

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



**Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de Master

**Filière :** Sciences Biologiques

**Option :** Biochimie Appliquée

**THEME**

---

**Etude de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits  
aqueux et des huiles essentielles de quatre plantes du genre *Citrus***

---

**Présenté par :**

Adlaoui Houda

Elbaroud Hocine

Sebaa Fatima

Devant les membres du jury :

**Présidente :** M<sup>me</sup> Bounouala Fatima Zohra

**Examinatrice :** M<sup>me</sup> Benabed Houda Khadîdja

**Promotrice :** M<sup>me</sup> Boussoussa Hadjer

**Co-Promotrice :** M<sup>me</sup> Gellouma Fatima Zohra

**Année Universitaire :** 2020/2021.

## Remerciements

---

On tient tout d'abord à remercier et en premier lieu ALLAH, le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force, la volonté et le courage pour mener à bonne fin ce travail.

Nous remercions vivement notre promotrice **M<sup>me</sup> Boussoussa Hadjer** qui a dirigé et soutenu ce travail et nous la remercions pour son aide, ses critiques, ses conseils judicieux ainsi que son intérêt pour le sujet qui ont été des stimulants très précieux.

Nous tenons particulièrement à remercier notre Co-promotrice **M<sup>me</sup> Galouma Fatima Zohra** pour le temps qu'elle nous a consacré, pour l'encadrement de nos expériences au laboratoire et pour tous ce que nous avons pu apprendre de sa part.

Nous exprimons toute notre reconnaissance envers les membres du jury **M<sup>me</sup> Bounouala Fatima Zohra** et **M<sup>me</sup> Benabed Houda Khadidja** pour avoir consacré une partie de leur temps précieux à l'examen de ce mémoire.

Notre reconnaissance va à **Mr Yousfi Mohamed** et **Mr Harrat Mohamed** pour leurs aides remarquables et leurs soutiens.

Sans oublier les ingénieurs du laboratoire pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail. Et pour leurs disponibilités, leurs gentillesse, leurs patiences.

Finalement, notre gratitude s'adresse aux fonctionnaires du département de biologie et à tous ceux et celles qui d'une manière ou d'une autre nous ont aidé et soutenu de près ou de loin.

### Je dédie ce travail :

A mes très **chers parents** source d'amour et d'affection qui m'ont motivé et soutenue tout au long de mes expériences

A Mes chers frères **Ibrahim** et **Yacine** que dieu les protège

A Mes trinôme Surtout mon amie **Fatima** qui j'ai passé les meilleurs jours avec elle en préparant ce mémoire

Je tiens également à ne pas oublier tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la bonne réalisation de ce travail

**ADLAOUI Houda**



Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant Qui nous 'a tracé le chemin de notre vie et accordé la volonté, la santé et la Patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire

Je dédie ce modeste travail à ma source de bonheur mes ***chers parent***

Sans eux je n'ai pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études.

***A mes sœurs***

***A mes frères***

***A toute ma famille***

***A mes amis***

Je tiens également à ne pas oublier tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à la bonne réalisation de ce travail.

***ELBAROUD Hocine***



Je dédie ce modeste travail

### *À mes chers parents*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que vos prières m'accompagnent toujours. Puisse Dieu, le très haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

*A mes frères* Mohammed et Aissa et *ma sœur* Douaa, je vous exprime à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

*A Toute ma famille*, qui m'aiment et me comble de conseils

*À mes très proches amies* Abir, Hiba, Thoraya et Houda qui m'ont toujours supporté moralement par leurs encouragements pendant la réalisation de ce travail.

*SEBAA Fatima*



## Résumé

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'effet antibactérien et antioxydant des composés phénoliques et huiles essentielles de quatre plantes de genre *Citrus* (*Citrus limon* L., *Citrus sinensis* L., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L.). Les écorces et les feuilles de quatre plantes sont soumises à une infusion pour l'obtention des extraits aqueux et à une hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevernger pour l'obtention des huiles essentielles. L'activité antibactérienne a été évaluée par la technique de diffusion sur la gélose sur quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*). Les résultats obtenus montrent que les quatre souches ont manifesté une résistance (non sensible) contre les HEs et les extraits aqueux testés. Par conséquent, nous pouvons déduire l'absence d'activité antibactérienne de nos échantillons. D'autre part, L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits aqueux a été évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH. Cette étude a permis de révéler le fort pouvoir antioxydant des extraits aqueux des écorces avec des  $IC_{50}$  entre  $0,36 \pm 0,02$  mg/ml et  $0,61 \pm 0,02$  mg/ml de même des feuilles avec des  $IC_{50}$  entre  $1,33 \pm 0,6$  mg/ml et  $4,46 \pm 0,3$  mg/ml. Alors que les huiles essentielles exposaient un résultat très modeste avec des concentrations inhibitrices entre  $5,002 \pm 0,1$  mg/ml et  $52,36 \pm 0,9$  mg/ml comparé à celui des extraits aqueux et de l'antioxydant de référence (Vitamine C) avec  $0,005 \pm 0,001$  mg/ml.

**Mots clé :** *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium*, extraits aqueux, huiles essentielles, activité antibactérienne, activité antioxydante.

## Abstract

The objective of our work is to evaluate the antibacterial and antioxidant effect of phenolic compounds and essential oils of four plants of *citrus* genus (*Citrus limon* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L.). The bark and leaves of four plants were subjected to infusion to obtain aqueous extracts and to hydrodistillation using a Clevernger type apparatus to obtain essential oils. The antibacterial activity was evaluated by the agar diffusion technique on four bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris*). The obtained results show that all strains showed resistance (not sensitive) against the essential oils and the aqueous extracts. Therefore, we can infer the absence of antimicrobial activity from our samples. On the other hand, the antioxidant activity of essential oils and aqueous extracts was evaluated by the DPPH free radical scavenging test. This study revealed the strong antioxidant power of the aqueous extracts of bark with  $IC_{50}$  between  $0.36 \pm 0.02$  mg/ml and  $0.61 \pm 0.02$  mg/ml, even of leaves with  $IC_{50}$  between  $1.33 \pm 0.6$  mg/ml and  $4.46 \pm 0.3$  mg/ml. While the essential oils exhibited a very modest result with inhibitory concentrations between  $5.002 \pm 0.1$  mg/ml and  $52.36 \pm 0.9$  mg/ml compared to that of the aqueous extracts and the reference antioxidant (Vitamin C) with  $0.005 \pm 0.001$  mg/ml.

**Key words:** *Citrus limon* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L, aqueous extracts, essential oils, antibacterial activity, antioxidant activity.

## الملخص

يهدف هذا العمل الى تقييم التأثير المضاد للبكتيريا والمضاد للأكسدة للمركبات الفينولية والزيوت العطرية لأربعة نباتات من الحمضيات (*Citrus aurantium* ، *Citrus reticulata* Blanco ، *Citrus sinensis* L ، *Citrus limon* L). تخضع قشور وأوراق النباتات الأربعة للنقع المغلي للحصول على المستخلصات المائية والتقطير المائي باستخدام جهاز من نوع Clevernger للحصول على الزيوت العطرية. تم تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا بتقنية انتشار الأجار على أربع سلالات بكتيرية (*Proteus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli*) عن طريق المقارنة مع المضاد الحيوي القياسي (Gentamicine). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالات الأربعة أظهرت مقاومة (غير حساسة) ضد الزيوت العطرية والمستخلصات المائية المختبرة. لذلك، يمكننا أن نستنتج عدم وجود نشاط مضاد للميكروبات من عيناتنا. من ناحية أخرى، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت العطرية والمستخلصات المائية من خلال اختبار مسح الجذور الحرة DPPH. كشفت هذه الدراسة عن قوة مضادات الأكسدة للمستخلصات المائية من القشور مع  $IC_{50}$  بين  $0,36 \pm 0,02$  ملغ/مل و  $0,61 \pm 0,02$  ملغ/مل، حتى للأوراق المحتوية على  $IC_{50}$  بين  $1,33 \pm 0,6$  ملغ/مل و  $4,46 \pm 0,3$  ملغ/مل. بينما أظهرت الزيوت العطرية نتيجة معتبرة للغاية بتركيزات مثبطة تراوحت بين  $0,1 \pm 5,002$  ملغ/مل و  $52,36$  ملغ/مل مقارنة بمستخلصات المستخلصات المائية ومضادات الأكسدة المرجعية (فيتامين ج) بمقدار  $0,001 \pm 0,005$  ملغ/مل.

**الكلمات المفتاحية:** *Citrus aurantium* ، *Citrus reticulata* Blanco ، *Citrus sinensis* L ، *Citrus limon* L.

L، المستخلصات المائية، الزيوت العطرية، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للأكسدة.

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Liste des abréviations ..... | i   |
| Liste des tableaux .....     | iii |
| Liste des figures.....       | iv  |
| Introduction .....           | 2   |

## Synthèse bibliographique

|  |    |
|--|----|
| I. Généralités sur les plantes médicinales .....                       | 5  |
| II. Activités biologiques des métabolites secondaires .....            | 6  |
| III. Le genre <i>Citrus</i> .....                                      | 8  |
| III.1. Généralités sur les <i>Citrus</i> .....                         | 8  |
| III.2. Composition biochimique des <i>Citrus</i> .....                 | 8  |
| III.3. Présentation des espèces étudiées .....                         | 9  |
| III.3.1. Description botanique des espèces étudiées .....              | 9  |
| III.3.1.1. <i>Citrus limon</i> L .....                                 | 9  |
| III.3.1.2. <i>Citrus sinensis</i> L .....                              | 9  |
| III.3.1.3. <i>Citrus reticulata</i> Blanco .....                       | 10 |
| III.3.1.4. <i>Citrus aurantium</i> L .....                             | 10 |
| III.3.2. Les caractéristiques systématiques des espèces étudiées ..... | 10 |
| IV. Méthodes de la détermination de l'activité antibactérienne .....   | 11 |
| IV.1. Méthodes en milieu solide (Méthodes de diffusion) .....          | 11 |
| IV.2. Méthode en milieu liquide (Méthode de dilution) .....            | 11 |
| IV.3. Méthode de diffusion en gradient ou méthode E-test .....         | 12 |
| V. Méthodes de la détermination de l'activité antioxydante .....       | 12 |

## Chapitre II : Matériels et méthodes

|  |    |
|--|----|
| II.1. Matériel végétal.....                          | 16 |
| II.2. Préparation des extraits .....                 | 18 |
| II.2.1. Préparation des extraits aqueux .....        | 18 |
| II.2.2. Extraction des huiles essentielles .....     | 20 |
| II.3. Détermination du rendement .....               | 21 |
| II.3.1. Calcul du rendement de l'extrait .....       | 21 |
| II.3.2. Calcul du teneur en huile essentielle .....  | 21 |
| II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne ..... | 22 |
| II.4.1. Les souches bactériennes étudiées .....      | 22 |
| II.4.2. Le choix du témoin .....                     | 22 |

|   |    |
|---|----|
| II.4.3. Méthode de diffusion sur disque .....     | 22 |
| II.4.3.1. Principe .....                          | 22 |
| II.4.3.2. Protocole expérimentale .....           | 23 |
| II.4.3.2.1. Stérilisation du matériel .....       | 23 |
| II.4.3.2.2. Réalisation d'une suspension .....    | 23 |
| II.4.3.2.3. Ensemencement .....                   | 23 |
| II.4.3.2.4. Application des disques .....         | 23 |
| II.4.3.2.5. Lecture des résultats .....           | 24 |
| II.5. Evaluation de l'activité antioxydante ..... | 24 |
| II.5.1. Test de piégeage du radical DPPH .....    | 24 |
| II.5.1.1. Principe .....                          | 24 |
| II.5.1.2. Protocole expérimentale .....           | 24 |

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

|   |    |
|---|----|
| III.1. Rendement d'extraction .....   | 27 |
| III.1.1. Rendements des extraits bruts .....  | 27 |
| III.1.2. Les teneurs en huile essentielle et les caractéristiques organoleptiques ..... | 28 |
| III.2. Evaluation de l'activité antibactérienne .....                                   | 31 |
| III.3. Evaluation du pouvoir antioxydant par le test DPPH .....                         | 35 |
| Conclusion .....  | 42 |
| Références Bibliographiques .....   | 45 |
| Résumé  |    |

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

ABTS : 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

IC<sub>50</sub> : La concentration inhibitrice médiane

cm : Centimètre

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

D.O: Densité Optique

EA: Extrait Aqueux

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

g: Gramme

h : Heure

HE : Huile essentielle

mg : Milligramme

ml : Millilitre

mm : Millimètre

min : Minute

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

PH : Potentiel hydrogène

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

U.V : Ultraviolet

UFc : Unité Faisant Colonie

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µm : Micromètre

uM : Micromole.

V : Potentiel électrique

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1 :</b> Quelques activités biologiques des métabolites secondaires.....  | 6  |
| <b>Tableau 2 :</b> La classification botanique des espèces étudiées.....  | 10 |
| <b>Tableau 3 :</b> Description de quelques tests antioxydants spectroscopiques <i>in vitro</i> .....  | 13 |
| <b>Tableau 4 :</b> Les plantes étudiées, leurs noms scientifiques et communs, la partie utilisée ainsi que des informations sur la collecte.....  | 16 |
| <b>Tableau 5 :</b> Durée d'extraction, couleur, aspect et odeur des huiles essentielles de genre <i>Citrus</i> .....  | 30 |
| <b>Tableau 6 :</b> Diamètres des zones d'inhibition en mm de l'antibiotique de référence (gentamicine).....   | 31 |
| <b>Tableau 7 :</b> Quelques études de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Citrus aurantium</i> et <i>Citrus sinensis</i> sur certaines bactéries Gram + et Gram –..... | 34 |
| <b>Tableau 8 :</b> Les valeurs d'IC <sub>50</sub> en mg/ml des différents extraits et huiles essentielles et l'antioxydant standard.....  | 38 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Fruits et feuilles de <i>Citrus limon</i> L.....   | 9  |
| <b>Figure 2</b> : Fruits, fleurs et feuilles de <i>Citrus sinensis</i> L.....  | 9  |
| <b>Figure 3</b> : Fruits et feuilles de <i>Citrus reticulata</i> Blanco.....   | 10 |
| <b>Figure 4</b> : Fruits, fleurs et feuilles de <i>Citrus aurantium</i> L.....   | 10 |
| <b>Figure 5</b> : Poudre des feuilles et des écorces de chacune d'espèces pour la préparation des extraits aqueux (originale).....   | 17 |
| <b>Figure 6</b> : Les écorces et feuilles de chacun d'espèces pour la préparation des huiles essentielles (originale).....   | 17 |
| <b>Figure 7</b> : Organigramme du protocole d'extraction des extraits de quatre plantes.....   | 19 |
| <b>Figure 8</b> : Le montage de l'hydrodistillation (originale).....   | 20 |
| <b>Figure 9</b> : Les rendements d'extraction des écorces et feuilles de quatre plantes du genre <i>Citrus</i> .....   | 27 |
| <b>Figure 10</b> : Les teneurs en huile essentielle des écorces et feuilles de quatre plantes du genre <i>Citrus</i> .....   | 28 |
| <b>Figure 11</b> : L'effet des huiles essentielles et les extraits aqueux de quatre espèces de <i>Citrus</i> et la gentamicine sur la croissance des souches bactériennes testées..... | 32 |
| <b>Figure 12</b> : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition (I%) en fonction de la concentration des extraits aqueux.....   | 36 |
| <b>Figure 13</b> : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition (I%) en fonction de la concentration des huiles essentielles des écorces.....                         | 37 |
| <b>Figure 14</b> : Courbe représente la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant standard choisi pour l'étude.....                   | 37 |

# **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 (**Sofiane, 2018**).

En général, les agrumes occupent une place unique dans le règne végétal et ont une position importante vu leur grande consommation, car ils contiennent des constituants végétaux (les polyphénols et les terpènes) jouant un rôle dans la prévention de certaines maladies (**Virbel-Alonso, 2011**).

Au cours de ces dernières années, les scientifiques sont concentrés sur l'augmentation des infections humaines causées par des bactéries et des champignons pathogènes car ces micro-organismes ont des effets défavorables sur la qualité et la sécurité de la vie. Les produits chimiques synthétiques sont largement utilisés contre ces micro-organismes ; malheureusement, ils développent une résistance à de nombreux antibiotiques en raison de l'utilisation inconsidérée d'antibiotiques commerciaux. De plus, ces antibiotiques provoquent parfois des réactions allergiques et une suppression de l'immunité (**Mazari et al, 2010**).

Par ailleurs, le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreux mécanismes pathologiques, notamment ceux dus au vieillissement, tels que l'athérosclérose, le cancer, les maladies auto-immunes ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. En effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérogènes (**Toure, 2015**).

L'utilisation des plantes représente un potentiel inestimable pour la recherche de nouvelles substances à pouvoir antibactérien et/ou antioxydant. Ainsi les huiles essentielles et les extraits organiques, notamment les polyphénols, suscitent un intérêt croissant comme source potentielle de molécules naturelles bioactives pouvant être employées comme alternatives à certaines substances synthétiques (**Bouhaddouda, 2016**).

Plusieurs travaux ont déjà examiné les agrumes en termes de leurs compositions chimiques, leurs différentes méthodes d'extraction, et en termes d'activités biologiques : antibactérienne, antioxydante, antifongique et anti-inflammatoire (**Ben Miri, 2019 ; Bouderbala et al, 2020 ; Ouguelmane et Houichiti, 2020 ; Benabdi et Otmani, 2019 ; Aoudache et Arib, 2019 ; Kourta et Chouane, 2019 ; Desislava, 2018 ; Ouldyyerou et al, 2018 ; Ibelhoulen et Tighzert, 2016**).

Dans ce contexte, le travail entrepris dans ce mémoire est une tentative d'explorer le pouvoir des huiles essentielles et des extraits aqueux des différentes parties (feuilles, écorces) de quatre plante du genre *Citrus* (*Citrus limon* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L.) de la région de Laghouat comme une source naturelle d'antioxydants, et d'estimer également leur activité antibactérienne, vis-à-vis de certains germes pathogènes tels qu'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*.

Ce travail s'organise de deux parties :

- **Une synthèse bibliographique** présente successivement des généralités sur les plantes médicinales, les activités biologiques des métabolites secondaires, généralités et compositions biochimiques des *Citrus*, une présentation des espèces étudiées et enfin quelques méthodes d'études de chacune des activités antibactérienne et antioxydante.
- **Une partie pratique** montre une présentation détaillée du matériel et méthodes expérimentales utilisés pour l'extraction et l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante de nos extraits. Suivi par l'exposée des résultats obtenus ainsi que leurs interprétations et discussion.

Enfin, nous terminerons par une conclusion et perspectives de recherche.

# **Synthèse**

# **Bibliographique**

### I. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Durant ces dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (**Muthu et al, 2006**). D'après l'OMS, 80 % de la population mondiale a recours aux plantes pour se soigner, ceci sous plusieurs formes, majoritairement dans les pays en voie de développement, où elle est l'unique moyen de se soigner pour une grande majorité de la population et dans les pays développés sous formes de phyto médicaments (**Boissière, 2018**).

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (**Abayomi, 2010**). Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle et leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanogo, 2006**). Les espèces végétales d'intérêt médicinales sont impliquées dans différents secteurs à l'état brut ou sous formes d'huiles, extraits, solutions aqueuses ou organiques (**Adouane, 2016**).

Chaque plante médicinale a des principes actifs naturellement présents dans cette plante. Ces derniers sont souvent présents en quantité extrêmement faible dans la plante et ils représentent quelques pour-cent à peine du poids total de celle-ci, mais ce sont eux qui en sont l'élément essentiel (**Benghanou, 2012**).

La plupart des plantes ne sont pas utilisées en entier, leurs principes actifs étant souvent concentrés dans une seule partie : racines, feuilles, fleurs, graines, écorces, résines... etc. et peuvent être présentées de diverses façons : fraîches ou séchées (**Laouedj, 2016**).

L'expérience des praticiens combinés à celle des patients est souvent le guide de plus sur pour connaître l'effet thérapeutique des plantes et évidemment plusieurs milliers des plantes dans le monde ont un vaste champ d'action et leur puissance varie .Il ont des effets spécifiques sur certaines de l'organisme et pour pouvoir traiter divers cas : la digestion, la respiration et la circulation, évacuer les toxines et apaiser la peau, les systèmes nerveux, endocrine et immunitaire (**Iserin, 2001**).

Ces remèdes naturels sont capables de soigner même les maladies chroniques notamment la dépression, le diabète, le cancer, l'arthrose et l'herpès (**Laouedj, 2016**).

## **II. Activités biologiques des métabolites secondaires**

Parmi les originalités majeures des végétaux leurs capacités à reproduire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques, glucides, protides, lipides (**Macheix et al, 2005**), qu'ils jouent un rôle essentiel dans la photosynthèse, la respiration, la croissance et le développement de la plante (**Dewick, 2009**). Ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Ces derniers, représentent des structures chimiques souvent complexes, très dispersés et très différents selon les espèces (**Berreghioua, 2016**).

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies).L'activité de ces substances dépend principalement de leur nature chimique et de leur concentration (**Nsemi, 2010**).

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Mansour, 2009**).

Plusieurs molécules ont été isolées, identifiées et testées en utilisant différentes méthodes pour confirmer ou infirmer leur potentiel biologique. Selon la bibliographie, un nombre très élevé des travaux scientifiques a été publié sur les substances bioactives à faible dose et sans effets secondaires. Nous avons résumées certaines activités biologiques des métabolites secondaires dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 1:** Quelques activités biologiques des métabolites secondaires.

| Les métabolites secondaires |                       | Activités biologiques | Références                |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Composés<br>phénoliques     | Acides<br>phénoliques | antioxydants          | (Yener ,2020)             |
|                             |                       | anti-carcinogène      |                           |
|                             |                       | antifongique          | (Abdelkhalek et al, 2020) |
|                             |                       | insecticide           |                           |
|                             |                       | antivirale            |                           |
|                             | Stilbènes             | antioxydants          | (Jung et al, 2009)        |
|                             |                       | anticancéreuse        | (Banik et al, 2020)       |
|                             |                       | neuro-protective      | (Nagumo et al, 2019)      |

| antiinflammatoire          |                    |  |
|----------------------------|--------------------|--|
| <b>Flavonoïdes</b>         | antivirale         | (Wu <i>et al</i> , 2016 ; Guo <i>et al</i> , 2019) |
|                            | antiallergique     |  |
|                            | antiulcéreuse      | (Mwakalukwa <i>et al</i> , 2019).                  |
|                            | antioxydant        |  |
|                            | cardiovasculaire   | (Vil <i>et al</i> , 2019)                          |
|                            | anticancéreuse     |  |
|                            | antiinflammatoire  | (Bailly, 2020 ; Luo <i>et al</i> , 2018)           |
|                            | antifongique       | (Bailly, 2020)                                     |
|                            | antiparasitaire    | (Liu <i>et al</i> , 2020)                          |
|                            | insecticide        |  |
| <b>Les tanins</b>          | antioxydant        | (Liang <i>et al</i> , 2020)                        |
|                            | anti-diarrhéique   | (Djahra <i>et al</i> , 2013)                       |
|                            | antimicrobienne    |  |
|                            | antivirale         | (Ulomskiy <i>et al</i> , 2020)                     |
| <b>Lignines</b>            | antioxydant        | (De Melo <i>et al</i> , 2020)                      |
|                            | antifongique       |  |
|                            | immunostimulant    |  |
|                            | anti-cancéreux     | (Barapatre <i>et al</i> , 2016)                    |
|                            | antimicrobienne    | (Alzagameem <i>et al</i> , 2019)                   |
|                            | antivirale         | (Gordts <i>et al</i> , 2015)                       |
| <b>Coumarines</b>          | anti-inflammatoire | (Liang <i>et al</i> , 2020)                        |
|                            | antiparasitaire    | (De Alcantara <i>et al</i> , 2015)                 |
|                            | analgésique        | (Li <i>et al</i> , 2017)                           |
|                            | anticancéreux      | (Önder, 2020)                                      |
|                            | antioxydante       | (Khaldi-Khellafi <i>et al</i> , 2020).             |
|                            | antispasmodique    | (Kostova, 2005)                                    |
| <b>Huiles essentielles</b> | antifongique       | (Hamdani, 2018)                                    |
|                            | larvicide          | (Scalvenzi <i>et al</i> , 2019)                    |
|                            | antibactériennes   | (Gherairia <i>et al</i> , 2019)                    |
|                            | antioxydant        | (Zeragui <i>et al</i> , 2019)                      |
|                            | anticancéreuse     |  |
|                            | insecticide        | (Touahir et Kadri ,2020)                           |

|                   |                    |                      |
|-------------------|--------------------|----------------------|
|                   | anti-inflammatoire | (Bayala, 2014)       |
|                   | antiproliférative  |                      |
|                   | anti-migratoire.   |                      |
| <b>Alcaloïdes</b> | anti-inflammatoire | (Fu et al, 2020)     |
|                   | antiproliférative  |                      |
|                   | analgésique        | (Guo et al, 2018)    |
|                   | antioxydant        | (Dai et al, 2018)    |
|                   | antimicrobienne    |                      |
|                   | gastro protectrice | (Boeing et al, 2020) |
|                   | anti-arythmique    | (Serdoz et al, 2019) |
|                   | antivirale         | (Fukuda et al, 2020) |
|                   | antitumorale       | (Wang et al, 2012)   |
|                   | antidiabétique     | (Yin et al, 2012)    |
|                   | anticancéreux      |                      |

### III. Le genre *Citrus*

#### III.1. Généralités sur les *Citrus*

Le genre *Citrus* regroupe les plantes de la grande famille des Rutaceae. Les arbres de genre *Citrus* donnent les fruits que nous connaissons sous le nom d'agrumes, terme provenant du terme latin « *acrumen* » signifiant « saveur acre » en raison de la présence de l'acide acétique qui leurs confère l'âcreté qui les caractérisent (Haineault, 2011).

Les *Citrus* sont probablement originaires du Sud-Est Asiatique, des enterrages de l'Himalaya. Les arbres de *Citrus* se distribuent dans les régions intertropicales où la température est constante (20°C à 25 °C) et l'humidité très forte (Harley et al, 2006).

Les *Citrus* s'identifient par leur appareil sécréteur constitué par des poches sécrétrices particulières dites schizolysigènes. Ces poches toujours superficielles sont d'origine épidermique. Il suffit de les écraser légèrement pour qu'une forte odeur d'essence s'en dégage (Harley et al, 2006).

#### III.2. Composition biochimique des *Citrus*

Les espèces des *Citrus* présentent une différence dans leurs compositions en éléments nutritifs énergétiques. Ils sont considérés comme des fruits charnus, vue leurs contenance élevé en eau qui varie entre 85,7% pour l'orange jusqu'à 91% pour le lime (Virbal-Alonso, 2011). Les glucides sont les principaux constituants énergétiques des *Citrus*, ils sont constitués principalement de saccharose, fructose et glucose. Les espèces les plus riche sont la mandarine et l'orange douce avec un taux de  $\approx 10\text{mg}/100\text{g}$  de fruits. Quant à la clémentine elle n'en

contient que 0,2 mg par 100 g de fruits. Les fruits des *Citrus* contiennent des polysaccharides complexes dont les plus abondants sont les pectines, au point que les principales sources industrielles de pectines sont les écorces de citron et d'orange (Haineault, 2011). Les *Citrus* contiennent les protides (0,7 à 1g /100 g de fruit), et à faible taux les lipides (0,2-0,6 g/100g de fruit), à l'exception du lime qui en contient plus (2,4g/100g) (Haineault, 2011).

La vitamine C est la plus abondante en plus il se trouve la vitamine B9, la vitamine B6, vitamine A, thiamine, riboflavine (Virbal-Alonso, 2011 ; Haineault, 2011).

Une variété en substances minérales et d'oligo-éléments ont été identifiées dans les *Citrus* avec une teneur importante de potassium et de calcium. On y trouve aussi du magnésium, du fer, ainsi que du cuivre, du zinc, du manganèse, et différents oligo-éléments à l'état de traces (Virbal-Alonso, 2011).

### III.3. Présentation des espèces étudiées

#### III.3.1. Description botanique des espèces étudiées

##### III.3.1.1. *Citrus limon* L

C'est un arbre à feuilles persistantes, oblongues lancéolées, à limbe nettement articulé avec un pétiole non ailé. Il peut vivre environ quatre-vingt ans. Ses fleurs à pétales blanc violacé, axillaires, sont réunies en petits groupes. Ses fruits oblongs, pointus de 8 à 12 cm de long, de couleur d'abord verte, virant au jaune à maturité, ont une pulpe acide et une écorce épaisse contenant une essence à odeur forte et quelques graines à cotylédons blancs (Nicolas, 2016).



Figure 1 : Fruits et feuilles de *Citrus limon* L. (Iserin, 2001)

##### III.3.1.2. *Citrus sinensis* L

L'oranger est un arbre au port harmonieux et de croissance rapide, de 7,5 m de hauteur et dans certains cas jusqu'à 15 m. Son aspect est plutôt arrondi ou parfois en colonne. Les branches portent des feuilles vert sombre, ovales, coriaces et finement denticulées, le pétiole est légèrement ailé. Les fleurs sont très odorantes, à cinq pétales blancs recourbés vers l'arrière (Etebu et Nwausoma, 2014).



Figure 2 : Fruits, fleurs et feuilles de *Citrus sinensis* L. (Milind et Dev, 2012)

**III.3.1.2. *Citrus reticulata* Blanco**

*Citrus reticulata* communément appelé « mandarine » est un Petit arbre à feuilles persistantes atteignant 3 à 5 m de haut et de large avec de nombreux rameaux épineux. Le fruit est subglobuleux, aplati ou piriforme, de 5–9 cm de diamètre, l'écorce vert virant au jaune vif brillant, orange à rouge orangé avec des glandes sébacées enfoncées, lisse, rugueuse ou verruqueuse ; croûte mince ou épaisse, douce à acide et parfois amère, avec peu à beaucoup de graines ou rarement sans pépins. Les feuilles sont unifoliolées, de 6–8 cm de long, lancéolées, ovales-lancéolées à elliptiques-lancéolées, marge crénelée, base largement cunéiforme (Lim, 2012).



**Figure 3 :** Fruits et feuilles de *Citrus reticulata* Blanco. (Lim, 2012)

**III.3.1.3. *Citrus aurantium* L**

Le *Citrus aurantium* ou le bigaradier est un arbuste atteignant 5 m à 8 de hauteur, à tronc ramifié, à feuillage toujours vert brillant et à floraison abondante. Les feuilles sont entières, elliptiques et persistantes. Les fleurs actinomorphes d'un blanc très pur, d'odeur agréable sont groupées par 2 à 3 à l'aisselle des feuilles et possèdent 5 à 8 pétales charnus ponctués de poches sécrétrices à huile essentielle, Le fruit est multiloculaire possède une partie blanche ou mésocarpe plus épaisse que celle de l'oranger doux (Ghedira et Goetz, 2015).



**Figure 4 :** Fruits, fleurs et feuilles de *Citrus aurantium* L. (Ghedira et Goetz, 2015)

**III.3.2. Les caractéristiques systématiques des espèces étudiées**

La classification botanique des espèces étudiées est illustrée dans le tableau suivant.

**Tableau 2 :** La classification botanique des espèces étudiées.

|                |               |               |               |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Règne</b>   | Plantae       | Plantae       | Plantae       | Plantae       |
| <b>Classe</b>  | Magnoliopsida | Magnoliopsida | Magnoliopsida | Magnoliopsida |
| <b>Ordre</b>   | Sapindales    | Sapindales    | Sapindales    | Sapindales    |
| <b>Famille</b> | Rutaceae      | Rutaceae      | Rutaceae      | Rutaceae      |
| <b>Genre</b>   | <i>Citrus</i> | <i>Citrus</i> | <i>Citrus</i> | <i>Citrus</i> |

|                        |                           |  |                            |
|------------------------|---------------------------|--|----------------------------|
| <i>Citrus limon</i> L. | <i>Citrus sinensis</i> L. | <i>Citrus reticulata</i> Blanco.         | <i>Citrus aurantium</i> L. |
| <b>Espèce</b>          | (Dev et al, 2016)         | (Chand et al, 2020)                      | (Suryawanshi, 2011)        |
|                        |                           | (D'après Guignard, 2001 in Hallal, 2011) |                            |

#### **IV. Méthodes de la détermination de l'activité antibactérienne**

A l'heure actuelle, l'activité antibactérienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide (El Kalamouni, 2010).

##### **IV.1. Méthodes en milieu solide (Méthodes de diffusion)**

La méthode par diffusion comprend deux types : la méthode de diffusion à partir de disques imprégnés et la méthode de diffusion à partir de puits. Actuellement, la méthode de diffusion à partir de disques est la plus connue et la plus utilisée, elle consiste en l'ensemencement sur un milieu gélosé, dans une boîte de Pétri, d'une suspension bactérienne. La substance à tester est ensuite imprégnée sur un disque de cellulose, lui-même déposé sur la boîte de Pétri. Durant l'incubation, la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse) ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance (Fontanay et al, 2015).

Le principe de la méthode de diffusion en puits est semblable à la méthode de disque, mais ce dernier est remplacé par des puits creusés stérilement sur la gélose ensemencée. Elle consiste à creuser un trou de 6 à 8 mm de diamètre dans la gélose. Un volume fixe d'extrait végétal est ensuite introduit dans le puits d'agar perforé et incubé à une température et une durée optimales en fonction du microorganisme testé (Das et al, 2010).

Pour ces deux techniques, la sensibilité du germe testé peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu. En effet, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm le germe est très sensible (Lakhdar, 2015).

##### **IV.2. Méthode en milieu liquide (Méthode de dilution)**

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de concentration minimales CMI (La concentration la plus faible inhibant encore la croissance bactérienne) d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure, car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution

d'agar) ou dans le bouillon (la microdilution ou la macrodilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries et les champignons (**Balouiri et al, 2016**).

La technique consiste à introduire l'inoculum dans une gamme de concentration décroissante en huile essentielle ou l'extrait. L'ensemble des tubes inoculés est incubé à la température optimale de la croissance du germe pendant 24 à 48h. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI de l'huile essentielle ou l'extrait qui est le premier tube dépourvu de croissance bactérienne (**Brahimi, 2019**).

### VI.3. Méthode de diffusion en gradient ou méthode E-test

La méthode du gradient antimicrobien basée sur la combinaison de deux concepts : diffusion du disque et de la dilution de gélose afin de déterminer la valeur de la CMI. Elle repose sur la possibilité de créer un gradient de concentration de l'agent antimicrobien testé dans le milieu gélosé (**Balouiri et al, 2016**).

Elle consiste à placer sur une gélose MHensemencée avec la souche à tester, une bandelette imprégnée d'un gradient de concentration d'antibiotique, qui va diffuser dans la gélose, générant une concentration décroissante à mesure que l'on s'éloigne de la source. Le gradient de la bandelette associé au gradient de diffusion va conduire à une zone d'inhibition de la culture bactérienne de forme ellipsoïdale. Le côté visible de la bandelette est gradué, la CMI correspond à la valeur de la concentration en antibiotique présente à la jonction de la zone d'inhibition et de la bandelette (**Egli et al, 2018**).

## IV. Méthodes de la détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits peut mesurer par des différents tests *in vitro*. Selon le type de réactions chimiques subies par les antioxydants, ces tests peuvent être divisés en deux catégories : ceux qui mesurent le transfert d'électrons et ceux qui mesurent les réactions de transfert de l'atome d'hydrogène (**Munteanu et Apetrei, 2021**). Dans le premier cas, la capacité des antioxydants potentiels à transférer des électrons et à réduire certains composés, notamment les carbonyles, les métaux et les radicaux, est évaluée. Dans le second cas, la capacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres est mesurée par don de protons (**Lewoyehu et Amare, 2019**).

Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Brahimi, 2019**).

Les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests spectroscopiques *in vitro* seront représentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3 :** Description de quelques tests antioxydants spectroscopiques *in vitro*.

| Tests                               | DPPH   | ABTS ou TEAC  | FRAP   | ORAC  |
|-------------------------------------|--|---|--|---|
| <b>Mécanismes réactionnels</b>      | Transfert d'électron majoritaire   | Transfert d'électron et de proton   | Transfert d'électron   | Transfert de proton   |
| <b>Principe de la méthode</b>       | Réaction antioxydante avec un radical organique  | Réaction antioxydante avec un radical cationique organique                            | Réaction antioxydante avec un complexe Fe(III)   | Réaction antioxydante avec les radicaux peroxydes, induite par l'AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane) |
| <b>Nature des molécules testées</b> | Hydrophiles et lipophiles  | Hydrophiles et lipophiles   | Hydrophiles  | Hydrophiles et lipophiles   |
| <b>Expression des résultats</b>     | CI50 et/ou en mg ou $\mu\text{mol}$ équivalent Trolox®   | CI50 et/ou en mg ou $\mu\text{mol}$ équivalent Trolox®                                | en mg ou $\mu\text{mol}$ équivalent Fe <sup>2+</sup>   | CI50 et/ou en mg ou $\mu\text{mol}$ équivalent Trolox®  |
| <b>Avantages</b>                    | Très facile à mettre en œuvre.<br>Peu couteux.   | Très facile à mettre en œuvre.<br>Cinétique de réaction très rapide.<br>peu couteuse. | Peu couteux.<br>Facile à mettre en œuvre.  | Couteux (nécessité d'un fluorimètre).<br>Utilisation d'un générateur de radicaux (ROO•).              |
| <b>Inconvénients</b>                | Encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires<br>Interférences possibles à 515 nm. | Produits de dégradation antioxydants.<br>Radical inexistant <i>in vivo</i>            | pH utilisé non physiologique.<br>interférences possibles à 595 nm.<br>interférences avec composés possédant $E^\circ < 0,77 \text{ V}$ . | Mécanismes de génération des ROO• non physiologique.<br>Interférences possibles des protéines.        |

|                   |  |  |  |  |
|-------------------|--|--|--|--|
|                   | Forte dépendance<br>au pH et solvant.<br>Radical inexistant<br><i>in vivo</i> .            |  |  |  |
| <b>Références</b> | <b>(Moharram et Youssef, 2014 ; Dontha, 2016 ; Romulo, 2020 ; Shahidi et Zhong, 2015).</b> |  |  |  |

# **Chapitre II : Matériels et méthodes**

## II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est constitué de quatre plantes du genre *Citrus*. Les noms des plantes (noms scientifiques et communs), les régions de récolte, le stade végétal et la date de leur collecte ainsi que leur partie utilisée sont résumées dans le **tableau 4**.

**Tableau 4 :** Les plantes étudiées, leurs noms scientifiques et communs, la partie utilisée ainsi que des informations sur la collecte.

| Nom botanique            | Nom commun                  | Partie utilisée | Région   | La date de récolte | Le stade végétal |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------|----------|--------------------|------------------|
| <i>Citrus limon</i>      | Citron                      | Ecorces         | Laghouat | Mars 2021          | Fructification   |
|                          |                             | Feuilles        |          |                    | Inflorescence    |
| <i>Citrus sinensis</i>   | Oranger                     | Ecorces         |          |                    | Fructification   |
|                          |                             | Feuilles        |          |                    | Inflorescence    |
| <i>Citrus reticulata</i> | Mandarinier                 | Ecorces         |          |                    | Fructification   |
|                          |                             | Feuilles        |          |                    | Croissance       |
| <i>Citrus aurantium</i>  | Bigaradier ou Oranger amère | Ecorces         |          |                    | Fructification   |
|                          |                             | Feuilles        |          |                    | Croissance       |

Les écorces de *Citrus aurantium* ainsi que les feuilles de tous nos échantillons ont été récoltés alors que les écorces de *Citrus limon*, *Citrus reticulata* et *Citrus sinensis* ont été achetés du marché local de Laghouat. Les feuilles et les écorces ont été nettoyées puis séchées à l'abri de la lumière à température ambiante pendant quelques jours afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Puis, conservées dans des sacs en papier jusqu'à le jour de l'extraction.

Nous avons effectué un broyage pour les feuilles et les écorces à l'aide d'un moulin électrique de manière à obtenir une poudre fine et homogène pour préparer les extraits aqueux. Tandis que dans la préparation des huiles essentielles les feuilles et les écorces sont coupées en petit morceaux.



**Figure 5 :** Poudre des feuilles et des écorces de chacune d'espèces pour la préparation des extraits aqueux (originale).



**Figure 6 :** Les écorces et feuilles de chacun d'espèces pour la préparation des huiles essentielles (originale).

### II.2. Préparation des extraits

En s'inspirant des méthodes traditionnelles, nous avons préparé des extraits aqueux des feuilles et des écorces de quatre plantes par infusion. En parallèle, nous avons réalisé d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.

#### II.2.1. Préparation des extraits aqueux

Les composés phénoliques ont été extraits à partir des feuilles et des écorces de ces plantes par la méthode d'infusion.

Ce type de procédé est utilisé quand les principes actifs de la plante sont hydrosolubles, elle consiste à verser de l'eau bouillante sur des plantes (les feuilles ou les fleurs) finement broyées puis les laisser tremper pour faire dissoudre leurs principes actifs (**Handa, 2008**).

La préparation de ces extraits a été réalisée comme suit :

- Après le broyage des feuilles et des écorces de chaque plante, 10g de poudre de chaque échantillon infusée dans 200ml d'eau distillée bouillante (95°C) pendant 10 min.
- Filtration des solutions obtenues à l'aide d'un papier filtre.
- Les extraits ont été évaporées à sec sous pression réduite à l'aide du rota vapeur à 45°C.
- Les résidus séchés ont été dissous dans le Diméthyle Sulfoxide (DMSO) à 5% et conservés à 4°C jusqu'à le jour d'analyse.

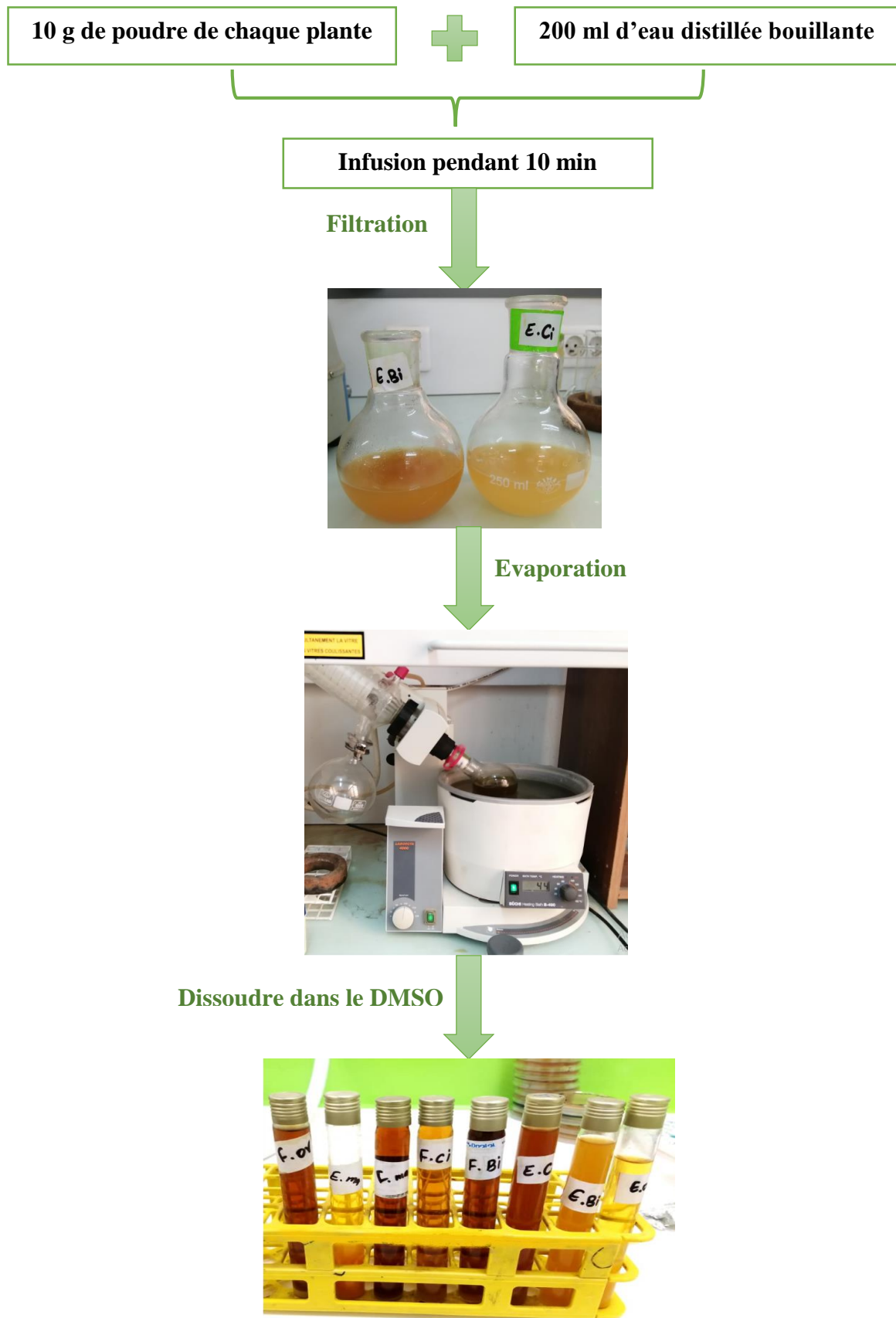


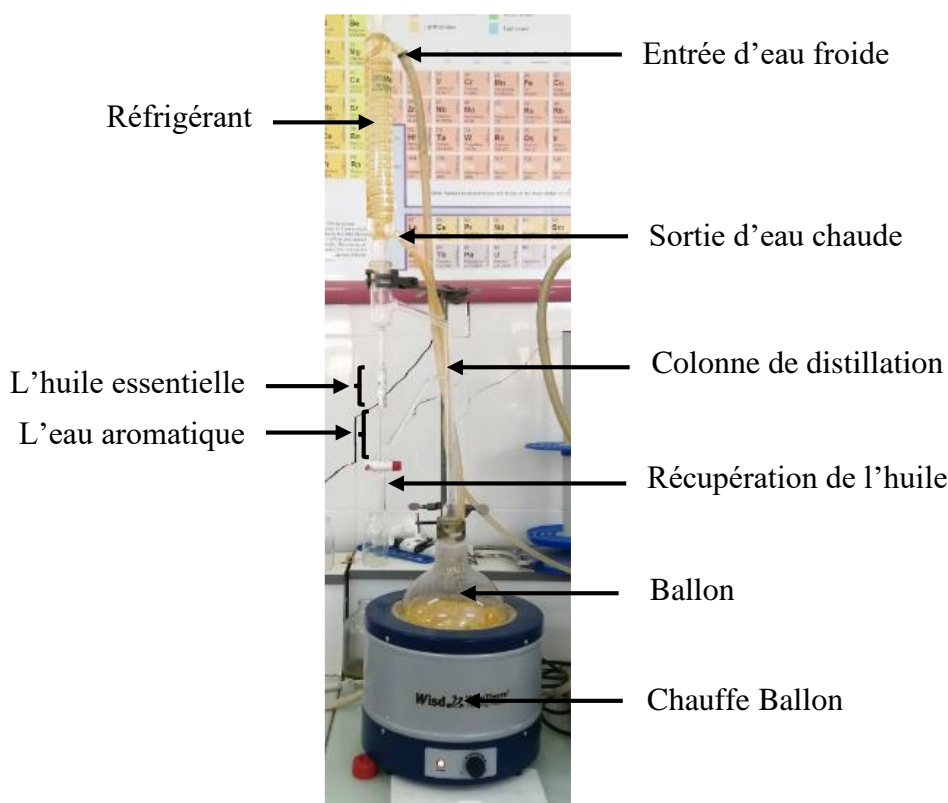
Figure 7 : Organigramme du protocole d'extraction des extraits de quatre plantes.

### II.2.2.Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des différents échantillons des plantes a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (**Figures 8**).

Le matériel végétal (éventuellement broyé) est immergé directement, dans un alambic rempli d'eau qui est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées, refroidies, sur une surface froide, puis décantées. Par la suite, l'huile essentielle est séparée par différence de densité (**Bruneton, 2009**).

Le montage est constitué d'un ballon en verre de 2 litres contenant 100 g de matériel végétal, 1 litre d'eau est additionné, placé au-dessus d'un chauffe ballon. Ce dernier est surmonté de l'appareil Clevenger. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, en traversant un réfrigérant se condensent et se séparent en deux phases liquides ; une phase aqueuse (eau aromatique) et une phase organique constituée d'huile essentielle. A la fin de l'hydro distillation, l'huile essentielle est récupérée dans un tube en verre.



**Figure 8 :** Le montage de l'hydrodistillation (originale).

La distillation dure de 3 heures à 6 heures après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur selon la matière végétale à traiter.

Afin d'éliminer toute trace d'eau dans les huiles essentielles obtenues, on ajoute une petite quantité de sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), par la suite on les transfère dans des tubes en verre, hermétiquement fermé et couverts de papier aluminium.

Les huiles essentielles extraites sont conservées au réfrigérateur à  $+4^\circ\text{C}$ , à l'abri de la lumière jusqu'à le jour d'analyse.

### II.2.3. Détermination du rendement

#### II.2.3.1. Calcul du rendement de l'extrait

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminé après évaporation du solvant par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction. , il est exprimé en pourcentage et est déterminé par la formule suivante :

$$R\% = \frac{P2 - P1}{P0} * 100$$

Où : R (%) : Rendement exprimé en %.

P2 : poids du ballon après évaporation.

P1 : poids du ballon vide.

P0 : poids de la matière végétale de départ.

#### II.2.3.2. Calcul des teneurs en huile essentielle

Selon **Goudjil et al, (2015)**, la teneur en huile essentielle est définie comme étant le rapport entre le volume d'huile essentielle et la masse végétale sèche à traiter. Il est déterminé par la formule suivante :

$$T\% = \frac{V}{M0} * 100$$

Où : T (%) : Teneur exprimé en %.

M : Volume en millilitre de l'huile essentielle résultant.

M0 : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

### II.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aqueux a été évaluée sur 4 souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque pour tester la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits testés.

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne ont été réalisés au laboratoire d'analyse médicale de Centre Hospitalier Universitaire de Laghouat.

#### II.2.4.1. Les souches bactériennes étudiées

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne de nos extraits, quatre souches bactériennes dont trois bactéries sont des bacilles à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) et une bactérie de forme Cocci à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) ont été utilisées. Les souches testées sont impliquées dans les maladies opportunistes ou nosocomiales ainsi que dans toute autre maladie infectieuse. Les différentes souches d'origine hospitalières ont été fournies par le laboratoire d'analyses médicales de Centre Hospitalier Universitaire de Laghouat.

#### II.2.4.2. Le choix du témoin

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries (Van Bambeke et Tulkens, 2008). 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 à Gram positives, mais demeurent peu actifs contre celles à Gram négatives et contre les levures (Guinoiseau, 2010).

Dans notre travail, l'antibiotique utilisé est la gentamicine (GM), c'est un aminoglycoside, utilisé cliniquement pour traiter les infections Gram-négatives et Gram-positives sévères (nosocomiales). Il a été isolé de *Micromonospora* en 1963, un genre de bactéries à Gram positif largement répandu dans l'eau et le sol. GM exerce une action bactéricide concentration-dépendante et est actif contre un large éventail d'espèces de bactéries (Chen *et al*, 2014).

#### II.2.4.3. Méthode de diffusion sur disque

##### II.2.4.3.1. Principe

Cette méthode est utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de nos extraits. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats

essentiellement qualitatifs. Le principe de la méthode repose sur l'inhibition de la croissance microbienne dans la boîte de Pétri après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition (Himed et al, 2016).

### **II.2.4.3.2. Protocole expérimentale**

#### **II.2.4.3.2.1. Stérilisation du matériel**

L'eau physiologique, les milieux de culture, les tubes à essai utilisés pour la préparation de la solution bactérienne et les disques en papier wattman (6mm de diamètre), ont été stérilisés par les U.V sous la hotte (BIOBASE) pendant 30 min.

#### **II.2.4.3.2.2. Réalisation d'une suspension**

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton. Les souches ont été par la suite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après incubation, quelques colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un vortex dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. La concentration des différentes suspensions a été ajustée à 10<sup>6</sup> cellule/ml correspondant à 0,5Mc Farland ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm (CLSI, 2011).

#### **II.2.4.3.2.3. Ensemencement**

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé MH en surfusion est coulé aseptiquement afin d'obtenir une épaisseur de 4 mm. Après la solidification, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne fraîchement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min (CLSI, 2011).

#### **II.2.4.3.2.4. Application des disques**

Des disques de papier-filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman n° 1) qui sont bien immergés et imprégnés d'un volume de 20 µl d'huile essentielle ou d'extrait aqueux des feuilles et des écorces de *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium* ou *Citrus sinensis* sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri à l'aide d'une pince stérile. Le disque

d'antibiotique (Gentamicine) à 30 µg/disque est déposé à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. L'antibiotique est utilisé comme contrôle positif. Les disques de papier-filtre stérilisés de 6 mm de diamètre (Whatman n°1), sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile puis imprégnés de 20 µl de DMSO, utilisé comme contrôle négatif. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque à l'aide d'une règle graduée (**Shah et Williamson, 2019**).

### II.2.4.3.2.5. Lecture des résultats

Selon le diamètre d'inhibition, les souches ont été classées en se basant sur leur sensibilité aux extraits et huiles essentielles comme suit : résistante pour un diamètre inférieur à 8 mm, moyennement sensible pour un diamètre compris entre 8-14 mm, sensible pour un diamètre de 14 à 20 mm et hautement sensible pour un diamètre supérieur à 20 mm (**Sfeir et al, 2013**).

## II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans notre travail nous avons utilisé le test DPPH pour l'évaluation du pouvoir anti radicalaire des extraits aqueux des feuilles et des écorces ainsi que des huiles essentielles des écorces de quatre plantes.

### II.2.5.1. Test de piégeage du radical DPPH

#### II.2.5.2. Principe

Le 1,1-Diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) est un radical relativement stable qui se présente sous forme d'un solide cristallisé, paramagnétique (à cause de l'électron libre) qui se dissout dans les solvants organiques (**Munteanu et Apetrei, 2021**).

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Le radical DPPH est réduit en son hydrazine (2,2 Diphényl -1- picryl hydrazine) correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violet à une couleur jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (**Milardovic et al, 2006**).

#### II.2.5.2.1. Protocole expérimentale

Le Protocole suivi est celui décrit par **Katawal et al, (2016)** avec quelques modifications.

Le DPPH 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) est solubilisé dans l'éthanol absolu pour en avoir une solution de 200 µM.

Le control négatif correspond à l'absorbance de DPPH avec l'éthanol, il consiste à mettre dans un tube à essai 500 µl de DPPH et 500 µl de l'éthanol.

Après la dilution des extraits de chaque plante. 500 µl de la solution de DPPH est ajouté à 500 µL de l'éthanol contenant l'extrait dilué à tester de chaque échantillon à différentes concentrations croissantes.

A des fins comparatives, un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard : la vitamine C (l'acide ascorbique) a été utilisé. Son absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Toutes les opérations ont été réalisées en duplicata.

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage est calculée par l'équation suivante :

$$PI\% = \frac{Ac - Ae}{Ac} * 100$$

Avec : PI % : Pourcentage d'inhibition

Ac : Absorbance du contrôle négatif (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai) (DPPH + éthanol).

Ae : Absorbance de l'échantillon testé (Absorbance du DPPH en présence du composé d'essai). (**Munteanu et Apetrei, 2021**).

L'efficacité antioxydante de nos extraits est déterminée ensuite par le calcul du paramètre IC<sub>50</sub> « Concentration Inhibitrice » qui est défini comme étant la concentration en substance qui est à l'origine de la perte de 50% de l'activité du DPPH. C'est-à-dire la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres (**Popovici et al, 2009**).

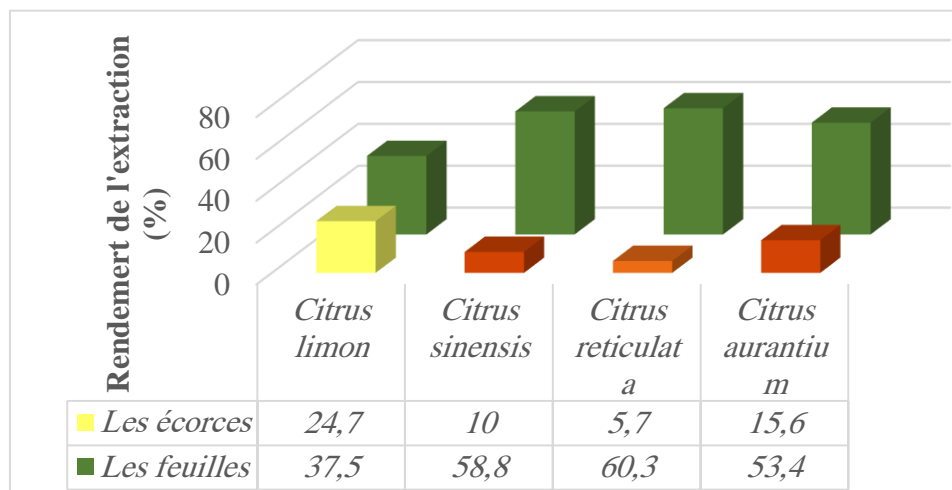
# **Chapitre III :**

## **Résultats et discussion**

### III.1 Rendement d'extraction

#### III.1.1 Rendements des extraits bruts

Les rendements d'extraction obtenus ont été calculés par rapport au poids total de la poudre végétale (**figure 9**).



**Figure 9** : Les rendements d'extraction des écorces et feuilles de quatre plantes du genre *Citrus*.

D'après les résultats présentés dans la figure ci-dessus, on remarque que l'extrait des écorces de *Citrus limon* présente le rendement le plus élevé de 24,7%, suivi par l'extrait de *Citrus aurantium* qui représente un rendement de 15,6%. En troisième position vient l'extrait de *Citrus sinensis* avec 10% et enfin l'extrait de *Citrus reticulata* avec un rendement de 5,7%.

Concernent les feuilles, le rendement le plus élevé est celui de l'extrait de *Citrus reticulata* 60,3%, suivi par les extraits de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* avec un rendement de 58,8% et 53,4% respectivement. Et la valeur la plus faible est obtenue avec l'extrait de *Citrus limon* avec un taux de 37,5%.

Les rendements d'extraction observés dépendent de l'organe de la plante, où l'on note que les rendements d'extraction des extraits aqueux des feuilles sont les plus élevés que les écorces des quatre échantillons (*Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium*). De plus, les écorces de *Citrus limon* présentent le taux d'extraction le plus élevé tandis que leurs feuilles présentent le taux d'extraction le plus bas par rapport aux autres plantes. Et l'inverse pour les feuilles de *Citrus reticulata*, qui montrent un taux d'extraction plus élevé par rapport à leurs écorces représentent le rendement le plus bas.

Un rendement inférieur aux résultats de la présente étude a été obtenu par **Tigrine, (2016)** pour son travail sur l'extrait éthanolique comme solvant d'extraction des écorces de *Citrus limon* et écorce de *Citrus reticulata*, où les taux d'extraction ont été respectivement 18%, 0,8%.

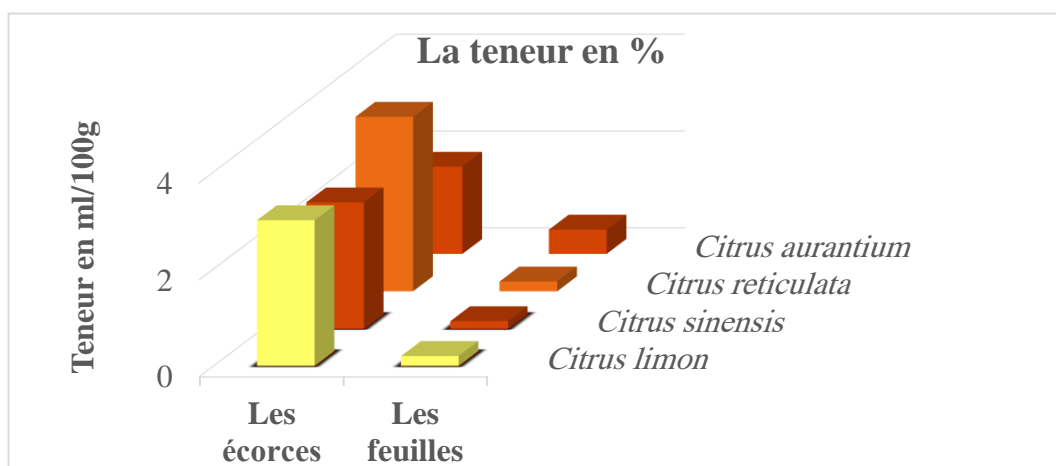
Cependant, **Ousmer et Tahri, (2017)** ont obtenu un rendement d'extraction plus élevé que celui obtenu par notre échantillon pour l'extrait aqueux et éthanolique des écorces de *Citrus sinensis* égal à 13,87% et 11,67% respectivement. Alors qu'elles ont trouvé un taux inférieur à celui de notre étude pour l'extraction aqueuse des polyphénols d'écorce de *Citrus aurantium* avec un rendement de 6,77%, de même avec l'extrait éthanolique de ce dernier (5,3%).

L'étude effectuée par **Hachemaoui et Oumbiche, (2013)** a montré que l'extrait aqueux des feuilles de *Citrus reticulata* présente un meilleur rendement : 23,44% par rapport à celui de l'extrait éthanolique : 22,2% et 16,2% pour l'extrait méthanolique. Ces résultats sont inférieurs de notre étude.

Cette variation de rendement est probablement due à la polarité des solvants, la solubilité, ainsi qu'à d'autres paramètres tels que la concentration du solvant, le pH, la température et le temps ou la méthode d'extraction (**Safdar et al, 2017 ; Quy Diem Do et al, 2014**).

### III.1.2 Les teneurs en huile essentielle et les caractéristiques organoleptiques

Les teneurs en huile des écorces et feuilles de, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium* exprimé en pourcentage de matière sèche, sont présentées dans la (figure 10).



**Figure 10 :** Les teneurs en huile essentielle des écorces et feuilles de quatre plantes du genre *Citrus*.

Les résultats de l'histogramme (Figure 10) montrent la présence des huiles essentielles dans les quatre espèces d'agrumes avec des proportions variables selon l'espèce et la partie du fruit.

Les teneurs en HE extraite par l'hydrodistillation des écorces de quatre espèces varient entre 1,8% à 3,7% (v/m), et pour les feuilles varient de 0,15% à 0,5% (v/m).

En analysant les résultats de l'histogramme, nous pouvons déduire que les teneurs les plus élevées ont été enregistrées dans les HE des écorces de *Citrus reticulata* avec une teneur de 3,7% et de feuilles de *Citrus aurantium* avec une teneur de 0,5%. Les plus faibles teneurs ont été enregistrées par les huiles essentielles d'écorces de *Citrus aurantium* et de feuilles de *Citrus sinensis* avec des teneurs de 1,8% et 0,15% respectivement. Les feuilles de *Citrus limon* et *Citrus reticulata* ont enregistré la même teneur.

Les écorces de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* ont fourni des huiles essentielles avec une teneur de 3% et 2,6% respectivement. Ces taux et nettement supérieur à celui des HEs extraites des mêmes espèces récoltées dans la même période dans la région de Blida en Algérie (*Citrus limon* (0,62%) et *Citrus sinensis* (0,55%)) par **Ben Miri, (2019)**. Une autre étude de **Himed et Barkat, (2014)** a été rapportée une teneur inférieur ( $2,18 \pm 0,04\%$ ) à celui obtenu par notre étude de pour l'huile essentielle de zeste de *Citrus limon* de la variété *Euréka* extraite par le même procédé, dans la région de Takariet wilaya de Bejaia.

La teneur en HE des feuilles de *Citrus sinensis* est nettement identique à celui d'HE extraite de la même espèce récoltée pendant le mois d'Avril en Madagascar (0,15%) par **Rabearison, (2015)**. Par contre elle a déterminé une faible teneur en HE des feuilles et zestes de *Citrus aurantium* (0,2%, 0,8%) par rapport à notre étude (0,5%, 1,8%).

Ces différences de teneurs en HE peuvent être expliquées par les divers paramètres appartenant à deux catégories. Ceux intrinsèques qui correspondent aux espèces, aux organes et à la maturité des plantes, ainsi qu'aux méthodes culturales, à la récolte, les interactions temporelles et environnementales (climat, sol, etc.) et, ceux extrinsèques comprenant l'extraction, le stockage et le conditionnement (**Ben Miri, 2019**).

Les caractéristiques organoleptiques et la durée d'extraction sont illustrées dans le **tableau 5**.

**Tableau 5 :** Durée d'extraction, couleur, aspect et odeur des huiles essentielles du genre *Citrus*.

| Caractère<br>plante          |         | Durée<br>d'extraction | Couleur              | Aspect              | Odeur   |
|------------------------------|---------|-----------------------|----------------------|---------------------|---|
| <i>Citrus<br/>limon</i>      | Ecorce  | 4h                    | Jaune Pâle           | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, plus<br>fraiche, légère. |
|                              | Feuille | 3h                    | Jaune<br>Verdâtre    | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, forte.                   |
| <i>Citrus<br/>sinensis</i>   | Ecorce  | 3h                    | Blanc<br>Transparent | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, plus<br>fraiche, légère. |
|                              | Feuille | 3h                    | Jaune<br>Verdâtre    | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, forte.                   |
| <i>Citrus<br/>reticulata</i> | Ecorce  | 6h                    | Jaune Pâle           | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, plus<br>fraiche, légère. |
|                              | Feuille | 3h                    | Jaune<br>Verdâtre    | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, forte.                   |
| <i>Citrus<br/>aurantium</i>  | Ecorce  | 5h                    | Jaune pâle           | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, plus<br>fraiche, légère. |
|                              | Feuille | 2h                    | Jaune pâle           | Liquide<br>visqueux | Odeur caractéristique, forte.                   |

D'après le tableau ci-dessus, nous pouvons déduire que toutes les huiles sont caractérisées par le même aspect par contre la couleur et l'odeur varie d'un organe à l'autre.

Des caractéristiques similaires ont été trouvées par **Bouderbala et al, (2020)** pour des échantillons de *Citrus sinensis* acheté du marché local de Guelma en Février, et par **Ouguelmane et Houichiti, (2020)** pour les feuilles et les zestes de *Citrus aurantium* récoltés dans la période de la fin de décembre et le début de janvier dans la région de Ghardaïa. Et par **Benabdi et Otmani, (2019)** pour les huiles essentielles obtenues par l'hydrodistillation des feuilles de *Citrus reticulata*. De même pour les huiles essentielles des écorces et des feuilles de *Citrus limon* (**Ben Miri, 2019 ; Kaibi et Timizar, 2016**).

Selon **Li et al, (2014)**, l'odeur typique des huiles essentielles dépend des organes, des espèces et des origines des plantes, et la majorité des huiles essentielles sont des liquides incolores, lucides et mobiles à température ambiante. Cependant, tout le spectre de couleurs des HE va en fait du jaune au brun foncé avec toute l'échelle intermédiaire de couleurs.

### III.2 Evaluation de l'activité antibactérienne

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et des huiles essentielles d'écorce et de feuilles de quatre plantes de genre *citrus* a été exploitée, en comparant à celle d'antibiotique standard utilisé ce qui permet de savoir quelle espèce a une bonne activité selon la partie du fruit.

Les observations effectuées sur l'effet des HEs et les extraits aqueux de *Citrus* de même l'antibiotique gentamicine sur la croissance des souches bactériennes testées sont représentées par le tableau et la figure suivante, ils représentent les diamètres des zones d'inhibitions des extraits testés

**Tableau 6** : Diamètres des zones d'inhibition en mm de l'antibiotique de référence (gentamicine).

|                    | Gram négative                         |                               |                         | Gram positive                |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|
|                    | <i>Escherichia coli</i>               | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|                    | Diamètre des zones d'inhibition en mm |                               |                         |                              |
| <b>Gentamicine</b> | 16 ± 0,05                             | 25 ± 0, 01                    | 17 ± 0,05               | 20 ± 0,05                    |
| <b>Sensibilité</b> | Sensible                              | Hautement sensible            | Sensible                | Sensible                     |

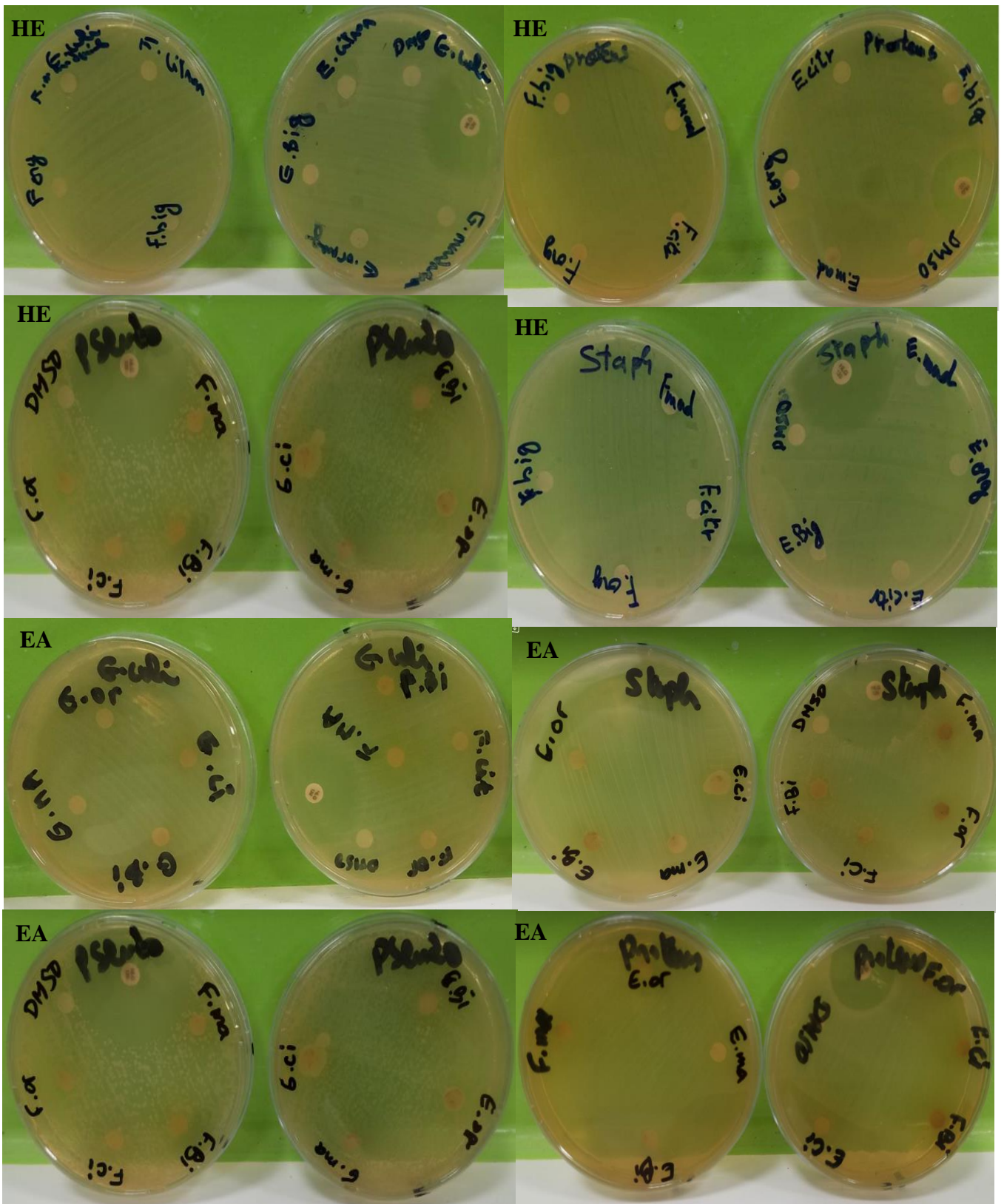


Figure 11 : L'effet des huiles essentielles et des extraits aqueux de quatre espèces de *Citrus* et la gentamicine sur la croissance des souches bactériennes testées

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antibactérienne *in vitro* obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose ne montrent aucune zone d'inhibition, cela indique que les quatre souches ont manifesté une résistance (non sensible) vis-à-vis des HEs et des extraits aqueux des feuilles et écorces des *citrus*. Par conséquent, nous pouvons déduire l'absence d'activité antibactérienne de nos échantillons.

Les résultats observés peuvent s'expliquer par le fait que ces composés sont présents dans les feuilles et les écorces mais pas en quantité suffisante pour induire une bonne activité ou la perte de certains composants inhibiteurs pendant le processus de séchage, en particulier les composés volatils.

Une étude Algérienne (**Saadoune et Meguenni, 2016**) sur l'évaluation du pouvoir de l'huile essentielle de *Citrus limon* à l'état pur et dilué, extrait par hydrodistillation des écorces de citron sur des souches bactériennes (bactéries à Gram positif (+) : *Staphylococcus Aureus* et bactéries à Gram négatif (-) : *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) a montré que les souches bactériennes testées sont résistantes vis-à-vis de l'huile essentielle pur étudiée. Alors que les (bactéries à Gram positif (+) : *Staphylococcus Aureus*) et les bactéries à Gram négatif (-) : *Pseudomonas aeruginosa* sont extrêmement sensibles et les bactéries à Gram négatif (-) : *Escherichia Coli* sont plus sensibles.

Les résultats d'une étude Tunisienne (**Ben Hsouna et al, 2017**) trouvent que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des fleurs de *Citrus limon* sur des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*) était un puissant antimicrobien contre les bactéries à Gram positif (+) avec un diamètre des zones d'inhibition de  $22 \pm 0,6$  mm. Tandis que les bactéries Gram négatif sont plus sensibles avec un diamètre des zones d'inhibition de  $15 \pm 0,5$  mm.

Différentes études concordent avec notre étude et montrent aucune activité antibactérienne des huiles essentielles de l'orange amer (*Citrus aurantium*) et de l'orange douce (*Citrus sinensis*) sur certaines bactéries Gram + et Gram -, par contre certaines études prouvent une résistance ou sensibilité par rapport à notre travail. Les résultats sont résumés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7** : Quelques études de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis* sur certaines bactéries Gram + et Gram -.

|                         |                   | <i>Escherichia coli</i>               | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Référence                 |
|-------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|
|                         |                   | Diamètre des zones d'inhibition en mm |                              |                         |                               |                           |
| <i>Citrus sinensis</i>  | Feuilles fraîches | 6                                     | 12                           |                         |                               | (Kaibi et Timizar, 2016)  |
|                         | Ecorces           | 0                                     | 0                            |                         | 0                             | Aoudache et Arib, 2019)   |
| <i>Citrus aurantium</i> | Feuilles          | 0                                     | 10 pour 20µl                 | 0                       | 0                             | (Benabdi et Otmani, 2019) |
|                         |                   | 8 ± 1                                 | 12,33±1,52                   |                         |                               | (Ouedrhiri et al., 2015)  |
|                         | Zeste frais       | 9,00 ± 0,47                           | 9,00 ± 0,47                  |                         | 9.00± 0,47                    | (Desislava, 2018)         |

Une autre recherche sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata* déterminée par la méthode de diffusion en puits sur milieu solide, contre les bactéries à Gram positifs et Gram négatif, (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*) montre une très forte activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 13 mm pour 20 µl. Pour *Escherichia coli* le diamètre est de 13 mm pour 20 µl de l'extrait. Ces souches sont sensibles à cette huile. *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris* sont indiqués des diamètres d'inhibition plus faibles (6 et 4 mm) donc ils sont résistances vis-à-vis de l'huile testé (Benabdi et Otmani, 2019).

D'après Kalembe et Kunicka, (2003) la sensibilité d'un microorganisme dépend des propriétés de l'HE et du microorganisme lui-même. Samarakoon et al, (2012) ont également confirmé que la grande résistance des bactéries Gram négatif aux HEs est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient un double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram positive.

L'absence d'activité antibactérienne dans les extraits aqueux d'écorce et des feuilles de nos extraits ne signifie pas que de ces espèces n'ayant pas d'activité antibactérienne. Ceci peut bien être en rapport avec beaucoup de paramètres influençant cette activité antibactérienne, comme la concentration de l'extrait qui pourrait donner une activité s'il est suffisamment concentré, et le choix du solvant car les extraits éthanoliques, méthanoliques des feuilles de *Citrus reticulata*, testés par Hachemaoui et Oumbiche, (2013) ont manifesté une activité

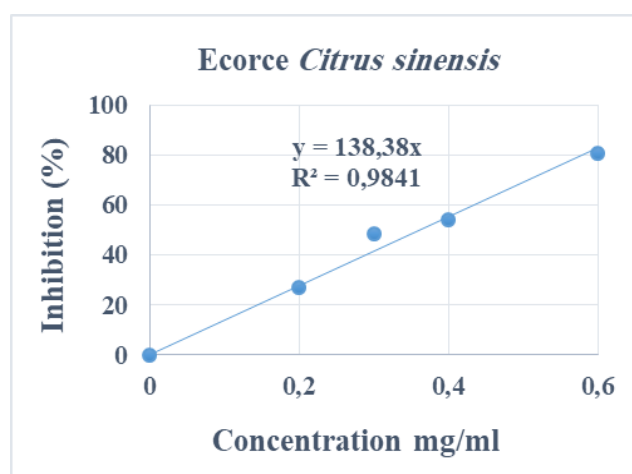
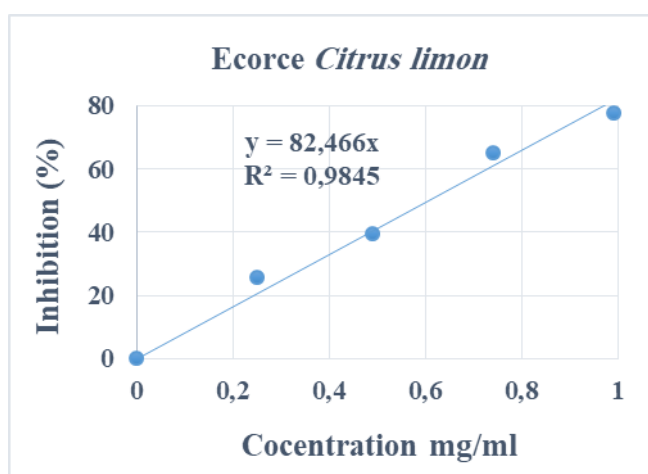
antibactérienne vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, dont les zones d'inhibition varient de 7,2 à 32,9 mm.

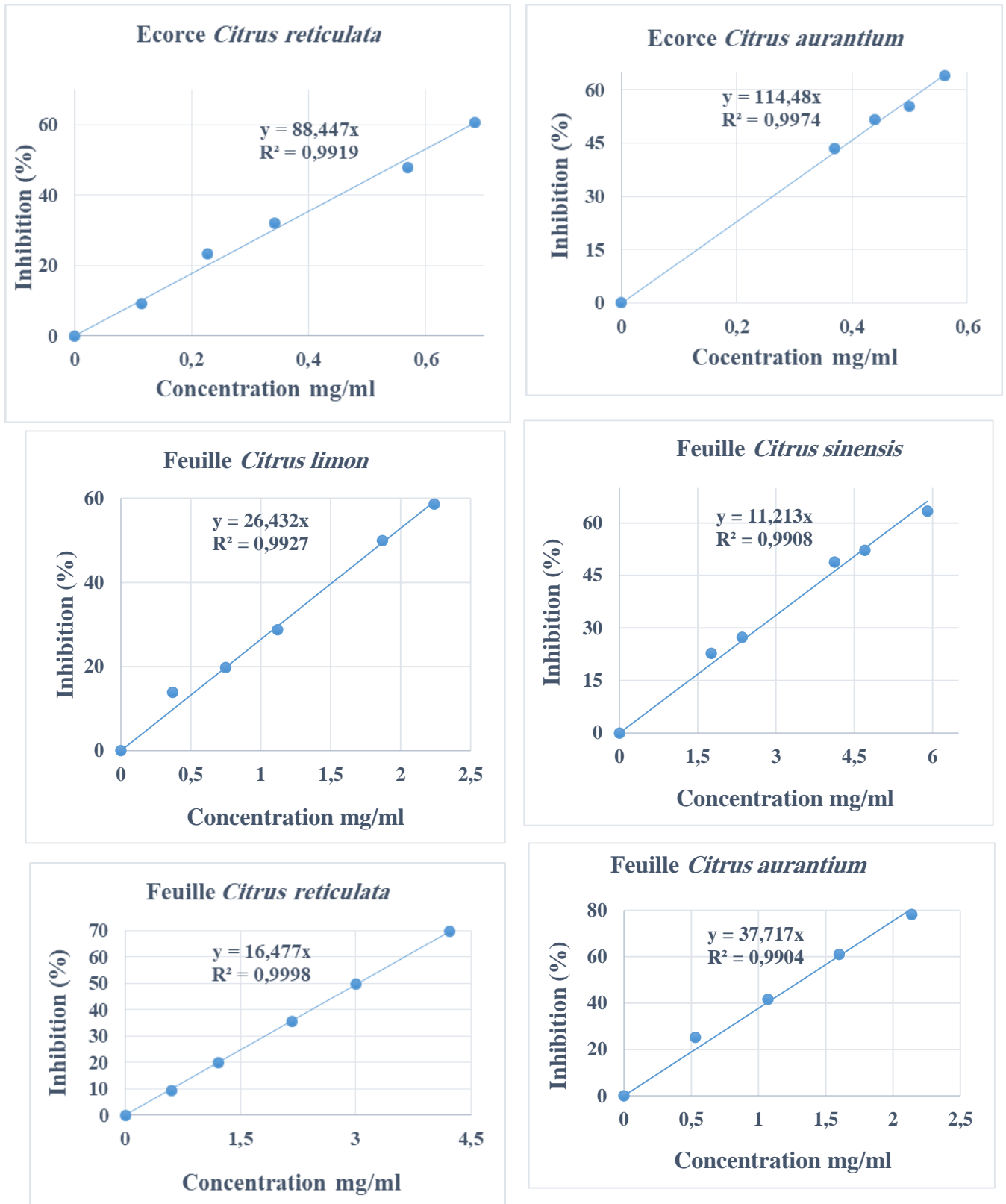
Par ailleurs, **Ousmer et Tahri, (2017)** ont constaté que les extraits aqueux d'écorces de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* à 2000 µg/ml ont montré des activités antibactériennes importantes contre les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* qui se traduit par l'apparition des zones d'inhibition de (13 ± 3mm) ; (12 ± 3,17 ± 4mm) ; (12 ± 2, 12 ± 2mm) respectivement. À l'exception d'*E. Coli* qui se révèle résistante à l'extrait aqueux d'écorce de *Citrus aurantium* (8 ± 2mm).

Les extraits aqueux d'écorces de *Citrus limon* testés sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus spp* par **Hindi et Chabuck, (2013)**, ont révélé la résistance de ces bactéries à ces extraits. Ce résultat est similaire à celui que nous avons trouvé pour l'extrait phénolique d'écorce de *Citrus limon* sur les souches testés.

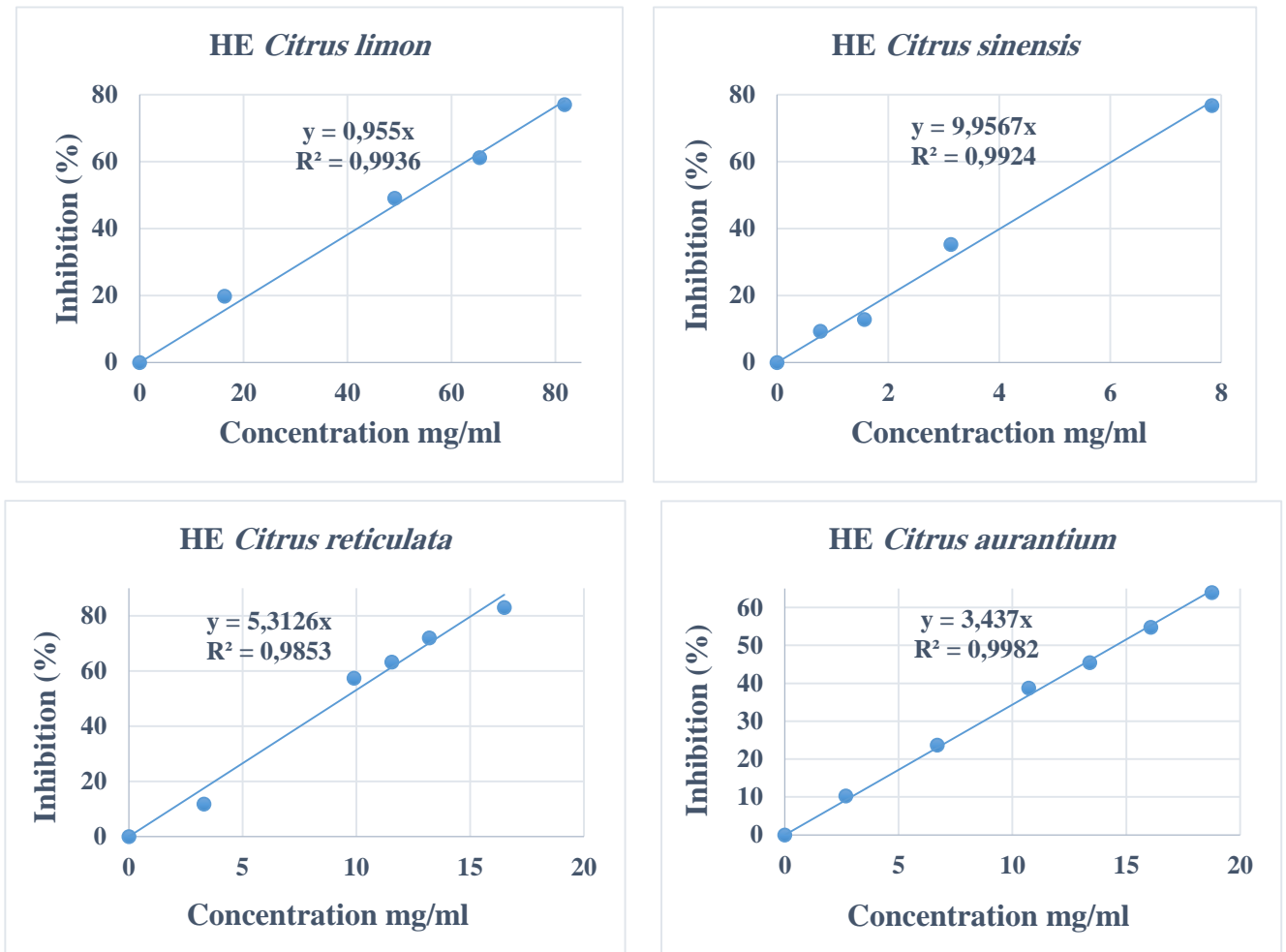
### III.3 Evaluation du pouvoir antioxydant par le test DPPH

Les figures qui suivent représentent les tracés du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des extraits aqueux (**figure 12**) et des huiles essentielles des écorces (**figure 13**) ainsi que la **figure 14** qui représente la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en mg/ml de l'antioxydant standard choisi pour cette étude à savoir la vitamine C.

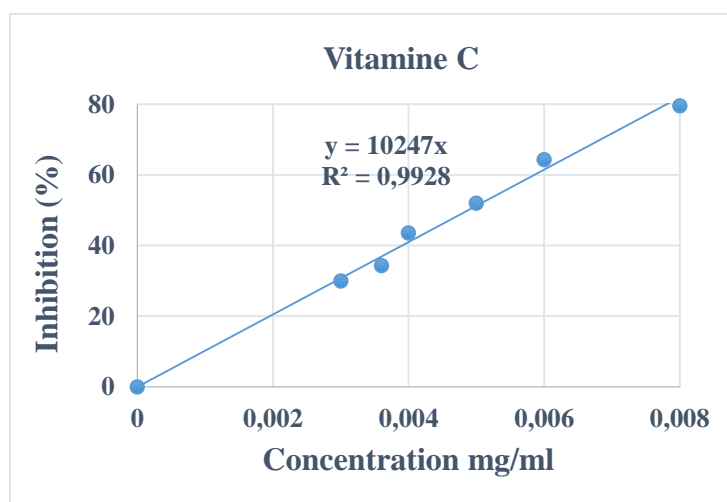




**Figure 12 :** Courbes représentant la variation du pourcentage d’inhibition (I%) en fonction de la concentration des extraits aqueux.



**Figure 13 :** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition (I%) en fonction de la concentration des huiles essentielles des écorces.



**Figure 14 :** Courbe représente la variation du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant standard choisi pour l'étude.

Les pourcentages d'inhibition (I%) ainsi déterminés à partir des tracés précédents nous ont permis de déterminer la concentration d'inhibition à 50% (IC<sub>50</sub>) des antioxydants présents dans les extraits aqueux et les huiles essentielles exprimés en mg/ml.

De même, nous avons calculés l'IC<sub>50</sub> de la vitamine C (l'acide ascorbique) afin de la comparer avec ceux des différents extraits. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenus sont résumées dans le (tableau 8). Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante.

**Tableau 8** : Les valeurs d'IC<sub>50</sub> en mg/ml des différents extraits et huiles essentielles et l'antioxydant standard.

| Nom de l'extrait  | Nom de la plante         | IC <sub>50</sub> en mg/ml |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Extrait aqueux    | <i>Citrus limon</i>      |                           |
|                   | Ecorce                   | 0,61 ± 0,02               |
|                   | Feuille                  | 1,89 ± 0,3                |
|                   | <i>Citrus sinensis</i>   |                           |
|                   | Ecorce                   | 0,36 ± 0,02               |
|                   | Feuille                  | 4,46 ± 0,3                |
|                   | <i>Citrus reticulata</i> |                           |
|                   | Ecorce                   | 0,57 ± 0,03               |
|                   | Feuille                  | 3,03 ± 0,3                |
|                   | <i>Citrus aurantium</i>  |                           |
|                   | Ecorce                   | 0,44 ± 0,07               |
|                   | Feuille                  | 1,33 ± 0,6                |
| Huile essentielle | <i>Citrus limon</i>      | 52,36 ± 0,9               |
|                   | <i>Citrus sinensis</i>   | 5,002 ± 0,1               |
|                   | <i>Citrus reticulata</i> | 9,41 ± 0,8                |
|                   | <i>Citrus aurantium</i>  | 14,95 ± 0,2               |
| Vitamine C        |                          | 0,005 ± 0,001             |

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que les valeurs de l'IC<sub>50</sub> varient globalement de 0,36 ± 0,02 mg/ml à 4,46 ± 0,3 mg/ml pour les extraits aqueux et de 5,002 ± 0,1 à 52,36 ± 0,9 mg/ml pour les huiles essentielles. La plus forte activité a été enregistrée pour l'extrait aqueux et l'huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* de même l'extrait des feuilles de *Citrus aurantium*. Par contre la plus faible a été enregistrée pour l'extrait aqueux des feuilles de *Citrus sinensis* et l'huile essentielle d'écorces de *Citrus limon*.

En analysant l'ensemble de nos résultats et sachant que le paramètre IC<sub>50</sub> est inversement proportionnel à l'activité antioxydante. Nos résultats montrent clairement que les extraits phénoliques et l'huile essentielle d'écorces des espèces *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium* possèdent un potentiel antioxydant inférieur à celui de l'antioxydant utilisés comme référence dans ce test.

En plus, nous constatons que quelque soit l'espèce les extraits aqueux des écorces représentent une activité antiradicalaire importante par rapport les extraits aqueux des feuilles.

La différence dans l'activité antiradicalaire au DPPH entre les extraits analysés est probablement due à leur composition en différents composés phénoliques. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais à l'interaction entre plusieurs composés, ces interactions peuvent exister dans un extrait pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits.

Les extraits aqueux des écorces des espèces *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* ont donné de meilleures concentrations inhibitrices par rapport à l'étude faite par **Lamri et Bouti, (2018)** sur les extraits éthanoliques et méthanoliques des mêmes espèces avec des valeurs de (0,89 ±0,07, 6,51±0,04, 7,66±0,01 mg/ml) et (0,56±0,02, 2,08±0,05, 1,23±0,03 mg/ml) respectivement. Tandis que les extraits éthanoliques et méthanoliques extraites à partir les feuilles de ces espèces possèdent un potentiel antioxydant très puissant que nos extraits avec des valeurs de (0,51±0,03, 1,44±0,007, 0,88±0,01 mg/ml) et (0,76, 1,3, 1,53 mg/ml) respectivement.

D'après nos résultats il est montré que les écorces de *Citrus sinensis* présente un potentiel antioxydant élevé que les écorces de *Citrus limon*. Ces résultats sont opposés aux résultats effectuée par **Hamidi et Limam, (2018)** qu'ils ont révélé que les extraits éthanoliques des écorces de *Citrus limon* est plus active que les écorce de *Citrus sinensis* avec des concentrations inhibitrices égal à 8310 et 16622,6 mg/ml respectivement.

Il ressort de nos résultats que l'extrait aqueux des écorces de Bigaradier (*C.aurantium*) présente une activité radicalaire importante, ces résultats sont nettement supérieurs à celui obtenus par la recherche d'**Essadik et al, (2015)** pour les extraits méthanoliques (2,193 mg/ml) et aqueux (4,439 mg/ml) de même plante. Par contre, **Ouldyeou et al, (2018)** ont montré que l'extrait brut issu de la macération des fruits de *Citrus aurantium* avec le méthanol possède une activité antioxydante extrêmement élevé que nos extraits avec d'IC<sub>50</sub> égal à 0,059 mg/ml.

Ces résultats du pouvoir antioxydant peuvent être fortement influencés par les conditions de l'essai (température de réaction, rapport antioxydant/DPPH, type de solvant, pH...etc.), l'origine des plantes étudiées, la partie testée (feuilles, fleurs...), la méthode d'extraction... tous ces facteurs peuvent avoir une influence sur la composition chimique de l'extrait et par conséquent sur leurs pouvoirs antioxydants (**Popovici et al, 2009 ; Khelfallah, 2013**).

En comparant nos résultats du pouvoir antioxydant de nos huiles essentielles par ceux de **Hamdani, (2018)**. Celui-ci a enregistré des faibles concentrations inhibitrices égale à 148,61 mg/ml pour l'HE de *Citrus limon*, 23,16 mg/ml pour l'HE de *Citrus sinensis* et 32,9 mg/ml pour l'HE de *Citrus aurantium*. Toutefois, des concentrations inhibitrices nettement supérieures à celle obtenue par notre plante ont révélé par **Himed, (2018)**. Ce chercheur a trouvé que l'activité antiradicalaire des huiles essentielles extraites par pression à froid des variétés *Euréka* ( $0,66\pm 0,03$  mg/ml) et *Lisbon* ( $0,77\pm 0,07$  mg/ml) est plus importante que celle des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des mêmes variétés ( $0,81\pm 0,03$ ,  $0,94\pm 0,02$  mg/ml).

En outre, les huiles essentielles de pépins de (*Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*) ont donné de faibles concentrations inhibitrices avec des IC<sub>50</sub> de 155,19 mg/ml et 177,52 mg/ml respectivement par contre le mélange des deux huiles représentent un potentiel antioxydant légèrement fort avec 36,74 mg/ml (**Benabdi et Otmani, 2019**).

Ainsi que, **Ouedrhiri et al, (2015)** ont trouvé que l'huile essentielle de zeste et feuilles de *Citrus aurantium* collectés au Maroc exercé un pouvoir antioxydant moins important par rapport à celle de notre échantillon avec des IC<sub>50</sub> égal à 26,99 mg/ml et 496,2 mg/ml.

La capacité des huiles essentielles à piéger le radical DPPH peut être due au fort pourcentage de composés oxygénés (mono et sesquiterpène) tels que le camphre, 1,8 cineole, linalool et autres qui sont connus par leur activité antioxydante (**Selmi et al, 2016**).

# Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, pour cela la phytothérapie constitue une alternative intéressante pour explorer de nouvelles molécules qui pourraient représenter une base de nouvelles voix de recherche. Ces plantes peuvent être sélectionnées comme ressources naturelles afin d'isoler des nouveaux composés antibactériens ou antioxydants à la base de production de nouveaux médicaments originaux efficaces et moins toxiques pour le corps humain.

La présente étude a pour le but d'évaluer l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits aqueux et des huiles essentielles des écorces et feuilles de quatre espèces du genre *citrus* de la région de Laghouat à savoir le citron (*Citrus limon* L), l'orange (*Citrus sinensis* L), le mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco) et le bigaradier (*Citrus aurantium* L).

Cette étude a porté dans un premier temps sur l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger et les extraits aqueux par l'infusion des écorces et feuilles des quatre plantes. Il ressort que les écorces des plantes étudiées ont des teneurs importantes en huiles essentielles par rapport à leurs feuilles et l'inverse pour les extraits aqueux. Des teneurs en huiles essentielles allant de 1,8% à 3,7% (v/m) pour les écorces et 0,15% à 0,5% (v/m) pour les feuilles. Les extraits aqueux d'écorces et des feuilles des plantes étudiées représentent des rendements variant entre 5,7% et 24,7% et 37,5% et 60,3% respectivement.

Dans un deuxième temps, Les résultats du test de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et des huiles essentielles d'écorce et de feuilles de quatre plantes de genre *citrus* par la méthode classique de diffusion sur la gélose vis-à-vis de certaines souches testées : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, en comparant à celle d'antibiotique standard (gentamicine) ne montrent pas de zone d'inhibition. Cela indique que les quatre souches ont manifesté une résistance (non sensible) contre les HEs et les extraits aqueux testés. Par conséquent, nous pouvons déduire l'absence d'activité antimicrobienne de nos échantillons.

Une évaluation de l'activité antioxydante a été également étudiée par le test du radical libre DPPH en déterminant leur IC<sub>50</sub> en comparant à celui de la vitamine C. Suivant ce paramètre, la plus forte activité a été enregistrée pour l'extrait aqueux et l'huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* ( $0,36 \pm 0,02$  mg/ml,  $5,002 \pm 0,1$  mg/ml) respectivement, de même l'extrait des feuilles de *Citrus aurantium* avec une concentration inhibitrice égale à  $1,33 \pm 0,6$  mg/ml. Par contre, la plus faible activité a été enregistrée pour l'extrait aqueux des feuilles de

*Citrus sinensis* et l'extrait et l'huile essentielle d'écorces de *Citrus limon* avec des concentrations de  $0,61 \pm 0,02$  mg/ml et  $52,36 \pm 0,9$  mg/ml.

L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel des plantes étudiées et confirme encore une fois la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreux maux. Mais ces résultats ne constituent qu'une ébauche dans le domaine de recherche des antioxydants et des antimicrobiens naturels, il serait intéressant d'étayer ce travail par :

-la réalisation des analyses phytochimiques et pharmaco-toxicologiques, plus approfondies afin de déterminer les composés actifs responsables de ces activités, et évaluer leur efficacité, leur innocuité et leur synergie potentielle.

-Une étude de la composition chimique des huiles est aussi nécessaire et ce afin d'identifier et de préciser les différents principes actifs et pour mieux comprendre leur mode d'action.

-Faire des tests complémentaires pour confirmer l'activité antioxydante et des tests antimicrobiens sur d'autres souches bactériennes

-Une étude *in vivo* des molécules bioactives isolées serait souhaitable pour rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

-Etudier d'autres propriétés biologiques de ces extraits et des huiles essentielles, à savoir les propriétés anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et autres.

-L'activité antimicrobienne et antioxydante de ces quatre espèces a été démontrée, cependant cette recherche d'activité reste à investiguer sur d'autres espèces de *Citrus* en utilisant d'autres techniques ou élargir le spectre d'étude en étudiant les mêmes espèces d'autres régions à des fins comparatives.

# **Références Bibliographiques**

**Abayomi S.**, 2010-*Les plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. Ed. Karthala, Nigeria, 384 p.

**Abdelkhalek A., Salem M. Z., Ali H. M., Kordy A. M., Salem A. Z., Behiry S. I.**, 2020-Antiviral, antifungal, and insecticidal activities of *Eucalyptus* bark extract: HPLC analysis of polyphenolic compounds. *Microbial Pathogenesis*, 147 : 104383.

**Adouane S.**, 2016-Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Mémoire De Magistère. Université Mohamed Khider. Biskra. 239p.

**Alzagameem, A., Klein, S. E., Bergs, M., Do, X. T., Korte, I., Dohlen, S., & Schulze, M.**, 2019-Antimicrobial activity of lignin and lignin-derived cellulose and chitosan composites against selected pathogenic and spoilage microorganisms. *Polymers*, 11(4), 670.

**Aoudache K., Arib D.**, 2019- Caractérisation de l'huile essentielle de l'orange douce variété « Thomson » et évaluation de son activité antibactérienne et antioxydante. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. 74p.

**Bailly C.**, 2020-Molecular and cellular basis of the anticancer activity of the prenylated flavonoid icaritin in hepatocellular carcinoma. *Chemico-Biological Interactions*, 109124.

**Balouiri M., Sadik M., Ibnsouda S K.**, 2016- Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Vol. 6, Issue. 2 : 71-79.

**Banik K., Ranaware A. M., Harsha C., Nitesh T., Girisa S., Deshpande V., Kunnumakkara A.B.**, 2020-Piceatannol: A natural stilbene for the prevention and treatment of cancer. *Pharmacological research*, 153, 104635.

**Barapatre, A., Meena, A. S., Mekala, S., Das, A., & Jha, H.**, 2016-In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. *International journal of biological macromolecules*, 86: 443-453.

**Bayala B.**, 2014-Etude des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et antimigratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse De Doctorat. Université Blaise Pascal. Burkina-Faso. 224p.

**Ben Hasouna A., Ben Halima N., Smaoui S., and Hamdi N.**, 2017-Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in health and disease*.

**Ben Miri Y.**, 2019- Etude du potentiel antifongique, antiaflatoxinogène et antioxydant de certaines huiles essentielles et leur efficacité dans le système alimentaire. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. 192p.

**Benabdi B., Otmani A.**, 2019- Evaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*. Mémoire de Master. Université Akli Mohand Oulhadj. Bouira. 92p.

**Benghanou M.**, 2012-La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, Institut De Formation Paramédical Chettia, Alger. 56p.

**Berreghioua A.**, 2016-Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud Algérien : *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*. Thèse De Doctorat. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen. 257p.

**Boeing, T., Mariano, L. N. B., dos Santos, A. C., Tolentino, B., Vargas, A. C., de Souza, P., et da Silva, L. M.**, 2020-Gastroprotective effect of the alkaloid boldine: Involvement of non-protein sulfhydryl groups, prostanoids and reduction on oxidative stress. *Chemicobiological Interactions*, 109166.

**Boissière M.**, 2018- Consommation des plantes médicinales par les patients suivis en cabinet de médecine générale à La Réunion : expériences, représentations et ressentis des patients dans le cadre de la communication médecin-patient. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux. 94p.

**Bouderbala A., Sandli R., Grana N.**, 2020- Etude du potentiel de rendement en huiles essentielles de deux espèces végétales du Nord-Est Algérien (*Eucalyptus camaldulensis* et *Citrus sinensis*). Mémoire de Master. Université 8 mai 1945. Guelma. 72p.

**Brahimi S.**, 2019-*Deverra reboudii* Coss. *Et Durieu* : biologie, composition chimique et activités biologiques des extraits et des huiles essentielles. Thèse De Doctorat. Université Ziane Achour. Djelfa. 111p.

**Bruneton J.**, 2009-*Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 4<sup>ème</sup> édition, Paris: Lavoisier. 1269p.

**Chand P., Rana S., Singh A.**, 2020- A Review on citrus: Medicinal activity of *Citrus X sinensis* (orange). *International Journal of Scientific Development and Research*, Vol. 5 Issue. 8: 438-442.

**Chen C., Chen Y., Wu P., Chen B.,** 2014- Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. *Journal of the Formosan Medical Association*, 113, 72-82.

**CLSI,** 2011- *Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale 6<sup>ème</sup> édition*. Ed. ANDS. 195p.

**Dai J., Dan W., Schneider U., et Wang J.,** 2018- $\beta$ -carboline alkaloid monomers and dimers: Occurrence, structural diversity, and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157: 622-656.

**Das k., Tiwari R. K. S., Shrivastava D. K.,** 2010- Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 4(2): 104-111.

**De Alcantara, F. C., Lozano, V. F., Velosa, A. S. V., dos Santos, M. R. M., & Pereira, R. M. S.,** 2015-New coumarin complexes of Zn, Cu, Ni and Fe with antiparasitic activity. *Polyhedron*, 101: 165-170.

**De Billerbeck V.G.,** 2007- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 249–253.

**De Melo C. M. L., da Cruz Filho I. J., de Sousa G. F., de Souza Silva G. A., do Nascimento Santos D. K. D., da Silva R. S., et de Moraes Rocha G. J.,** 2020-Lignin isolated from *Caesalpinia pulcherrima* leaves has antioxidant, antifungal and immunostimulatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162: 1725-1733.

**Desislava T., Rositsa D., Bogdan., Yana H., Aleksandar S., Zapryana D., Georgi K.,** 2019-Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from *Citrus aurantium* L zest against some pathogenic microorganisms, *Z. Naturforsch*, 74(5–6) c: 105–111.

**Dewick P M.,** 2009-*Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, third Edition*. Ed. John Wiley & Sons. 546p.

**Djahra A. B., Bordjiba O., & Benkherara S.,** 2013-Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie*, 11(6) : 348-352.

- Dontha S.**, 2016- A Review on Antioxidant Methods. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol. 9, Suppl. 2:14-32.
- Egli A., Greub G., Riniker F S., Schrenze J.**, 2018- Méthodes pour la détermination des résistances aux antibiotiques. *Swiss Médical Forum*, 18(46) :950–956.
- El Kalamouni C.**, 2010-Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse De Doctorat. Université De Toulouse.263p.
- Essadik F.Z., Haida S., Kribii A., Kribii A.R., Ounine K., Habsaoui A.**, 2015- Antioxidant activity of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Peel from western of Morocco, identification of volatile compounds of its essential oil by GC-MS and a preliminary study of their antibacterial activity. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, Vol. 16. N° 2: 425-432.
- Fontanay S., Mougenot M E., Duval R E.**, 2015-Evaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, Vol. 5 N° 2:109-118.
- Fu Y. H., Guo J. M., Xie Y. T., Hua J., Dai Y. Y., Zhang W & Liu Y. P.**, 2020-Structural characterization, antiproliferative and anti-inflammatory activities of alkaloids from the roots of *Zanthoxylum austrosinense*. *Bioorganic Chemistry*, 104101.
- Fukuda T., Ishibashi F., & Iwao M.**, 2020-Lamellarin alkaloids: Isolation, synthesis, and biological activity. *In The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 83: 1-112.
- Ghédira K, Goetz P.**, 2015-*Citrus aurantium* L var. *amara* Link. *Phytothérapie*, 13: 320-327.
- Gherairia N., Boukerche S., Chouikh A., Khoudir S., Chefrou A.**, 2019- Antibacterial activity of essential oils from two species of genus *Thymus* growing in different sites of North Eastern Algerian. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, Tom. XXVI, Issue. 2: 100-104.
- Gordts S. C., Férir G., D'huys T., Petrova M. I., Lebeer S., Snoeck R., & Schols D.**, 2015-The low-cost compound lignosulfonic acid (LA) exhibits broad-spectrum anti-HIV and anti-HSV activity and has potential for microbicidal applications. *PLoS One*, 10(7), e0131219.
- Goudjil M.B., Ladjel S., Bencheikh S., Zighmi S.**, 2015- Influence du séchage sur le rendement de l'extraction des huiles essentielles de *Mentha piperita*, *5ème Séminaire Maghrébin sur les Sciences et les Technologies du Séchage*, Ouargla (Algérie), 1-4.
- Guinoiseau E.**, 2010-Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université De Corse-Pasquale Paoli, 149p.

**Guo H., Wan X., Niu F., Sun J., Shi C., Ye J. M., Zhou C.,** 2019-Evaluation of antiviral effect and toxicity of total flavonoids extracted from *Robinia pseudoacacia* cv. idaho. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109335.

**Guo Q., Xia H., Meng X., Shi G., Xu C., Zhu C & Shi J.,** 2018-C19-Diterpenoid alkaloid arabinosides from an aqueous extract of the lateral root of *Aconitum carmichaelii* and their analgesic activities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(3) : 409-419.

**Hachemaoui K., Oumbiche N.,** 2013- Activités antioxydant et antibactérienne des polyphenols des feuilles de *Citrus reticulata* Blanco (mandarine). Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira .Bejaïa. 90p.

**Haineault S.,** 2011-*Les Vertus Thérapeutiques des agrumes, 3éme édition.* Quebecor. 152p.

**Hamdani S.,** 2018- Etude chimique et activité antioxydante des huiles essentielles des agrumes cultivés dans la région de Tlemcen. Mémoire de Master. Université Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen. 49p.

**Hamidi F., Et Limam F.,** 2018-Etude phytochimique et pouvoir antioxydant de l'écorce d'orange et citron. Mémoire de Master. Université Abdelhamid Ibn Badis. Mostaganem. 80p.

**Handa S.,** 2008. *An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants.* International Centre for Science and High Technology. Italy. 266p.

**Harley I. M., Richard S. B., Smith V.E, Deborah W., Craig R. E.,** 2006-*Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat).* *Species Profiles For Pacific Island Agroforestry* : 2-22.

**HELLAL Z.,** 2011-Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.120p.

**Himed I.,** 2018- Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon*) : encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée. Thèse De Doctorat. Université Freres Mentouri Constantine 1.158p.

**Himed L., Barkat M.,** 2014- Elaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de *Citrus limon*. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, Vol. 21, N° 1. A102 :1-5.

**Himed L., Merniz S., Barkat M.,** 2016- Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété *Lisbon*) extraite par hydrodistillation. *Algerian Journal of Natural Products*, 4:1, 252-260.

**Hindi N K K., Chabuck Z A G.,** 2013- Antimicrobial Activity of Different Aqueous Lemon Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 3 (06) :74-78.

**Ibelhoulen N., Tighzert S.,** 2016-Evaluation *in-vitro* de l'activité anti-inflammatoire des écorces et des pulpes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaia. 77p.

**Iserin P.,** 2001-*Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins*. Ed. Larousse. Paris 335p.

**Jung J. C., Lim E., Lee Y., Kang J. M., Kim H., Jang S., Jung M.,** 2009-Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(8) : 3166-3174.

**Kaibi F.Z., Timizar A.,** 2016- Etude de quelques activités biologiques antimicrobienne, antioxydant et cicatrisante de deux agrumes « *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* ». Mémoire de Master. Université Saad Dahlab. Blida. 92p.

**Kalemba D., Kunicka A.,** 2003-Antibactérien et antifongique propriétés des huiles essentielles. *Current Medicinal Chemistry*, 10:813-829.

**Katawal I., Kharel G. P., & Poudel B. H.,** 2016-Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Nepalese Nak Cheese. *Biol. Chem. Res*, 3, 234-245.

**Khaldi-Khellafi N., Oukacha-Hikem D., Bouaziz S. T., Abdoun A., Makhloufi-Chebli M., Dumas F & Hamdi M.,** 2020-Green synthesis, characterization, structure, biological activity, theoretical calculations and drug-likeness analysis of coumarins. *Chemical Data Collections*, 25, 100341.

**Khelfallah A.,** 2013- Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Mémoire de Magister. Université Constantine 1. 179p.

**Kostova I.,** 2005-Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(1), Pp.29-46.

**Kourta M., Chouane F.,** 2019-Identification des champignons phytopathogènes de l'oranger *Citrus sinensis* associés aux attaques de la mouche des fruits *Ceratitidis capitata* en vue d'une lutte biologique par *Bacillus* dans la région de Lakhdaria. Thèse De Doctorat. Université Akli Mohand Oulhadj. Bouira.98p.

**Lakhdar L.**, 2015- Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles Marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude *in vitro*. Thèse De Doctorat. Université Mohammed V de Rabat.183p.

**Lamri Y., et Bouti A.**, 2018-Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles et des écorces de l'espèce *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*. Mémoire de Master. Université Amar tledji. Laghouat. 47p.

**Laouedj M.**, 2016-*Posologies des plantes médicinales d'Algérie Première partie*. Ed. Ediliver, Algérie, 210 p.

**Lewoyehu M et Amare M.**, 2019-Comparative evaluation of analytical methods for determining the antioxidant activities of honey: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 5:1, 1685059.

**Li Y., Sylvie A., Tixier F., Chemat F.**, 2014- *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability. Ed. Sharma .78p.

**Li R., Zhao C., Yao M., Song Y., Wu Y., & Wen A.**, 2017-Analgesic effect of coumarins from *Radix angelicae pubescentis* is mediated by inflammatory factors and TRPV1 in a spared nerve injury model of neuropathic pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 195: 81-88.

**Liang H., Shi Y., Zeng K., Zhao M., Tu P., & Jiang Y.**, 2020-Coumarin derivatives from the leaves and twigs of *Murraya exotica* L. and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*, 177, 112416.

**Liang X., Jiang Y., Guo Z., & Fang S.**, 2020-Separation, UPLC-QTOF-MS/MS analysis, and antioxidant activity of hydrolyzable tannins from water caltrop (*Trapa quadrispinosa*) pericarps. *LWT*, 110010.

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

**Liu Y. P., Yu X. M., Zhang W., Wang T., Jiang B., Tang H. X., & Fu Y. H.**, 2020-Prenylated chromones and flavonoids from *Artocarpus heterophyllus* with their potential antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Bioorganic Chemistry*, 101, 104030.

**Luo X., Cui J., Zhang H., Duan Y., Zhang D., Cai M., & Chen G.**, 2018-Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their

biological activities and polyphenolic compositions. *Industrial Crops and Products*, 112: 296-304.

**Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-allemend C., 2005-***Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique.* Ed. Presses poly Technologiques et Universitaires Romandes, France, 192 p.

**Mansour A., 2009-** Investigation phytochimique de l'extrait n-butanol de l'espèce *centaurea africana*. Mémoire De Magister. Université Mentouri Constantine.114p.

**Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C et Fernandez X., 2010-**Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 4(10): 959-964.

**Milardovic S., Ivekovic D., Grabaric S.B., 2006-** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68, 175 – 180.

**Milind P et Dev C., 2012-**orange: range of benefits. *International Research Journal of Pharmacy*.3 (7): 59-63.

**Moharram H A., Youssef M M., 2014-** Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* Vol. 11, No° 1: 31-42.

**Munteanu I.G., Apetrei C., 2021-** Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1-30.

**Muthu C., Ayyanar M., Raja N., Ignacimuthu S., 2006-**Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43:1-10.

**Mwakalukwa R., Ashour A., Ame, Y., Niw, Y., Tamrakar S., Miyamoto T., Shimizu K., 2019-**Anti-allergic activity of polyphenolic compounds isolated from olive mill wastes. *Journal of Functional Foods*, 58: 207-217.

**Nagumo M., Ninomiya M., Oshima N., Itoh T., Tanaka K., Nishina A., Koketsu M., 2019-**Comparative analysis of stilbene and benzofuran neolignan derivatives as acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29(17) : 2475-2479.

**Nicolas J.P., 2016-** *Plantes médicinales du Nord de Madagascar Ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques.* Ed. Jardins du Monde, France, 298 p.

**Nsemi F. M.**, 2010-Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse De Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. 296p.

**Önder, A.**, 2020-Anticancer activity of natural coumarins for biological targets. *Studies in Natural Products Chemistry*, 64: 85-109.

**Ouedrhiri W., Bouhdid S., Balouiri M., Lalami A. E. O., Moja S., Chahdi F. O., & Greche H.**, 2015-Chemical composition of *Citrus aurantium* L. leaves and zest essential oils, their antioxidant, antibacterial single and combined effects. *J. Chem. Pharm. Res*, 7(1), 78-84.

**Ouguelmane A., Houichiti R.**, 2020- Etude des activités biologiques d'une plante aromatique médicinale locale "*Citrus aurantium*". Mémoire de Master. Université de Ghardaïa. 92p.

**Ouldyeou K.**, 2018-Eude phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes antidiabétique au niveau de la wilaya de mascara. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 5(1) : 670-679.

**Ousmer L., Tahri S.**, 2017- Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou.141p.

**Popovici C., Saykova I., Tylkowski B.**, 2009- Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue De Génie Industriel*, 4, 25-39.

**Quy-Diem D., Artik E., Phuong L, Lien H.**, 2014- Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity of *Limnophila* aromatic. *J. Food and Drug Analysis*, Vol. 22, Issue 3: 296-302.

**Rabearison N.I.**, 2015- Etude comparative de trois *Citrus* : *C. medica* Linnée; *C. aurantium* Linnée ; *C. sinensis* L. Osbeck (*Rutaceae*). Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies. Université d'Antananarivo. 114p.

**Romulo A.**, 2020- The Principle of Some *In vitro* Antioxidant Activity Methods: Review. *Earth and Environmental Science* ; 426, 012177.

**Saadoune Z., Meguenni F.**, 2016- Impact de la composition des huiles essentielles de *Citrus sinensis* (Orange) et *Citrus limonum* (Citron) sur l'activité microbiologique. Mémoire de Master. Université De Blida 1.84p.

- Safdar M.N., Kausar T., Jabbar S., Mumtaz A., Ahad K., Saddozai A.A.,** 2017-Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 25, Issue 3: 488-500.
- Samarakoon, K., Senevirathne, M., Lee, W. W., Kim, Y. T., Kim, J. I., Oh, M. C., & Jeon, Y. J.,** 2012-Antibacterial effect of citrus press-cakes dried by high speed and far-infrared radiation drying methods. *Nutrition research and practice*, 6(3), 187-194.
- Sanago R.,** 2006. *Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle*. Université Bamako (Mali) : 53.
- Scalvenzi L., Radice M., Toma L., Severini F., Boccolini D., Bella A., Guerrini A., Tacchini M., Sacchetti G., Chiurato M., Romi R et Di Luca M.,** 2019- Larvicidal activity of *Ocimum campechianum*, *Ocotea quixos* and *Piper aduncum* essential oils against *Aedes aegypti*. *Parasite* 26, 23:1-8.
- Selmi S., Rtibi K., Grami D., Hajri A., Hosni K., Marzouki L., & Sebai H.,** 2016.- Antioxidant properties of *Artemisia herba-alba* and *Eucalyptus camaldulensis* essentials oils on malathion-induced reproductive damage in rat. *RSC advances*, 6(112), 110661-110673.
- Serdoz L. V., Rittger, H., Furlanello, F., & Bastian, D.,** 2019-Quinidine-a legacy within the modern era of antiarrhythmic therapy. *Pharmacological Research*, 144: 257-263.
- Sfeir J., Lefrançois C., Baudoux D., Derbré S., & Licznar P.,** 2013-In vitro antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, Vol. 2013: 1- 9.
- Shah P. J., et Williamson M. T.,** 2019-Evaluation of synergism between Cefotaxime and *Allium sativum* against Extended-spectrum beta-lactamase and Ambler class C co-producers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(03): 98-104.
- Shahidi F et Zhong Y.,** 2015- Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18: 757–781.
- Sofiane I.,** 2018-Propriétés phytochimiques et pharmacologiques de deux Plantes Médicinales du Nord-est d'Algérie : *Calendula suffruticosa subsp suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata*. Thèse De Doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba.218p.
- Suryawanshi J.A.,** 2011- An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. *African Journal of Plant Science*, Vol. 5(7) : 390-395.

**Tigrine N.**, 2016-Activité antioxydante des extraits d'écorce et de pulpe de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira .Bejaïa.77p.

**Touahir Zi et Kadri R.**, 2020- Activité insecticide des huiles essentielles de *Heliotropium bacciferum* contre *Ectomyelois ceratoniae*. *Zeller (Lepidoptera : Pyralidae)*. Mémoire De Master. Université Mohamed Khider de Biskra. 47p.

**Toure D.**, 2015-Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse De Doctorat, Université Felix Houphoët Boigny, Côte d'Ivoire.153p.

**Ulomskiy E. N., Ivanova A. V., Gorbunov E. B., Esaulkova I. L., Slita A. V., Sinegubova E. O., & Gerasimova E. L.**, 2020-Synthesis and biological evaluation of 6- nitro-1, 2, 4-triazoloazines containing polyphenol fragments possessing antioxidant and antiviral activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 127216.

**Van Bambeke F., Tulkens P.**, 2008- Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse, Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire. Université Catholique De Louvain, 212p.

**Vil V. A., Terentev A.O., Savidov N., Glorizova T.A., Poroikov V.V., Pounina T.A., Dembitsky V.M.**, 2019-Hydroperoxy steroids and triterpenoids derived from plant and fungi: Origin, structures and biological activities. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 190:76-87.

**Virbal-Alonso C.**, 2011-*Citron et autres agrumes, un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé, votre beauté* .Groupe ayrolles. 142p.

**Wang L, Liu L, Shi Y, Cao H, Chaturvedi R.**, 2012-Berberine Induces Caspase-Independent Cell Death in Colon Tumor Cells through Activation of Apoptosis-Inducing Factor. *PLoS ONE* 7(5), e36418.

**Wu W., Li R., Li X., He J., Jiang, S., Liu, S., & Yang, J.**, 2016-Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses*, 8(1), 6.

**Yener I.**, 2020-Determination of antioxidant, cytotoxic, anticholinesterase, antiurease, antityrosinase, and antielastase activities and aroma, essential oil, fatty acid, phenolic, and terpenoid-phytosterol contents of *Salvia pocolata*. *Industrial Crops and Products*, 155, 112712.

**Yin A., Ye J., Jia W.**, 2012- Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(4): 327-334.

## Résumé

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'effet antibactérien et antioxydant des composés phénoliques et huiles essentielles de quatre plantes de genre *citrus* (*Citrus limon* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L.). Les écorces et les feuilles de quatre plantes sont soumises à une infusion pour l'obtention des extraits aqueux et à une hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevernger pour l'obtention des huiles essentielles. L'activité antibactérienne a été évaluée par la technique de diffusion sur la gélose sur quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris*). Les résultats obtenus montrent que les quatre souches ont manifesté une résistance (non sensible) contre les HES et les extraits aqueux testés. Par conséquent, nous pouvons déduire l'absence d'activité antibactérienne de nos échantillons. D'autre part, L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits aqueux a été évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH. Cette étude a permis de révéler le fort pouvoir antioxydant des extraits aqueux des écorces avec des  $IC_{50}$  entre  $0,36 \pm 0,02$  mg/ml et  $0,61 \pm 0,02$  mg/ml de même des feuilles avec des  $IC_{50}$  entre  $1,33 \pm 0,6$  mg/ml et  $4,46 \pm 0,3$  mg/ml. Alors que les huiles essentielles exposaient un résultat très modeste avec des concentrations inhibitrices entre  $5,002 \pm 0,1$  mg/ml et  $52,36 \pm 0,9$  mg/ml comparé à celui des extraits aqueux et de l'antioxydant de référence (Vitamine C) avec  $0,005 \pm 0,001$  mg/ml.

**Mots clé :** *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium*, extraits aqueux, huiles essentielles, activité antibactérienne, activité antioxydante.

## Abstract

The objective of our work is to evaluate the antibacterial and antioxidant effect of phenolic compounds and essential oils of four plants of *citrus* genus (*Citrus limon* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L.). The bark and leaves of four plants were subjected to infusion to obtain aqueous extracts and to hydrodistillation using a Clevernger type apparatus to obtain essential oils. The antibacterial activity was evaluated by the agar diffusion technique on four bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris*). The obtained results show that all strains showed resistance (not sensitive) against the essential oils and the aqueous extracts. Therefore, we can infer the absence of antimicrobial activity from our samples. On the other hand, the antioxidant activity of essential oils and aqueous extracts was evaluated by the DPPH free radical scavenging test. This study revealed the strong antioxidant power of the aqueous extracts of bark with  $IC_{50}$  between  $0.36 \pm 0.02$  mg/ml and  $0.61 \pm 0.02$  mg/ml, even of leaves with  $IC_{50}$  between  $1.33 \pm 0.6$  mg/ml and  $4.46 \pm 0.3$  mg/ml. While the essential oils exhibited a very modest result with inhibitory concentrations between  $5.002 \pm 0.1$  mg/ml and  $52.36 \pm 0.9$  mg/ml compared to that of the aqueous extracts and the reference antioxidant (Vitamin C) with  $0.005 \pm 0.001$  mg/ml.

**Key words:** *Citrus limon* L, *Citrus sinensis* L, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantium* L, aqueous extracts, essential oils, antibacterial activity, antioxidant activity.

## المخلص

يهدف هذا العمل الى تقييم التأثير المضاد للبكتيريا والمضاد للأكسدة للمركبات الفينولية والزيوت العطرية لأربعة نباتات من الحمضيات (*Citrus limon* L، *Citrus sinensis* L، *Citrus reticulata* Blanco، *Citrus aurantium* L). تخضع قشور وأوراق النباتات الأربعة للنقع المغلي للحصول على المستخلصات المائية والتقطير المائي باستخدام جهاز من نوع Clevernger للحصول على الزيوت العطرية. تم تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا بتقنية انتشار الأجار على أربع سلالات بكتيرية (*Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Proteus vulgaris*) عن طريق المقارنة مع المضاد الحيوي القياسي (Gentamicine). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالات الأربعة أظهرت مقاومة (غير حساسة) ضد الزيوت العطرية والمستخلصات المائية المختبرة. لذلك، يمكننا أن نستنتج عدم وجود نشاط مضاد للميكروبات من عيناتنا. من ناحية أخرى، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت العطرية والمستخلصات المائية من خلال اختبار مسح الجذور الحرة DPPH. كشفت هذه الدراسة عن قوة مضادات الأكسدة للمستخلصات المائية من القشور مع  $IC_{50}$  بين  $0,36 \pm 0,02$  مل/مغ و  $0,61 \pm 0,02$  مل/مغ، حتى للأوراق المحتوية على  $IC_{50}$  بين  $1,33 \pm 0,6$  مل/مغ و  $4,46 \pm 0,3$  مل/مغ. بينما أظهرت الزيوت العطرية نتيجة معتبرة للغاية بتركيزات مثبتة تراوحت بين  $5,002 \pm 0,1$  مل/مغ و  $52,36$  مل/مغ مقارنة بمسخلصات المستخلصات المائية ومضادات الأكسدة المرجعية (فيتامين ج) بمقدار  $0,005 \pm 0,001$  مل/مغ.

**الكلمات المفتاحية:** *Citrus limon* L، *Citrus sinensis* L، *Citrus reticulata* Blanco، *Citrus aurantium* L، المستخلصات المائية، الزيوت العطرية، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للأكسدة.