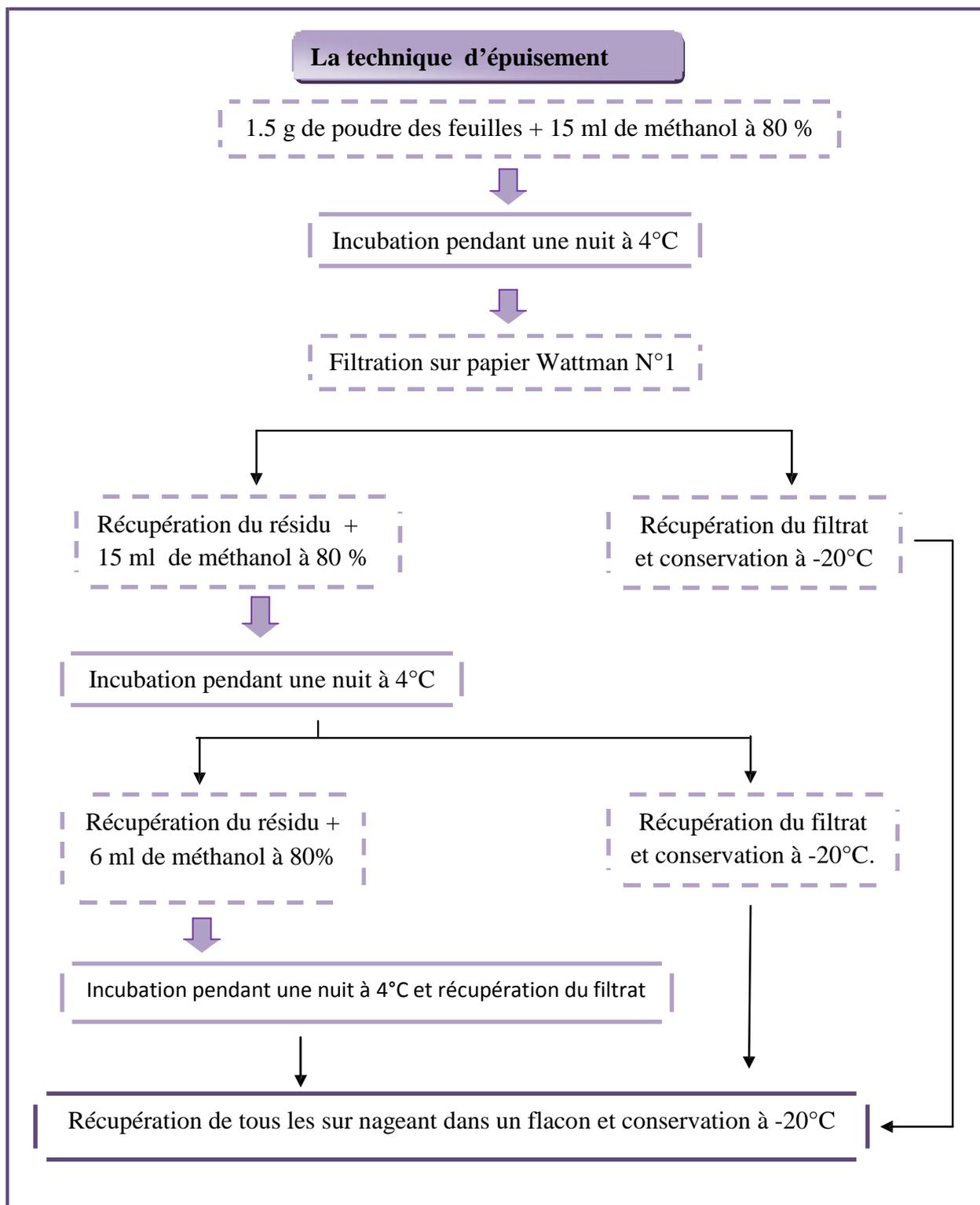


Figure 8 : Protocole d'extraction par épuisement (Ramful et al., 2011).

### III- Analyses chimiques

#### III-1- Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu selon la technique décrite par **Yap et al. (2009)** avec une légère modification.

##### ◆ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). La méthode de folin-ciocalteu est basée sur l'oxydation des cycles phénoliques, couplée à la réduction de l'acide phosphomolybdique (**Castellucci, 2010**).

Le réactif de folin-ciocalteu voit ses propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules, il réagit avec la fonction-OH des phénols, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée, permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues (**Khatabi et al., 2011**).

##### ◆ Mode opératoire

5 mg de l'extrait (Méthanolique, Ethanolique, épuisement et aqueux) dilué dans 3 ml de méthanol, sont ajoutés à 1.5 ml du réactif de folin-ciocalteu (10 ) puis ce mélange est incubé pendant 3 à 5 minutes à l'obscurité. 0.2 ml de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 7.5 % sont ensuite ajoutés à ce mélange qui est incubé pendant 2 heures à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue à 765 nm.

Contre un témoin contenant :

- 0.3 ml de méthanol.
- 1.5 ml du réactif de folin-ciocalteu.
- 0.2 ml de  $Na_2CO_3$ .

La concentration des polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche (L'extrait aqueux est dissout dans l'eau distillée au lieu du méthanol).

#### III-2- Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des feuilles de *Citrus du reticulata blanco* a été estimée par un dosage colorimétrique basée sur la méthode de **Mimica-Dukic (1992) in Abdou Bouba (2010)** avec quelques modifications.

◆ **Principe**

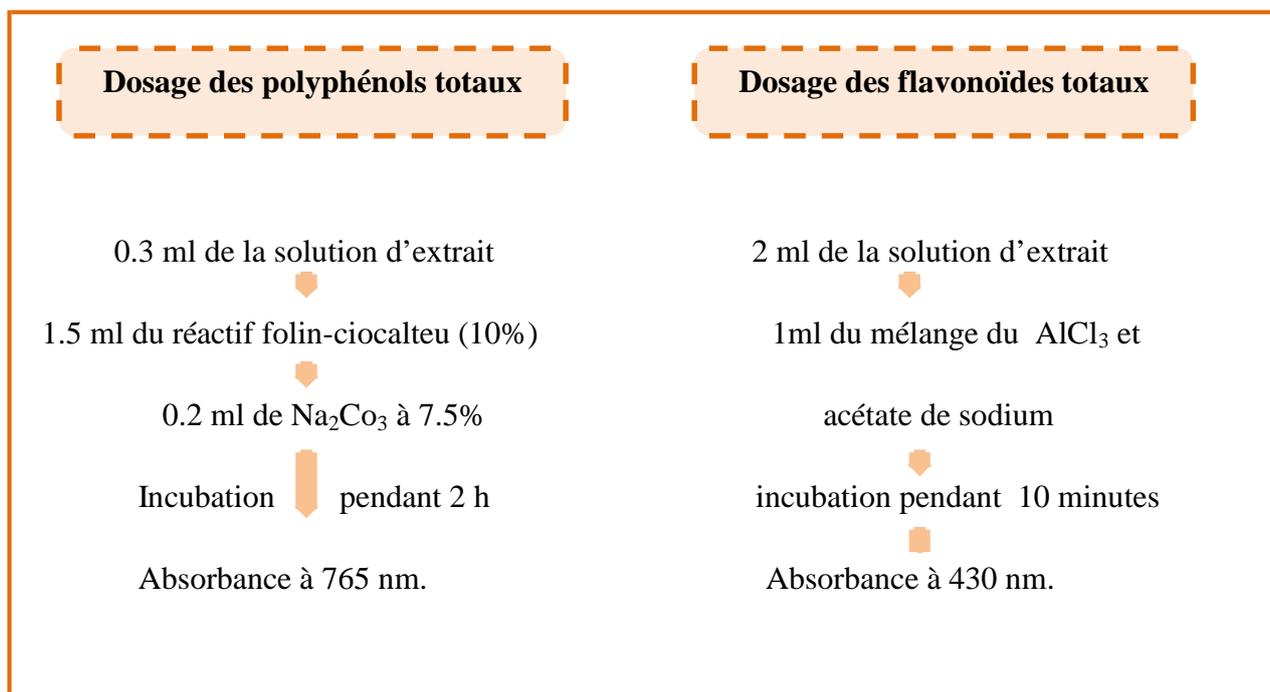
Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium) (Chang *et al.*, 2002).

L'AlCl<sub>3</sub> forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols, ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm (Ribéreau-Gayon, 1968).

◆ **Mode opératoire**

2 ml de la solution d'extrait sont additionnés à 1ml du mélange d'AlCl<sub>3</sub> et d'acétate de sodium (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), après incubation à température ambiante pendant 10 minutes on mesure l'absorbance à 430 nm contre un témoin contenant 2 ml d'extraits et 1 ml d'eau distillée.

Le protocole de dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes sont illustrés dans la figure 9.



**Figure 9 :** Protocole de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux (Yap *et al.*, 2009; Mimica- Dukic, 1992) .

**IV- Pouvoir antioxydant**

Pour étudier les activités antiradicalaires et antioxydants des composés phénoliques des feuilles de *Citrus reticulata blanco*, deux méthodes ont été employées : la méthode de

réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrozyle) et la méthode d'ABTS (sel d'ammonium de acide 2,2- azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique).

#### IV-1- Méthode de réduction du DPPH°

Le composé chimique DPPH est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur l'atome du pont formé par les deux azotes (figure 10) (Popovici et al., 2009).

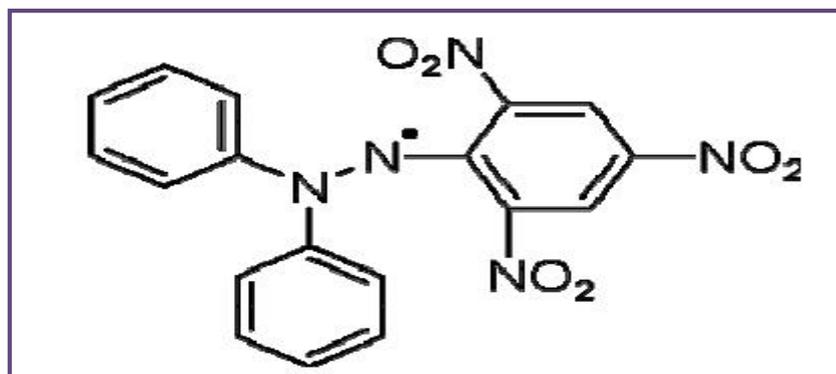


Figure 10 : Structure chimique du radical libre DPPH° (Popovici et al., 2009).

Le DPPH est un radical libre stable utilisé expérimentalement pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse à des stress internes ou externes (Akroum, 2011).

#### ◆ Principe

L'activité antiradicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH, qui est un radical synthétique présentant une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturé en contact d'antioxydant (figure 11), ce qui explique la disparition de sa coloration (Menichini et al., 2011).

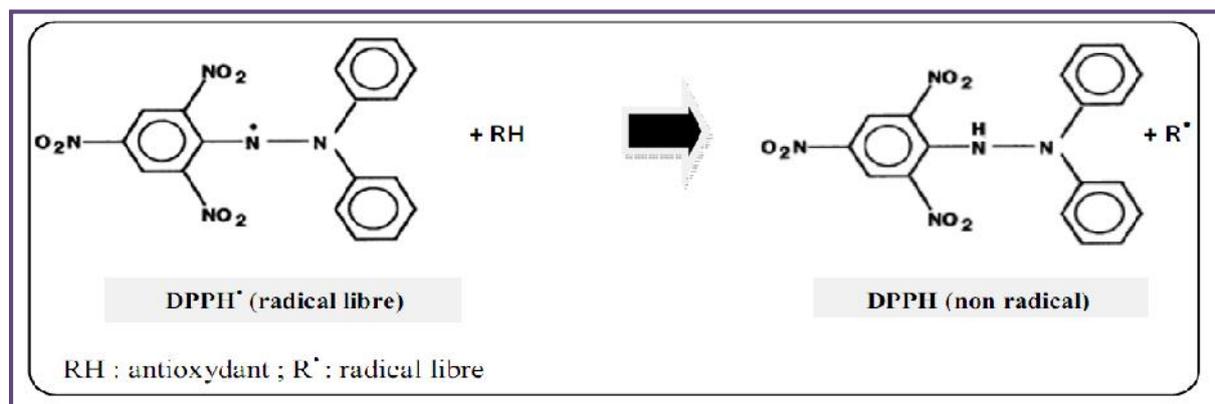
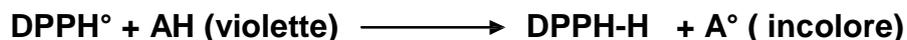


Figure 11: Réaction du DPPH° avec un antioxydant (Bouguerra, 2012).

Cette décoloration explique le pouvoir des extraits de la plante à piéger ce radical selon la réaction suivante, qu'on peut détecter par spectrophotomètre-UV.



Cette activité a été testée selon la méthode d'écrite par **Hemalatha (2010)** avec une légère modification.

#### ◆ **Mesure de l'activité**

Un aliquote de 1.5 ml de l'extrait (0.1 mg/ ml) à déférentes concentrations (100, 200, 300, 400, 500 µg/ ml) est mélangé avec 0.5 ml de solution de DPPH (0.1 mM). Après une agitation vigoureuse et une incubation pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un :

Témoin : contenant 1.5 ml de m éthanol et 0.5 ml de DPPH.

Blanc : contenant 1.5 ml de l'extrait et 0.5 ml de méthanol.

**N.B** : Pour les extraits aqueux on utilise de l'eau distillée au lieu du méthanol.

Pour chaque concentration, le test est répété 03 fois.L'activité anti radicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\left( \frac{\text{ } - \text{ ( )}}{\text{ ( )}} \right)$$

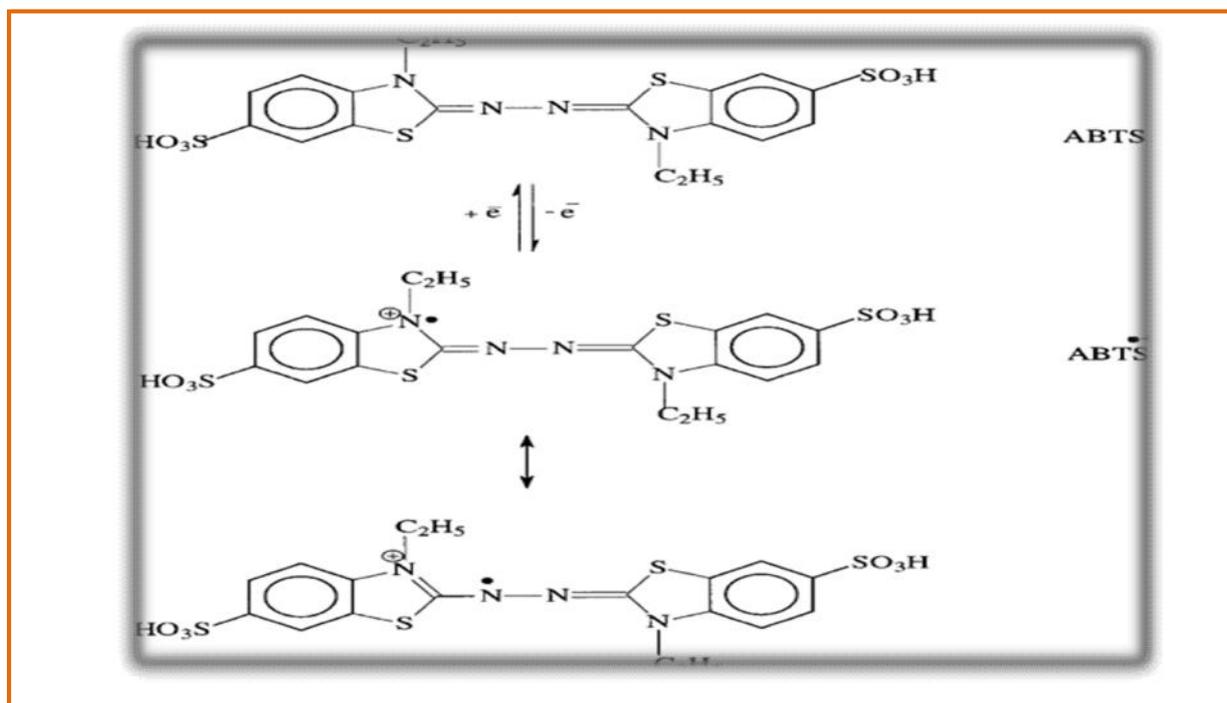
At : Absorbance du témoin; Ae : Absorbance du test; Ab : Absorbance du blanc.

La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (CI<sub>50</sub>); la valeur de CI<sub>50</sub> est exprimée en µg/ ml.

#### **IV-2- Réduction du radical ABTS<sup>•+</sup>**

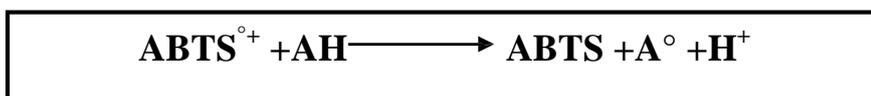
##### ◆ **Principe**

C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant (**Milardovic et al., 2007**). Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant (**Damintoti et al., 2005; Osman et al., 2006**) (figure 12). L'un des radicaux plus couramment utilisés pour l'évaluation de l'efficacité anti-oxydante des composés purs et des mélanges complexes des cations, est le radical dérivé de 2,2-azinobis-3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) (**Osman et al., 2006**).



**Figure 12 :** Les étapes de formation du radical ABTS (Stjepan *et al.*, 2007).

La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydant, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance tester. La réaction entre les antioxydants et  $ABTS^{\bullet+}$  est estimée selon la réaction suivante :



La solution d' $ABTS^{\bullet+}$  se caractérise par une absorbance de  $0.700 \pm 0.020$  à 734 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante (Li *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2013).

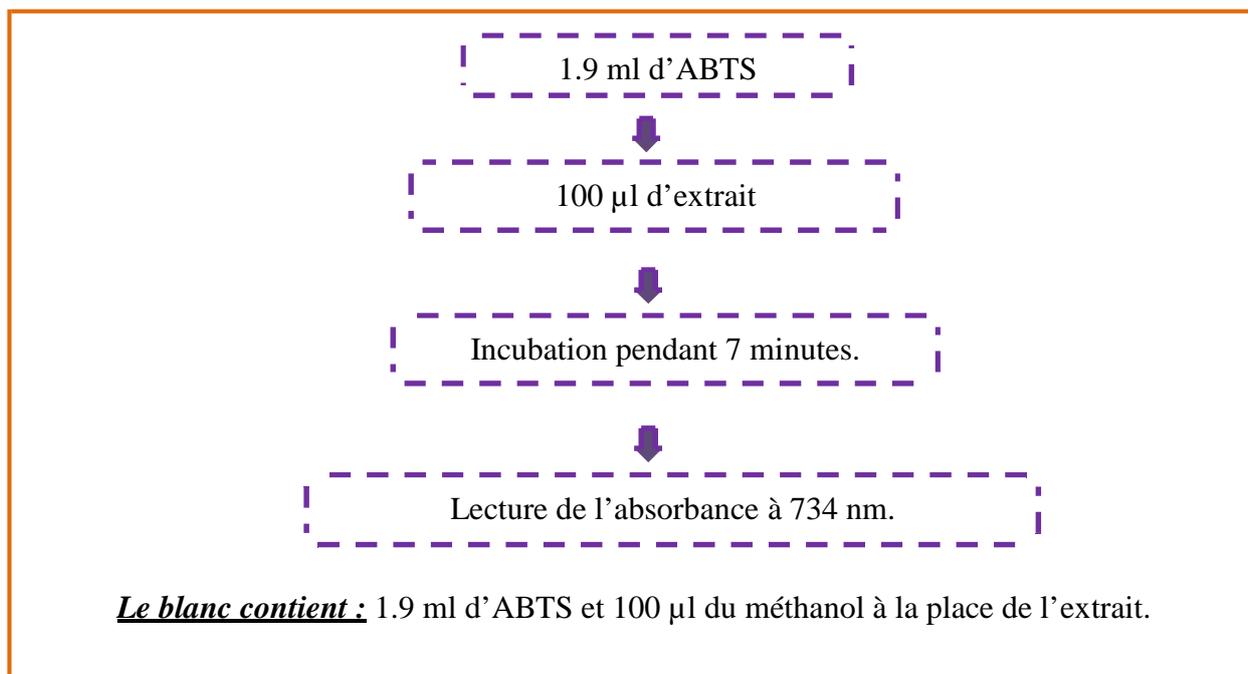
$$\text{Activité scavenging \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

**Ac :** Abs du blanc; **As :** Abs du l'extrait.

#### ◆ Mode opératoire

La solution du radical  $ABTS^{\bullet+}$  (7 mM) est obtenue par le mélange de la poudre ABTS avec la solution de persulfate de potassium (2.45 mM). Elle est ensuite incubée à l'obscurité pendant 16 h à température ambiante.

La solution d'  $ABTS^{\bullet+}$  est diluée ensuite avec l'eau distillée afin d'obtenir une absorbance de 0.7 ± 0.02 à 734 nm; la procédure est illustrée dans la figure 13.



**Figure 13 :** Protocole de réduction de radical ABTS (Le et al., 2007).

#### **IV-3- détermination du pouvoir réducteur des composés phénoliques**

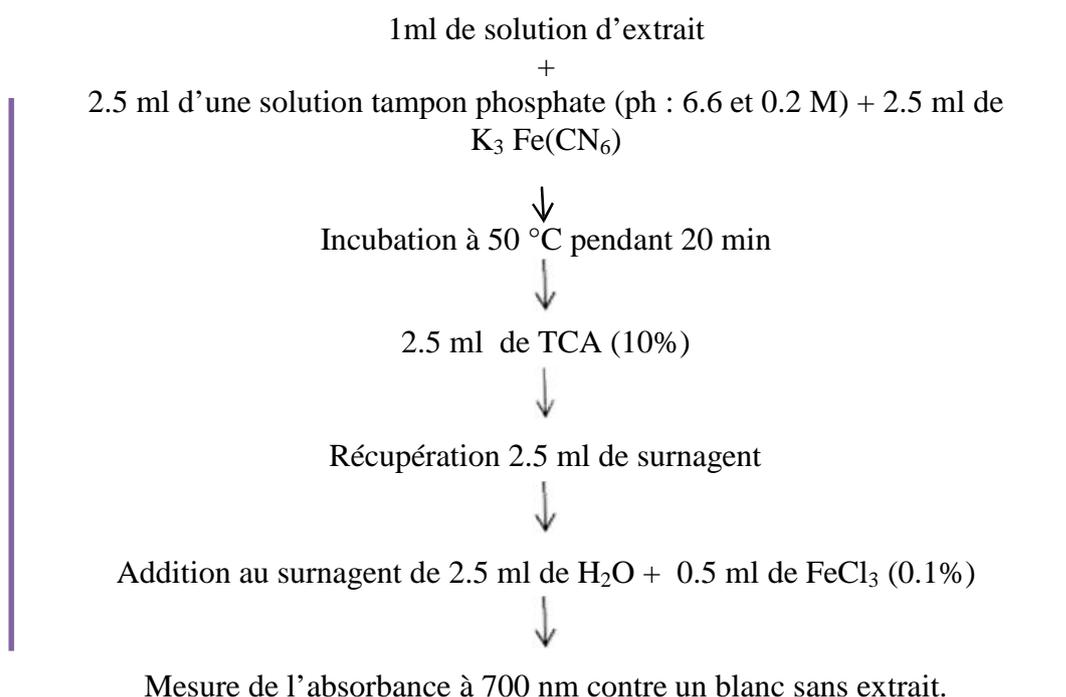
Le pouvoir réducteur des composés phénoliques a été déterminé selon la méthode développée par Oyaizy (1986) in Ogunlana (2008) avec quelques modifications.

##### ◆ **Principe**

Le pouvoir réducteur est basé sur la réduction de Fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) du ferricyanure de potassium en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ), celui-ci se traduit par le changement de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers une couleur bleue verdâtre, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque composé phénolique (Ribéro et al., 2008).

##### ◆ **Protocole**

Le mode opératoire de détermination du pouvoir réducteur est présenté dans la figure n° 14.



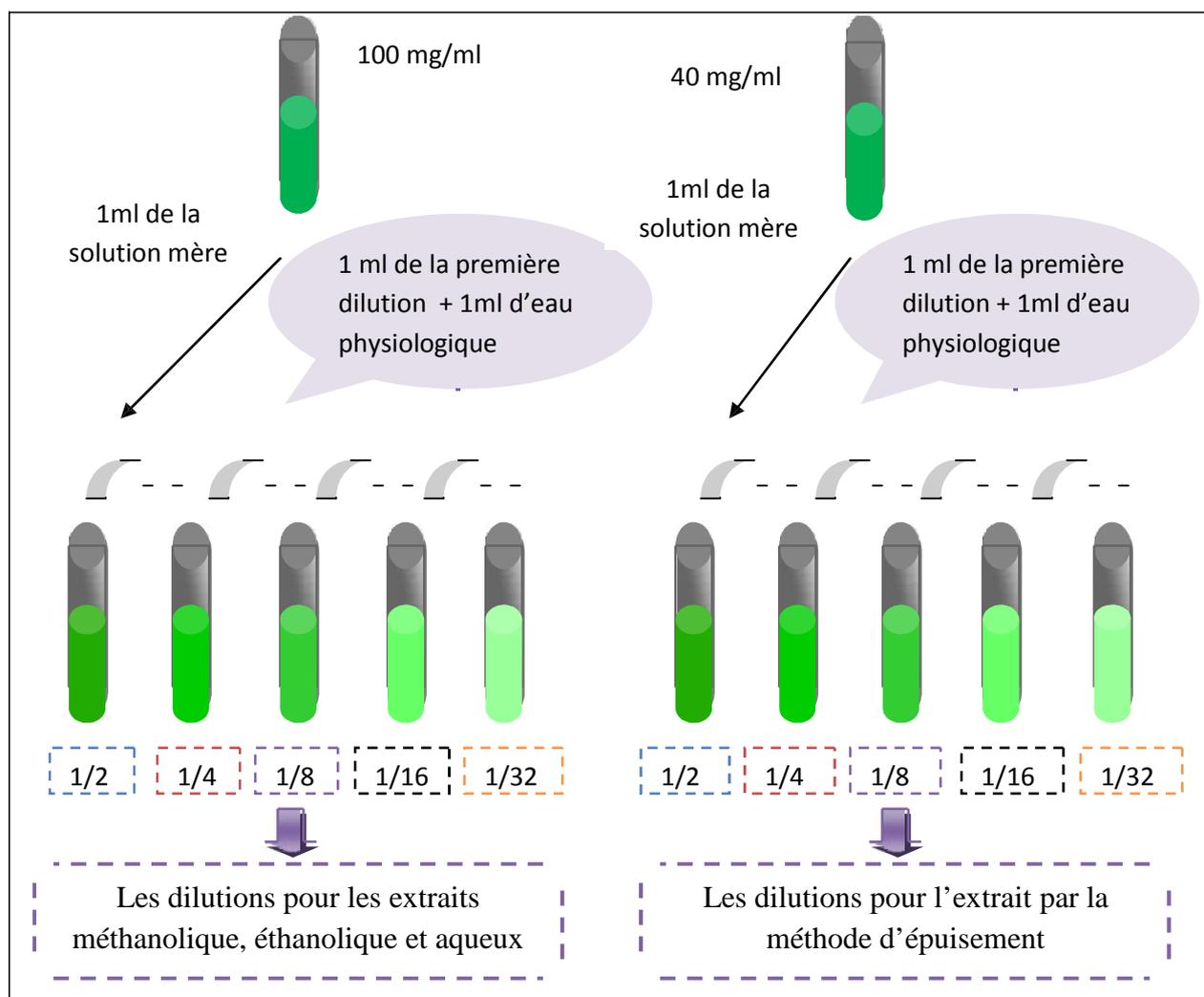
**Figure 14 :** Protocole de détermination de pouvoir réducteur (Oyaizy, 1986).

## V- L'évaluation de l'activité antibactérienne

L'objectif de cette étude est de déterminer parmi les extraits préparés, ceux qui ont une activité inhibitrice des bactéries à Gram-positif et des bactéries à Gram-négatif. L'évaluation de l'activité antibactérienne est effectuée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé selon **Mothana et lindequist (2005)** et **Mamoudi et al., (2012)**.

### V-1- Préparation des dilutions des extraits de *Citrus reticulata blanco*

Les extraits de *Citrus reticulata Blanco* ont été dissous dans l'eau physiologique pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives (**Terki et al., 2009**). Sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 100 mg/ml pour les extraits méthanolique, éthanolique et à l'eau bouillante, 40 mg/ml pour la méthode par épuisement (figure 15).



**Figure 15 :** Préparation des dilutions des extraits de *Citrus reticulata blanco*.

### V-2- Souches bactériennes et milieux de culture

Les bactéries utilisées dans ce travail sont des souches de référence: *E. coli* ATCC 4157 – *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella typhi* S.R hospitalière (**Tableau III**).

**Tableau III :** Souches bactériennes testées (**Larpent ,2000 ; Humbert, 1998 ; Sutra, 1998 ; Magras et al, 1998; Bernard et Alain, 2002**).

Souches bactériennes	Famille	Gram	pathogénicité
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	-	+/-
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcaceae</i>	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	+	+/-
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	-	+

### V-3- Standardisation

A partir d'une culture pure et fraîche de 24 heures, les bactéries isolées sont raclées à l'aide de l'anse de platine, l'anse est ensuite déchargée dans 9 ml d'eau physiologique. Après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, les inocula sont ajustés jusqu'à obtenir une DO de 0.08 à 0.1 environ ce qui correspond à  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml à 625 nm.

### V-4- Isolement des souches

Les souches ont été isolées à partir d'une culture fraîche, obtenue sur bouillon nutritif. Un ensemencement par strie est réalisé sur les milieux : Hektoon pour *E. coli* et *Salmonella typhi*, gélose nutritive *S. aureus* et *Bacillus subtilis*. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 heures à 37°C, l'objectif de la technique est d'avoir des colonies bien isolées (Bolou et al., 2011).

### V-5- L'inoculum

A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement, on racle à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur stérile quelques colonies bien isolées et semblable. On décharge l'anse dans de bouillon nutritif stérile, on homogénéise la suspension bactérienne et on l'incube pendant 18 heures à 37 °C (Bolou et al., 2011).

### V-6- Préparation des disques

- les disques sont préparés à partir de papier filtre, avec un diamètre de 6 mm, suivant le diamètre de l'emporte-pièce (Bekhechi et al., 2008).
- une fois les géloses Muller – Hinton ensemencées, les disques sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen.

### V-7- L'ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillon selon les étapes suivantes :

- Le milieu de culture utilisé est Muller–Hinton, c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- Tremper l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Sur une boîte de Pétri présentant 4 mm d'épaisseur de gélose Muller–Hinton, frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération en tourne la boîte sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Déposer les disques imbibés de 15  $\mu$ l de chaque extrait sur la gélose de Muller-Hinton.

### **V-8- Incubation et lecture**

Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C, les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition.

#### **◆ Préparation des contrôles**

Contrôle négatif : ensemencement d'extrait sur la boîte de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton.

Contrôle positif : ensemencement les bactéries sur la boîte de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton.

### **V-9- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

Cette technique se pratique sur milieu solide, elle consiste à réaliser des dilutions d'extrait, et à les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi, et à tester sur ces milieux les souches bactériennes à étudier. Ce test donne un intervalle de valeurs de la concentration minimale inhibitrice de chaque souche après 24 heures d'incubation dans l'étuve à 37°C (Alzoreky et Nakahara, 2003; Salie et al., 1996).

Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations aux quelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives, ont été réalisées. En prélève 15 µl et on imbibe les disques qui sont ensuite déposés sur les boîtes de Pétri.

### **V-10-Evaluation de l'activité bactériostatique ou bactéricide**

La détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide a été réalisée en frottant la gélose dans les zones d'inhibition autour des disques, puis en réalisant un ensemencement dans des tubes contenant du bouillon nutritif. Après agitation au vortex, les tubes sont incubés à 37°C durant 24h. L'absence de trouble indique l'inhibition de la croissance de l'inoculum bactérien, dans ce cas l'extrait est considéré comme étant bactéricide. La présence de trouble indique par contre que l'extrait est bactériostatique.

# *Chapitre V: Résultats et discussions*

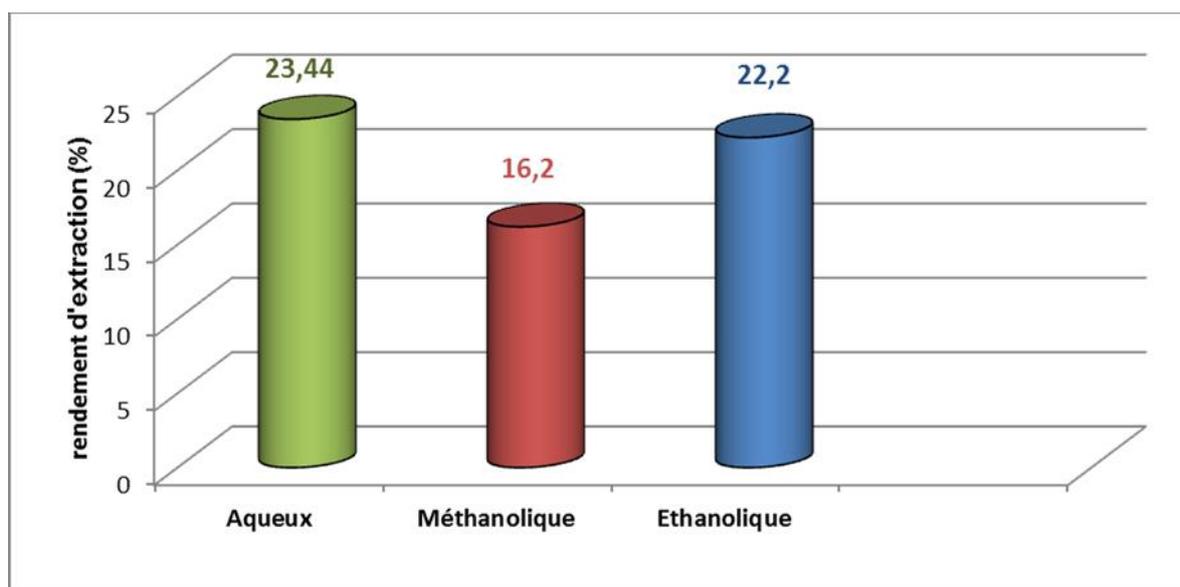
## 1- Détermination du rendement d'extraction des composés phénoliques

D'après les résultats présentés dans la figure16, l'extrait aqueux des feuilles présente un meilleur rendement : 23.44% par rapport à celui de l'extrait éthanolique : 22.2% et 16.2% pour l'extrait méthanolique.

Les variations des rendements d'extraction peuvent être attribuées à la différence de solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction. A côté de la méthode d'extraction, d'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité de l'extraction des polyphénols on cite :

- La nature et le volume du solvant utilisé.
- La récolte des échantillons, en effet la période de récolte à une influence sur le rendement d'extraction (Telli et al., 2010).
- La température et le temps d'extraction (macération).

On constate que l'eau est le solvant le plus approprié pour cette extraction.



**Figure 16 :** Comparaison des rendements d'extraction des quatre extraits de *C. reticulata blanco*.

Selon Amarti et al., (2010) la composition chimique des composés phénoliques, du point de vue qualitatif et quantitatif, peut varier. Ces variations sont en rapport avec certains facteurs écologiques, la partie de la plante utilisée et l'âge de la plante ou même les facteurs génétiques.

## 2- Teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits de *Citrus reticulata blanco*

### 2-1- Teneur en polyphénols totaux

La couleur bleue après 2 h d'incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif Folin-Ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphénols.

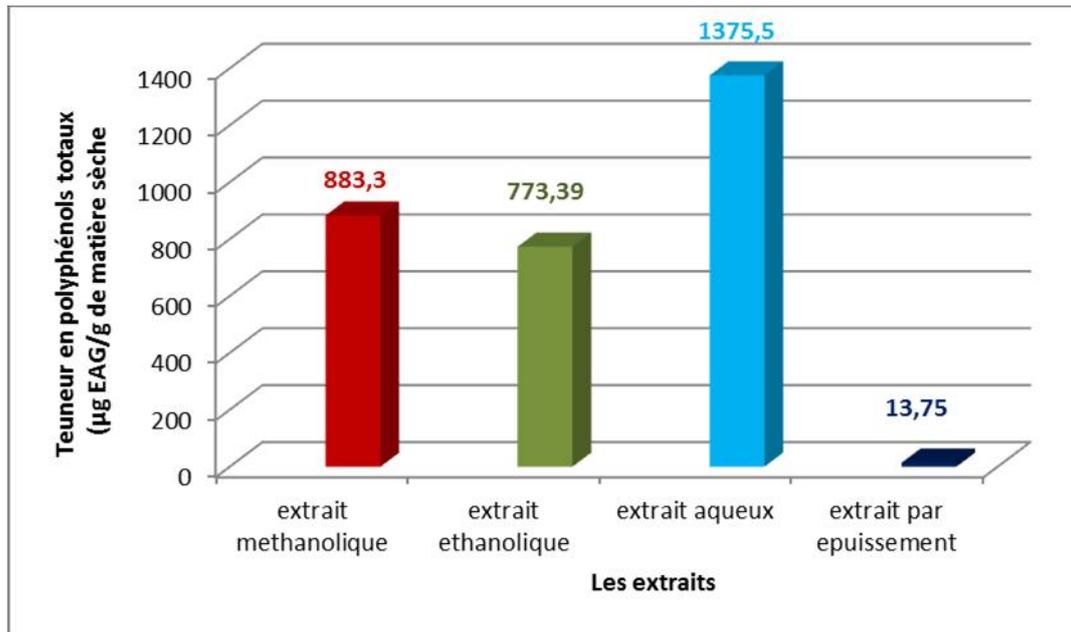
La teneur totale en composés phénoliques des extraits de *Citrus reticulata blanco* a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique (annexe V) comme polyphénol de référence. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/g de MS) et présentés dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Résultats du dosage des polyphénols totaux.

	<b>Extrait méthanolique</b>	<b>Extrait ethanolique</b>	<b>Extrait aqueux</b>	<b>Extrait par épuisement</b>
<b>Concentration en E AG (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	83	77.03	27.4	55.03
<b>Taux en mg EAG/g de MS</b>	833.3	773.39	1375.5	13.75

Les résultats obtenus (figure 17) confirment que les différents solvants d'extraction utilisés présentent des différences dans leur capacité à extraire les composés phénoliques de *Citrus reticulata blanco*.

La teneur la plus élevée est obtenue par l'extrait aqueux 1375.5 mg EAG/g de matière sèche (MS), la plus faible est enregistrée pour l'extrait obtenu par la technique d'épuisement 13.75 mg EAG/g de matière sèche. Ceci confirme que la méthode d'extraction influence la teneur en polyphénols.



**Figure 17:** Teneurs en polyphénols des quatre extraits de *C. reticulata blanco*.

Une étude menée par **Li et ses collaborateurs (2006)** sur l'effet de la concentration du solvant et la durée d'extraction, sur la teneur en composés phénoliques de plusieurs variétés de *Citrus*, montra que l'extraction avec l'éthanol à 72 % après 6 heures de macération donne une teneur de  $1.21 \pm 0.11$  mg EGA / g d'écorce sec de la mandarine et  $1.616 \pm 0.17$  mg EGA/ g d'écorce sec de limon ce qui est inférieur aux valeurs obtenues dans notre étude avec l'extrait à éthanolique à 80 %.

L'étude de **Boudries et al. (2012)** sur le jus de mandarine présente une valeur de  $3888 \pm 43.71$  mg équivalent d'acide gallique ce qui est largement supérieur au taux enregistré par tous les extraits des feuilles de *Citrus reticulata blanco* dans notre étude. Ceci prouve que les concentrations en polyphénols varient selon la partie de la plante utilisée dans les tests (**Boudries et al., 2012**).

Une autre étude réalisée par **Gghasemi et ses collaborateurs (2009)** sur l'écorce et les tissus de 13 variétés de citrus exhibe des valeurs variant de 104.2 ; 161.7 et 172.1 mg EGA/ g de matière sèche d'écorce selon les variétés de *Citrus reticulata*, ces derniers sont largement inférieur à tous les résultats des extraits des feuilles de *Citrus reticulata Blanco* sauf pour l'extrait par épuisement.

Une étude faite par **Menichini et al. (2011)** sur les fleurs, les feuilles et les fruits de *Citrus medica* enregistre une teneur de  $4.016 \pm 0.5$  mg /g de matière sèche dans les feuilles, cette valeur est largement inférieure à celle obtenu dans les feuilles de *Citrus reticulata*

*blanco*. Cette différence est probablement due à la technique d'extraction utilisée par cet auteur.

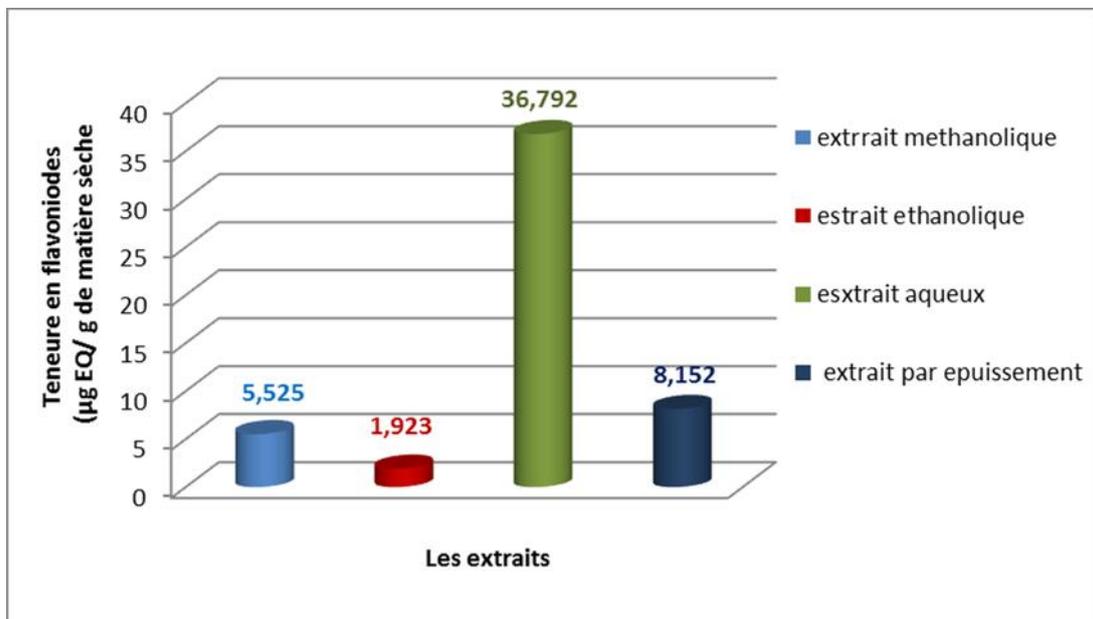
### 2-2- Teneur en flavonoïdes

La quantité de flavonoïdes contenus dans les extraits des feuilles de *citrus reticulata blanco* a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage utilisant la quercétine comme flavonoïde de référence (Annexe V). Les résultats du dosage des flavonoïdes sont consignés dans le tableau V.

**Tableau V:** Résultats du dosage des flavonoïdes.

	Extrait méthanolique	Extrait éthanolique	Extrait aqueux	Extrait par épuisement
<b>Concentration en EQ (µg/ml)</b>	3.667	12.772	4.886	18.045
<b>Taux en mg EQ/g de MS</b>	5.525	1.923	36.792	8.152

Suivant les données obtenues (figure 18), le taux le plus élevé en flavonoïdes est repéré dans l'extrait aqueux avec 36.79 mg équivalent de quercétine / g d'extrait, suivi de l'extrait par épuisement avec 8.15 mg EQ/g MS, puis l'extrait méthanolique avec 5.52 mg EQ/g MS et enfin l'extrait éthanolique qui présente une faible teneur en flavonoïdes correspondant à 1.92 mg EQ/g d'extrait.



**Figure 18 :** Teneurs en flavonoïdes des quatre extraits de *C. reticulata blanco*.

La teneur moyenne des feuilles de *Citrus reticulata blanco* en flavonoïdes est relativement plus élevée dans le cas de l'extrait aqueux, par épuisement et méthanolique par

rapport à la teneur de l'écorce des fruits des citrus étudiées par **Huang et al. (2010)** qui est de  $4.78 \pm 0.7$  mg équivalent de rutine/ g d'extrait pour *citrus rediculata*. Une étude menée par le même auteur, montre un taux de  $1,93 \pm 0.8$  mg équivalent rutine / g de matière sèche dans l'écorce des fruits de variété *Citrus reticulata x Citrus sinensis (Murcott)*, Cette valeur se rapproche de celle retrouvée par l'extrait éthanolique et est inférieure à celle des extrait méthanolique, aqueux et par épuisement dans les feuilles de *Citrus reticulata blanco*.

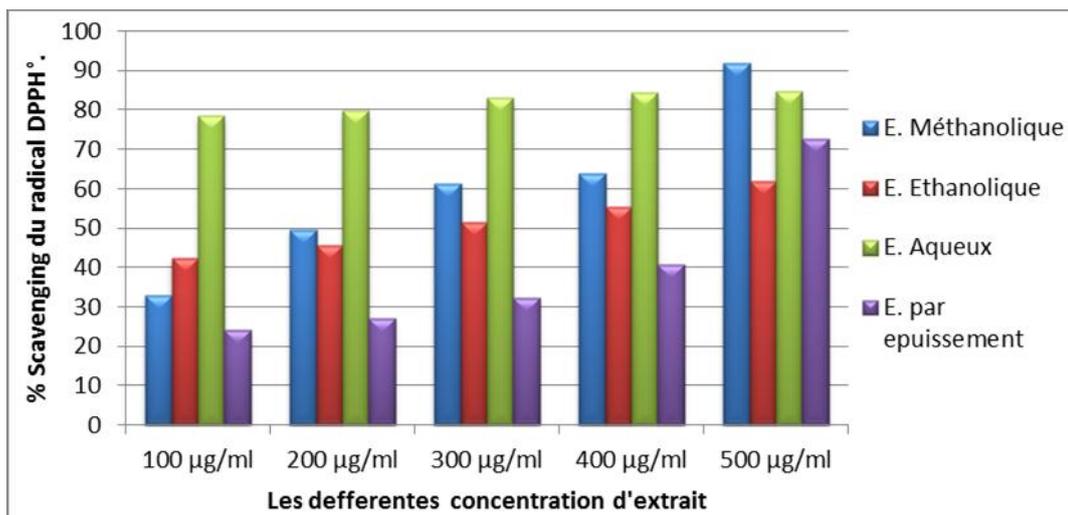
Une étude réalisée par **Ramful et al. (2011)** sur les fruits des citrus exhibe une valeur variant de 0.4 à 0.6 mg/g de matière sèche ce qui est largement supérieur à tous les résultats des extraits de notre étude. Cela est probablement dû à la différence entre la méthode et la partie de la plante utilisée.

### 3- Evaluation de l'activité antioxydant et antiradicalaire

Le pourcentage d'activité scavenger est proportionnel à la concentration des différents extraits, elle augmente avec l'augmentation de la concentration. En effet, les extraits des feuilles de *Citrus reticulata blanco* expriment une capacité scavenger importante vis-à-vis du radical DPPH et ABTS. Cette capacité varie considérablement d'un extrait à un autre, elle est en fonction de la concentration et de la nature des composés phénoliques.

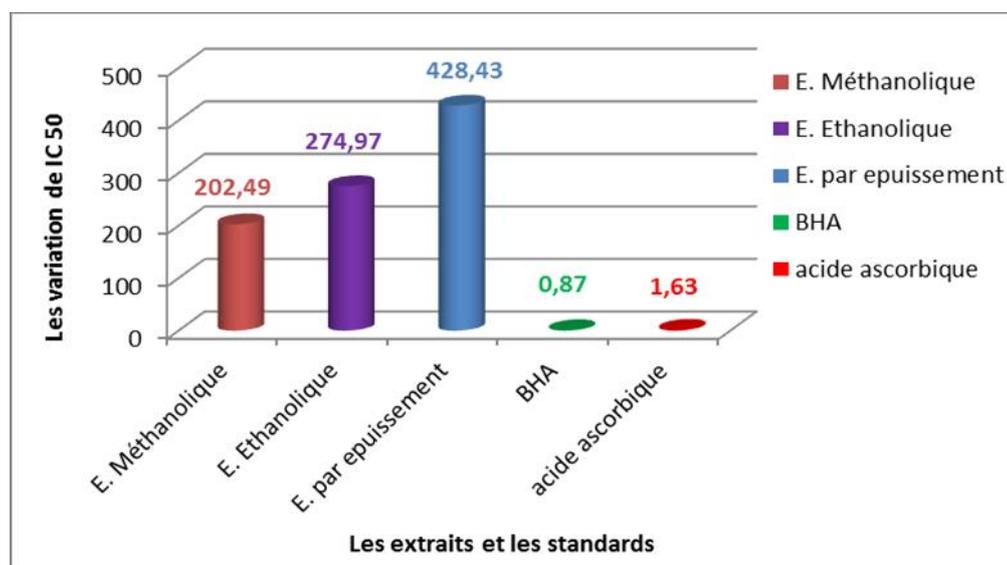
#### 3-1- Activité scavenging du radical DPPH°

Les résultats figurant dans le tableau VI et les figures 19, 20 illustrent l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH aussi que les  $IC_{50}$  des différents extraits utilisés dans cette étude (Annexe IV).



**Figure 19** : Variation de l'inhibition de DPPH° en fonction des concentrations des extraits.

L'activité antioxydant des extraits est exprimée en IC<sub>50</sub>, il définit la concentration de l'extrait qui cause la perte de 50 % de l'activité du radical DPPH.



**Figure 20 :** Activité anti-radicalaire des extraits de *C. reticulata blanco* et des standards.

**Tableau VI :** Activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH.

Les concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH° (IC <sub>50</sub> )	
Extrait méthanolique	202.49 ± 0.02
Extrait éthanolique	274.97 ± 0.01
Extrait par épuisement	428.43 ± 0.02
BHA	0.87 ± 0.10
Acide ascorbique	1.63 ± 0.14

D'après les résultats obtenus (figure 20), les extraits méthanolique et éthanolique ont exhibé les meilleures capacités antioxydant vis-à-vis du radical DPPH, enregistrant ainsi des IC<sub>50</sub> de 202.49 ± 0.02, 274.97 ± 0.01 µg/ml respectivement. Une faible capacité antioxydant est enregistrée par l'extrait par épuisement qui présente une valeur de 428.43 ± 0.02 µg/ml. Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire contre le DPPH°. Plus la valeur de CI<sub>50</sub> est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

La capacité antioxydant est 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).

Les extraits des feuilles de *Citrus reticulata blanco* ont donné de meilleures concentrations inhibitrices par rapport aux études faites par :

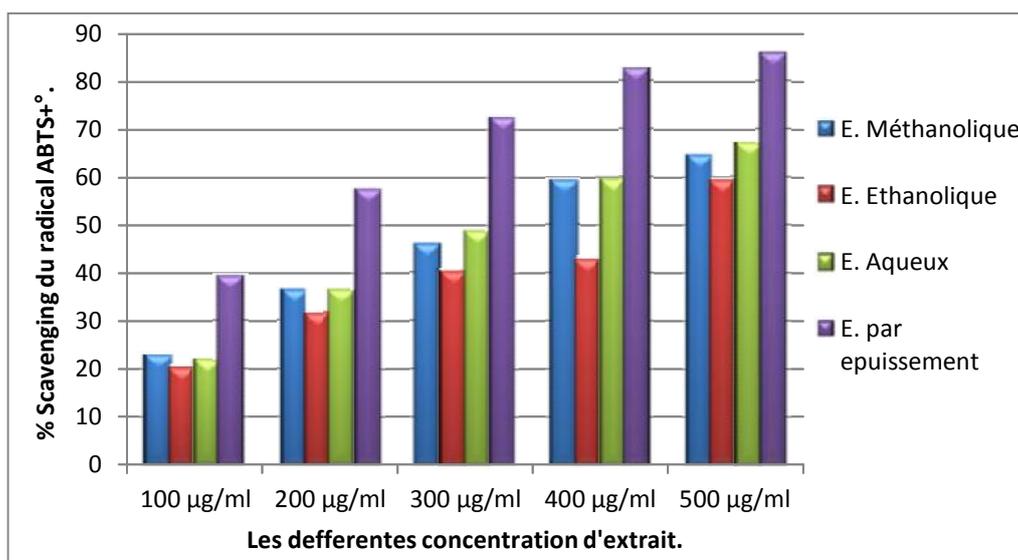
- **Boudrie et al., (2012)** sur le jus du *Citrus* avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 1140 ± 0.05 à 1910 ± 0.06 µg/ml.
- **Ghasmi et al., (2009)** sur *Citrus reticulata* avec une valeur de 600 µg/ml.
- **Menichini et al., (2011)** sur les feuilles de *Citrus medica* avec une valeur de 502.0 ± 3.01.
- **Moulehi et al., (2012)** sur fruit des *Citrus reticulata Blanco* avec une valeur de 210 µg/ml dans le cas de l'extrait méthanolique seulement.

### 3-2- Activité scavenging du radical ABTS<sup>o</sup>

L'activité des extraits est exprimée par la capacité antioxydant équivalente du Trolox (annexe V) qui correspond à la concentration du Trolox donnant la même capacité antioxydant qu'une concentration du composé testé. Le tableau VII et la figure 21 illustrent les résultats de l'activité anti-radicalaire contre l'ABTS<sup>o</sup> exprimés en pourcentage d'inhibition.

**Tableau VII : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS<sup>o</sup>.**

	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml	400 µg/ml	500 µg/ml
<b>Extrait méthanolique</b>	32.95 %	49.62 %	61.31 %	63.8 %	91.90 %
<b>Extrait éthanolique</b>	42.50 %	45.53 %	51.60 %	55.33 %	61.78 %
<b>Extrait aqueux</b>	78.38 %	79.68 %	82.99 %	84.22 %	84.57 %
<b>Extrait par épuisement</b>	24.00 %	26.97 %	32.34 %	40.81 %	72.73 %



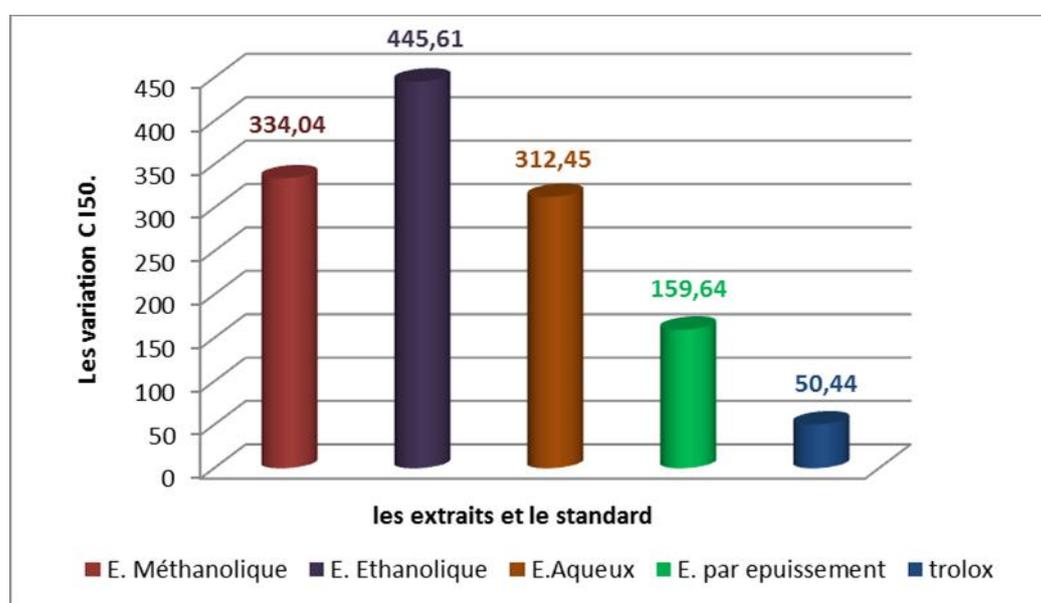
**Figure 21 : Variation de l'inhibition de l'ABTS<sup>o</sup> en fonction des concentrations des extraits.**

L'IC<sub>50</sub> est la concentration qui correspond à 50 % d'inhibition du radical ABTS<sup>°+</sup>, la valeur la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée par conséquent une activité anti-radicalaire plus importante. Les résultats des IC<sub>50</sub> des différents extraits ainsi que de la molécule de référence exprimée sont présentés sur le tableau VIII et la figure 22.

**Tableau VIII :** Activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical ABTS<sup>°+</sup>.

Les concentrations inhibitrices de 50% du radical ABTS <sup>°+</sup> (IC <sub>50</sub> )	
Extraits méthanolique	334.04 ± 0.055
Extraits éthanolique	445.61 ± 0.015
Extraits par épuisement	159.64 ± 0.046
Extrait aqueux	312.45 ± 0.091
Trolox	50.44 ± 0.039

L'extrait au méthanol des feuilles de *Citrus reticulata blanco* se montre plus performant avec la meilleure activité antioxydant et un effet scavenger du radical ABTS<sup>°+</sup> qui s'avère très puissant avec les pourcentages d'inhibition de 91.90 %. Cependant les plus faibles IC<sub>50</sub> est obtenue pour l'extrait par épuisement, ce qui montre que ce dernier est plus performant.



**Figure 22 :** Activité anti-radicalaire des extraits de *C. reticulata blanco* et les standards.

De ces résultats nous pouvons conclure que les extraits des feuilles manifestent un effet anti-radicalaire puissant contre le radical ABTS<sup>°+</sup> exprimant ainsi des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 159.64 µg/ml pour l'extrait par épuisement, 312.45 µg/ml pour l'extrait aqueux et de 334.04

$\mu\text{g/ml}$  pour l'extrait méthanolique. L'extrait éthanolique exprime par contre une valeur d' $\text{IC}_{50}$  élevée de  $445.61\mu\text{g/ml}$ , il a donc un effet antiradicalaire plus faible vis-à-vis du radical ABTS.

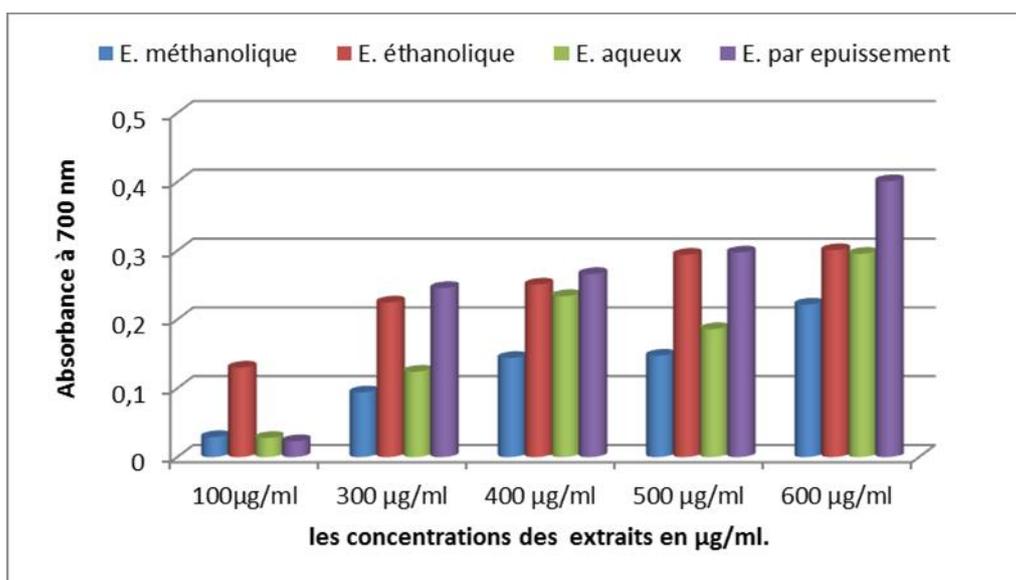
Ces résultats nous permettent de conclure que les composés phénoliques responsables de la capacité antioxydant des extraits des feuilles de *Citrus reticulata blanco* sont polaires, ceci peut être expliqué par la richesse de la plante en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Nos résultats sont largement supérieur à ceux obtenus lors d'une étude menée par **Ramful et ses collaborateurs (2011)** sur le fruit du *Citrus* qui exhibe des valeurs variant entre  $2.92 \pm 0.06$  à  $5.63 \pm 0.19 \mu\text{mol}$  équivalente de Trolox/ g matières sec. Ces différences pouvaient être expliquées par la présence des molécules anti-oxydantes différentes au niveau des feuilles et des fruits et à des taux différent (**Ramful et al., 2011**).

### 3-3- Activité réductrice (FRAP)

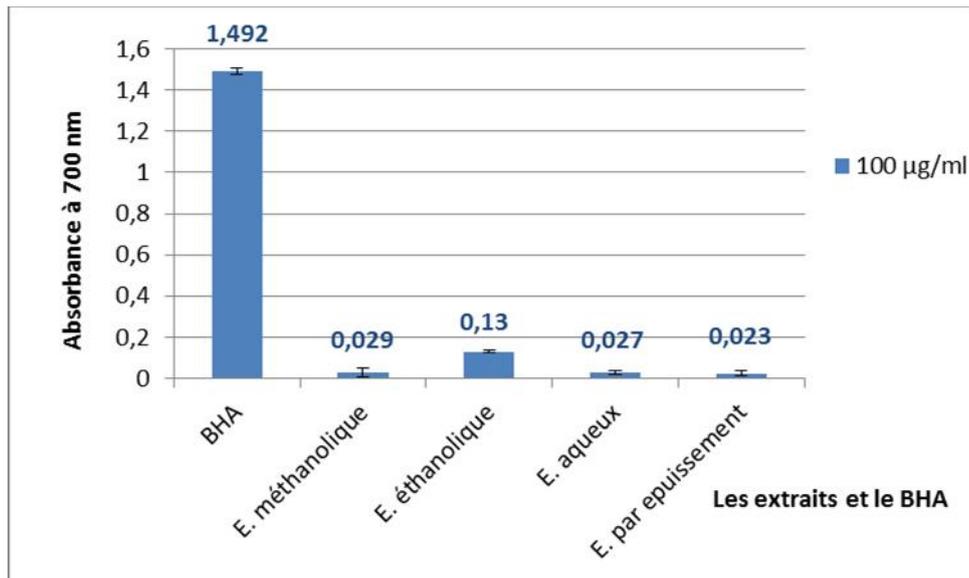
Le pouvoir réducteur d'une substance peut être défini par sa capacité de transférer un électron ou de donner un atome d'hydrogène. Dans cet essai, le potentiel réducteur est mesuré par la transformation de  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ .

De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son activité antioxydant. La concentration des composés réducteurs présents dans tous les extraits étudiés est exprimée en équivalence de BHA comme standard (annexe V), les résultats obtenus sont montrés dans la figure 23.



**Figure 23 :** Comparaison entre les pouvoirs réducteurs des différents extraits de *Citrus reticulata blanco*.

D'après la figure 24, les meilleurs pouvoirs réducteurs ont été obtenus avec le BHA ( $1.492 \pm 0.018$ ) suivis par l'extrait éthanolique ( $0.13 \pm 0.007$ ) qui a une activité réductrice plus importante que celle obtenue par l'extrait méthanolique ( $0.029 \pm 0,02$ ) puis l'extrait aqueux ( $0.027 \pm 0.01$ ). La plus faible concentration est exhibée par l'extrait par épuisement ( $0.023 \pm 0.013$ ) à  $100 \mu\text{g/ml}$ . L'extrait de la plante étudiée possède la plus faible activité réductrice parce qu'il a une concentration faible en composés antioxydants par rapports aux standards utilisés.



**Figure 24 :** Comparaison entre les pouvoirs réducteurs des extraits de *Citrus reticulata blanco* et le standard BHA à  $100 \mu\text{g/ml}$ .

Les résultats obtenus sont largement inférieurs à ceux d'une étude réalisée par **Ramful et al. (2011)** sur le pouvoir réducteur des écorces des fruits de *Citrus* ( $3.27 \pm 0.06$  à  $8.22 \pm 0.04$ ).

#### 4- L'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de quatre (04) bactéries.

Le tableau IX montre l'activité antibactérienne des polyphénols des différents extraits de *Citrus reticulata blanco* vis-à-vis des bactéries testées.

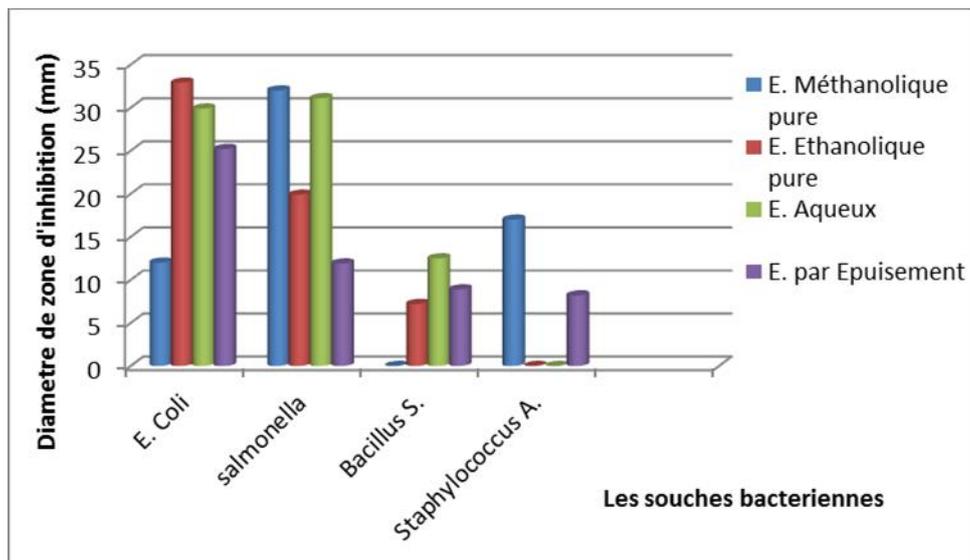
**Tableau IX :** Activité antimicrobienne des extraits de *C. reticulata blanco*.

Concentration d'extrait (mg/ml)		Diamètre de zones d'inhibition (mm)			
		Gram -		Gram +	
		<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Extrait Méthanolique	Pure (100)	12.0	32.0	17.0	*
	50	8.9	8.4	8.9	*
	25	8.0	8.2	7.9	*
	12.5	8.0	8.0	7.8	*
	6.25	7.4	8.0	7.5	*
	3.125	7.2	7.4	7.2	*
Extrait Ethanolique	Pure (100)	32.9	19.9	*	7.2
	50	21.2	8.6	*	*
	25	16.2	*	*	*
	12.5	16.0	*	*	*
	6.25	12.2	*	*	*
	3.125	12.0	*	*	*
Extrait Aqueux	Pure (100)	29.9	31.1	*	12.5
	50	21.2	14.2	*	*
	25	19.8	13.8	*	*
	12.5	18.9	11.4	*	*
	6.25	15.2	9.1	*	*
	3.125	13.1	8.9	*	*
Extrait par Épuisement	Pure (40)	25.2	11.9	8.2	8.9
	20	24.9	10.5	7.4	8.0
	10	19.9	10.0	*	7.9
	5	17.8	9.0	*	*
	2.5	14.0	7.3	*	*
	1.25	12.1	*	*	*
Témoin positive	*	*	*	*	*
Témoin négative	*	*	*	*	*

\* : absence de zone d'inhibition.

Les zones d'inhibition les plus élevées sont obtenues par l'extrait méthanolique à une concentration de 100 mg/ml sur *Salmonella typhi* (32 mm), *S. aureus* (17 mm) et *E. coli* (12 mm) par contre *Bacillus subtilis* est très résistant aux différentes concentrations de cet extrait.

Par ailleurs, *E. coli* et *Salmonella typhi* sont les plus sensibles à l'extrait éthanolique avec des zones d'inhibition de 32.9 mm et 19.9 mm de diamètre respectivement, 29.9 mm et de 31.1 mm de diamètre respectivement pour l'extrait aqueux et 25.2 mm, 11.9 mm de diamètre pour l'extrait par épuisement à 100 mg/ml. *Bacillus subtilis* et *S. aureus* sont résistant à ces extraits (figure 25).



**Figure 25 :** Effet inhibiteur des extraits pur (brut) sur quatre souches bactériennes.

**Melendez et Capriles (2006)**, ont mis en évidence un effet antibactérien des extraits appartenant aux genres *Citrus* à l'égard de *S. aureus*, *Bacillus subtilis* et *E. coli*. Cette dernière espèce s'est montrée sensible à *Citrus aurantium* et *Citrus aurantifolia* avec des zones d'inhibition respectivement de 12 mm et 20 mm, quand à *S. aureus*, les zones observées sont respectivement de 27 et 30 mm. Pour *Bacillus subtilis* les zones sont de 17 et 20 mm respectivement.

Les résultats obtenus avec nos extraits, en ce qui concerne l'activité inhibitrice des composés phénoliques sont inférieurs à ceux obtenus par **Melendez et Capriles (2006)** pour *Bacillus subtilis* et *S. aureus*. En revanche l'extrait éthanolique, aqueux et par épuisement présentent une activité très importante vis -à- vis de *E. coli* avec des zones d'inhibition de 32.9, 29.9, 25.2 mm respectivement d'une part, d'autre part l'extrait méthanolique a une activité similaire à celle de *Citrus aurantium*.

D'autres études réalisées par **Mathur et al. (2011)** sur l'écorce de trois variétés de citrus (*Citrus sinensis*, *Citrus maxima* et *Citrus reticulata*) montrent une activité importante des extraits éthanolique et aqueux sur *S. aureus*, ceci pourrait être dû à une composition ou une teneur différente des plantes étudiées en composés phénoliques.

◆ **Détermination des concentrations minimales inhibitrices**

Le tableau X montre les résultats des concentrations minimales inhibitrices des composés phénoliques des différents extraits étudiés.

**Tableau X :** Les CMI des extraits phénoliques de *C. reticulata Blanco*.

Les souches	Les valeurs des CMI (mg/ml)			
	Extrait Méthanolique	Extrait Ethanolique	Extrait Aqueux	Extrait par épuisement
<i>E. Coli</i>	> 3.125	> 3.125	> 3.125	> 1.25
<i>Salmonella typhi</i>	> 3.125	25	> 3.125	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 3.125	100 (brute)	100 (brute)	10 (brute)

D'après les résultats de tableau X, il a été constaté que l'extrait méthanolique, éthanolique et aqueux ont une concentration inhibitrice de >3.12 mg/ml vis-à-vis de *E. coli*. La même concentration enregistre pour les extraits méthanolique et aqueux vis-à-vis de *Salmonella typhi*. *Bacillus sebtilis* étant, d'après les résultats obtenus, résistante à la plupart des extraits, la détermination de la CMI n'a pas été réalisée.

La plus faible concentration inhibitrice est de >1.25 mg/ml a été estimée pour l'extrait par épuisement contre *E. coli* et *Salmonella typhi*.

◆ **Détermination de l'activité bactériostatique et bactéricide**

Les tubes contenant le bouillon nutritif,ensemencés à partir des zones d'inhibition ayant montré un trouble après 24h d'incubation, nous pouvons donc déduire que nos extraits ont une action bactériostatique sur les souches étudiées ayant présenté une sensibilité vis-à-vis des extraits.

*Conclusion*

## Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leur propriété thérapeutique.

Le présent travail, nous a permis d'étudier l'activité antioxydant et antibactérienne des polyphénols des feuilles d'une plante locale qui représente une source de substances naturelles bioactives.

A l'issue des résultats obtenus, le dosage des composés phénoliques contenus dans les 4 extraits a révélé des teneurs moyennement élevées en polyphénols qui sont respectivement de 833.3, 773.39, 1375.5 et 13.75 mg E AG/g de MS pour l'extrait méthanolique, l'extrait éthanolique, l'extrait aqueux et l'extrait par épuisement. Avec des concentrations importantes en flavonoïdes qui sont respectivement de 5.525, 1.923, 36.792 et 8.152 mg EQ/g de MS pour l'extrait méthanolique, l'extrait éthanolique, l'extrait aqueux et l'extrait par épuisement.

L'activité antioxydant, déterminée par DPPH, ABTS et pouvoir réducteur montre que les composés phénoliques ont une activité moyenne comparée à d'autres études pour tous les extraits.

Au cours de cette étude nous avons réalisé un test antibactérien vis-à-vis de 4 bactéries à Gram – et Gram +, selon la méthode de diffusion utilisant des disques. Les résultats de l'évaluation de l'effet antibactérien des polyphénols totaux de *Citrus reticulata Blanco* ont permis d'affirmer que tous les extraits ont manifesté une activité antibactérienne sur les 4 souches testées mais une activité importante est notée pour l'extrait éthanolique, l'extrait aqueux et l'extrait par épuisement sur *E. coli* dont les zones d'inhibition dépassent les 25 mm et pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux sur *Salmonella typhi* dont les zones dépassent les 30 mm. Les concentrations minimales inhibitrices pour *E. coli* est supérieure à 3.125mg/ml pour tous les extraits et supérieure à 3.125 mg/ml pour *Salmonella typhi*.

En perspectives, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur les feuilles de *Citrus reticulata Blanco* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les principes actifs de cette plante en utilisant des méthodes plus précises telles que l'HPLC et RMN. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, il serait intéressant de définir le mécanisme d'action de ces substances végétales sur les microorganismes.

L'étude de l'activité antioxydant serait un atout car *Citrus reticulata Blanco* est connue pour son pouvoir antioxydant, cette propriété est recherchée dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Cependant en sachant que les antioxydants contribuent de manière significative au traitement des maladies telles que le cancer et les maladies cardiaques, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour. La réalisation d'une étude toxicologique serait une étape substantielle afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux comprendre les sites d'action des substances actives.

*Références bibliographiques*

# Référence Bibliographique

## A

**Abdou Bouba A., Njintang Y.N., Scher J., Mbofung C M F. (2010).** Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices; *Agric. Biol. J. N. Am.*, **1(3)**: 213-224.

**Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Arab L., El Ajjouri M., Chaouch A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne de huiles essentielles de *Tymus algeriensis* Boiss, et Reut, et *Tymus ciliatus* (Desf.). Benh. Du Maroc ; *biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14 (1)**: 141-148.

**Akman T., Akarsu M., Akpınar H., Resmi H., Sezer E. (2012).** Erythrocyte Deformability and Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease; *Dig Dis Sci*; **57**: 458–464.

**Akowuah G.A., Ismail Z., Norhayati I., Sadikun A. (2005).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of orthosiphon stamineus and evaluation of the free radical-scavenging activity; *Food Chemistry*; **93**: 311–317.

**Akroum S. (2006).** Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* ; mémoire de magister ; Option de Biochimie et Microbiologie Appliquée ; Université Mentouri de Constantine ; pp 91.

**Akroum S. (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels ; thèse de doctorat en sciences ; option physio-toxicologie ; Université du Montouri de Constantine ; pp 112.

**Alzoreky S., Nakahara K. (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia; *International Journal of Food Microbiology*; **80**: 223– 230.

**Atanasova .M., Ribarova .F.( 2009).** Phénol et flavoniodes totaux dans les extraits sec des feuilles des bouleaux argentés bulgares (betula pendula) ; *Revue de Génie industrielle*; **4** : 21-25

**Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., Khebri S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminim L.*, *Lebanese Science Journal*, **11(1)** : 69-81.

## B

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

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

**Barreca .D.,Bellocco. E.,Caristi. C., Leuzzi .U., Gattuso. G.( 2011).** Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and rip chinotte ( citrus mgrtifolia Rof) fruit tissues, leaves and seed, *Food Chemistry*; **129**: 1504-1512.

**Belkheiri N. (2010).** Dérives phénoliques à activités antiathérogènes ; thèse de Doctorat ; l'Université Toulouse III - Paul Sabatier ; spécialité : Chimie-Biologie-Santé ; pp 193.

**Bellebcir L.( 2008).** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales ; Mémoire de magister; option Biodiversité et production végétale ; Université Mentouri de Constantine ; pp 69.

**Bellow S. (2012).** Etudes des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au mildiou; Thèse doctorat en sciences ; Université paris SUD; pp 120.

**Benarous K. (2006).** Chapitre 6: evaluation de Pactivite antioxydante in Effets des extraits de quelques plantes medicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase.

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

**Benouda A., Tagajdid M.R. (2008).** Antibiogramme: choix, interpretation et limites; les technologies de laboratoires, **10** : 16-20.

**Bernard J., Alain R, (2002).** Entérobactéries systématique et méthodes de diagnostic, Edition TEC & DOC, Paris ; pp 27-46.

**Bolou G.E.K, Attioua B., N'Guessan A.C., Coulibaly A., N'Guessan J.D., Djaman A.J. (2011).** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* ; Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liégé ; **80** : 772-790.

**Bouguerra A. (2012).** Etude des activités biologiques des l'huiles essentielles extraite des graines de *Foeniculum Vulgare* MILL. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire ; mémoire de magister en sciences alimentaires ; option de biotechnologies alimentaires, Université Montouri Constantine ; pp 77.

**Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (1999).** Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], p. 647-673.

## C

**Camille B. (2009).** Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en poly phénols chez la tomate ; These de Doctorat de l'INPL ; *Mention Sciences Agronomiques* ; UMR 1121 Nancy Université – INRA, Agronomie et Environnement; pp 227.

**Chang, C.C.; Yang, M. H.; Wen H. M. and Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, **10 (3)**:178-182.

**Castellucci F. (2010).** Overall determination of phenolic compound in spirituou beverage of vitivinicultural origin without added caramel, **1**: 1-4.

**Chebil L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle ; Thèse de doctorat ; filière ingénieur en Industries Alimentaires ; Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, pp 195.

**Chen P.S., Wang L.Y., Chen Y.J., Tzeng K.C., Chang S.C., Chung K.R., Lee M.H. (2012).** Understanding cellular defence in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*; *Physiological and Molecular Plant Pathology*; **79**:1-12.

## D

**Dabrowski A., Gabryelewicz A. (1992).** Oxidative Stress, An Early Phenomenon Characteristic of Acute Experimental Pancreatitis, *International journal of pancreatology*; **12 (3)**: 193-199.

**De Lourdes Mata Bilbao M., Andre ´s-Lacueva C., Jauregui O., Lamuela-Raventos R. M. (2007).** Analytical, Nutritional and Clinical Methods : Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC–DAD and LC–MS; *Food Chemistry*; **101**: 1742–1747.

**Damintoti .K., Mamoudou .H. D., Jacques .S., Alfred .S. T.(2005).** Antioxidant and antibacterial activity of polyphenols form ethnomedicinal plants of Burkina Faso, *African Journal of Biotechnology*; **4 (8)**: 823-823.

**Dorji K., Yapwattanaphun C. (2011).** Morphological Identification of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in Bhutan; *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*; **45**: 793 - 802.

**Duda-Chodak A., Tarko T., Rus A. (2011).** Antioxidant activity and total polyphenol content of selected herbal medicinal products used in Poland; **57(1)**: 48-63.

## E

**Escribano-Bailon, M.T.; Santos-Buelga, C. (2003).** Polyphenols extraction from foods. In: Method in polyphénols analysis. Ed. Roya society of Chemistry. 1-16.

## G

**Galvan d’Alessandro L., Kriaa K., Nikov I., Dimitrov K. (2012).** Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry; *Separation and Purification Technology*; **93**: 42–47.

**Gennéa D., H. Siegristb H. (2003).** De l’antibiogramme à la prescription d’un antibiotique ; *Forum Med Suisse* ; **20** : pp 464-468.

**Ghasmi K., ghasmi y., Ebrahimzadeh M.A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid content of 13 citrus species peels and tissues; *Pak-J. Pharm. Sci*; **22(3)**: 277-281.

**Ghedira. K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique

et emplois en thérapeutique ; *Pharmacognosie* ; **4**: 162-169.

**Guedes .A.C., Amaro .H.M., Giau . M.S.,Malcata .F.X.(2013).** Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria, *Food Chemistry*, **138**: 638-643.

**Guinoiseau .E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action ; thèse de doctorat ; université de Corse-Pasqual Paoli ; pp 114.

## *H*

**Hammoudi R., Hadj Mahammad M., Ramdane F., Khodir A. A. (2012).** Activité antibactérienne des extraits phénoliques de la plante *Teucrium polium geyrii*; **2(1)** : 49-55

**Hallal Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraits des citrus. Application sur la sardine (*sardina pilchardus*). Mémoire de magister en biologie, option biochimie appliquée et biotechnologie, université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pp 75.

**Harkati B. (2011).** Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de famille astéraceae: *Scorzonera Undulata.* ; Thèse de doctorat en science ; spécialité chimie organique ; Université Mentouri-Constantine ; pp 128.

**Hemalatha S., Lalitha P., Arulpriya P. (2010).** Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre); *Der Pharma Chemica*; **2(6)**: 84-89.

**Huang Y-S., Ho S-C. (2010).** Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel; *Food Chemistry*; **119**: 868–873.

**Humbert F., les salmonelles in Sutra L., Federighi M., jouve J.L. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Ed polytechnica, paris, pp 27-39.

## *I*

**Isorez G. (2007).** Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vins rouges ; Thèse de doctorat; Spécialité en chimie organique ; Université Louis Pasteur de Strasbourg; pp 207.

## K

**Kahkonen M. P., Hopia A.I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T. S., Heinonen M.(1999).** Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds; *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 3954–3962

**Kamran Khan M., Maryline A-V., Anne-Sylvie F-T., Dangles O., Chemat F. (2010).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel; *Food Chemistry*; **119**: 851–858.

**karimi E., Oskoueian E., Hawa Z.J.(2012).** Phenolic compounds choraetrization and biological activities of citrus aurantium bloom molecules; **14**: 1203-1218.

**Khatabi O., Hanine H., Elothmani D., Hasib A., (2011).** Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*), *Arabian Journal of Chemistry*.

**Khizar H., Xiaoming Z. , Umar F., Shabbar A., Shuqin X. Chengsheng J., Fang Z., Jing Z. (2010).** Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace; *Food Chemistry*; **23**: 423–429.

## L

**Larpent J.P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne : les principaux groupes bactériens, Ed TEC & DOC, paris, pp 151.

**Le K., Chiu F., Ng K. (2007).** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*; *Food Chemistry*; **105**: 353–363.

**Levaj B. ,Dragovic-Uzelac V. ,Dancevic T. ,Liber S. ,Repajic M., Bursackovacevic D . (2009).** Quality of Clementine Jam Infl uenced by Purée Pretreatment, Sugar Type and Pectin Addition, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, **74 (3)**: 227-231.

**Li B.B., Smith B., Hossain Md. M.(2006).** Extraction of phenolics from citrus peels, I. Solvent extraction method; *Separation and Purification Technology*; **48**: 182–188.

**Li .H., Xiaofei .Z., Honggao .X., Chao .X., Frang .Y., Zeliko .K., Zoran .N. ,Yanxiang .G.( 2012).** Subcritical water extraction of phenolic compounds form pomegranate (punica granatuml) seed residues and inverstigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS<sup>o+</sup> assay; *Food and Bioproducts processing*; **90**: 215-223.

**Lim. T.K. (2012).** Citrus reticulata Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. *Springer sciences et Business Media B.V.*; **4**: 695-715.

## M

**Ma Y., Ye X., Hao Y., Xu G., Xu G., Liu D. (2008).** Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel; *Ultrasonics Sonochemistry*; **15**: 227–232.

**Madani K., Boudries H., Touati N., Souagui S., Medouni S., Chibane M. (2012).** Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of Algerian Clementine Cultivars and Mandarin; *African Journal of Biotechnology*; **11(18)**: 4258-4267.

**Maurice N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI<sup>e</sup> siècle Ed. Lavoisier; Paris; p. 12-14.

**Mathur A., Verma S. K., Purohit R., Gupta V., Dua V.K.; Prasad G.B.K.S.; Mathur D.; Singh S. K., Singh S.. (2011).** Evaluation of in vitro antimicrobial and antioxidant activities of peel and pulp of some citrus fruits; *IJPI'S Journal of Biotechnology and Biotherapeutics*; **1(2)**: 1-16.

**Magras C., Federighi M., Pilet. M.F. (1998).** *Escherchai coli* vérotoxinogènes in Sutra L., Federighi M., jouve J.L. *Manuel de bactériologie alimentaire* ; Ed polytechnica, paris, pp 81-83.

**Melendez P.A., Capriles V.A. (2006).** Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico; *Phytomedicine*; **13**: 272–276.

**Menichini. F, Loizzo M.R., Bonesi M., Conforti F., Luca D., Statti G. A., Cindio B., Menichini F.,Tundis R. (2011).** Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante

flowers, leaves and fruits at two maturity stages; *Food and Chemical Toxicology*; **49**: 1549–1555.

**Meziti A. (2009).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude in vitro et in vivo, mémoire de magister en biochimie appliquée, Option: Molécules Bioactives, Université El-Hajlakhdar Batna, pp 71.

**Michel T.(2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) ; These de doctorat ; Discipline : Chimie Analytique – Phytochimie ; université d'Orléans ; pp 286.

**Milardovic .S., Kerekovic .I., Rumenjak .V. (2007).** A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic berberis using bienzymatically produced ABTS<sup>o+</sup>; *Food chemistry*, **105**: 1688-1694.

**Milind. P., Dev C. (2012).** Orange: range of benefits; *international Research Journal and Pharmacy*; **3 (7)**: 59-63.

**Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobienne et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plants de la région de Tlemcen ; thèse de magistère en biologie option des produits naturels, activités biologique et synthèses ; université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. ; pp 140.

**Morel S. (2011).** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae) ; Thèse de doctorat ; spécialité : Chimie des Biomolécules : Synthèse, Structure et Réactivité ; Ecole doctorale VENAM ; pp 246.

**Mouffok S. (2011).** Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *omphalotricha* (Asteraceae) ; Mémoire de Magister en chimie organique ; Université Hadjilakhd; pp 159.

**Mothana R.A.A., Lindequist U. (2005).** Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra; *Journal of Ethnopharmacology*; **(96)**: 177–181.

**Mukht AR. R; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A. (2005).** In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulata (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, **7(3)**: 414-416.

## N

**Néve J. (2002).** Nutrition et stress oxydant, modulation du rapport alimentaire en antioxydants. Optimisation of dietary intake of antioxydants; nutrition clinique et métabolisme ; **16** : 292-300.

**Nkhili E. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant ; These de Doctorat ; Spécialité de Sciences des Aliments ; universite d'avignon et des pays de vaucluse Montpellier; pp 328.

## O

**Ogunlana O. E., Ogunlana O. O. (2008).** In vitro assessment of antioxidant activity of *Newbouldia laevis*; *Journal of Medicinal Plants Research*; **2(8)**: 176-179.

**Ojeil A., El Darra N., El Hajj Y., Bou Mouncef P., Rizk T. J., Maroun R. G. (2010).** Identification et caracterisation de composes phénoliques extraits du raisin chateau ksara; *Lebanese Science Journal*; **11(2)** : 117-130.

**Osman A.M., Wong .K.K.Y., Feryhough .A. (2006).** ABTS radical driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **346**: 321-329.

**Osman A.M., Wong .K.K.Y., Hill .S.J., Feryhough .A. (2006).** Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS- derived radicals formed upon reaction with polyphenols, *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, **340**: 597-603.

## P

**Popovici .C., Saykova .I; Tylkowski .B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composes phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de Génie industriel*, **4** : 25-39.

## R

**Ramful D., Tarnus E. , Aruoma O. I., Bourdon E., Bahorun T. (2011).** Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps; *Food Research International*; **44**: 2088-2099.

**Rapisarda P., Fabroni S., Peterek S., Russo G., Mock H.P. (2009).** Juice of New citrus hybrids (*Citrus clementine* Hort ex *Tan.C. sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants; *Food Chemistry*; **117**: 212–218.

**Rashida U., Ibrahimc M., Yasinb S., Yunusa R., Taufiq-Yapd Y.H., Knothee G. (2013).** Biodiesel from *Citrus reticulata* (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock; *Industrial Crops and Products*; **45**: 355–359.

**Rezaie A., Parker R.D., Abdollahi M. (2007).** Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?; *Dig Dis Sci*; **52**: 2015–2021.

**Rezaie A., Robyn D., Parker M. A. (2007).** Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?, *Dig Dis Sci* , **52**:2015–2021.

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

**Ribeiro S.M.R., Barbosa L.C.A., Queiroz J.H., Knodler M. et Schieber A. (2008).** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, **110** : 620–626.

**Ribereau–Gayon P. (1968).** Notion générale sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. pp : 1-40.

## S

**Salie F. , Eagles P.F. K. Leng, H.M.J. (1996).** Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species; *Journal of Ethnopharmacology*; **52**: 27-33 .

**Santos R. M., Fortes G. A. C., Ferri P. H., Santos S. C. (2011).** Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*; *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn*; **21(4)**: 581-586.

**Shohaib.T, Shafique M., Dhanya.N, Madhu.C.Divakar. (2011).** Importance of flavonoides in therapeutics; *Hygeia Journal for Drugs and Medicines (.J.D.M)*; **3 (1)**: 1-18.

**Sutra L.** Staphylococcus aureus in Sutra L., Federighi M., Jouve J.L. *Manuel de bactériologie alimentaire*. (1998), Ed polytechnica, Paris, pp 53-63.

## T

**Telli A., Mahboub N., Boudjeh S., Siboukeur O. E. K., Moulti-Mati. F. (2010).** optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera L*) variété; *Annales des Sciences et Technologie* ; **2 (2)** : 107- 1140

**Tripoli E., Guardia M. L., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chemistry*; **104**: 466–479.

**Tumbas Vesna .T, etkovi Gordana S., Djilas Sonja M., anadanovi -Brunet Jasna M, Vuli , Željko Knez Jelena J., Škerget Mojca. (2010).** Antioxydant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel; *BIBLID* ; **40**: 195-203.

## V

**Van Bambeke F., Tulkens P. (2008).** Pharmacologie et Pharmacothérapie , Anti-infectieuse (Antibiotiques , Antifongiques) ; pp 199.

**Vladimir O., Grosser J. W.** Citrus; *Methods in Molecular Biology*, **344**: 177-198.

**Vinson J.A., Liang X., Proch J. Hontz B.A., Dance L.J., Sanedone N. (2002).** Polyphénols antioxydants in citrus juices: in vitro and in vivo studies related to heart disease; *Adv Exp Med Biol*; **505**: 113-122.

## Y

**Yap C.F., Ho C.W., Wan Aida W. M, Chan S.W., Lee C.Y., Leong Y. S. (2009).** Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Star Fruit (*Averrhoa carambola L.*) Residues (Pengoptimuman Parameter Pengekstrakan Jumlah Sebatian

Fenolik daripada Residu Belimbing (*Averrhoa carambola* L.); *ains Malaysiana*, **38(4)**: 511–520

**Yi Z., Yu Y., Lianga Y., Zeng B. (2008).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus cultivar and its main flavonoids; *LWT*; **41**: 597–603.

**Yu .L; Li X; Liu .S; Xu .G; Liang .Y. (2009).** Comparative analysis of volatil constituent in citrus Reticulata Blanco using Gc-Ms and alternative moving window factor analysis ; *J.Sep.Sc*; **32**: 3457-3465.

## Z

**Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne; Mémoire de magister; Option du Biotechnologie végétale ; Université Mentouri Constantine ; pp 84.

*Amnes*

## *Annexe I : matériels et produit chimiques*

### **1- Matériels du laboratoire**

- La verrerie : tube à essai, bécher, erlenmeyer, flacon.
- L'appareillage
- Balance de précision (RADWAG<sup>R</sup> (PS 600/C/2 et AS 220/C/2)).
- Broyeur (IKA<sup>R</sup>-WORKS (A111 basic)).
- Etuve (WTC binder) et Etuve d'Incucell.
- Plaque magnétique (multistirrer VELP scientifica).
- Spectrophotomètre UV-Visible (unico<sup>R</sup> 1200).
- Tamiseur (Retsch<sup>R</sup> (AS 200)).
- For à pasteur (Trade Raypa®).
- Ph mètre
  - Autre : spatule, micropipettes (100 et 1000 µl), papier d'aluminium, papier absorbant, papier filtre, boîte de pétri, tube à essais, anse en platine, écouvillon, ben benzène, para-film.

### **2- Les produits chimiques et les solvants**

- Réactif de folin-ciocalteu (FCR).
- Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).
- Trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) et Acétate de sodium.
- Eau distillée, Ethanol et Méthanol.
- Le DPPH
- L'ABTS et persulfate de potassium.
- Eau physiologique
- Bouillon nutritive

#### ◆ Les standards utilisés :

- Acide gallique.
- Quercitine.
- Vitamine C (Acide ascorbique) et BHA.
- Trolox.

## *Annexe II : préparation des solutions*

- **Solution de folin-ciocalteu à 10 %**

1.5 ml de folin-ciocalteu dans 13.5 ml d'eau distillée.

- **Solution de carbonate de sodium :**

0.225 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans 2 ml d'eau distillée suivie d'agitation, puis ajuste jusqu'à 3 ml avec l'eau distillée.

- **Solution de trichlorure d'aluminium et acétate de sodium :**

26.6 mg de  $\text{AlCl}_3$  + 80 mg d'acétate de sodium dans 20 ml d'eau distillée.

- **Solution de DPPH (0.1 mM) :** 0.789 g de DPPH dans 20 ml de méthanol.
- **Solution d'ABTS (7 mM) :** 72 mg d'ABTS dissoudre dans 20 ml d'eau distillée, après agitation en ajoute 13.24 mg de persulfate de potassium de 2.45 Mm, incubation pendant 12 à 16 heures à l'abri de la lumière et à température ambiante.
- **Eau physiologique :** 9 g de chlorure de sodium ( $\text{Na Cl}$ ) dissoudre dans 1000 ml d'eau distillée.
- **gélose Muller – Hinton à pH 7.4 :** 38 g de poudre de Muller-Hinton dissoudre dans 1000 ml d'eau distillée.
- **Bouillon nutritive à pH 7.2 :** 25 g de poudre de bouillon dissoudre dans 1000 ml d'eau distillée.

*Annexe III : les résultats bruts de rendement d'extraction et de dosage des polyphénols*

**1- détermination de taux d'extraction de la plante.**

	La poudre fraîche (g)	Produit sec (g)	Rendement %
<b>Extrait Aqueux</b>	25	5.97	23.44
<b>Extrait Méthanolique</b>	5	0.81	16.2
<b>Extrait Ethanolique</b>	5	1.11	22.2

**2- les valeurs de l'absorbance de dosage des polyphénols totaux.**

**a- Résultat d'absorption de l'extrait éthanolique.**

	Extrait éthanolique			
Absorbances à 765 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.808	0.751	0.677	0.745 ± 0.066
<b>Solution mer: 5 mg de l'extrait éthanolique dans 3 ml du méthanol (1.66 mg/ml).</b>				

**b- Résultat d'absorption de l'extrait Méthanolique.**

	Extrait Méthanolique			
Absorbances à 765 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.760	0.367	0.850	0.659 ± 0.257
<b>Solution mer: 5 mg de l'extrait méthanolique dans 3 ml du méthanol (1.66 mg/ml)</b>				

**c- Résultat d'absorption de l'extrait aqueux.**

	Extrait aqueux			
Absorbances à 765 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.254	0.220	0.273	0.249± 0.027
<b>Solution mer: 5 mg de l'extrait aqueux dans 3 ml du l'eau distillée (1.66 mg/ml)</b>				

**d- Résultat d'absorption de l'extrait Méthanolique par épuisement.**

Extrait Méthanolique par épuisement				
Absorbances à 765 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.550	0.507	0.519	
Solution mer: 500 µl de l'extrait Méthanolique dans 1 ml du méthanol (0.02 g/ml)				

**3- les valeurs d'absorbance de dosage des flavonoïdes totaux :**

**a- Résultat d'absorption de l'extrait éthanolique.**

Extrait éthanolique				
Absorbances à 430 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.610	0.614	0.432	0.612 0.003
Solution mer: 1.666 mg de l'extrait éthanolique dans 1 ml du méthanol (1.66 µg/ml)				

**b- Résultat d'absorption de l'extrait Méthanolique**

Extrait Méthanolique				
Absorbances à 430 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.139	0.139	0.176	0.151± 0.021
Solution mer: 1.666 mg de l'extrait Méthanolique dans 1ml du méthanol				

**c- Résultat d'absorption de l'extrait aqueux**

Extrait aqueux				
Absorbances à 430 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.214	0.199	0.202	0.205 0.008
Solution mer : 16.66 mg de l'extrait aqueux dans 10 ml du l'eau distillée				

**d- Résultat d'absorption de l'extrait Méthanolique par épuisement.**

Extrait Méthanolique par épuisement				
Absorbances à 430 nm	1 <sup>ère</sup> tube	2 <sup>ème</sup> tube	3 <sup>ème</sup> tube	La moyenne
	0.770	0.800	0.779	0.783 ±0.015
Solution mer: 500 µl de l'extrait Méthanolique dans 1 ml du méthanol (0.02 g/ml)				

*Annexe IV : Les résultats bruts de l'activité antiradicalaire et antioxydant*

**1- Pourcentages d'inhibition du radical DPPH°**

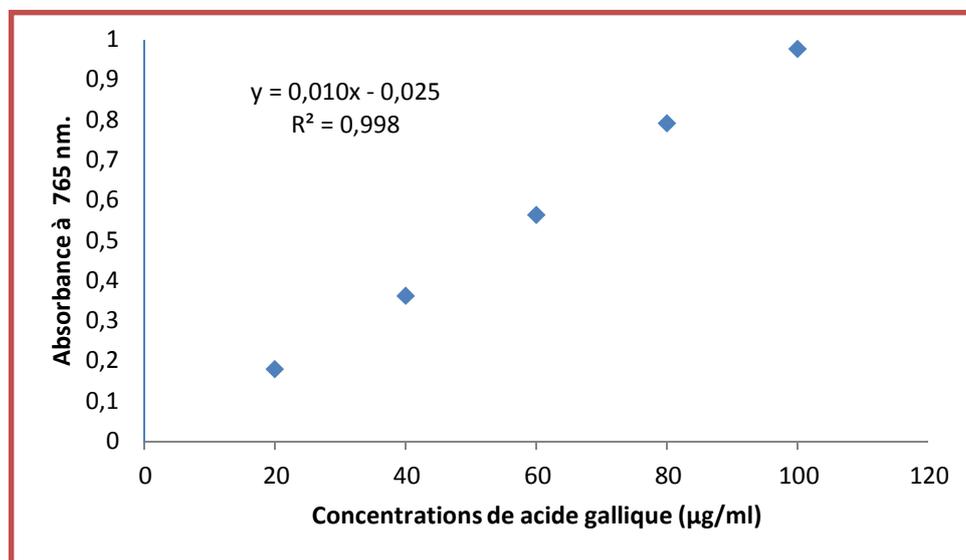
	<b>100 µg/ml</b>	<b>200 µg/ml</b>	<b>300 µg/ml</b>	<b>400 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>Extrait méthanolique</b>	32.95 %	49.62 %	61.31 %	63.8 %	91.90 %
<b>Extrait éthanolique</b>	42.50 %	45.53 %	51.60 %	55.33 %	61.78 %
<b>Extrait aqueux</b>	78.38 %	79.68 %	82.99 %	84.22 %	84.57 %
<b>Extrait par épaissement</b>	24.00 %	26.97 %	32.34 %	40.81 %	72.73 %

**2- Pourcentages d'inhibition du radical ABTS<sup>o+</sup>.**

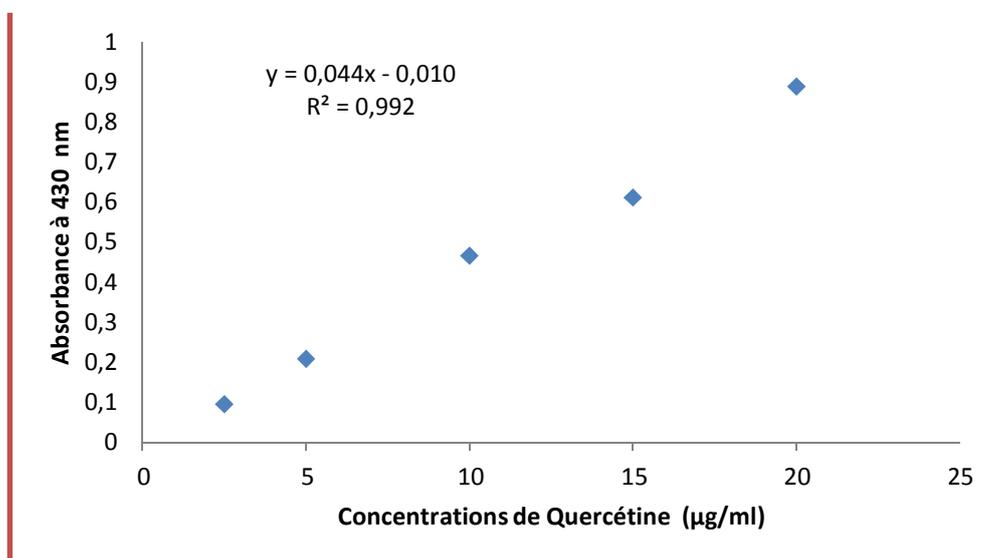
	<b>100 µg/ml</b>	<b>200 µg/ml</b>	<b>300 µg/ml</b>	<b>400 µg/ml</b>	<b>500 µg/ml</b>
<b>Extrait méthanolique</b>	32.95 %	49.62 %	61.31 %	63.8 %	91.90 %
<b>Extrait éthanolique</b>	42.50 %	45.53 %	51.60 %	55.33 %	61.78 %
<b>Extrait aqueux</b>	78.38 %	79.68 %	82.99 %	84.22 %	84.57 %
<b>Extrait par épaissement</b>	24.00 %	26.97 %	32.34 %	40.81 %	72.73 %

## *Annexe V : Les courbes d'étalonnage*

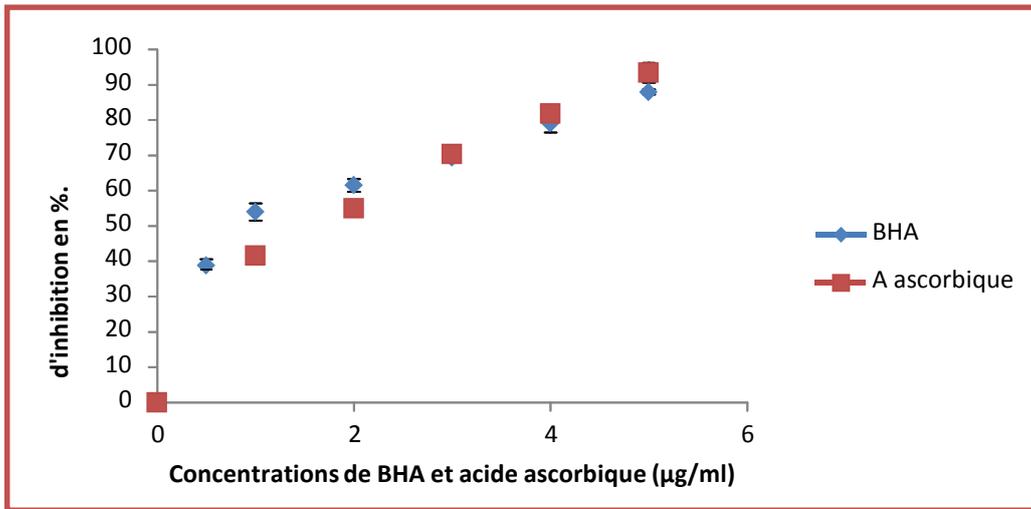
### **1- courbe d'étalonnage (acide gallique) du dosage des polyphénols totaux**



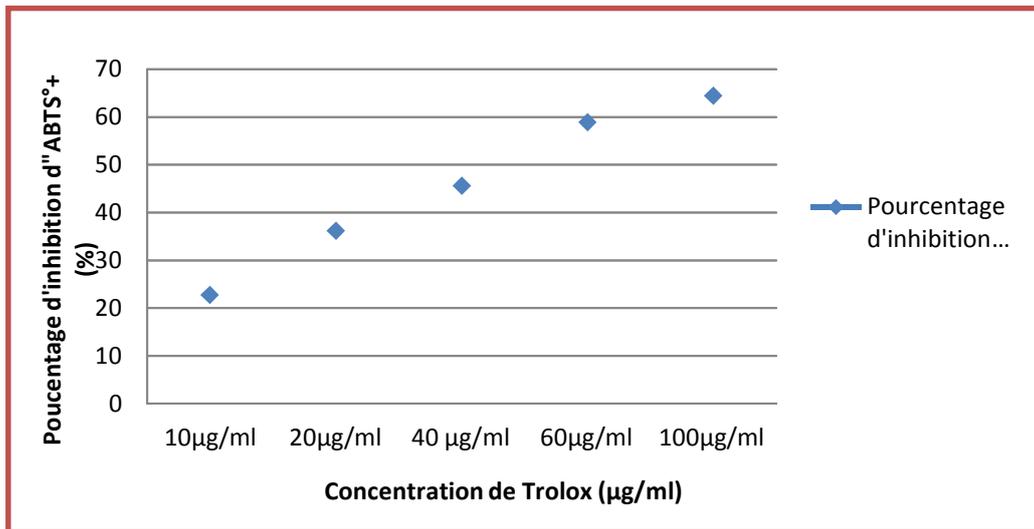
### **2- courbe d'étalonnage (Quercétine) du dosage des flavonoïdes totaux**



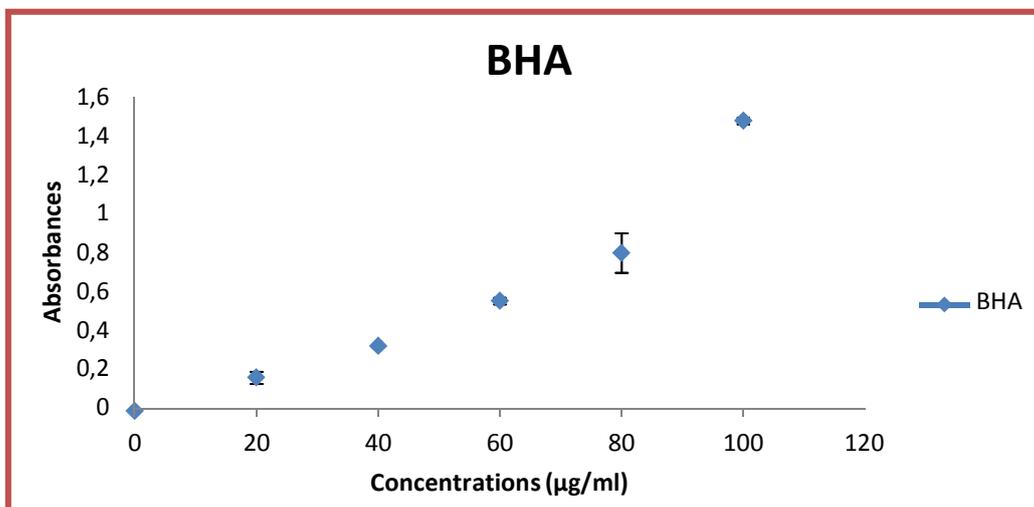
### 3- courbe d'étalonnage de réduction du radical DPPH.



### 4- courbe d'étalonnage de réduction du radical ABTS<sup>o+</sup>



### 5- courbe d'étalonnage de pouvoir réducteur.



*Glossaire*

# Glossaire

- ❖ **Alcaloïdes** : Ce sont des bases organiques possédant souvent deux ou plusieurs atomes d'azote dans la molécule, la plupart dérivent des acides.
- ❖ **Analgésique** : Substance qui soulage ou supprime la douleur (Antidouleur).
- ❖ **Antiallergique** : Se dit de ce qui traite les allergies
- ❖ **Antibiotique** : C'est une molécule naturelle ou semi-synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries
- ❖ **Antispasmodique** : Ce sont des médicaments qui aident à traiter les spasmes musculaires. Il s'agit de calmer ou de neutraliser des contractions involontaires des muscles.
- ❖ **Anti-tumoral** : Est une substance ou produit qui permet de lutter contre les tumeurs
- ❖ **Aromatogramme** : C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir anti-bactérien<sup>1</sup>. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme.
- ❖ **Bactéricide** : Signifie qui tue les bactéries
- ❖ **Bactériostatique** : Désigne l'action de certaines substances permettant de suspendre la multiplication des bactéries ce qui aboutit au vieillissement de celles-ci et à leur mort, à condition que la dose utilisée soit suffisante.
- ❖ **Bilirubine** : C'est un pigment jaune issue de la destruction des globules rouges et particulièrement de l'hémoglobine dans la rate. Éliminée par le foie, elle donne sa couleur jaunâtre à la bile.
- ❖ **Cancer** : Tumeur maligne formée par la prolifération désordonnée des cellules d'un tissu ou d'un organe.
- ❖ **Carminative** : Se dit des médicaments qui ont la propriété d'expulser les gaz intestinaux.
- ❖ **Caroténoïde** : Correspondent à des pigments liposolubles pouvant présenter une couleur orange et jaune. Naturellement produits par les végétaux et les cyanobactéries, ils participent activement à la photosynthèse Ils appartiennent à la famille chimique des terpénoïdes.
- ❖ **Catalase** : C'est une enzyme qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et dioxygène.

- ❖ **Chélateur** : En chimie un chélate est un corps qui possède la capacité de fixer des cations métalliques en constituant un complexe stable non ionisé, non toxique et facilement éliminé par le rein (sont utilisés comme médicaments).
- ❖ **Composés bioactifs** : Ce sont des composants d'aliments qui possèdent une activité biologique, en plus de leur valeur nutritionnelle.
- ❖ **Composés phénoliques** : Constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal, ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes.
- ❖ **Concentration minimal inhibitrice (CMI)** : Est la concentration minimale d'un antibiotique qui permet d'inhiber le développement d'une colonie bactérienne
- ❖ **Cyclo-oxygénase** : (COX) est une enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine.
- ❖ **Cytotoxique** : Se dit des substances nocives pour les cellules, ayant donc la propriété de les détruire.
- ❖ **Dégénératif** : En pathologie qui affecte l'organisme par une dégradation cellulaire.
- ❖ **Détoxification** : Processus métabolique qui transforme les molécules toxiques en composés moins toxiques.
- ❖ **Dismutation** : C'est une réaction d'oxydoréduction dans laquelle une espèce chimique joue à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur.
- ❖ **Douleur thoracique** : C'est un symptôme important pouvant être parfois le révélateur d'une maladie grave dont le traitement est une urgence.
- ❖ **Effet anti-allergique** : Susceptible de traiter les allergies et leurs effets.
- ❖ **Effet antidépresseur** : Soulage les symptômes de la dépression et améliore l'humeur du patient.
- ❖ **Effet antioxydant** : Protège l'organisme contre les dommages causés par les radicaux libres et diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.
- ❖ **Effet anti-radicalaire** : Neutralise les radicaux libres ayant ainsi un rôle de défense au sein de la membrane et de la cellule.
- ❖ **Effet antiviral** : Agit contre la multiplication d'un virus.
- ❖ **Flavonoïde** : Sont des métabolites secondaire possédant de fortes propriétés antioxydants. Elles sont responsables de la couleur des aliments.
- ❖ **Fongique** : Qui a rapport aux champignons.

- ❖ **Glutathion** : Molécule formée d'acide glutamique, de cystéine et de glycolle, qui joue dans l'organisme un rôle important de transporteur d'hydrogène.
- ❖ **Glutathion peroxydase** : Protéine enzymatique à propriétés antioxydantes. Naturellement présente dans les organismes vivants, elle fait partie des enzymes qui constituent nos défenses antioxydantes. Ces protéines antioxydantes endogènes vont aider les cellules de l'organisme à lutter contre le stress oxydatif.
- ❖ **Glutathion réductase** : Une enzyme qui est impliquée dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction, une carence peut provoquer l'hémolyse.
- ❖ **Glutathion S-transférase** : Sont des protéines cytosoliques, mitochondriales ou microsomales, sont présentes chez les eucaryotes et les procaryotes. Elle catalyse de nombreuses réactions et se lie à des substrats endogènes et xénobiotiques.
- ❖ **Glycosidase** : Protéine participant à l'hydrolyse des aliments (coupe les molécules glucidiques).
- ❖ **Huile essentielle** : C'est un liquide concentré en substances végétales (métabolite secondaire), obtenu par extraction ou distillation de molécules volatiles de la plante d'origine.
- ❖ **Hypocholestérolémiant** : Sont des médicaments qui visent à diminuer le taux sanguin de cholestérol pour le rapprocher des valeurs normales.
- ❖ **Insomnie** : Des troubles du sommeil, qui incluent notamment la narcolepsie (des entrées subites et imprévisibles dans un état d'endormissement).
- ❖ **Lipo-oxygénase** : Est un type de protéine enzymatique qui catalyse l'oxydation des acides gras ou autres alcènes.
- ❖ **Sédative** : Se dit de substances agissant contre la douleur, l'angoisse, l'insomnie.
- ❖ **Stomachique** : Se dit de ce qu'est bon pour l'estomac.
- ❖ **Trouble digestif** : Regroupent un ensemble de symptômes liés au fonctionnement de l'appareil digestif.
- ❖ **Veinotonique** : Sont des médicaments destinés à traiter les troubles de la circulation veineuse. Également appelés phlébotoniques, ils sont administrés par voie orale ou en application cutanée, leur propriété est d'augmenter le tonus de la paroi veineuse.

**Résumé :** *Citrus reticulata Blanco* est un arbre qui appartenait à la famille des *Rutaceae*. Les feuilles de cette plante sont soumises à une macération par la méthode d'épuisement avec le méthanol à 80 % et une macération par les solvants méthanol, éthanol et l'eau distillée bouillante, cette dernière enregistre le rendement le plus élevé qui est de 23.44%.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu, et les flavonoïdes ont été évalués par la méthode de colorimétrie. L'extrait aqueux présente une meilleure concentration en polyphénols totaux et en flavonoïdes qui est de 1375.5 mg E AG/g de MS et 36.792 mg EQ/g de MS respectivement.

L'activité antioxydant est réalisée par trois méthodes DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur, les meilleures concentrations inhibitrices exprimées en IC<sub>50</sub> a été obtenu pour extrait méthanolique (202.49 µg/ml) vis-à-vis du radical DPPH et une meilleure activité réductrice en présence du radical ABTS est enregistré par l'extrait par épuisement (159.64 µg/ml). En ce qui concerne le pouvoir réducteur l'extrait éthanolique présenté la meilleure activité (0.13 µg/ml).

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes (Gram+ et Gram-) selon la méthode de diffusion. *Bacillus subtilis* a manifesté une résistance vis-à-vis de tous les extraits par contre *E. coli* s'est avérée la plus sensible envers tous les extraits avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de >3.12 mg/ml pour les extraits méthanolique, éthanolique et aqueux et de >1.25 mg/ml pour l'extrait par épuisement.

**Mots clés :** *Citrus reticulata Blanco*, composés phénoliques, activité antioxydant, activité antibactérienne.

**Summary:** *Citrus reticulata Blanco* is a tree belonging to the family of *Rutaceae*. The leaves of this plant are sowing maceration by the method of exhaustion with 80% methanol by maceration and solvents methanol, ethanol and distilled boiling water, the latter recorded the highest yield which is 23.44 %.

The content of total polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, and flavonoids were evaluated by the colorimetric method. The aqueous extract has a higher concentration of total polyphenol and flavonoid which is E AG 1375.5 mg / g DM and 36 792 mg EQ / g DM respectively.

The antioxidant activity is performed by three methods DPPH, ABTS and the reducing power, best expressed as inhibitory concentration IC<sub>50</sub> was obtained for the methanol extract (202.49 µg / ml) against DPPH radical and improved activity in the presence of reductive ABTS radical is recorded by the extract draining method (159.64 µg / ml), regarding the reducing power of ethanolic extract presented a good activity (0.13 µg / ml).

The antimicrobial activity was determined for four strains of bacteria (Gram + and Gram-) according to the disc diffusion method. *Bacillus subtilis* shored resistance against all the extracts however *E. coli* was the most sensitive all extracts with minimum inhibitory concentrations (MIC) > 3.12 mg / ml in methanol, ethanol and aqueous extracts and > 1.25 mg / ml extract obtained by draining method.

**Key words:** *Citrus reticulata Blanco*, phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial activity.