



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté Science de la nature et de la vie et science de la terre
Département Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière :

Sciences Biologiques

Spécialité :

Biochimie Appliquée

Par :

- Abdelkader ben dehiba
- Abdelhak boumaaza

Etude des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de pepins et de l'huile essentielle du Bigaradier (*Citrus aurantium*)

Devant le jury :

M. BELGUIDOUM Mahdi	Maitre Conférence B	Univ. Ghardaïa	Président du jury
M. KADRI Mouhamed	Maitre Conférence B	Univ. Ghardaïa	Examineur
M. KHANE M'hammed Amine	Maitre Conférence B	Univ. Ghardaïa	Encadrant
M ^{lle} KHALOUFI Maroua	Doctorante	Univ. Ghardaïa	Co-Encadrante

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et le miséricordieux, qui nous a aidé et nous a donné la force, le courage et la patience pour accomplir ce modeste travail. On tient à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre Directeur de mémoire, Mr KHENE Mohamed Amine pour son assistance et ses conseils, ses encouragements et son suivi régulier pour assurer le succès de ce travail.

Nos sincères remerciements vont également à Melle KHELOUFI Maroua, Co-Directeur de ce mémoire, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils avisés et précieux. Nous exprimons nos vifs remerciements à Mr BELGUIDOUM Mahdi, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nos remerciements vont aussi à Mr KADRI Mohamed, qui a accepté d'examiner ce travail et de consacrer de son temps pour l'évaluer. On adresse nos sincères remerciements à l'ingénieur du laboratoire de Biochimie du département de la Science de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre de l'université de Ghardaïa M. BENSALAH Bachir.

Nous tenons à remercier l'ensemble des enseignants du département de Biologie qui ont participé à notre formation. Nous remercions enfin toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail À mes très chers parents ; ma mère Fatma et mon père Hamel. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien. J'espère que par ce modeste travail je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille, et qu'il sera le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieu le très haut vous accorde santé, bonne heure et longue vie.

A toute mes collègues de la promotion biochimie appliquée. A toutes les personnes qui ont contribué à mon éducation mon enseignement et ma formation.

ABDELKADER

Dédicace

Ce modeste travail est dédié à la mémoire de mes grands-parents dont les parents n'ont pas le meilleur moyen de leur exprimer ma gratitude pour leur égard. Je le dédie également à mes très chers parents pour leur soutien et encouragement.

ABDELEHAK

ملخص:

يخصص هذا العمل لإستخلاص الزيوت العطرية، من ناحية لتحديد المحصول في HE لعدة عينات من الحمضيات أورانتيوم القادمة من محطات منطقة غرداية (المنصورة) من ناحية أخرى لتقييم الأنشطة البيولوجية، في أنشطة خاصة مضادة للفطريات ومضادات الأكسدة.

تم إستخلاص الزيوت العطرية عن طريق التقطير المائي باستخدام جهاز من نوع كليفنجر. إن قشر ثمار هذا النوع من النباتات غني بالزيوت العطرية. العوائد متغيرة للغاية، وتتراوح من 1.77 إلى 2.48%. إلا أن متوسط المحصول في محطة غرداية (2.14%)

أظهرت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا أن الزيوت العطرية من أنواع الحمضيات أورانتيوم

يُظهر نشاطًا مثبتًا أفضل ضد البكتيريا إيجابية الجرام (+) (المكورات العنقودية الذهبية، العسوية الرقيقة) من البكتيريا سالبة الجرام (-) (الإشريكية القولونية).

الكلمات المفتاحية البرتقال المرء *Citrus aurantium* ، الزيت الأساسي، التقطير المائي، نشاط

مضادات الأكسدة، IC 50,DPPH

Résumé:

Le présent travail est consacré à l'extraction des huiles essentielles de *Citrus aurantium* provenant de la région de Ghardaïa (Mansoura), afin d'évaluer leurs rendements et leurs activités biologiques, notamment antifongique et antioxydante

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger. L'épicarpe des fruits de cette espèce végétale est riche en huile essentielle. Les rendements sont très variables, allant de 1.77 à 2.48%. Cependant, la moyenne des rendements dans la station de Ghardaia(%2.14) .

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que les huiles essentielles de espèces de *Citrus aurantium*.

Présentent une meilleure activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif (+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) que les bactéries à Gram négatif (-) (*Escherichia coli*).

Mots clés : Orange amère, *Citrus aurantium*, huile essentielle, hydrodistillation, activité antioxydante, DPPH, CI50,

Abstract:

The present work is devoted to the extraction of essential oils, on the one hand to determine the EO yields of several samples of *Citrus aurantium* coming from stations in the region of Ghardaia (Mansoura) and to evaluate the biological activities, in particular antifungal and antioxidant activities.

The extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation with a Clevenger type apparatus. The epicarp of the fruits of this plant species is rich in essential oil. Yields vary widely, ranging from 1.77 to 2.48%. However, the average yield in Ghardaia station(%2.14)

The antibacterial activity results showed that the essential oils of *Citrus aurantium* species

exhibit better inhibitory activity against Gram-positive (+) bacteria (Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis) than Gram-negative (-) bacteria (Escherichia coli).

Keywords: Bitter orange, *Citrus aurantium*, essential oil, hydrodistillation, antioxidant activity, DPPH, CI50

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 COUPE TRANSVERSALE D'UNE ORANGE	5
FIGURE 2 MORPHOLOGIE DE CITRUS AURANTIUM.....	8
FIGURE 3 VUE D'ENSEMBLE D'UN ARBRE DE BIGARADIER.....	9
FIGURE 4 FRUIT DU BIGARADIER	9
FIGURE 5 L'ARBRE DE L'ORANGE AMER DE MANSOURAH ET BOUNOURA.. MATERIEL BIOLOGIQUE ...	19
FIGURE 6 SITUATION GEOGRAPHIQUE	
FIGURE 7 L'ORANGE AMER.....	20
Figure 7 L'orange amer Des lieux de prélèvement de C.....	20
FIGURE 8 ZESTES DE L'ORANGE AMERE	
FIGURE 9 MONTAGE D'HYDRODISTILLATION	21
Figure 9 Montage d'hydrodistillation type Clevenger.....	21
FIGURE 10 APPAREILLAGE UTILISE.....	21
FIGURE 11 SCHEMA DU PROTOCOLE DE LA PREPARATION DES EXTRAITS PHENOLIQUES.	24
FIGURE 12 : L'ELIMINATION DE L'ETHANOL DES EXTRAITS ORGANIQUES PAR LE ROTAVAPEUR.....	25
FIGURE 13 SCHEMA DU PROTOCOLE DU DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX.	26
FIGURE 14 SCHEMA DU PROTOCOLE DU DOSAGE DES FLAVONOÏDES TOTAUX	28
FIGURE 15 STRUCTURE DE DPPH ET SA REDUCTION PAR L'ANTIOXYDANT RH	29
FIGURE 16 PIEGEAGE DU RADICAL ABTS.	30
FIGURE 17 COURBE D'ETALONNAGE A LA QUERCITRINE.....	35
FIGURE 18 COURBE D'ETALONNAGE A L'ACIDE GALLIQUE.....	37
FIGURE 19 Activités Antioxydants (DPPH) de BHT.....	38
FIGURE 20 Activités Antioxydants (DPPH) de Pépins.....	38
FIGURE 21 ACTIVITES ANTIOXYDANTS (DPPH) DE L'HUILE ESSENTIELLE.....	39
Figure 22 Histogramme comparatif des IC50 de l'effets cavenger.....	40
FIGURE 23 COURBE D'ETALONNAGE DE TROLEX.....	40
FIGURE 24 COURBE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE	41
FIGURE 25 COURBE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE	41

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 LES PRINCIPAUX CITRUS CULTIVES EN MEDITERRANEE.....	7
TABLEAU 2 DESCRIPTION DE CITRUS AURANTIUM.....	10
TABLEAU 3 SYSTEMATIQUE DE L'ESPECE CITRUS AURANTIUM.....	10
TABLEAU 4 PRODUIT UTILISER D'ETUDE.....	22
TABLEAU 5 APPAREILLAGE UTILISE.....	23
TABLEAU 6 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIEN EXTRAIT (PEPINS).....	42

LISTE DES ABREVIATIONS:

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

B. subtilis : Bacillus subtilis

C. aurantium : Citrus aurantium

DPPH: 2,2-Di-Phényl-1 -Picryl-Hydrazyl

E. coli : Escherichia coli

HE : Huile essentielle

IC50 : Concentration d'inhibition à 50%

S. aureus: Staphylococcus aureus

ZI: Zone d'inhibition

ANSM : l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AFNOR : Association Française de Normalisation

TABLE DES MATIERES

1	Chapitre I : Généralités sur les agrumes	3
1.1	Généralités sur les agrumes	3
1.2	Systematique des agrumes	3
1.3	Origine et première cultures	3
1.4	Morphologie	4
1	Description de la famille des Rutacées.....	7
2	Description du genre Citrus.....	7
3	Citrus Aurantium	8
3.1	Introduction	8
3.2	Description botanique de Citrus aurantium	9
3.2.1	<i>Le fruit</i>	9
3.2.2	<i>Systematique de l'espèce Citrus aurantium</i>	10
3.3	Les différents usages de Citrus aurantium.....	13
3.3.1	<i>Les usages traditionnelles</i>	13
3.3.2	<i>Les usages pharmaceutiques</i>	13
3.3.3	<i>L'alopathie</i>	14
3.3.4	<i>Les usages cosmétiques</i>	14
4	Généralités sur les huiles essentielles	14
4.1	Définition.....	14
4.2	Propriétés des huiles essentielles	15
4.3	localisation des huiles essentielles.....	15
5	fonction des huiles essentielles dans la plante	16
1	Matériel et méthodes	19
1.1	Matière végétale :	19
2	Situation géographique et période de récolte des plantes	19
3	Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type Clevenger :	20
3.1	Matériels et les produits :	20
3.2	Protocole d'expérience :	20
4	Matériel du laboratoire	21
4.1	Appareillage.....	22
5	Extraction des polyphénols	23
5.1	Pré-traitement	23
5.2	Préparation des extraits aqueux et organiques par macération.....	24

5.3	Rendement d'extraction.....	25
6	Dosages biochimiques.....	25
6.1	Dosage des polyphénols Totaux.....	25
6.1.1	<i>Principe</i>	26
6.1.2	<i>Mode opératoire</i>	26
6.2	Dosage des flavonoïdes.....	27
6.2.1	<i>Principe</i>	27
6.2.2	<i>Mode opératoire</i>	27
7	Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>.....	28
7.1	Test de piégeage du radical (DPPH).....	28
7.1.1	<i>Principe</i>	29
8	Test de réduction du radical-cation ABTS+•.....	30
9	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	31
9.1	Principe.....	31
9.2	Mode opératoire.....	31
9.3	Revivification des souches.....	31
9.4	Repiquage des espèces bactériennes.....	31
9.5	Préparation des dilutions d'extraits.....	31
9.6	Préparation de l'inoculum et standardisation.....	32
9.7	L'aromatogramme.....	32
9.8	Ensemencement.....	32
9.9	Dépôt des disques.....	33
9.10	Lecture des résultats.....	33
1	Calcul des rendements en huile essentielle (écorce) :.....	35
2	Calculer des rendements d'extraie (pépins) :.....	35
3	Teneur en polyphénols totaux des extraits:.....	35
4	Dosage des flavonoïdes totaux :.....	36
5	Evaluation des activités biologiques.....	37
5.1	Test activité anti radicalaire (DDPH).....	37
5.2	Test de reduction de radical -cation ABTS+.....	39
5.3	Capacité antioxydante totale.....	41
6	Etude de l'activité antimicrobien.....	42
6.1	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne :.....	43
	Conclusion :.....	51

Introduction

Les plantes du genre *Citrus*, notamment *Citrus aurantium* (oranger amer), sont largement exploitées en médecine traditionnelle et en industrie alimentaire en raison de leurs multiples composés bioactifs. Les pépins et l'huile essentielle de cette plante renferment des molécules prometteuses aux propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, suscitant un intérêt croissant pour leurs applications potentielles en pharmacologie et en agroalimentaire.

Les antioxydants jouent un rôle crucial dans la neutralisation des radicaux libres, réduisant ainsi le stress oxydatif lié à diverses pathologies (maladies cardiovasculaires, vieillissement cellulaire, etc.). Parallèlement, la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques classiques incite à la recherche de nouveaux agents antibactériens d'origine naturelle.

Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer les activités antioxydante et antibactérienne des extraits de pépins et de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, afin d'explorer leur potentiel thérapeutique et industriel. Les résultats pourraient contribuer à valoriser ces sous-produits souvent sous-exploités, ouvrant des perspectives d'application en nutraceutique, en cosmétique ou dans la conservation des aliments.

Pour mener cette étude, trois étapes principales seront suivies:

- 1 .L'extraction des polyphénols à l'aide de deux solvants (eau et éthanol);
- 2 .Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux;
3. L'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne par des tests spécifiques.

Synthèse bibliographique

1 Chapitre I : Généralités sur les agrumes

1.1 Généralités sur les agrumes

Praloran (1971) a noté que les agrumes appartiennent à la famille des Rutaceae, originaires de Chine, d'Inde et d'Indonésie, et que la période de floraison s'étend de l'automne des feuilles à juillet. Les fleurs sont blanches. Les arbres mesurent jusqu'à 500cm de haut, sont pérennes et ont des feuilles persistantes. Les méthodes de greffage comprennent le semis à chaud, le greffage en deux parties sur des citronniers ou des limettiers en août et septembre, et le greffage en bouclier en mai et août. En général, la greffe est possible à partir de branches âgées d'à peine deux ans .

La taille se fait en interne, en coupant l'extrémité des branches pour réduire la croissance.

1.2 Systématique des agrumes

Selon **Adjdir et Bensnoussi (2009)**, la classification des agrumes est comme suivie :

Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Ordre	Géniales (Rutales)
Famille	Rutaceae
Sous-famille	Aurantioideae
Tribu	Citreae
Genre	<i>Citrus</i>

Praloran en 1971 a souligné que la classification phylogénétique des agrumes et des genres apparentés est un problème complexe reconnu par les experts. Swingle, Tanaka, Hume, Hodgson et Chapot en matière

1.3 Origine et première culture

Bien qu'incertaine, l'origine des agrumes se situerait dans les contres forts de l'Himalaya en Asie du Sud-Est, entre le 15 et le 20 parallèle, au milieu de la zone intertropicale où la chaleur est constante (20-25°C) et l'humidité très élevée. Leur culture a été décrite pour la première fois dans des textes religieux indiens et chinois entre 800 et 500av. Par la suite, la Chine est devenue véritable berceau de la plupart des agrumes (Bachés et Bachés, 2002)

En Europe :

Le premier agrume connu et cultivé est le cédrat, connu des Grecs sous le nom de « pomme de Médie », c'est-à-dire le kumquat en pot. Les Grecs, puis les Romains, ont adopté la pomme, mais sa diffusion au tour de la Méditerranée est due en grande partie à la communauté juive, qui l'utilisait lors des fêtes des cabanes. Les citrons et les bigarades (oranges amères) ont probablement été introduits par les Arabes et se sont répandus en Afrique du Nord et en Espagne à partir du VIII^e siècle environ, d'où ils se sont répandus dans toute la Méditerranée. Les oranges douces ne sont apparues en Europe qu'au 8^e siècle, lorsque les Portugais les ont importées de Chine. Les mandarines, très importantes en Asie du Sud-Est, sont finalement arrivées en Occident au 19^e siècle (Bachés et Bachés, 2002).

1.4 Morphologie

Les agrumes présentent la même structure anatomique (**Figure 1**) qui comprend trois parties :

- **Épicarpe ou flavédo** : Est la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jaune orangé ou en rouge. (Tenschler *et al.*, 2005).
- **Mésocarpe ou albédo** : Est la couche intérieure blanche et spongieuse et riche en pectines (Bouroukka, 2012),
- **Endocarpe ou pulpe** :

Il s'agit de la partie comestible du produit naturel, constituée d'une section standard recouverte d'une fine pellicule, répartie autour d'un axe central de même composition que l'albédo. La pulpe est constituée de vésicules de jus recouvertes d'une pellicule encore plus fine et contenant des cellules de jus. Au fur et à mesure que le produit naturel mûrit, le jus s'accumule dans les vacuoles et occupe la majeure partie du volume des cellules mûres (Kimball, 1999).

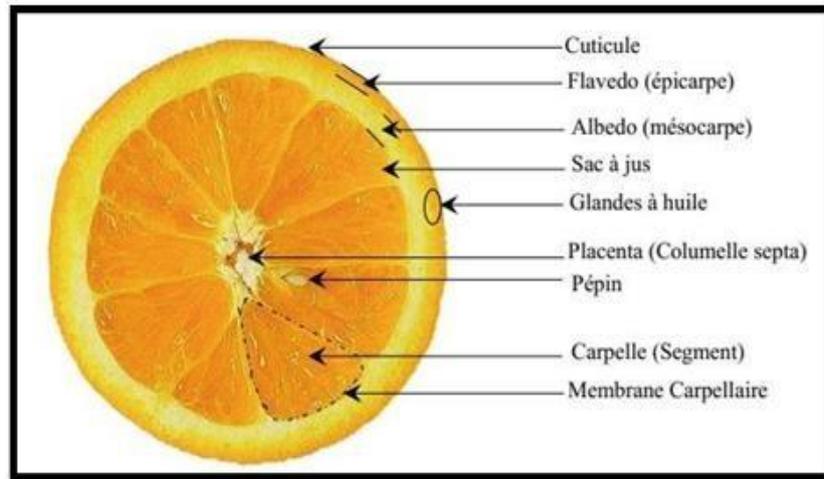


Figure 1 : Coupe transversale d'une orange (Hendrix et *al.*, 1995)

Aucun autre fruit n'est connu pour avoir cette structure. Les glandes à essence sont présentes dans toutes les parties de l'arbre : écorce, feuilles, branches, fleurs et fruits. Le parfum fait partie des agrumes. En ce qui concerne la longévité, les agrumes sont innombrables. (Bachés et Bachés, 2002).

Généralités sur l'espèce Citrus Aurantium

1 Description de la famille des Rutacées

La famille des Rutacées comprend environ 1500 espèces réparties en 150 genres. Elles sont principalement réparties dans les régions tropicales et subtropicales. La famille se caractérise par la présence de sacs sécrétoires contenant de l'huile aromatique dans différentes parties de la plante. La famille des mandarines est connue pour ses plantes ligneuses très ornementales (*choisya*, *skimmia*), mais certaines espèces ayant une importance économique particulière sont regroupées sous le terme d'agrumes. Le deuxième type appartient à trois genres : *Fortunella*, *Poncirus* et surtout *Citrus*. La plupart des plantes de la famille des agrumes portent des fruits comestibles (Bellec et Renard, 2010).

2 Description du genre *Citrus*

Le genre *Citrus* constitue, avec ses 145 espèces dénombrées, le genre le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées qui sont reportées dans le tableau 3.

Tableau 1 Les principaux *Citrus* cultivés en méditerranée (Loussert, 1989)

Espèces	Variétés d'intérêt commercial
<i>Citrus aurantium</i>	Le Bigaradier (utilisé comme porte-greffe).
<i>Citrus sinensis</i>	L'orange Navel : Washington, Thomson, Navelina, Navelate Les oranges blondes : Salustiana, Hamlin, Shamouti, Valencia Late, Cadenera. Les oranges demi-sanguines : double fin améliorée, Maltaise demi sanguine. Les oranges sanguines : Sanguinelli Nigra, Moro, Tarocco.
<i>Citrus unshiu</i>	Les mandariniers satsuma.
<i>Citrus deliciosa</i>	Les mandariniers communs.
<i>Citrus clementina</i>	Les clémentiniers : les clémentines sans pépins (nombreux clones).
<i>Citrus reticulata</i>	Les autres mandariniers : Mand. Ortanique, Mand. Murcott, Mand. Wilking.
<i>Citrus limon</i>	Les citronniers : Eureka, Lisbonne, Verna, Femminello ovale.
<i>Citrus paradisi</i>	Les pomélos : Marsh Seedless, Duncan, RuShambar.
<i>Citrus medica</i>	Les cédratiers : Cédrat de Corse, Cédrat Diamante
<i>Citrus grandis</i>	Les pamplemoussiers

3 *Citrus Aurantium*

3.1 Introduction

L'orange amère (*Citrus aurantium*) (Figure 5) n'est pas très connue car elle n'est pas souvent utilisée dans les produits alimentaires. Cependant, il est également utilisé dans d'autres domaines, tels que l'industrie pharmaceutique (**Ernould et Audrey, 2008**).



Figure 2 Morphologie de *Citrus aurantium*

Citrus aurantium (orange amère, bigarade, orange de Séville, Figure 4) est connu pour son goût très amer et acide (Bocco et al., 1998). Il se distingue des oranges douces par sa peau épaisse et rugueuse et sa pulpe amère (Leroy, 1968). En raison de son acidité et de son amertume, l'orange amère n'est pas utilisée comme fruit. Elle n'est pas comestible, mais elle est souvent utilisée pour fabriquer du jus et de la marmelade (**Ersus et Cam, 2007**).



Figure 3 Vue d'ensemble d'un arbre de bigaradier (orange amère) (Maghnia, 15/02/2022)

3.2 Description botanique de *Citrus aurantium*

Le bigaradier est un arbuste épineux atteignant une hauteur de 4 à 5 m, d'une couleur orange amère et d'une très grande valeur ornementale. Il est largement planté dans les zones côtières méditerranéennes. Les tiges sont ramifiées et les feuilles sont d'un vert vif. Les fleurs blanches sont violettes et parfumées. Les fruits sont ovoïdes (**Hadrich et al., 2009**).

3.2.1 Le fruit

L'orange amère est un fruit sphérique à la peau septe et craquelée, connu sous le nom d'agrume. Il est rouge-orange à maturité, mesure 7 à 8 cm de diamètre, a un arôme fort, amer et acide et n'est pas comestible.

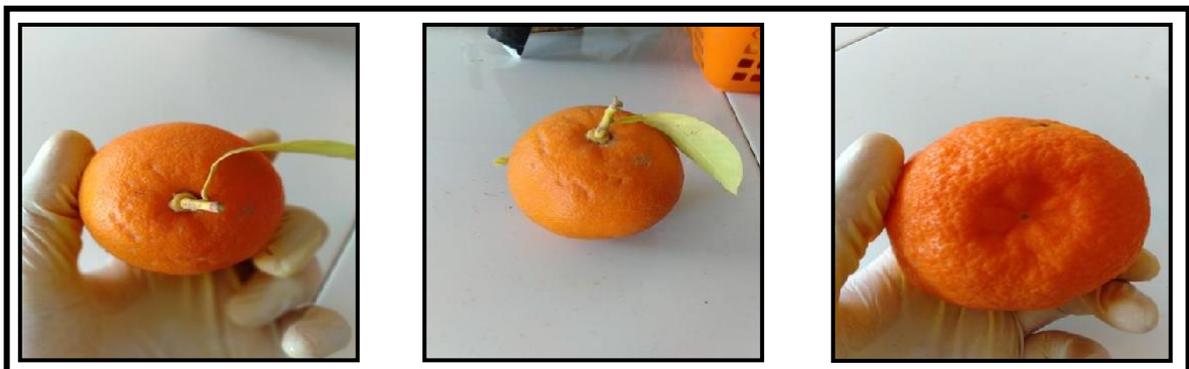


Figure 4 Fruit du bigaradier (15/02/2022)

Les sacs sécrétoires mitotiques contenant des huiles essentielles sont nombreux. Ces cellules nouvellement formées se séparent ensuite et délimitent les parties charnues qui reçoivent les substances aromatiques sécrétées par les cellules environnantes

Tableau 2 : Description de *Citrus aurantium* (Messaoudi, 2005)

Espèce	<i>Citrus aurantium</i>
Non commun	Bigaradier (orange amère)
Taille de l'arbre	5 à 10 m
Couleur de fruit	Rouge, orange
Forme de fruit	Taille moyenne à peau rugueuse, rond ou ovale
La pulpe	Acide et amère
Épines	À court épines
Feuilles	Bien vertes, pointues, fortement ailées
Fleurs	Blanches et très parfumées

3.2.2 Systématique de l'espèce *Citrus aurantium*

Tableau 3 : La position systématique du bigaradier est comme suit : (Manner et al., 2006)

Règne	Végétal
Division	Embroyophyta
Sous-division	Angiospermes
Classe	Dicotyledoneae
Ordre	Géraniales
Sous-ordre	Géraniineae
Famille	Rutaceae
Sous-famille	Aurantioideae
Tribu	Citreae
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus aurantium L.</i>

3.3 Les différents usages de Citrus aurantium

3.3.1 Les usages traditionnels

L'écorce est utilisée en décoction ou en poudre pour les maux d'estomac. Les feuilles fraîches sont utilisées en décoction et ont un effet apaisant. Le jus et l'écorce de l'orange amère sont utilisés pour acidifier et aromatiser les olives. Enfin, les fleurs sont utilisées pour aromatiser le thé à la menthe.

En phytothérapie, le fruit est utilisé pour faciliter la digestion et réduire les ballonnements. Une décoction soulage les maux de tête et fait baisser la fièvre. Le jus stimule les défenses immunitaires. En Occident, les huiles essentielles sont prescrites pour réguler le rythme cardiaque, réduire les palpitations et favoriser le sommeil. Réduit les palpitations et favorise le sommeil. Un massage relaxant à l'huile essentielle de néroli diluée peut également être utilisé. Enfin, les huiles essentielles de néroli et de petit grain sont largement utilisées dans les parfums (Cassan et al., 2008.).

3.3.2 Les usages pharmaceutiques

-Les préparations officinales

Préparations obtenues à partir des fruits de bigaradier :

- Teinture d'écorce d'orange amère Cette teinture est traditionnellement utilisée comme digestif amer, tonique (remontant, stimulant) et aussi comme stimulant de l'appétit (Schauenberg, 1977 ; Girre, 1995).
- Ses emplois : Il entre dans la composition d'ELIXIR GREZ (Laboratoire Monin Chanteaud). Cette préparation est utilisée pour le traitement symptomatique des troubles gastro-intestinaux (ballonnements, indigestions, éructations, flatulences) chez l'adulte à la dose de 30 gouttes avant les repas ou pendant la maladie. Une teinture d'écorce d'orange amère est également le principe actif d'une préparation de quinine utilisée comme aide thérapeutique dans l'asthénie fonctionnelle, diluée dans une cuillère à soupe de pur ou à boire avant les repas du midi et du soir.
- Sirops d'écorces d'orange amère:

Le sirop d'orange amère est utilisé comme analgésique, tonique et antispasmodique au goût amer, tout comme la teinture d'orange amère (Girre, 1995). Il est également utilisé comme édulcorant pour masquer le goût de certains médicaments. En outre, des études in vitro ont montré que le limonène, le principal composant de l'huile essentielle d'écorce d'agrumes, a des effets anticancéreux, antitumoraux et de promotion de la différenciation cellulaire. Le limonène

à également un effet d'amélioration du métabolisme (thermogénique) en raison de la présence de synéphrine (**Saonere Suryawanshi, 2011**).

3.3.3 L'allopathie

L'orange amère utilisé comme aromatisant : le bigaradier et ses dérivés, avec leur goût et leur odeur caractéristiques et prononcés, peuvent être utilisés comme agents aromatisants dans de nombreuses préparations pharmaceutiques, qu'elles soient à usage oral, nasal, buccal ou cutané. Parmi les principes aromatisants, les plus souvent rencontrés sont (**Cerdagne, 2004**). L'huile essentielle d'orange amère L'eau distillée de fleurs d'oranger. L'alcoolat d'orange amère. L'huile essentielle de néroli.

Parmi les principes aromatisants, les plus souvent rencontrés sont (**Cerdagne, 2004**) :

- ✓ L'huile essentielle d'orange amère ;
- ✓ L'eau distillée de fleurs d'oranger ;
- ✓ L'alcoolat d'orange amère ;
- ✓ L'huile essentielle de néroli.

3.3.4 Les usages cosmétiques

L'extrait d'orange amère a des propriétés antioxydantes potentielles lorsqu'il est consommé, mais certains glossaires indiquent que le méthanol peut provoquer une irritation de la peau lorsqu'il est utilisé par voie topique C.aurantium L'extrait d'écorce d'amara est extrait de l'écorce de l'orange amère C.aurantium. L'amara est utilisé comme matière première dans les produits cosmétiques tels que les écrans solaires, les après-shampooings, les barres de savon, les shampooings et le maquillage (**Saonere Suryawanshi, 2011**). Par conséquent, C. aurantium peut être utilisé pour prévenir la fragilité de la peau, améliorer le teint et favoriser le métabolisme. Il est également utilisé comme ingrédient dans les parfums.

4 Généralités sur les huiles essentielles

4.1 Définition

Le terme huile essentielle est défini par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) pour les applications pharmaceutiques et cosmétiques et par l'AFNOR/ISO pour

les applications aromatiques et alimentaires (**Larbi et al., 2009**) L'AFNOR (Association Française de Normalisation) définit les huiles essentielles comme suit Produits obtenus à partir de matières premières végétales par distillation à la vapeur d'eau ou par des procédés mécaniques. L'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par un procédé physique (**Tena et al., 1997**). Selon la Commission européenne de pharmacopée (2008), les huiles essentielles sont définies comme suit Un produit odorant obtenu à partir de matériel végétal botaniquement défini par distillation à la vapeur d'eau, par distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié n'impliquant pas l'application de chaleur. Les huiles essentielles sont généralement séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques qui n'entraînent pas de changements significatifs dans la composition (**Larbi et al., 2009**).

4.2 Propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés volatils, liquides à température ambiante, transparents et presque incolores. Elles sont principalement formées de composés asymétriques et sont donc rotatives et insolubles dans l'eau. Elle est généralement assez soluble dans les solvants organiques (éther, alcools, hexane, pentane, etc.) et presque insoluble dans l'eau. Il dissout les graisses, l'iode, le soufre et le phosphore et réduit certains sels. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau. Cependant, certaines huiles essentielles font exception. Il s'agit du saffran, du clou de girofle et de la cannelle. Elles sont incolores ou jaune pâle. Cependant, il existe aussi des couleurs : cannelle (orange), armoise (vert) et chrysanthème (bleu) (Bruneton, 2016 ; Seddik, 2010). Les huiles essentielles sont huileuses mais non collantes et volatiles. Chaque huile essentielle est unique et se caractérise par son arôme, sa couleur, sa viscosité et ses propriétés spécifiques. Les huiles essentielles ont un indice de réfraction élevé et réfractent la plupart des lumières polarisées. Les huiles essentielles sont différents indices chimiques (par exemple l'indice d'acide, d'ester, decarbonyle) (**Seddik, 2010**).

4.3 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées. Les huiles essentielles sont stockées dans tous les organes de la plante (**Laurent, 2017**).

- ✓ **Les feuilles:** Eucalyptus, citronnelle, laurier noble...
- ✓ **Les fleurs:** Camomille, lavande...
- ✓ **Les zestes:** Citron, orange, bergamote...

- ✓ **Le bois:** Bois de rose, santal...
- ✓ **L'écorce:** Cannelle...
- ✓ **La racine:** Vétiver...
- ✓ **Les fruits:** Anis, badiane...
- ✓ **Les rhizomes:** Curcuma, gingembre...
- ✓ **Les graines:** Muscade...

Tous les organes de certaines espèces contiennent des huiles essentielles, mais leur composition peut varier d'un endroit à l'autre (**Bruneton, 1993**). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiquement spécifiques, souvent situées à la surface ou à proximité de la plante. On retrouve par exemple :

- **Les cellules à huiles essentielles:** Chez les Lauracées et les Zingiberacées;
- **Les poils sécréteurs:** Chez les Lamiacées;
- **Les poches sécrétrices:** Chez les Myrtacées et les Rutacées;
- **Les canaux sécréteurs:** Chez les Apiacées et les Astéracées (Laurent, 2017).

Dans le cas du bigaradier, l'huile essentielle de bigarade est obtenue à partir de l'écorce fraîche du fruit. Les fleurs donnent l'essence de néroli,

Tandis que les feuilles et les rameaux donnent l'essence de petit grain bigaradier. La composition de ces trois huiles essentielles est différente (**Bruneton, 1993**).

5 Fonction des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles existent chez les plantes pour répondre au besoin de protection de l'espèce en fonction de son environnement, même si leur fonction n'est pas toujours connue avec précision .

- ✓ Les plantes ne pouvant se déplacer, elles développent des huiles essentielles pour se protéger chimiquement des micro-organismes. Les huiles essentielles tiennent les parasites à distance et

protègent les plantes de certaines maladies grâce à leurs propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes et insectifuges .

- ✓ Elles protègent également contre d'autres plantes. Par exemple, la bruyère *Erica cinerea* diffuse des substances toxiques à distance et empêche la croissance d'autres plantes à proximité (il n'y a pas d'autre végétation sur la lande de bruyère) .
- ✓ Au contraire, elle attire les insectes pollinisateurs (elle produit des fleurs odorantes qui sont fécondées par certains insectes butineurs) et augmente la fertilité des plantes .
- ✓ Aide à la cicatrisation des blessures et des diverses agressions subies par les plantes. -Prévient les coups de soleil.

Matériel et méthodes

1 Matériel et méthodes

Ce labour a été accompli au niveau des premier et second laboratoires communautaires d'analyses physiques et chimiques, du laboratoire de microbiologie pédagogique et du laboratoire d'analyses de biochimie et biotechnologie de l'Université de Ghardaïa durant la période de mars à mai 2023.

1.1 Matière végétale :

Le matériel végétal est l'orange amère, un arbre à feuilles toujours vertes atteignant dix mètres de hauteur. Ses feuilles sont d'un cuir sombre et ses fleurs blanches dégagent un parfum plaisant aromatique. Les fruits sont gros, sphériques, de couleur rouge orangé, rudes au toucher et un goût amer comme le citron.



Figure 5 : L'arbre de l'orange amère de Mansourah et Bounoura. Matériel biologique

Notre étude a été menée sur les pointes et écorces d'oranges : *Citrus Aurantium* ou Bigaradier.

2 Situation géographique et période de récolte des plantes

Les stations d'étude sont limitées par les coordonnées (longitude, altitude) suivantes :

L'altitude 31.9796, Longitude : 3.74597

31° 58' 47" Nord, 3° 44' 45" Est



Figure 6 : Situation géographique



Figure 7 : L'orange amer

Des lieux de prélèvement de C

. aurantium dans la région de Mansourah Ghardaia

3 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type Clevenger :

3.1 Matériels et les produits :

- ✓ Cette opération est effectuée par le montage d'hydrodistillation type Clevenger;
- ✓ Les fruits d'orange amer ;
- ✓ L'eau distillée ;
- ✓ Hexane pour séparer l'huile de l'eau.

3.2 Protocole d'expérience :

Pour extraire l'huile essentielle d'écorce d'orange amère fraîche, la technique d'hydrodistillation type Clevenger a été utilisée au niveau de laboratoire de biochimie ghardaia.

Dans ce processus, nous avons utilisé 300g d'écorce d'orange amère fraîche, puis nous l'avons divisée en deux quantités. L'opération consiste à introduire masse végétale (100g) dans un ballon en verre (21), nous avons rempli le ballon d'eau distillée (2/3 du volume du ballon).

On a placé le ballon dans le chauffe-ballon pour chauffer le mélange jusqu'à ébullition. Nous réglons le chauffage pour permettre la stabilité de l'extraction. Les vapeurs chargées de d'huile essentielle passent dans un long tube vertical (colonne de distillation), ensuite les vapeurs se condensent dans la colonne de refroidissement, le distillat qui a ralenti descend lentement sous forme de gouttelettes est récupéré dans une ampoule reliée au condenseur. L'eau retourne dans le ballon par un tube reliant le ballon et l'ampoule, Deux couches se forment dans l'ampoule. Une phase organique (huile essentielle et une phase aqueuse (eau aromatique), puis on vide d'abord l'eau aromatique pour que la couche organique reste dans l'ampoule, puis on vide l'huile dans l'hexane. Le produit est chauffé par plaque chauffante pour éliminer les traces d'eau et l'hexane. Bécher ajouter.

On récupère l'huile essentielle dans des flacons en verre bien fermés, et conservée dans un endroit opaque à température de 4 à 5°C, pour éviter la dégradation d'huile essentielle. Le processus d'extraction prend trois heures à partir du début de l'ébullition. En fait, le même procédé d'extraction est utilisé pour 100 g d'écorce d'orange amère



Figure 8 : Zestes de l'orange amère



Figure 9 : Montage d'hydrodistillation type Clevenger

4 Matériel du laboratoire

La réalisation de la présente étude a nécessité l'emploi des produits résumés dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4: Produits utilisés l'étude

	Source	Utilisation
Solvants		
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma Aldrich (Allemagne)	Diffusion des extraits dans le milieu Mueller-Hinton
Eau distillée	/	Extraction des polyphénols
Ethanol	Sigma Aldrich (Allemagne)	Extraction des polyphénols
Méthanol	Sigma Aldrich (Allemagne)	Solubilisation et conservation des extraits
Réactifs		
Folin- Ciocalteu	Sigma Life Science (Allemagne)	Dosage des polyphénols totaux
Carbonate de sodium	BiochemChemopharma (Québec)	Dosage des polyphénols totaux
Acide gallique	BiochemChemopharma (Québec)	Polyphénol standard
Nitrite de sodium	BiochemChemopharma (Québec)	Dosage des flavonoïdes totaux
Chlorure d'aluminium	BiochemChemopharma (Québec)	Dosage des flavonoïdes totaux
Hydroxyde de sodium	Riedel-de Haën (Allemagne)	Dosage des flavonoïdes totaux
Quercétine	Sigma Aldrich (Allemagne)	Flavonoïde standard
Tampon phosphate	/	Activité antioxydante
Ferricyanure de potassium	Prolabo (France)	Activité antioxydante
Acide trichloracétique	/	Activité antioxydante
Chlorure ferrique	Sigma Aldrich (Allemagne)	Activité antioxydante
1-1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma Aldrich (Allemagne)	Activité antioxydante
Acide ascorbique	BiochemChemopharma (France)	Antioxydant standard

4.1 Appareillage

La liste d'appareillage utilisé dans ce travail est détaillée dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Appareillage utilisé

Appareil	Source
Agitateur à barreau magnétique non chauffant	GERHARDT (Allemagne)
Agitateur à barreau magnétique chauffant	RAYPA (Allemagne)
Autoclave	WEBECO (Allemagne)
Bain Marie	MEMMERT (Allemagne)
Balance de précision	SARTORIUS BP121S (Allemagne)
Broyeur électrique	KRUPS 75 (Allemagne)
Centrifugeuse	HETTICH UNIVERSAL / K2S (Allemagne)
Etuve	MEMMERT à 37°C (Allemagne) BINDER à 28°C (Allemagne)
Four Pasteur	BINDER (Allemagne)
Hôte chimique	KÖTTERMANN (Allemagne)
Microscope optique	MOTIC (Allemagne)
pH mètre	HANNA Hi210 (Allemagne)
Réfrigérateur	ENIEM (Algérie)
Rotavapeur	STUART (UK)
Spectrophotomètre Visible	Vis-7220G Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK)
Spectrophotomètre UV-Visible	UV- Vis Medline (UK)
Vortex	HEIDOLPH (Allemagne)

5 Extraction des polyphénols

5.1 Pré-traitement

Les graines et l'écorce de chaque fruit sont lavés à l'eau du robinet, afin d'ôter les impuretés, égouttés ensuite séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière durant dix jours pour préserver au mieux l'intégrité des molécules.

Après séchage, ils sont broyés séparément en une poudre fine prête à l'emploi dans un moulin électrique. La poudre obtenue est gardée dans des flacons teintés en verre à 4°C, afin de faire l'objet d'une extraction des polyphenols totaux (PPT).

5.2 Préparation des extraits aqueux et organiques par macération

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction des composés d'intérêt et ainsi éviter leur modification chimique, dont l'eau et l'éthanol sont communément les solvants les plus utilisés (TURKMEN al., 2007).

Les polyphénols, d'après BOIZOT et CHARPENTIER (2006), sont extraits par macération.

à 4°C pour empêcher l'action de polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés Phénoliques.

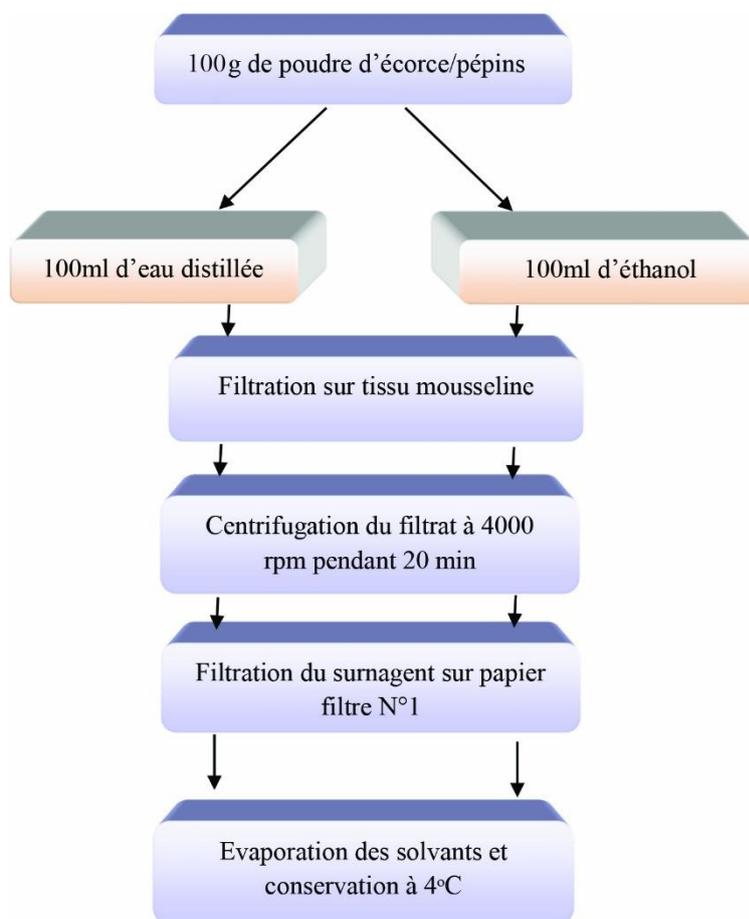


Figure 11 : Schéma du protocole de la préparation des extraits phénoliques. (MAHMOUDI et al., 2013)



Figure 12 : L'élimination de l'éthanol des extraits organiques par le rotavapeur

5.3 Rendement d'extraction

Le rendement représente la masse de l'extrait mesurée après évaporation du solvant, il est calculé selon la formule décrite par (MAHMOUDI al., 2013). Il est exprimé en pourcentage relativement à la masse initiale de la plante ayant subi l'extraction.

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

R : le rendement en %

M_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg et $M_{\text{éch}}$: la masse de la matière sèche végétale en mg.

6 Dosages biochimiques

6.1 Dosage des polyphénols Totaux

Le dosage des polyphénols pour les quatre échantillons est réalisé selon la méthode décrite par (TALBI et al., 2015).

6.1.1 Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₂PWD) et d'acide phosphomolybdique (HPMoun). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (SINGLETON et ROSSI, 1965 ; SINGLETON et al. 1999 ; BOIZOT CHARPENTIER, 2006).

La coloration produite, dont l'absorption est évaluée à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal (STANKOVIĆ, 2011 ; BONNAILLIE et al., 2012).

6.1.2 Mode opératoire

D'après (TALBI et al, 2015), l'imi de réactif de Folin (11 fois dilué) est versé à 200 µl d'échantillon ou d'étalon (préparés dans le méthanol) avec des dilutions appropriées. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont ajoutés au milieu réactionnel. L'absorbance est mesurée à 760nm après 2 h d'incubation à température ambiante. le protocole est illustré dans la figure 21 suivante

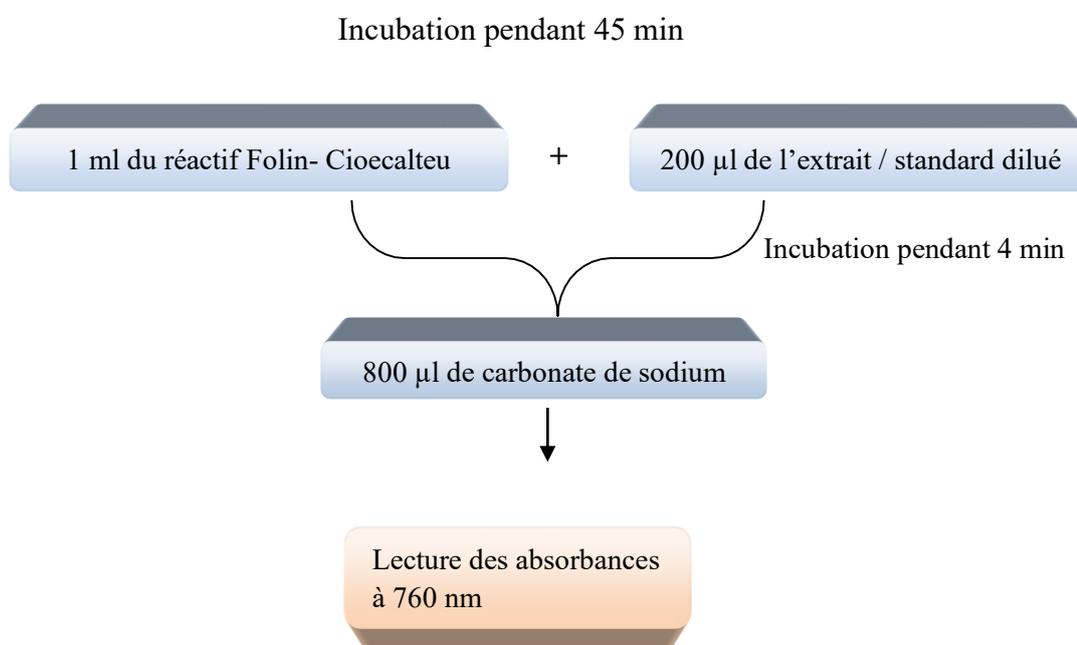


Figure 13 : Schéma du protocole du dosage des polyphénols totaux.

Le calcul de la concentration des polyphénols totaux se fait avec l'équation de régression de la gamme d'étalonnage formée avec l'acide gallique. Elle est donnée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) suivant l'équation suivante.

$$T = C \cdot V / M$$

T : Teneur en composés phénoliques (mg EAG / g d'extrait sec de la plante) ;

C : Concentration de l'extrait équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

V : Volume de l'extrait organique ou aqueux (ml) ; M : Poids de la matière végétale sèche (g).

6.2 Dosage des flavonoïdes

L'évaluation de la quantité de flavonoïdes totaux (FT) présents dans les extraits est effectuée par la technique expliquée par (KIM et al., 2003) avec certaines adaptations.

6.2.1 Principe

Les flavonoïdes détiennent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, lequel est susceptible de donner par son groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (RIBEREAU GAYON et al., 1972 ; BOULEKBACHE, 2005).

Selon RIBEREAU (1968), les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons afin de s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons.

6.2.2 Mode opératoire

Un millilitre de l'extrait adéquatement dilué ou de la solution du composé témoin (la quercétine) de concentration de 20, 40, 60, 80 et 100 mg/l, est versé dans une fiole jaugée de 10 ml comprenant au préalable 4 ml d'eau distillée.

- A l'instant ($t = 0$ mn) : 0,3 ml de NaNO_2 à 5 % (P/V) sont introduits ;
- A ($t = 5$ mn) : 0,3 ml de AlCl_3 à 10% sont ajoutés ;
- Six minutes après, 2 ml de NaOH 1M sont ajoutés au mélange et immédiatement 2,4 ml d'eau bidistillée sont additionnés sous une agitation vigoureuse.

L'absorbance est mesurée à 510 nm contre un témoin à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

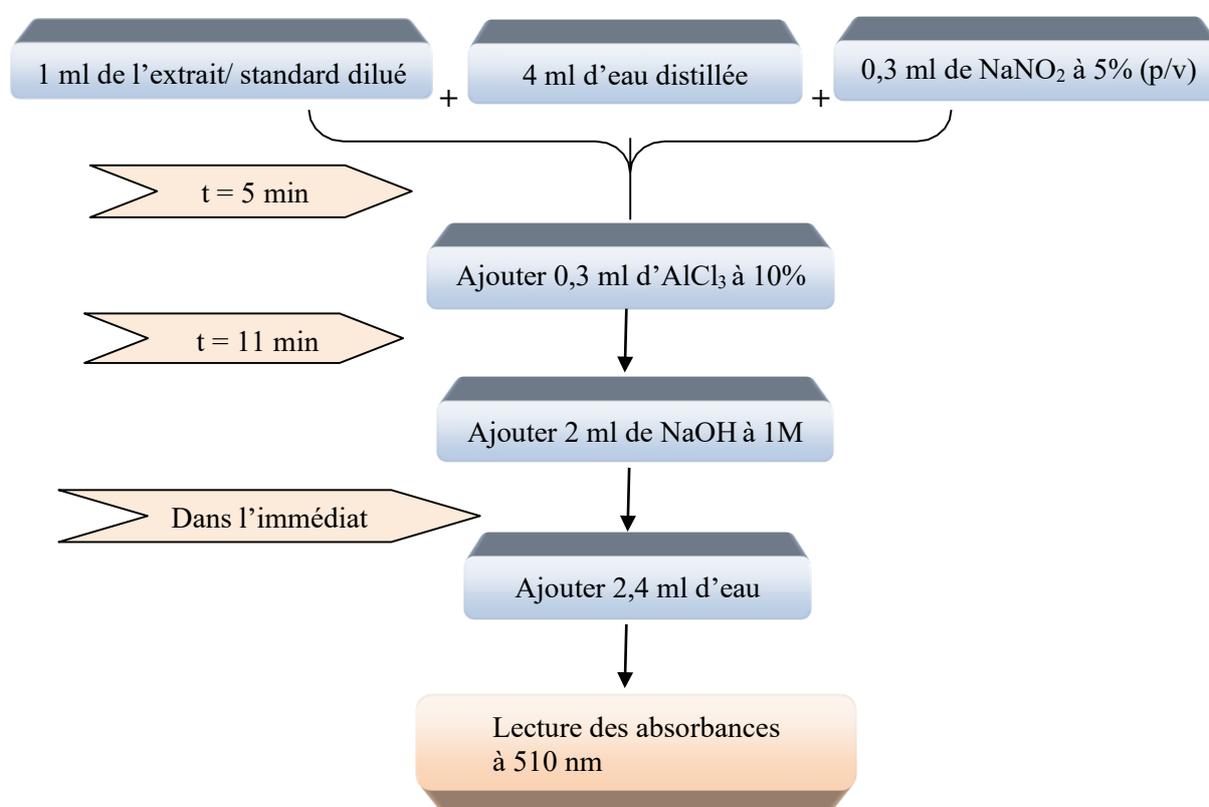


Figure 14 : Schéma du protocole du dosage des flavonoïdes totaux

7 Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

7.1 Test de piégeage du radical (DPPH)

L'activité anti radicalaire des extraits par la méthode au DPPH a été déterminée en se référant à celle de l'acide ascorbique qui est un antioxydant standard (VIRGINIE et al.

2015).

Du point de vue méthodologique, le test du radical libre DPPH est préconisé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH (SALAH *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est couramment utilisé pour les extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques (YI-ZHONG *et al.*, 2006. HATZIDIMITRIOU *et al.*, 2007).

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été sélectionnée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des plantes, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité de ce radical (BOZIN *et al.*, 2008).

7.1.1 Principe

D'après (ALAM *et al.*, 2013), le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres employé afin d'étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. De ce fait les molécules du radical ne forment pas de dimères (Figure 15)

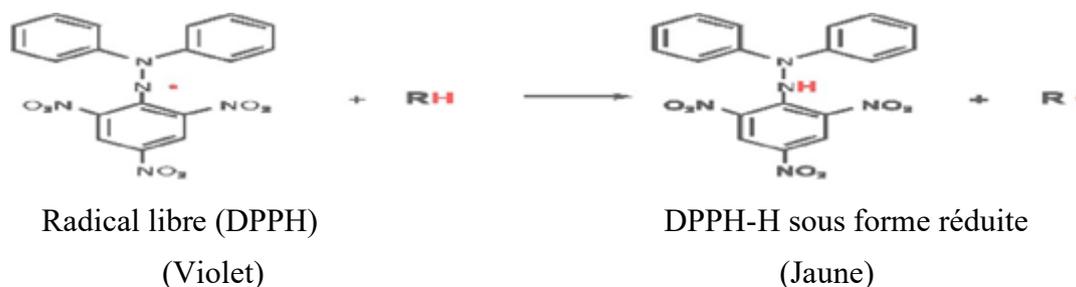


Figure 15 Structure de DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH (ROHMAN *et al.*, 2010).

D'après MOLYNEUX (2004), l'évaluation de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la réduction de la coloration bleue et le changement vers le jaune, dû à une recombinaison des radicaux DPPH, par spectrophotométrie à une longueur d'onde variant entre 515-518 nm.

L'inconvénient de ce procédé est sa sensibilité vis-à-vis de la lumière. Pour cette raison, la réaction doit se dérouler dans l'obscurité (KARSHEVA *et al.*, 2013).

8 Test de réduction du radical-cation ABTS+

Cette approche a été exposée initialement par **Miller et Rice-Evans (1993)**, ensuite perfectionnée en **1999**. Elle réside en la diminution d'un radical cationique coloré (acide 2' 2 azobis 3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) dénommé ABTS. +Entraîne une décoloration de l'ABTS- H⁺ et de la solution. L'évolution de sa concentration a été observée à 734 nm durant sa réaction avec les antioxydants (Figure 16).

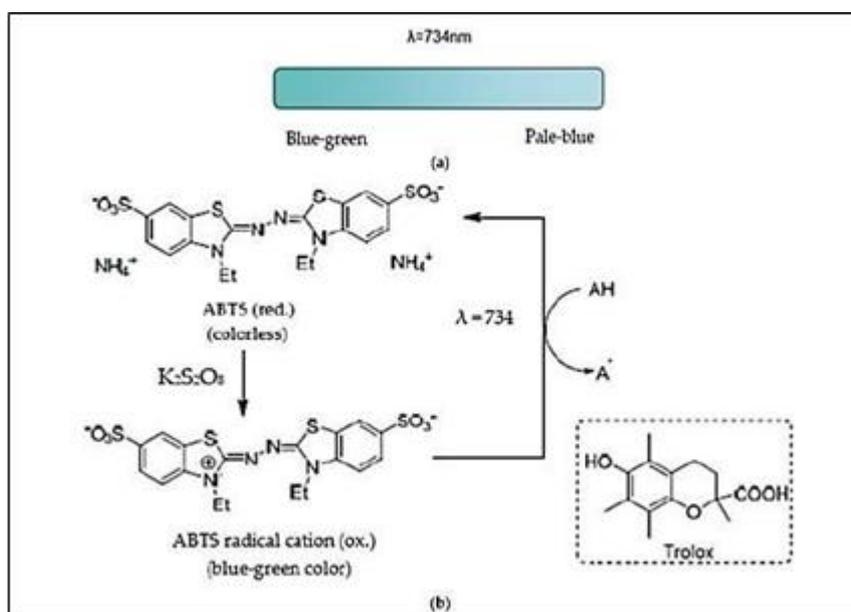


Figure 16 : Piégeage du radical ABTS (Munteanu et al., 2021).

Ce test a été effectué suivant le protocole décrit par **Re et al., (1999)**. La solution du radical cationique ABTS⁺ a été préparée en mélangeant 2,45 mM d'ABTS avec 7 mM de persulfate de potassium. Après 16 heures d'incubation la solution ABTS⁺ est diluée avec de l'eau déminéralisée, afin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,05$ à 734 nm. Un volume de 2,9 ml de cette solution fraîchement préparée est ajouté à 0,1 ml de différents extraits et l'absorbance est mesurée après 7 min d'incubation à température ambiante. Le trolox a été utilisé comme antioxydant de référence. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et en activité antiradicalaire (IC₅₀) de la même façon que ceux décrits au paravent pour le test DPPH.

9 Evaluation de l'activité antimicrobienne

9.1 Principe

Le principe de base de l'action antimicrobienne des polyphénols est de faire une culture microbienne sur milieu solide, avec des disques imbibés de polyphénols. Si les polyphénols ont une activité antimicrobienne, une zone d'inhibition sera observée autour du disque. Le diamètre de cette zone d'inhibition est proportionnel à l'efficacité de l'action antimicrobienne de l'échantillon (FATTOUCH *et al.*, 2006).

9.2 Mode opératoire

L'activité antimicrobienne des extraits est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose décrite par (OUELHADJ *et al.*, 2014). Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélose Mueller-Hinton en surfusion sont laissées solidifiées et séchées à une température de 25°C pendant 30 min. 100 µl de la solution standardisée (10 à 10 UFC/ml) est inoculé dans chaque boîte puis uniformément répartie avec un écouvillon. Les boîtes sont laissées sécher pendant cinq minutes. Des disques stériles en papier Wattman (5 mm) préalablement imprégnés de 15µl de chaque extrait sont déposés au milieu de la gélose.

9.3 Revivification des souches

Étant donné que les bactéries examinées sont gardées à -20°C et que l'action antibactérienne doit être faite sur une culture fraîche, une remise en culture des souches en bouillon BHIB est réalisée pendant 24h à 37°C

9.4 Repiquage des espèces bactériennes

Les diverses espèces bactériennes ont étéensemencées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C, afin d'obtenir des colonies isolées qui serviront à la préparation de l'inoculum. Les souches fongiques sontensemencées de la même manière, l'incubation est faite à 28 °C.

9.5 Préparation des dilutions d'extraits

Les extraits sont dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations de 500, 1000, 1500 et 2000 µg/ml.

9.6 Préparation de l'inoculum et standardisation

Les lignées bactériennes à examiner sont cultivées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C durant 24h, pour favoriser leur développement. Ensuite, on prélève au moyen d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et semblables de chacune des souches bactériennes à tester. L'anse est déchargée dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, l'opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0.10 à 620 nm L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est faiblement chargé, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop chargé (**DIB et al., 2013**)

9.7 L'aromatogramme

L'aromatogramme est l'équivalent de l'antibiogramme (technique utilisée en bactériologie médicale) où les antibiotiques sont remplacés par des extraits, réalisé grâce à la méthode de diffusion en milieu gélosé également appelée méthode des disques. Cet aromatoigramme sert à éprouver la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques (**HAMMOUDI 2009 BORDJIBA et al., 2011**).

Selon HAMMOUDI (2009), cette approche présente l'intérêt d'une flexibilité importante dans le choix des antibiotiques examinés, grâce à l'application d'un grand nombre d'espèces bactériennes, et a été beaucoup évaluée avec 50 ans d'usage international.

L'effet d'un antibiotique ou d'un extrait sur une souche bactérienne donne d'après BOULAHBAL (1993) deux états possibles :

- ✓ L'arrêt de l'augmentation de la population c'est l'effet bactériostatique où ;
- ✓ La destruction des bactéries : c'est l'effet bactéricide qui aboutit à la lyse bactérienne.

9.8 Ensemencement

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage sur boîtes de Pétri, l'écouvillon est plongé dans la suspension bactérienne, puis essoré en pressant fortement sur la paroi intérieure du tube. Il est frotté contre toute la surface gélosée en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en pivotant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est achevé en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée.

9.9 Dépôt des disques

Les disques imbibés d'extraits sont placés avec précaution sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. D'ailleurs, les antibiogrammes effectués avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) adapté, prêts à l'emploi, sont employés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et des disques imbibés de DMSO (témoin négatif). Ultiment, les boîtes de Pétri sont maintenues durant 2 h à 4 °C pour une diffusion optimale des substances bioactives, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

9.10 Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne est évaluée par la mesure des diamètres des halos d'inhibition (en millimètres) qui se créent autour des disques ; le diamètre de ces zones d'inhibition inclut celui du disque, ce qui permet de différencier les bactéries sensibles des bactéries résistantes.

On considère une bactérie sensible si le diamètre d'inhibition est supérieur à 8 mm (MOREIRA *et al.*, 2005)

Résultats et discussion

1 Calcul des rendements en huile essentielle (écorce) :

$$\text{Rdt \%} = M/M_0 \times 100$$

R=1,77% pour la première répétition, et R=2,48% pour la 2ème répétitions et R= 2.14% pour la 3ème répétitions, Cependant, la moyenne des rendements dans la station de Mansoura (Ghardaïa) (2.14%)

2 Calculer des rendements d'extraie (pépins) :

R=11,146% pour la première répétition

R= 12,77% pour la 2ème répétitions

Le rendement d'huile essentielle d'orange amère pour Mansoura est inférieur à 11,95% > 2.14%.
Et pour le rendement des pépins

3 Teneur en polyphénols totaux des extraits :

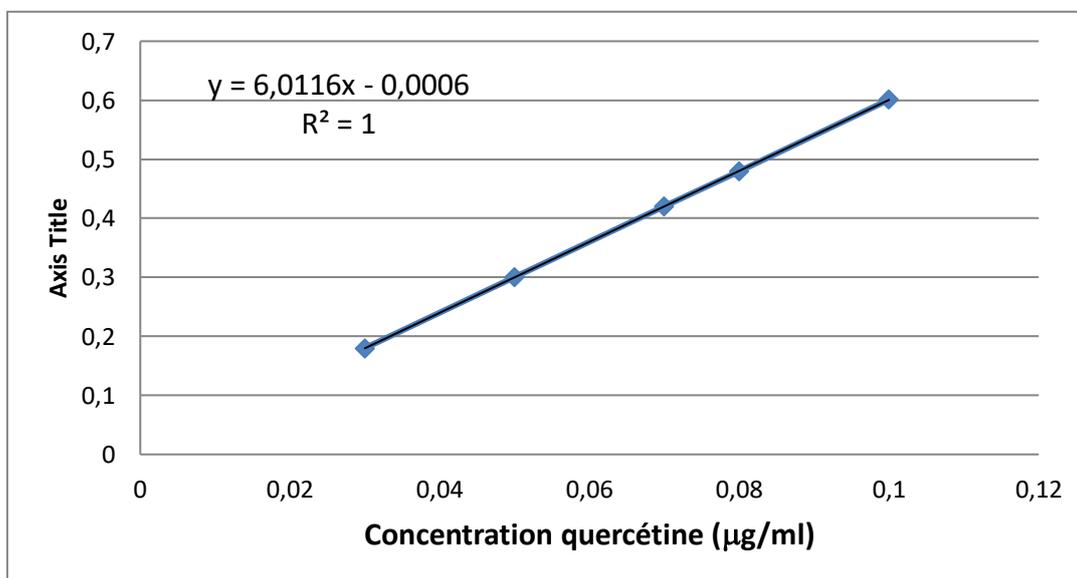


Figure 17 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique

Caurantium Le dosage des PPT est réalisé par la méthode spectrophotométrique employant le réactif de Folin-Ciocalten. Contenu en composés phénoliques dans différents extraits (aqueux et éthanoliques), exprimé en milligrammes d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG MS). Il est évalué à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Figure 17), qui a été faite avec un étalon de référence acide gallique à des concentrations allant de 0,03 à 0,1 µg/ml, selon (WONG *et al.*, 2007).

Les résultats (moyenne # écart type) concernant la répétabilité obtenu à partir du test PPT, en se servant de l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 6,0116x$) sont présentés dans la figure 17.

Les résultats décrits ont révélé la présence de polyphénols dans l'écorce et les pépins de Citrus aurantium orange à des niveaux changeants.

La teneur en polyphénols enregistrée dans notre étude est d'environ $0,601 \pm 0,18$ µg GAE/g (Fig. 18). Elle est inférieure à celle rapportée par Bejar *et al.*, (2011) qui ont estimé 5,22 mg de GAE/g. De plus, un contenu beaucoup plus élevé que le nôtre est observé par Selmi *et al.*, (2017), soit $169,94 \pm 2,13$ mg EAG/g MS.

Cette divergence des teneurs en polyphénols totaux serait due à la complexité de l'extraction des polyphénols, qui sont enclins à subir une dégradation, une oxydation, ou une hydrolyse. D'ailleurs d'autres paramètres peuvent influencer sur la quantification des composés phénoliques tels que la variété, le mode de conservation des extraits, les conditions environnementales, le degré de maturité du fruit et les facteurs génétiques (Lagha Benamrouche et Madani, 2013). D'après Al-anbari et Hasan, (2015), la teneur en polyphénols est pareillement influencée par le tissu analysé et l'origine géographique de la plante.

4 Dosage des flavonoïdes totaux :

La quantification des flavonoïdes a été menée selon la méthode Djeridane *et al.*, (2006), fondée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Le contenu en flavonoïdes est défini à partir de l'équation de la régression linéaire ($y = ax+b$) de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine, à diverses concentrations (Figure 18). La teneur des extraits en flavonoïdes a été donnée en µg quercétine équivalent/mg d'Ex.

Notre valeur est plus basse que celle rapportée par Omoba et al. (2015) s'élève à $3,30 \pm 0,30$ mg QE/g. ce qui est aussi inférieur à celui découvert par Salmi et al. (2017) estimé à $87,48 \pm 1,59$ mg OE/g Ambre et Hassan, (2015) ont montré que l'écart des taux constaté dans les polyphénols et les flavonoïdes est dû à la complexité des mélanges naturels de composés phénoliques et à la façon dont ces composés sont titrés,

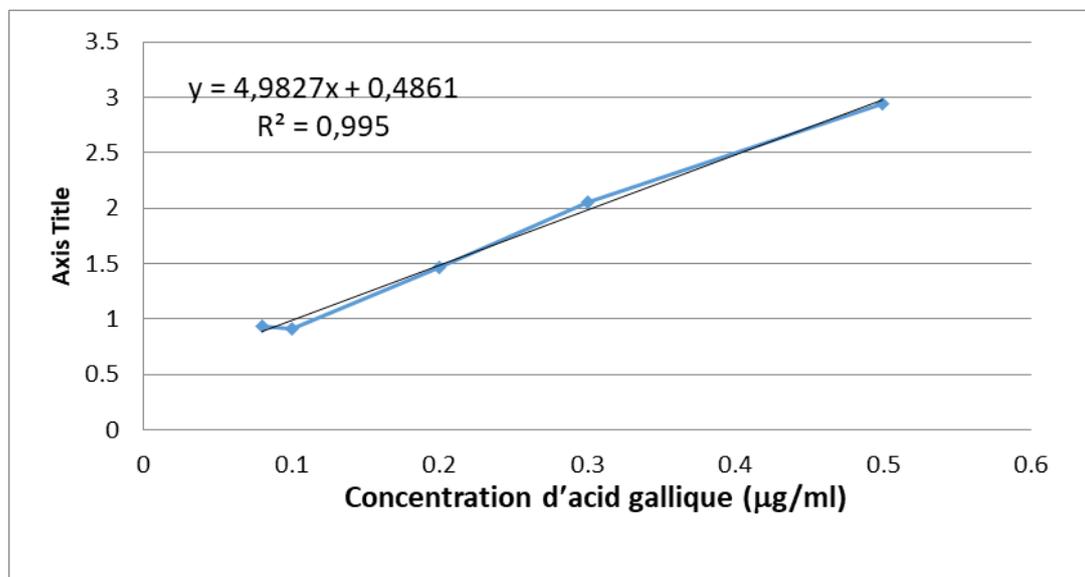


Figure 18 : Courbe d'étalonnage à la quercitrine

5 Evaluation des activités biologiques

5.1 Test activité anti radicalaire (DDPH)

Ces résultats valident ceux obtenus concernant le taux d'inhibition. Les graines et les écorces ont donc une faible aptitude antioxydante avec une IC50 de l'ordre de $0,175 \pm 0,386$ mg /ml. Cependant, les lignines se sont montrées significativement plus actives que le composé de référence, l'acide ascorbique (0,132).

Afin de comparer ces résultats avec la littérature, sommes conscients que nos échantillons révèlent peu d'activité antioxydante. En fait, **Teneva et al., En 2019**, ce riche antioxydant est disponible avec une concentration inhibitrice orale (ICE) de 88% de 1,0mg / ml. Par contre, **Saru et al., en 2013**, ce qui est une activité tout à fait envisageable par rapport au phloème. En effet, le pourcentage d'inhibition montré par le test DPPH est d'environ 19,29%, à une concentration de 54 mg/ml

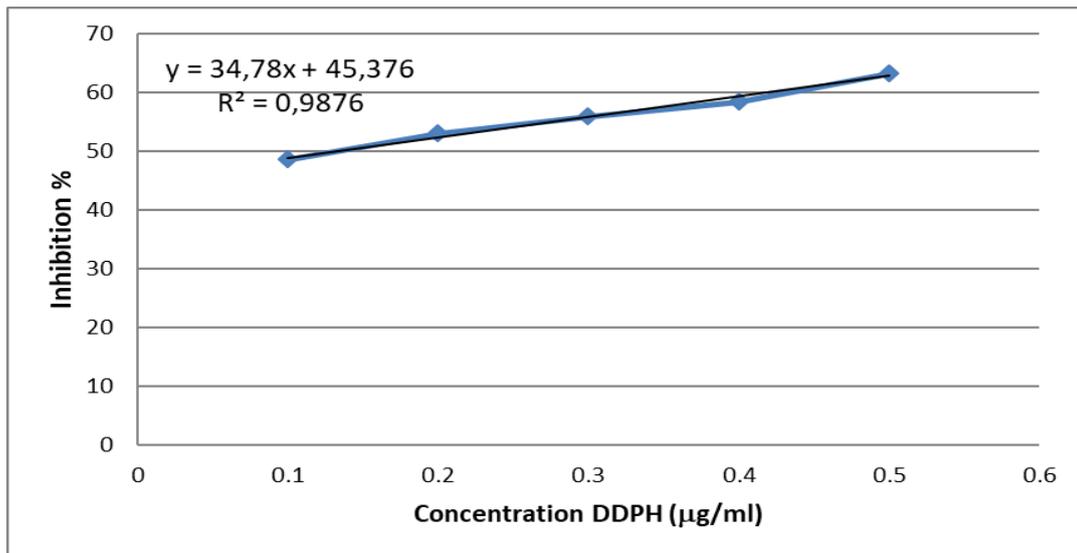


Figure 19 : Activités antioxydants (DPPH) de BHT

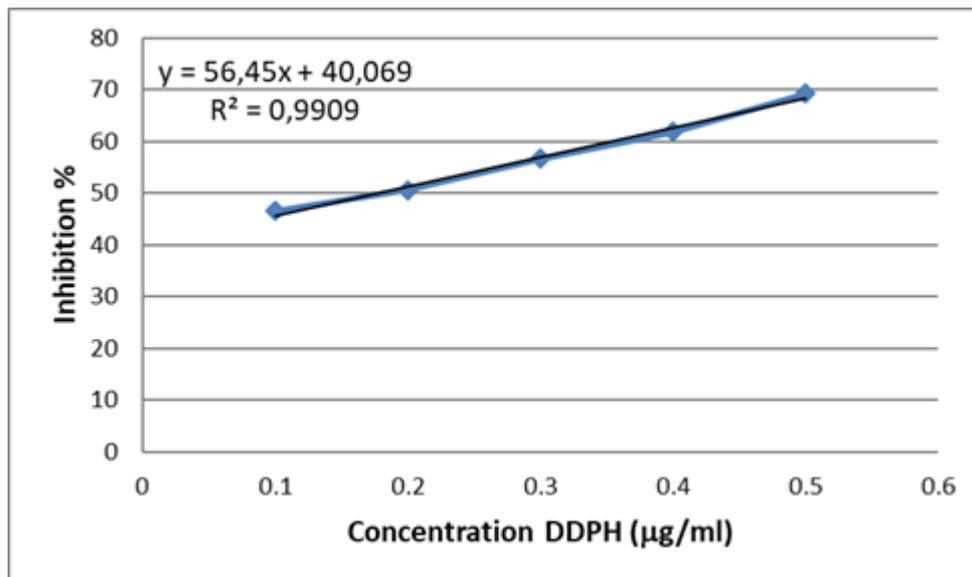


Figure 20 : Activités Antioxydants (DPPH) de pépins

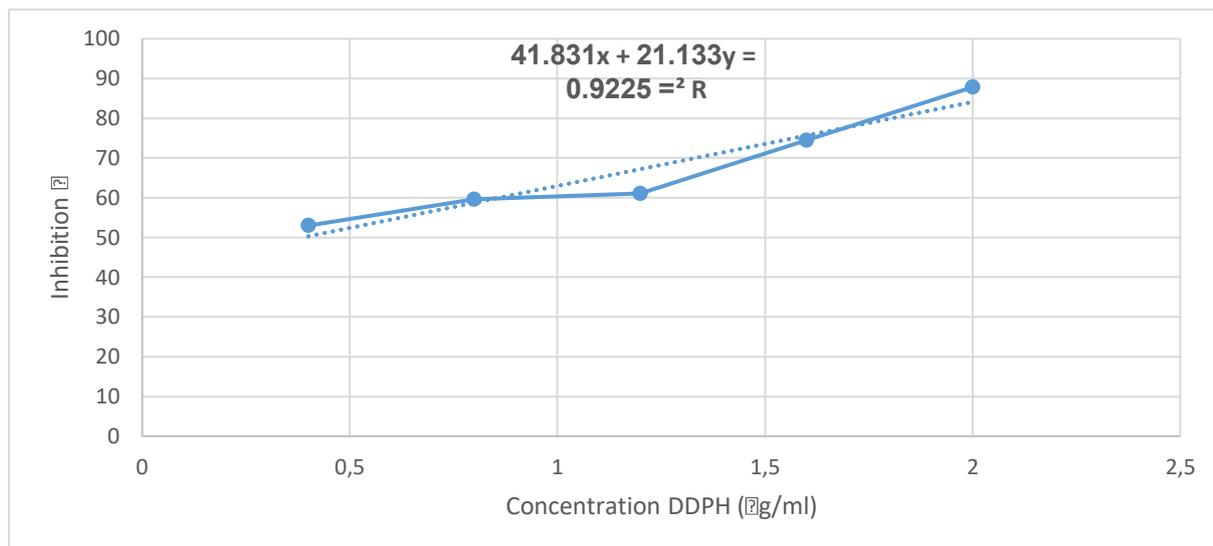


Figure 21 : Activités antioxydants (DPPH) de l'huile essentielle

Type	CI ₅₀ mg/mL
Acid ascorbique	0,132
L'écorce	0,386
pépins	0,175

5.2 Test de réduction de radical -cation ABTS+

La méthode de réduction du radical-cation ABTS^{•+} a été initialement développée par Miller et **Rice-Evans (1993)**, puis optimisée en 1999. Ce test repose sur la capacité des antioxydants à réduire le radical cationique coloré ABTS^{•+} (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), entraînant une décoloration de la solution. La cinétique de réaction est suivie par spectrophotométrie à 734 nm, proportionnellement à la concentration en antioxydants (Figure 21).

Les résultats du test ABTS (Figure 21) révèlent que l'extrait de résidus d'orange présente une activité antiradicalaire significative, avec une valeur d'IC₅₀ de $1,111 \pm 0,932 \mu\text{g/mL}$. Cette

activité est nettement supérieure à celle du Trolox (standard de référence), dont l'IC₅₀ est de $83,09 \pm 0,044 \mu\text{g/mL}$.

Par ailleurs, l'extrait testé montre une capacité de piégeage des radicaux ABTS•+ plus élevée que celle rapportée par **Omoba et al., (2015)** pour des extraits d'écorce d'orange (IC₅₀ $\approx 14,68 \mu\text{g/mL}$). Cette différence pourrait s'expliquer par:

- ✓ La composition phytochimique distincte des résidus (riches en flavonoïdes ou vitamine C),
- ✓ Les conditions d'extraction (solvant, température),
- ✓ La méthodologie utilisée pour générer le radical ABTS.+•

Ces résultats suggèrent que les résidus d'orange pourraient constituer une source prometteuse d'antioxydants naturels, avec des applications potentielles dans les industries alimentaire ou pharmaceutique.

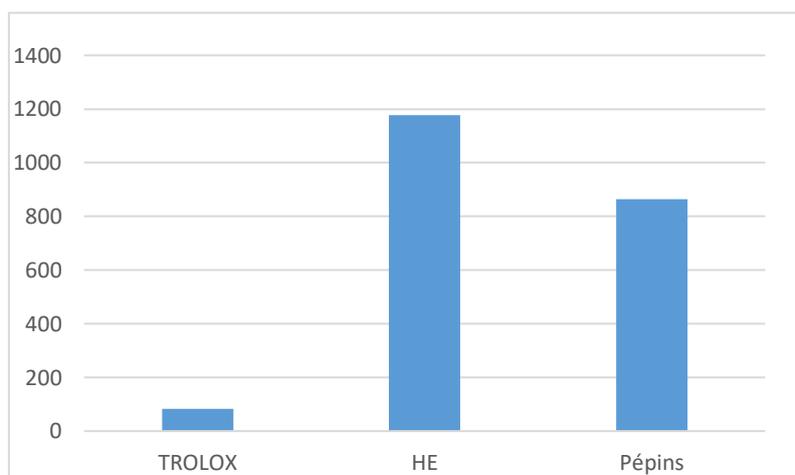


Figure 22 : Histogramme comparatif des IC₅₀ de l'effets scavenger

L'activité antioxydante de l'extrait de *C. arunatum* a été évaluée par rapport au standard Trolox en utilisant le test au radical ABTS. Les résultats, exprimés en moyenne \pm écart-type ($n=3$), montrent des différences significatives entre les échantillons ($p < 0,05$, test de Tukey).

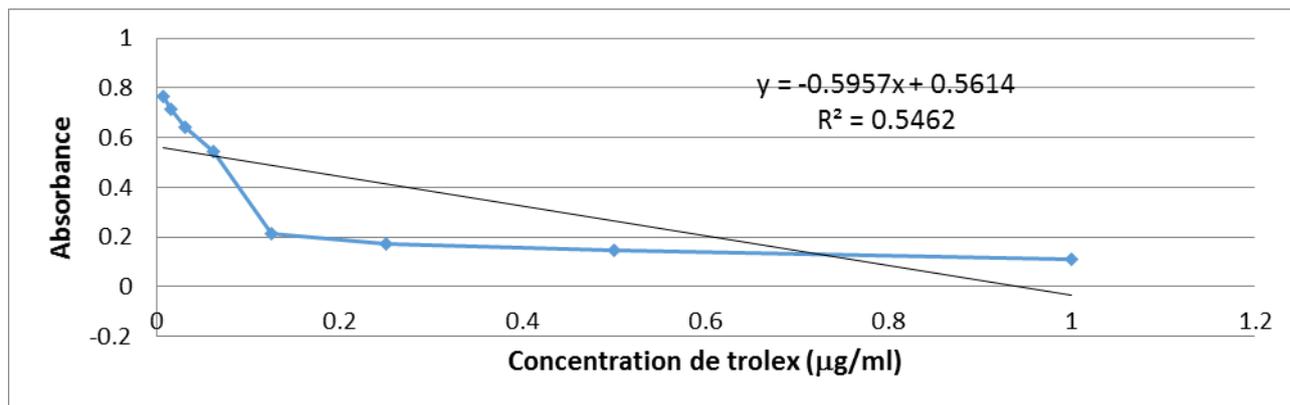


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de tro

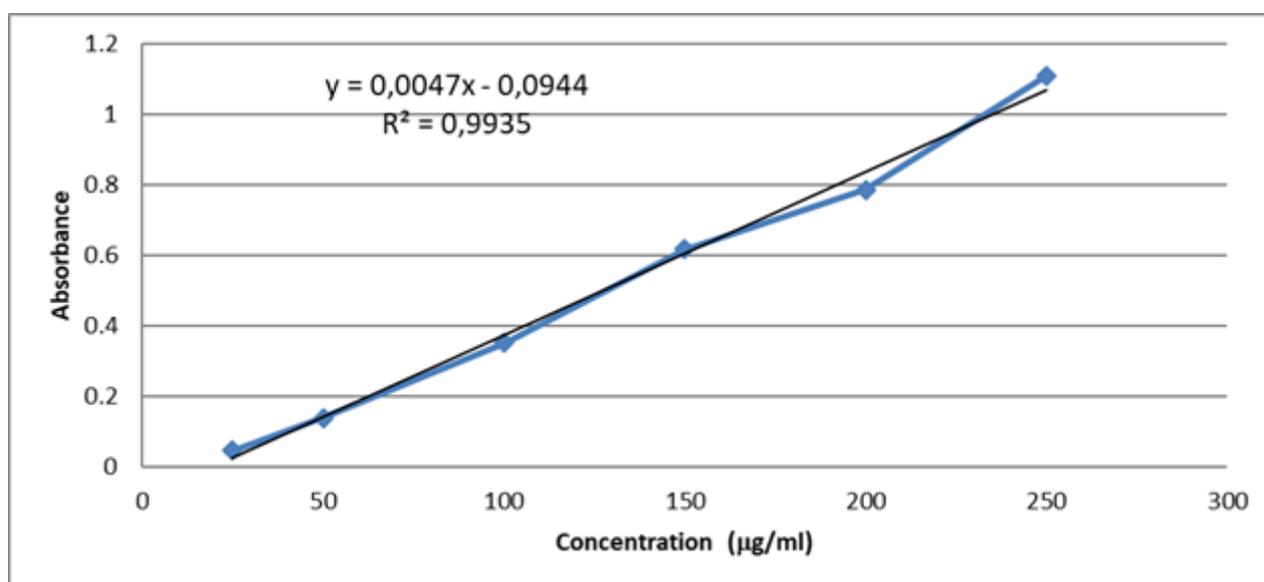


Figure 24 : La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

5.3 Capacité antioxydante totale :

Capacité antioxydante totale (CAT) La capacité antioxydante totale des extraits analysés est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique à partir d'une courbe d'étalonnage

($Y = 0.0047x - 0.0944$, $R^2 = 0,9935$) (figure 25). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par g de l'extrait sec (mg EAA/ig EXS).

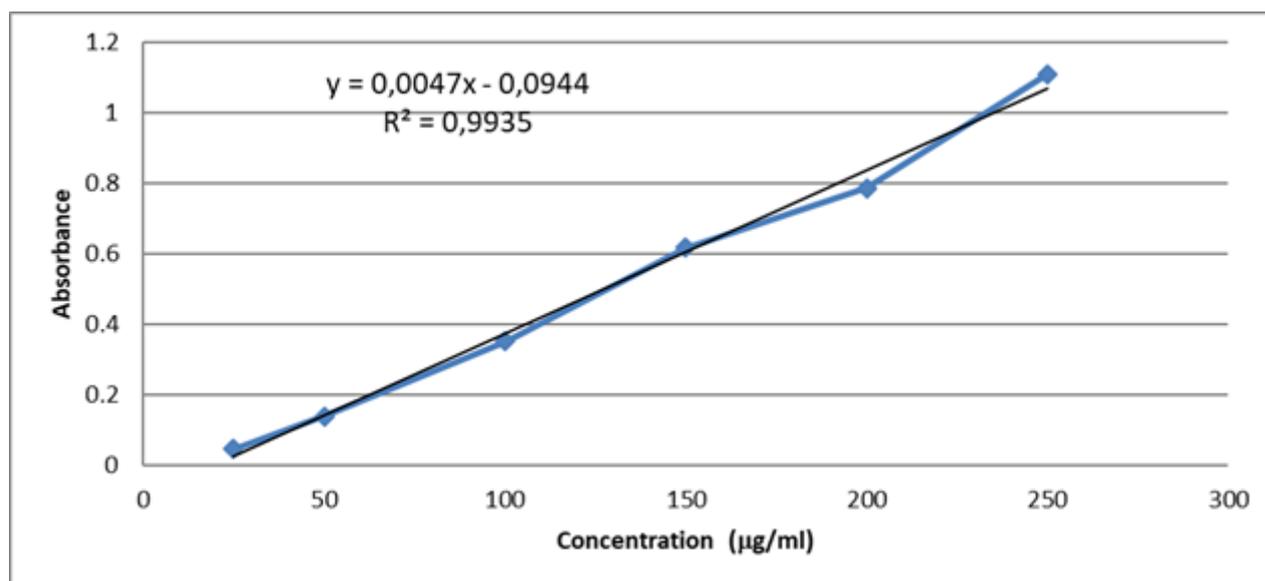


Figure 25 : La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

D'après les résultats exposés dans la figure 25, l'évaluation de la capacité antioxydant totale des écorces a démontré que les écorces possèdent une activité antioxydant supérieure au BHT, respectivement. $1,706 \pm 0,932 \mu\text{g EAA/mg Ex}$, $1,526 \pm 0,937 \mu\text{g EAA/mg Ex}$, or cette capacité reste valable ou présente une densité notable comparée au BHT, ne pas utiliser de CAT. $1,111 \pm 0,044 \mu\text{g AA/mg Ex}$.

6 Etude de l'activité antimicrobienne

Tableau 6 : Etude de l'activité antimicrobienne extrait (pépins et Ecorce)

Souche microbienne	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce <i>C.aurantium</i>	Pépins <i>C.aurantium</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	15/16	27/27
<i>Escherichia coli</i>	15/14	14/14
<i>Bacillus subtilis</i>	9/9	16/18
<i>Staphylococcus aureus</i>	12/11	12/14

Mise en évidence de l'activité antimicrobienne :

Cette étude a évalué l'activité antimicrobienne des extraits aqueux d'écorce et de graines de *Citrus aurantium* à une concentration de 300 µg/mL, en comparaison avec des antibiotiques standards. L'objectif était de déterminer quelle partie du fruit (écorce ou graines) présentait la meilleure activité inhibitrice.

L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (Mueller-Hinton), selon le protocole décrit par Ouelhadj et al. (2014). Le DMSO a été utilisé comme témoin négatif, tandis qu'une série d'antibiotiques standards servait de témoin positif. Les extraits ont été préparés dans des conditions stériles pour éviter toute contamination avant analyse.

Les résultats (Tableau 14) révèlent que tous les extraits testés ont induit des zones d'inhibition, variant entre 9 et 27 mm de diamètre, contre les souches bactériennes cibles. Une activité antibactérienne particulièrement notable a été observée contre *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition de 17 mm. En revanche, *Staphylococcus aureus* s'est montré sensible à l'ensemble des extraits aqueux testés.

Ces résultats suggèrent que les extraits de *C. aurantium*, notamment ceux issus de l'écorce, possèdent des composés actifs contre des pathogènes Gram+ et Gram-. Toutefois, leur efficacité reste inférieure à celle des antibiotiques standards utilisés comme témoins. Des études complémentaires sont nécessaires pour identifier les molécules responsables de cette activité et optimiser leur potentiel thérapeutique.

Ces résultats concordent avec les données de la littérature. En effet, plusieurs études ont rapporté des effets inhibiteurs similaires, avec des zones d'inhibition de 15,33 mm (Santhosh et al., 2015), 21 mm (Ali et al., 2016) et 11,33 mm (Egbunuonu et Osuiji, 2016) respectivement. Cependant, des travaux antérieurs (Nisha et al., 2013 ; Suja et al., 2017) ont mis en évidence une résistance de cette souche bactérienne à des extraits de même nature, suggérant une variabilité potentielle liée aux souches microbiennes ou aux méthodes d'extraction.

Conclusion

Conclusion

Les résultats de cette étude ont révélé que les écorces et les graines de *Citrus aurantium* contiennent des polyphénols, notamment des flavonoïdes. Les extractions aqueuses et éthanoliques ont permis d'obtenir des teneurs élevées en ces composés phénoliques. Les extraits obtenus présentent une activité antioxydante significative, comparable à celle de l'acide ascorbique, un antioxydant de référence. Ces résultats suggèrent que *Citrus aurantium* pourrait constituer une source naturelle prometteuse d'antioxydants, offrant une alternative intéressante aux antioxydants synthétiques.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne des extraits aqueux a été démontrée sur quatre souches bactériennes. Les tests ont révélé une forte inhibition de la croissance bactérienne, bien que l'effet sur *E. coli* soit resté limité à une concentration de 300 mg/mL.

Cependant, ces résultats, bien qu'encourageants, ne représentent qu'une première étape dans l'évaluation du potentiel bioactif de *Citrus aurantium*. Des études *in vivo* seraient nécessaires pour confirmer l'efficacité et l'innocuité des extraits phénoliques, tant pour leurs propriétés antioxydantes qu'antimicrobiennes.

Enfin, la valorisation des sous-produits du bigaradier (*Citrus aurantium*) par l'extraction de polyphénols présente un double avantage : d'une part, elle permet d'obtenir des composés bioactifs à faible coût, utiles en pharmacologie et dans l'industrie, et d'autre part, elle contribue à réduire les déchets agro-alimentaires, offrant ainsi une solution écologique et économique. L'extraction aqueuse, en particulier, constitue une méthode rentable et respectueuse de l'environnement, ouvrant des perspectives intéressantes pour des applications à plus grande échelle.

Références bibliographiques

- AFNOR, Recueil de normes les essentielles. Huiles 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, (2000) :440 p.
- AFNOR Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris, (1986) :57 p.
- Aubert, M., Vullin G. (1997). Pépinière et plantation d'agrumes. Ed. CIRAD, Paris, 184p.
- Bachés, B., Bachés, M. (2012). Agrumes : comment les choisir et les cultiver facilement. Editeur : Ulmer, Paris, 96p.
- Belakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Ibis presse, Paris, France, 764p.
- Bellec, F., Renard, V. (1997). Le grand livre des fruits tropicaux. Ed. Orphie, Paris, France, 189p.
- leaves and peel of *Citrus aurantium* L. var. *amara* from Tunisia. JEOP 9 (2), (2006) : 133-139.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of Citrus peel and seed extracts. Journal of agricultural and food chemistry, 46(6), 2123-2129.
- Bouroukaa, A. (2012). Etude biochimique de l'adultération du jus de fruits. Thèse, Université de Carthage, 89p.
- Bonnaillie C, Salacs M., Vassiliova E. et Saykova I. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). Revue de Génie Industriel, 7 :35-45.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss U-Technol .28 : 25-30.
- Boizot. N, Charpentier. J. P. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques.79-82.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier Tec. Et doc., 2ème Edition, Paris, 915p.

-
- Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, Tec. Et Doc., 5ème édition, Paris, 1504p.
 - Encyclopédie Encarta, 2006.
 - FATTOUCH S., CABONI P., CORENEO V., TUBERESSO C., ANGIIONI A. DESSI S., MARZOUKI N. et CABRAS P. (2006). Antimicrobial activity of Tunisian Quince (*Cydonia Oblonga miller*) pulp and peel phenolic extracts, *Journal of Agricultural and food chemistry*. 50 : 130-143.
 - Giraud N. "L'oranger doux, l'oranger amer". Thèse d'exercice en pharmacie. Clermont-Ferrand : Université de Clermont-Ferrand, (1993) :77p.
 - Girre, L. (1992). La santé par les plantes. Ed. Ouest-France, Rennes, France, 222p.
 - Girre, L. (1995). Les plantes médicinales. Ed. Ouest-France, Rennes, France, 32p.
 - GONTIER J. "L'oranger, Ar lez : actes sud", (2000) :89p.
 - Gontier J. " L'oranger". Arles Actes Sud, (2000) :89p. (collection le nom de l'arbre).
 - Guignard J.L. "Botanique. - (11ème édition révisée). Paris : Masson, (1998) : 278p. (collections abrégées de pharmacie).
 - Hadrich, B., et al. "Etude de séchage des feuilles de bigaradier." *Revue des énergies renouvelables*, (2009) : 145-149.
 - Hendrix, C. M., and J. B. Redd "Chemistry and technology of citrus juices and by products." *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages*. Springer, Boston, MA, (1995) :53-87.
 - KHRIBCH, J., NASSIK, S., EL HOUADFI, M., ZRIRA, S., & OUKESSOU, Kimbol M. (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(3), 300-307.
 - Karsheva M., Kirova E. et Alexandrova S. (2013). Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols; effect of operational conditions on total polyphenols contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48(1) : 35-41.
 - La Berche J.C."biologie végétale, (collection abrégés de sciences)" Paris : dunad (1999):240p.

- Larbi, D., Ghezli, C., Djelouah, K. (2009). Historical review of Citrus tristeza virus (CTV) in Algeria. *Options méditerranéennes*, 107-110.
- Laurent, J. (2017). *Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université de Rouen, France, 151p.
- LEROY, J.F. (1968). *Les agrumes les fruit tropicaux et subtropicaux*. Ed. Presses Universitaires de France, p : 100.
- Loussert, R. (1989). *Les agrumes-arboriculture*. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113p.
- Manner, H.L, Buker, R.S., Smith, V.E., Ward, D. and Elevitch, C.R. (2006). Citrus (Citrus) and Fortunella (Kumquat). *Species Profile for Pacific Island Agroforestry*, 2, 1-35. 72
- Mahmoudi. S, Khali. M, Mahmoudi. N. (2013) Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Nature & technologie. b- sciences agronomiques et biologiques*, N° 09 : 35-40.
- Mohammedi, Z. (2006). *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen*. Mémoire de Magister. Université Abou BakrBelkaïd Tlemcen. 105p.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 26(2) : 211219.
- Moreira M.R., Ponce A.G., de Valle C.E., Roura S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-LWT*. 38 :565–570.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Robert G. *Les Sens du Parfum*. Osman Eroyllles Multimedia. Paris, (2000) : 224 p.

-
- Salunkhe et Kadam, Spiegel-Roy et Goldschmidt *Biology of citrus* Pinhas Spiegel-Roy. Eliezer E. Goldschmidt., Spiegel-Roy, Pinchas. Cambridge; (1995-1996). New York Cambridge University Press.
 - Salunkhe, Dattajirao, K., Kadam, S., eds. (1995). *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing*. CRC press.
 - Saonere Suryawanshi, J.A. (2011). An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. *African Journal of Plant Science*, 5(7), 390-395.
 - Schauenberg, P. (1977). *Le guide des plantes médicinales*. 3^{ème} édition, Ed. Delachaux et Nestlé, Paris, France, 396p.
 - Seddik, M. (2010). *Analyse physico-chimique et spectroscopie de l'huile essentielle d'Ammodendron verticillata de la région d'Adrar, Etude de son activité biologique et antioxydante*. Mémoire Pour l'obtention du Diplôme de magister, Spécialité : Chimie Moléculaire : Analyse, Modélisation, Synthèse, université d'Oran, Algérie, 111p.
 - Talbi.H, Boumaza. A, El-mostafa. K. TalbiJ.Hilali A. (2015) *Evaluation de l'activitéantioxydanteet la composition physicochimique des extraitsméthanolique et aqueux de la Nigellasativa L. (Evaluation of antioxidantactivity and Physico-chemical*
 - Tena, M.T., Valcarcel, M., Hidalgo, P.J., Uebera, J.L. (1997). *Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication*. *Analytical Chemistry*, 69, 521-526.
 - Tenscher, E., Anton, R., Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed. Lavoisier Tec. Et Doc., France, 544p.
 - Turkmen. N, SedatVelioglu. Y, Sari. F and Polat. G. (2007) *Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea*, *Molecules* 12, 484-496.
 - Yan J., Zhang G., Hu Y., Ma Y., (2013). *Effect of luteolin on xanthine oxidase: inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation*. *Food chemistry*, 141(4).