



جمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسنطينة
كلية الطبيعة الحياة

Département : Ecologie et Biologie végétale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biodiversité et reproduction végétale

Spécialité : Biologie et physiologie végétale

Option : Métabolisme secondaires et molécules bioactives

Intitulé :

Contribution à l'étude phytochimique et biologique des flavonoïdes chez l'espèce Citrus limon et évaluation de leur pouvoir anti bactérien.

Présenté et soutenu par :

ATROUS FATIMA

Le : 25/06/2015

MENZRI YASMINA

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me} HAMMOUDA BOUSBIA DOUNIA. (MCB-UFM Constantine).

Rapporteur : M^{me} BOUCHOUKH IMANE. (MAA – UFM Constantine).

Examineur: M^{me} KARA KARIMA. (MCB – UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes parents
Pour vos mains qui ont tant travaillé
Pour votre cœur qui m'a tant donné
Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé
Pour vos yeux qui furent parfois mouillés
Pour vous qui m'avez tant aimé.*

A mes sœurs : Rayane Feriel Batoul Ikram

A mon frère Bouelem

A toute ma famille

A mes amis(e)

Menzri Yasmína

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents

A mes sœurs : Sonia Amel Rima

A toute ma famille

A mes amies

Atrous Fatima

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience d'achever ce petit travail.

Nous tenons à remercier Mme Bouchoukh Imane, Maître assistante à l'université de Constantine I, d'avoir accepté de présider ce travail.

Nous remercions Mme Hammouda Dounia, Maître des conférences à l'université de Constantine I, d'avoir accepté d'être la présidente du jury.

Nous remercions Mme Kara Karima, Maître des conférences à l'université de Constantine I, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions aussi nos collègues : Benhamama Loukmane et Hassine Boukal Chawki pour leur aide pendant toute cette période, pour leur gentillesse, et leur sourire.

A nos amies avec qui nous avons vécu de beaux moments au cours de notre cursus à l'université de Mentouri - Constantine particulièrement Nariméne Khawla Halima.

Nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance vont à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce petit mémoire nous remercions toute personne de près et de loin.

Résumé :

Notre travail porte sur l'étude phytochimique et des activités anti bactériennes de *Citrus limon* de la wilaya de Constantine.

L'arbre du Citronnier *Citrus limon* est une plante poussant dans la région méditerranéenne. Elle est aromatique médicinale utilisée comme anti inflammatoire, stimulant, anti bactérien.

Le screening phytochimique a permis de faire une évaluation quantitative et qualitative de flavonoïdes extraits à partir des feuilles et des fleurs de cette plante. Tandis que des tests biologiques ont été utilisés pour l'évaluation du pouvoir anti bactérien.

Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer la richesse des extraits étudiés de *Citrus limon* en flavonoïdes, ces derniers ont montré un pouvoir anti bactérien significatif qui pourrait nous permettre de la recommander dans la biotechnologie.

Mots clés : *Citrus limon*, flavonoïdes, phytochimique, activité anti bactérienne.

Summary :

Our work focuses on the phytochemical study and anti bacterial activities of *lemon Citrus* of the wilaya of Constantine.

The tree of Lemon *Citrus limon* is a plant that grows in the mediterranean region. It is used as a medicinal aromatic anti inflammatory, stimulant, anti bacterial.

The phytochemical screening has allows a quantitative and qualitative assessment of flavonoids extracted from the leaves and flowers of this plant. While biological tests were used for evaluation of anti-bacterial power.

The results of this work we were allowed to affirm the richness of the studied extracts of *Citrus limon* in flavonoids, they were shown a significant anti bacterial power that could allow us to recommend in biotechnology.

Key words: *Citrus limon*, flavonoids, phytochemical, anti bacterial activity.

:

لقد ارتكز عملنا على الدراسة الفيتوكيميائية و النشاط الضد بكتيري لنبات الليمون *Citrus limon* لولاية قسنطينة.

شجرة الليمون *Citrus limon* تنمو بمناطق البحر الأبيض المتوسط وهي نبتة عطرية طبية تستعمل كمضاد للالتهاب محفز و مضاد للبكتيريا .

الفحص الكيميائي النباتي من إجراء التقييم الكمي والنوعي للفلافونيدات المستخرجة من مستخلصات أوراق و أزهار هذا النبات في حين أن الاختبارات البيولوجية استخدمت لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا.

وقد سمحت نتائج هذا العمل من تأكيد ثراء العينات المدروسة لنبات الليمون *Citrus limon* بالفلافونويدات وأظهرت كذلك قوتها ضد البكتيريا وهذا ما يسمح لنا بإدراجها في مجال البيوتكنولوجيا.

الكلمات المفتاحية : نبات الليمون (*Citrus limon*) ، فلافونويدات فيتو كيميائي بكتيري .

Liste des figures :

Figure 1 :	Coupe longitudinale d'une fleur de la famille des <i>Rutacées</i>	5
Figure 2 :	Schémas de la biosynthèse des Flavonoïdes	16
Figure 3 :	Flavonones	17
Figure 4 :	Flavones	18
Figure 5 :	Anthocynes	18
Figure 6 :	Chalcones	19
Figure 7 :	Fleurs et feuilles du Citronnier	22
Figure 8 :	Moulin électrique	23
Figure 9 :	Fleurs broyées	23
Figure 10 :	Feuilles broyées	23
Figure 11 :	Protocol de screening phytochimique des flavonoïdes réalisé sur les différents organes de Citronnier (feuilles et fleurs)	25
Figure 12 :	Protocol de préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques	28
Figure 13 :	Protocol des fractionnements des extraits bruts par ELL	30
Figure 14 :	Schéma de l'analyse CCM des flavonoïdes des extraits des feuilles et des fleurs du Citron.....	31
Figure 15 :	Migration des constituants de l'extrait lors d'une CCM analytique.....	32
Figure 16 :	Schéma simplifié du principe de la méthode des disques	33
Figure 17 :	Protocol du test de l'activité antibactérienne des extraits (Techniques des disques).....	35
Figure 18 :	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	38
Figure 19 :	Contenu relatif des flavonoïdes des feuilles et des fleurs de <i>Citrus limon</i>	39
Figure 20:	Détection visible du chromatogramme des différentes phases d'un extrait méthanolique chez <i>Citrus limon</i>	41
Figure 21 :	Détection visible du chromatogramme des différentes phases d'un extrait éthanolique chez <i>Citrus limon</i>	41

Figure 22 :	Révélation par UV (250nm) d'un extrait méthanolique	42
Figure 23:	Révélation par UV (250nm) d'un extrait éthanolique	42
Figure 24 :	Révélation par UV (365nm) d'un extrait méthanolique	43
Figure 25 :	Révélation par UV (365nm) d'un extrait éthanolique	43
Figure 26 :	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut du <i>Citrus limon</i> . La bactérie <i>E. coli</i>	47
Figure 27 :	Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut du <i>Citrus limon</i> ; La bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	48

Liste des tableaux :

Tableau 1 :	Caractéristiques des 5 espèces du citrus limon	6
Tableau 2:	Les différents composés du métabolisme secondaire	13
Tableau 3:	la couleur de quelques classes des flavonoïdes	14
Tableau 4:	Résultats des tests	36
Tableau 5:	Les résultats de criblages des flavonoïdes des feuilles et des fleurs de <i>Citrus limon</i>	37
Tableau 6:	Absorbance lues au spectrophotomètre à 420nm.	39
Tableau 7:	les Rf des différents spots d'un extrait éthanolique	44
Tableau 8:	Les Rf des différents spots d'un extrait méthanolique	45
Tableau 9:	Diamètre de zone d'inhibition pour l'extrait brut des feuilles et des fleurs	48

Sommaire

Partie I : Synthèse bibliographique

Introduction générale	1
Chapitre I : Description de la plante	
1.1. La famille des <i>Rutacées</i>	4
1.2. Classification de la famille des <i>Rutacées</i>	5
1.3. Le genre <i>Citrus</i>	5
1.4. Description de l'espèce <i>Citrus limon</i>	6
1.5. Taxonomie de l'espèce	7
1.5.1. Systématique classique	7
1.6. Variétés cultivées de Citronnier	8
1.6.1. Variétés cultivées de Bigaradier (<i>Citrus aurantium</i>)	8
1.6.2. Variétés cultivées de Pomelo ou Grappe fruit : (<i>Citrus paradisi</i>)	8
1.6.3. Variétés cultivées de Cédratier (<i>Citrus medica</i>)	8
1.6.4. Variétés cultivées de Pamplemoussier (<i>Citrus grandis</i>)	8
1.6.5. Variétés cultivées de Limettier	9
1.6.6. Variétés cultivées de Lime	9
1.7. Culture du Citronnier.....	9
1.8. Rendement	9
1.9. Caractères botaniques.....	10
1.10. Utilisations.....	10

Chapitre II : Métabolisme secondaire

1. Définition.....	12
2. Fonctions de métabolites secondaires.....	13
3. Type et origine des métabolites secondaires.....	13
3.1. Les composés phénoliques.....	13
3.1.1. Les flavonoïdes.....	13
3.1.1.1. Définition.....	13
3.1.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes	14
3.1.1.2.1 Voie Shikimate	14
3.1.1.2.2. Voie acétate-malonate	15

3.1.1.3. Classes des Flavonoïdes	17
3.1.1.3.1. Flavonones	17
3.1.1.3.2. Flavones	17
3.1.1.3.3. Flavonoles	18
3.1.1.3.4. Les anthocyanes	18
3.1.1.3.5. Les Chalcones.....	18
3.1.1.4 Intérêt des flavonoïdes.....	19
3.1.1.4.1. Intérêt biologique.....	19
3.1.1.4.1.1. Rôle attractif	19
3.1.1.4.1.2. Rôle protecteur	19
3.1.1.4.2. Intérêt physiologique	19
3.1.1.4.3. Intérêt pharmacologique	20
3.1.1.4.4. Intérêt économique.....	20
3.1.1.5. Distribution des Flavonoïdes	20
3.1.1.6. Localisation.....	21

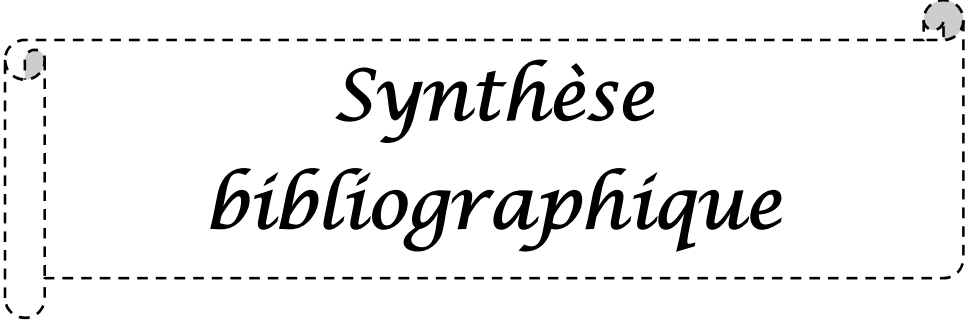
Partie II : Matériels et méthodes

1. Matériel végétale utilisé	22
1.1. Zone de récolte	22
1.2. Conservation.....	22
1.3. Broyage de parties séchées	23
2. Criblage des flavonoïdes	23
3. Dosage des flavonoïdes	26
4. Extraction des flavonoïdes.....	26
4.1. Macération et préparation des extraits éthanolique et méthanoliques	26
4.1.1. Méthode d'extraction	26
4.1.2. Protocole d'extraction	26
4.2. Fractionnement des extraits bruts Extraction Liquide-Liquide (ELL)	29
4.3. Séparation des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM)	30
4.3.1. Principe.....	30
4.3.2. Dépôts.....	31
4.3.3. Développement des plaques.....	32
4.3.4. Révélation des plaques (Visualisation des tâches)	32

5. Etude de l'activité antibactérienne	32
5.1. Objectif	32
5.2. Principe.....	33
5.3. Préparation des souches bactériennes	33
5.4. Culture des bactéries	34

Partie III : Résultats et discussions

1. Criblage des flavonoïdes.....	36
1.1. Résultats	36
1.2. Discussion.....	38
2. Dosage des flavonoïdes	38
2.1. Résultats	38
2.2. Discussion.....	40
3. Séparation des extraits bruts MeOH et EtOH par chromatographie sur couche mince (CCM)	40
3.1. Résultats	40
3.2. Discussion.....	46
4. Evaluation de l'activité antibactérienne	46
4.1. Résultats.....	46
4.2. Discussion.....	48
Conclusion	49
Perspectives	50
Références bibliographiques	51
Les sites	53



*Synthèse
bibliographique*

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**Introduction générale :**

Les arbres fruitiers ont leur place dans tous les jardins. Au printemps, leur floraison éblouissante ajoute le plaisir des yeux à la gourmandise.

Il ne s'agit pas ici de parler de tous les arbres fruitiers, tant ils sont divers. Jardiniers professionnels ou jardiniers amateurs, n'hésitez pas à planter des arbres fruitiers, tant pour leur qualité d'arbres ou d'arbustes d'ornement que pour leur côté jardin gourmand. Les formes et les tailles sont extrêmement variées. Les arbres fruitiers aiment en général une exposition ensoleillée. Certains, d'origine méditerranéenne, sont à rentrer en hiver (les agrumes, par exemple).

Sur la plupart des arbres fruitiers, la pollinisation est "croisée", c'est-à-dire qu'elle se produit d'un arbre à l'autre. Il faut donc souvent planter plusieurs fruitiers ensemble; c'est le cas des pommiers et des poiriers.

Le nom Agrume est donné aux arbres appartenant à la famille des *Rutacées* et au genre botanique *Citrus*. Cette appellation d'origine italienne, désigne les fruits comestibles et par extension les arbres qui les portent. A cette catégorie d'arbre appartiennent les orangers, les mandariniers, les citronniers, les cédratiers et le pamplemoussier .LOUSSERT, (1989).

En Afrique tropicale humide, et au Cameroun en particulier, les agrumes sont produits généralement dans des systèmes où ils jouent un rôle important à plus d'un titre. Ils constituent des sources de revenus pour les ménages et des apports nutritionnels de qualité notamment pour leur richesse en éléments minéraux, en vitamines et en fibres. ECONOMOS et CLAY, (1998). De par leur nature pérenne, ils sont (aussi un des éléments de restauration des équilibres écologiques après la déforestation. WESTPHAL et al. (1985).

BOUDI, (2005) signale que les agrumes sont les fruits les plus produits dans le monde. Ce même auteur souligne que l'Algérie qui été traditionnellement exportatrice d'agrumes, éprouve à l'heure actuelle des difficultés à satisfaire les besoins de consommation qui ne cessent de croître sous l'effet de la consommation en fruits frais. Ce même auteur souligne aussi que l'Algérie par sa situation géographique, son climat et la qualité de sa production peut à juste titre prétendre occuper sur les places européennes une position de choix pour l'ensemble de sa production agrumicole. L'agriculteur algérienne vit une situation très difficile généralement par l'instabilité où les rendements n'ont pas progressé depuis l'indépendance. A

cette régression des rendements, s'ajoute une diminution de la qualité qui rend nos agrumes non compétitifs, contrairement à ceux des autres pays méditerranéens.

LOUSSERT, (1989) signale que les agrumes sont originaires des pays du sud-est asiatique ou leur culture se confond avec l'histoire des civilisations anciennes de la Chine, qui les cultivèrent d'abord pour leur parfums, puis pour leurs fruits. Ce même auteur signale aussi que c'est avec le rayonnement des civilisations Chinoises et Hindoues que leur culture commença à se propager, au cours de premier millénaire avant notre ère, à l'ensemble des pays du sud-est asiatique (sud du Japon et archipel de Malaisie). Les Cédratiers furent probablement les premiers agrumes cultivés en méditerranée à l'époque des Mèdes, au VII^{ème} siècle avant notre ère. LOUSSERT, (1989).

Ce même dernier auteur souligne aussi que c'est à partir de bassin méditerranéen et aux grandes découvertes que les agrumes furent diffusées dans le monde. Dès le Xe siècle, les navigateurs arabes les propagent sur les côtes orientales de l'Afrique jusqu'au Mozambique. Christophe Colomb, à l'occasion de son second voyage (1493), les introduit en Haïti, à partir de laquelle la diffusion se fera vers le Mexique (1518), puis les Etats-Unis d'Amérique (1569 à 1890). Enfin, ce sont les navigateurs Anglo-hollandais qu'en 1654 introduisent les premiers agrumes dans la province du Cap en Afrique du Sud.

PRALORAN, (1971) souligne que les agrumes appartiennent à la famille des *Rutacées*, d'origine de la Chine, Inde et Indonésie, la période de floraison est entre mars et juillet. Pour ce qui est de la couleur des fleurs est blanche, l'exposition est vers le soleil, le type de sol est un mélange de terreau et de terre de jardin, léger et drainé, l'acidité du sol est neutre à légèrement acide. L'humidité du sol est fraîche, l'utilisation est isolé, bac et verger. La hauteur des arbres est de 500 cm, le type de plante est un arbre fruitier de type agrume, le type de végétation est vivace, le type de feuillage est persistant. Pour ce qui est de la méthode de multiplication est semis au chaud, greffe en fente sur citronnier ou bigaradier en Août ou en Septembre, ou greffe en écusson en Mai ou en Août, généralement il est intéressant de greffer un rameau de 2 ans. La taille est à l'intérieur, pincez les extrémités en mars des rameaux pour limiter le développement.

❖ Dans la présente recherche nous allons étudier le citronnier.

Le présent document est divisé en trois parties dont :

➤ La première concerne une synthèse bibliographique.

- Chapitre I : description de la plante.
- Chapitre II : le métabolisme secondaire.
- Le matériel et les méthodes sont rassemblés dans la deuxième partie.
- Ils sont suivis par les résultats et les discussions dans la troisième partie.
- L'étude est terminée par une conclusion générale et prescriptifs.

Chapitre I - Description de la plante :

I.1. La Famille des Rutacées :

Les *Rutacées* forment une famille de plantes appartenant à l'ordre des *Sapindales*. Selon Watson & Dallwitz, elle comprend 900 espèces réparties en 150 genres. Aujourd'hui la famille est plus grande (160 genres).

Ce sont des arbres, des arbustes ou plus rarement des plantes herbacées des régions tempérées à tropicales, producteurs d'huiles essentielles.

Les agrumes appartiennent à cette famille.

Les caractères morphologiques de cette famille sont assez variables. Le plus caractéristique est la présence de glandes à huiles essentielles visibles sur les feuilles sous la forme de points translucides.

Ce sont des arbres ou des arbustes, ou très rarement des plantes herbacées.

Les fruits sont des baies, des drupes, des samares, des capsules ou des follicules.

La plupart des plantes de cette famille sont toxiques, provoquant des troubles dermatologiques. En effet, les *Rutacées* sont riches en furanocoumarines photo sensibilisantes, qui sont responsables de manifestations phototoxiques. Le contact avec une plante de la famille (surtout les agrumes) ou l'un des produits qui en est issu : huile essentielle, produit cosmétique, etc., en présence de soleil, provoque un érythème, souvent suivi par la formation de vésicules qui fusionnent donnant naissance à des bulles. Par la suite, on peut observer une hyperpigmentation de la zone affectée due à la stimulation de la mélanogenèse. Ces réactions passent souvent inaperçues et sont souvent attribuées à des dermatites allergiques : impétigo, infection par les champignons,

Les plantes de la famille des *Rutacées* ayant pour nom latin *Rutaceae* et que l'on nomme communément la famille rue ou la famille agrumes, elle fait référence à une grande famille plus ou moins mille six cents espèces classées dans cent quarante genres de plantes dicotylédones.

La famille des *Rutacées* est célèbre par la présence de toutes les espèces d'agrumes inclut dans cette famille, elle est représentée par des arbres et des arbustes ligneux dont certains sont épineux et quelques plantes herbacées qui sont implantées des climats tempérés à tropicales de la planète.

Les *Rutacées* ou agrumes ont la particularité de produire des huiles essentielles que l'on extrait directement des glandes oléifères présentes sur leurs feuillages, qui ont l'aspect épars ou opposées avec des feuilles simples ou composées et sans stipules.

Les plantes de la famille des *Rutacées* possèdent une inflorescence en cyme ou grappe et parfois solitaire avec des fleurs radiales ou latérales, régulière et hermaphrodites, et donnant comme fruit assez varié allant de la baie à la drupe, de la samare à la capsule.



Figure 1 : Une fleur de la famille des *Rutacées*.

I.2. Classification de la famille *Rutacées* :

- Embranchement : *Spermatophytes*
- Sous Embranchement : *Angiospermes*.
- Classe : *Magnoliopsides (Dicotylédones)*.
- Ordre : *Rutales*.

I.3. Le genre *Citrus* :

Citrus est un genre de petits arbustes à fruits, qui rassemble la plupart des espèces d'agrumes. C'est un genre assez compliqué, car il existe plusieurs espèces, mais qui peuvent se mélanger entre elles (on dit qu'elles s'hybrident) pour former de nouvelles variétés. Certains des agrumes les plus courants appartiennent à ce genre.

Espèces	Caractères
Pamplemoussier (<i>Citrus grandis</i>)	Feuilles ailées, grandes, tiges grosses, peu épineuses, fruit très gros, sphérique, amer et consommable uniquement comme fruit confit ou en confiture.
Pomelo ou Grape-fruit (<i>Citrus paradisi</i>)	Grandes feuilles, fruits de grosseur moyenne, à écorce lisse, réunis en grappes.
Citronnier (<i>Citrus limon</i>)	Feuilles grandes, sans ailerons, peu brillantes, tige assez grosse plus ou moins épineuse. Fruit moyen, allongé, jaune clair, écorce lisse et mince.
Cédratier (<i>Citrus medica</i>)	Il se distingue par d'assez gros fruits et le <i>Citrus aurantifolia</i> plus sensible au gel que le précédent, à petits fruits, dénommé "Citron vert", actuellement très recherché.
Limettier (<i>Citrus latifolia</i>)	Feuilles grandes, sans ailerons, peu brillantes, tige assez grosse, plus ou moins épineuse, fruit gros, jaune clair, écorce épaisse et plus ou moins verruqueuse.

Tableau1 : Caractéristiques des 5 espèces du *Citrus limon*.

I.4. Description de l'espèce *Citrus limon* :

SWINGLE, (1948) signale que le genre *Citrus* contient plusieurs caractéristiques comme :

- c'est un arbre de petite taille dont les jeunes rameaux deviennent très rapidement cylindriques, épineux (épine simple à l'aisselle des fruits), mais dont les branches âgées sont fréquemment inermes.
- Ce même auteur souligne que les feuilles des folioles habituellement minces, non coriaces, dont les veines principales sont peu nombreuses et le réseau de veines secondaires ne ressort pas sur le limbe.
- Le pétiole est en général plus ou moins ailé et articulé avec le limbe (sauf dans le genre *C. medica*) à pétiole non ailé ou simplement marginé et non articulé avec le limbe. Pour ce qui est des fleurs ils apparaissent à l'aisselle des feuilles, elles sont solitaires ou en petites grappes corymbiformes, parfaites ou mâles par avortement plus ou moins complet du pistil.
- Le calice est en forme de coupe, a 4 ou 5 sépales, droite et abondamment pourvus de glandes.
- Les étamines sont en nombre généralement de quatre fois supérieurs à celui des pétales et parfois jusqu'à 6 à 10 fois plus nombreuses.
- Le disque nectarifère est petit.
- L'ovaire est sub-globuleux et bien distinct du style mince, ou tronqué, fusiforme ou sub-cylindrique passant progressivement à un style d'épaisseur voisine de celle de la partie

Supérieure de l'ovaire ; il comporte 8 à 18 loges (généralement 10 à 14) avec 4 à 8 ovules par loge, en deux rangs parallèles.

- Le style, cylindrique, se termine brusquement en un stigmate sub-globuleux ou en sphère aplatie.
- Pour ce qui est des fruits ils sont formés de segments contenant les graines placés dans l'angle intérieur, le reste de l'espace est rempli de poils vésiculaire pédonculés, fusiforme, composé de grosses cellules à contenu très aqueux.
- Les segments sont entourés d'un endocarpe blanc à l'extérieur duquel est une écorce à très nombreuses glandes à essence, devenant jaune ou rouge à maturité.
- Enfin pour ce qui est des graines ils sont obovales aplatie, plus ou moins anguleuses. Elles contiennent un ou plusieurs embryons blanc ou vert.

ESCLAPON, (1975) dit que la classification des espèces est basée sur les caractères botaniques propres à ces diverses espèces, dont les trois principaux genres de la sous-famille des Aurantioidées (*Poncirus*, *Citrus* et *Fortunella*) ont été rattachés aux groupes qui sont présentés dans les tableaux suivants.

I.5. Taxonomie de l'espèce :

I.5.1. Systématique classique :

La classification des agrumes est selon ADJDIR et BENSNOUSSI (2009) comme suite :

- Règne : Végétale
- Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Eudicotes*
- Sous classe : *Archichlomydeae*
- Ordre : *Geniales (Rutales)*
- Famille : *Rutaceae*
- Sous famille : *Aurantoideae*
- Tribu : *Citreae*
- Sous tribu : *Citrineae*
- Genre : *Citrus*

PRALORAN, (1971) souligne que la classification systématique des agrumes et des genres voisins est un problème que les spécialistes s'accordent à qualifier de complexe. Des divergences se manifestent entre les opinions de Swingle, Tanaka, Hume, Hodgson et Chapot en matière.

I.6. Variétés cultivées de Citronnier :

Selon REBOUR, (1966), Le Citronnier contient quelques variétés comme *Eureka*, *Lisbon*, *Lunari*, *Villafranca*, *Meyer* et *Vernia ou Berna pomelo*.

I.6.1. Variétés cultivées de Bigaradier : (*Citrus aurantium*)

Selon ESCLAPON, (1975) le Bigaradier avec ses divers clones est cultivé surtout pour les fleurs, les fruits, les feuilles et les brouts de taille, qui assurent la production (après distillation) de l'eau de fleur d'oranger, déconfitures (avec les fruits mûrs) et de vins apéritifs avec les fruits verts. C'est un excellent porte-greffe, car il est résistant à la Gommose et accepte les sols calcaires.

I.6.2. Variétés cultivées de Pomelo ou Grappe fruit : (*Citrus paradisi*)

PRALORON, (1971) souligne que c'est la seule espèce des agrumes qui ne soit pas originaire du sud-est Asiatique, puisqu'elle est apparue aux Antilles. Elle provient très certainement d'une mutation de bourgeon ou d'une hybridation du pamplemousse. Le pomelo n'est pas très sensible au froid que l'oranger, mais il a besoin de beaucoup de chaleur pour donner des fruits de bonne qualité. Selon ce même auteur deux types de pomelo existent c'est le pomelo à pulpe blonde (Var : Duncan, Marsh, Frost Marsh) et le pomelo à pulpe sanguins (Var : Foster, Redblush, Thompson, Shambar).

I.6.3. Variétés cultivées de Cédratier : (*Citrus medica*)

ESCLAPON, (1975) dit que les Cédratiers autrefois sont très cultivés, puis abandonnés, semble à la faveur de conditions économiques favorables. Ce fruit intéresse les producteurs de fruits confits et accessoirement ceux de la liqueur "Cédratine". Des essais de greffage réalisés avec des greffons sélectionnés, sur le *Citrus volkameriana*, comme pour le citronnier, donnent des sujets résistants à la gommose et productifs.

I.6.4. Variétés cultivées de Pamplemoussier : (*Citrus grandis*)

PRALORON, (1971) souligne que bien que cette espèce forme deux espèces différentes, le pamplemoussier et le pomelo sont assez étroitement apparentés et plusieurs auteurs considèrent que le pomelo n'est qu'une sous-espèce ou une variété botanique de *Citrus grandis*. Il se distingue par plusieurs caractères comme de jeune rameau et pétiole pubescents, axe creux, pulpe ferme et croquante, fruits volumineux, saveur très variable et pépin mono-embryonnés, leur importance commerciale est très limitée.

I.6.5. Variétés cultivées de Limettier :

ESCLAPON, (1975) signale que cette variété se cultive dans les sites les moins exposés au gel, on distingue : les Limettiers à gros fruits (*Citrus latifolia*), avec la variété Tahiti moins sensible au gel que les limettiers à petits fruits (*Citrus aurantifolia*).

I.6.6. Variétés cultivées de Lime :

Selon ESCLAPON, (1975) ils ont la taille d'un petit citron, se récolte principalement entre la fin Septembre et la fin Décembre lorsque sa peau est encore verte.

I.7. Culture du citronnier :

Citrus limon préfère un mélange légèrement acide, riche et drainant. On plante donc le citronnier dans un mélange dit de terreau pour agrumes, ou on fait un mélange comprenant environ 60 % de terreau, 30 % de terre de jardin, et 10 % de sable non calcaire.

Pendant la belle saison, le citronnier est mis à l'extérieur en plein soleil, avec un arrosage régulier et abondant, tout en laissant sécher le pot entre deux. Lorsque les feuilles se dressent vers le haut, il a soif, et lorsqu'elles sont toutes pendantes, c'est signe qu'il a eu trop d'eau. En hiver les arrosages sont plus espacés.

- ❖ C'est une plante gourmande qui demande de l'engrais riche en azote et potassium, une fois par mois, ainsi qu'un rempotage tous les 2 ou 3 ans.

I.8. Rendement :

BICHE, (2012) souligne que la production totale en Algérie des agrumes pour l'année 2007 a atteint 689.467 tonnes dont 539000 tonnes d'oranges, 100.000 tonnes en clémentines et en mandarine et 50.000 tonnes pour le citron et le pomelo. Ce même auteur signale que 97% de la production est destinée à la consommation en frais, la transformation est autour de 8000 tonnes par an. Dont les grandes zones de production par ordre d'importance sont la plaine de la Mitidja avec 44%, Habra Mascara avec 25%, le périmètre Bounamoussa et la plaine de SafSaf à Skikda avec 16% et le périmètre de la Mina et le Bas Chéelif avec 14 %. Le centre du pays occupe une surface de 39305 ha d'agrumes soit 62%, l'ouest représente 26% soit 16453 ha, l'est 9,7% représente par 6134 ha et 1404 ha pour le sud soit 2,2%.

I.9. Caractères botaniques :

- Famille: *Rutacées*
- Origine: sud-est asiatique
- Période de floraison: étalée
- Couleur des fleurs: blanche.
- Exposition: ensoleillée.
- Type de sol: riche et drainant
- Acidité du sol: acide à neutre
- Humidité du sol: frais
- Utilisation: potée, en extérieur hors-gel
- Hauteur: 6m maxi en pleine terre
- Type de plante: agrume
- Type de végétation: vivace
- Type de feuillage: persistant au-dessus de 2°C
- Rusticité: peu rustique, -5 °c
- Plantation, rempotage: printemps, été
- Méthode de multiplication: greffage, bouture.
- Espèces, variétés intéressantes: Le genre comprend environ 15 espèces mais des incertitudes persistent, tant il est hybridé depuis des millénaires.
- Maladies et ravageurs: cochenilles, maladies cryptogamiques.

I.10. Utilisations :

Le citron présente de nombreux bienfaits pour la santé. Antiseptique, astringent, antiscorbutique, reminéralisant, il stimule les défenses naturelles (d'où sa prescription en cas de rhume, de grippe), favorise la digestion, améliore la circulation sanguine, assouplit les articulations (efficace en cas de rhumatismes), et aide aussi à lutter contre les allergies et la fatigue car il est riche en vitamine C.

Par ailleurs, des études ont démontré des effets anti cancer et hypocholestérolémiant.

- **Traitement de fond** : consommation régulière de jus de citron dans l'alimentation.
- **Traitement des crises aiguës** : 2 cl de jus pour 5 cl d'eau chaude, avec éventuellement une gousse d'ail écrasée. A boire 3 fois par jour.
- **En usage externe** : Contre le rhume, la grippe, l'angine et la pharyngite.
- **Gargarismes** : 2 cl de jus dans 2 cl d'eau chaude. Boire 3 ou 4 fois par jour.

- **Nébulisation** : pour parfumer et désinfecter l'air ambiant.
- **Contre l'acné** : Appliquer du jus de citron sur les zones atteintes, tous les soirs après un nettoyage de la peau.

Chapitre II : Métabolisme secondaire

I. Définition :

Les plantes produisent un grand nombre de composés auxquels on ne suit pas toujours le rôle qu'ils jouent exactement pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultat des réactions chimiques ultérieures. On les appelle donc des métabolismes secondaires.

Un métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire, ce dernier est indispensable à la nutrition, il assure la croissance, le développement d'un organisme. Les métabolites primaires rassemblent les acides aminés, les lipides, les sucres ou les acides nucléiques, par exemple.

Les métabolites secondaires sont plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons. On les retrouve dans des compartiments particuliers ou à des moments précis de la vie.

Contrairement aux métabolites primaires, ils ne participent pas directement à l'assimilation des nutriments et donc, au développement de la plante. Ce pendant, ces composés ne sont pas totalement différents des métabolites primaires. F.A.T Barberan F., Ferreres and F., Tomas baic. (1985).

Les métabolites secondaires:

-Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress

Biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction.

-Ils sont différents dans les différentes espèces

Au contraire :

Les métabolites primaires:

-ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal

-se retrouvent dans toutes les espèces. (Buchanan, Cap. 24).

II. Fonctions des métabolites secondaires :

Ils ont des fonctions très différentes, exemples:

- ✓ Protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores (menthe par exemple)
- ✓ Attraction des pollinisateurs
- ✓ Ils participent à des réponses allélopathiques

(Compétition entre les plantes pour la germination et croissance)

- ✓ Ils sont des molécules qui sont aussi très utiles pour l'homme, comme colorants, arômes, antibiotiques, herbicides, drogues etc. (Buchanan, Cap. 24).

classes	origine	Nombre de structure
Terpénoides	L'IPP (isopentenylidiphosphate) Une molécule à C5	25000
Alcaloïdes	Acides Amines	12000
Molécules phénoliques	Voie de l'acide shikimique et acétate/malonate.	8000

Tableau. 2 : Les différents composés du métabolisme secondaire (Buchanan, Cap. 24).

III. Types et origine des métabolites secondaires :

III. 1 Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH). Il en existe environ 4500. On peut nommer dans cette famille les tanins, les coumarines, la lignine ou encore les flavonoïdes. Ces composés sont typiques des plantes vasculaires et ont colonisés l'environnement aérien. La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine. Gerhard Richter, (2006).

III .1.1 Les Flavonoïdes :

III.1.1.1 Définition :

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly phénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes.

Ils sont surtout abondantes chez les plantes supérieures particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composés ; mais ils peuvent également se trouver dans le règne animale les Glandes à sécrétion odoriférante du castor, la propolis des abeilles (la Chryisine, la Quercitrine, la Galangine) et dans les Ailes des papillons. Gerhard Richter, (2006).

Flavonoïdes	couleur
Flavones, flavonoles	jaune
Flavonones	Incolore jaune
Flavononoles	voire
Isoflavones	Ne prennent pas une seule couleur
Chalcones et Aurones	Jaune
Anthocyanidines	Rouge en milieu acide Bleu en milieu alcalin Violette, mauve rose

Tableau 3: la couleur de quelques classes des flavonoïdes.

III.1.1.2 Biosynthèse des flavonoïdes :

Il existe 2 vois pour la biosynthèse des flavonoïdes :

- la voie Shikimate : qui a deux enzymes clés (phénylalanine ammonialyase et tyrosine ammonialyase)
- la voie acétate-malonate : la chalcone synthétase est l'enzyme clé de cette voie.

II.1.1.2.1 Voie Shikimate :

Cette voie commence par l'acide phosphoenol pyruvique (pep) qui provient de la glycolyse et du D'érythrose-4-P provenant de la voie des pentoses.

Un composé intermédiaire de 7 atomes de carbones est issu de l'association de ces deux composés. La cyclisation donne l'acide hydro quinone (6C) qui se trouve à l'équilibre avec l'acide quinone.

La voie continue jusqu'à l'acide shikimique, il y a formation de l'acide chorismique en passant par 3 étapes, cet acide chorismique occupe une position clé dans ce métabolisme et son devenir est multiple :

-Réarrangement pericyclique du type clissé en acide périphérique.

-La transamination, au nom de la carboxylation, produit la tyrosine et la préphénylanine. La désamination de la phénylalanine par l'ammonia-lyase (PAL) produit l'acide cinnamique

-La désamination de la tyrosine conduit à l'acide hydroxycinnamique ou coumarique par la tyrosine ammonia-lyase (TAL)

-La réduction des acides cinnamique conduit à l'alcool coniférylique qui est un précurseur important des lignines. Ligin. Hai Sheng Chen., Zhea Bao Xiang., Shnan Gliang., Yong Sheng Jinand Jian Guo Liu Baic, (2007).

III.1.1.2.2 Voie acétate-malonate :

C'est une condensation d'un triacétate : la malonyl acyl coA qui fournit, par décarboxylation, des unités en (C₂) pour allonger le complexe acyle coA.

-L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalcone synthétase de trois molécules de malony-coA (noyau A) avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydrox cinnamique (noyau B). Le produit de la réaction est une chalcone, dans les conditions physiologique normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavonone racémique, la cyclisation de la chalcone catalysée par la chalcone synthétase, qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant ainsi à la seule (2-S) flavanone.

La complication biogénétique d'hydroxylation nucléaire, méthylation et glycosylation interviennent pour créer la diversité structurale des molécules flavonique. La dioxgénase catalyse l'hydroxylation de la (2-S) flavanone et qui induit :

L'hydroxylation de la (2-S) naringénine en (2-R-3-R) dihydrokaempférom et celle de (2-S) eryodictyol en (2-R-3-R) dihydroquercétol. La transformation des dihydroflavonols en flavonols

fait intervenir la déshydrate d'intermédiaire hydroxylé en 2. Ligin. Hai Sheng Chen., Zhea Bao Xiang., Shnan Gliang ., Yong Sheng Jinand Jian Guo Liu Baic., (2007).

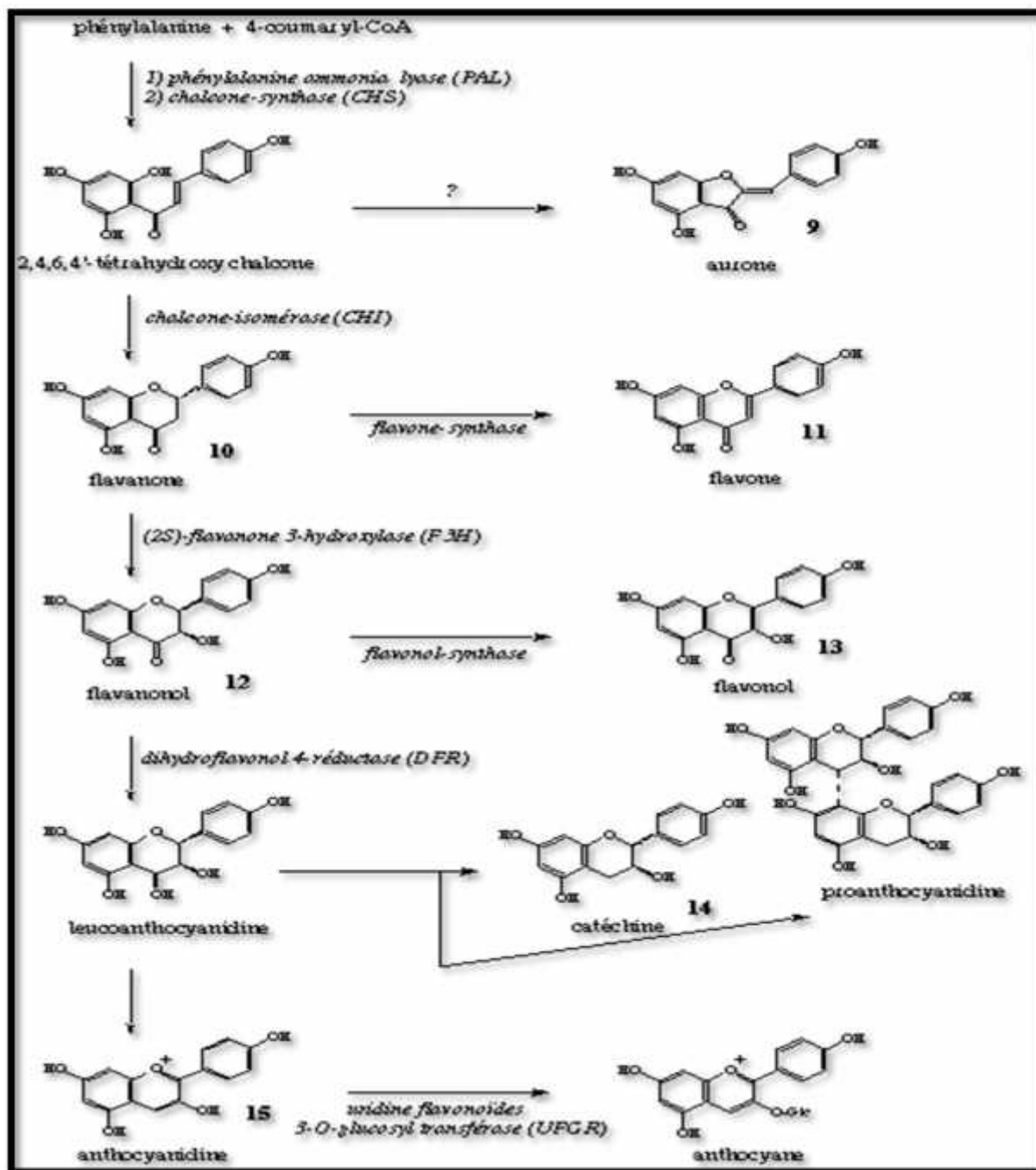


Figure 2: Schémas de la biosynthèse des Flavonoïdes.

III.1.1.3 Classes des Flavonoïdes :

III.1.1.3.1 Flavonones :

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2-C3 et par la présence d'un centre d'asymétrie, elle ne comporte pas le groupement OH en position C3. Ghgiabe Rym , Nezar Awatif ,Henni lamia.

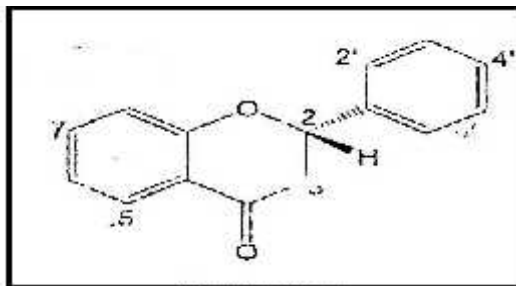


Figure 3 : Flavonones

III.1.1.3.2 Flavones :

Ils représentent 80% des Flavonoïdes connus, le noyau A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et C-7 libres ou estérifiés. Le noyau B est dans 80% des cas substitué en 4' ou di substitué en 3' et 4' ou encore tri substitué en 3', 4' et 5'. Les positions 2', 6' ne sont qu'exceptionnellement substitués ; les substituants sont de groupes -OH ou -OCH₃. La différence essentielle entre les Flavones et Flavonoles est la présence d'une oxygénation en C-3 dans les Flavonoles.

Il y a deux flavones communes, l'Apigénine et la Lutéoline (et leur dérivés), ils peuvent être reconnus sur le chromatogramme du forestal comme taches marrons sombres qui virent au jaune vert ou jaunissent en employant le gaz ammoniac fumant comme agent de révélation.

Il y a environ 34 Flavones rares qui peuvent être convenablement répartis en cinq classes dont les représentants sont : 5-Hydroxyflavone, Baicalein, 2'-Hydroxyflavone, C-Methylflavone, 5, 6, 7, 8-Tétrahydroxyflavone. La plupart d'entre elles ont des spectres d'absorption UV. Caractéristiques. Une condensation de l'Acétate Malonate et l'Acide Cinnamique est l'étape clé de la biosynthèse de certains composés Flavoniques. A. F. Barrero, E. Cabrera, I. Rodriguez, Eva M. Fernandez-Gallego, (1994).

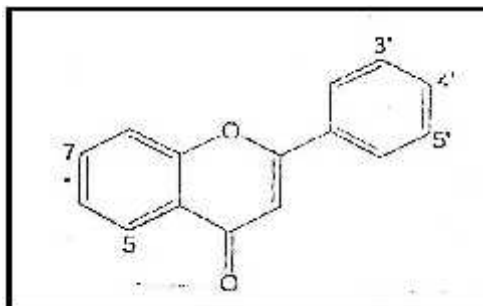


Figure 4 : Flavones.

III.1.1.3.3 Flavonoles :

Se distinguent des catéchines par la présence du OH en position 4 ils possèdent trois atomes de carbones asymétriques, et peuvent, théoriquement, exister sous forme de huit stéréoisomères Optiquement actifs, mais ces entités n'ont pu être isolées à l'état individuel stable. Ces composés réactifs sont les précurseurs des procyanidines oligomériques. Y. Aratanechemuge, H. Hibasami, K. Sanpin, H. Katsuuaki, K. Imai, T. Komiya, (2004).

III.1.1.3.4 Anthocyanes :

Ce sont des pigments rouges en milieu acide, virant au bleu en milieu alcaline ; ils sont très répandus dans les fleurs et les fruits.

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatique conjugués d'où l'absorption de lumière visible. Y. Aratanechemuge, H. Hibasami, K. Sanpin, H. Katsuuaki, K. Imai, T. Komiya, (2004).

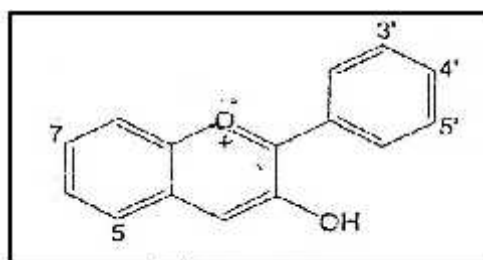


Figure 5 : Anthocynes

III.1.1.3.5 Chalcones :

Les Chalcones sont dépourvues de l'hétérocycle central. Elles sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarbonée cétonique. Le noyau B est assez fréquemment non substitué. Les sont

caractérisés par une structure de 2-Benzylidène-Coumaranone. F.A.T Barberan F. Ferreres and F. Tomas baic, (1985).

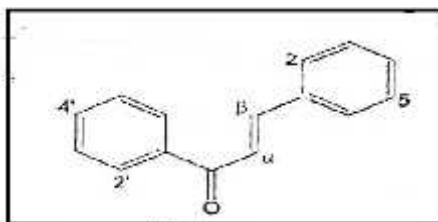


Figure 6: Chalcones

III.1.1.4 Intérêts des Flavonoïdes :

Les Flavonoïdes possèdent des caractéristiques particulières, pour la compréhension du monde végétal.

III.1.1.4.1 Intérêt biologique :

Ce rôle se représente sous deux aspects principaux :

III.1.1.4.1.1 Rôle attractif :

La variation de couleurs des fleurs est due à l'accumulation dans cellules de pigment capables d'absorber sélectivement la lumière visible. Dans d'autre cas, les pigments végétaux peuvent jouer un rôle répulsif vis-à-vis de pollinisateurs, par exemple les abeilles préfèrent les fleurs et jaunes, les papillons le rose et le blanc.

III.1.1.4.1.2 Rôle protecteur :

Les composés phénoliques contenus dans la plante disposent d'un système de défense efficace contre toute agression parasitaire ou abiotique .La fonction majeure des flavonoïdes est de servir d'Antioxydant pour les lipides et les poly acétylènes. J.B. Harbon., T.J.Mabuyand., H Mabuy., (1975).

III.1.1.4.2 Intérêt physiologique :

Grace au groupement hydroxyle les flavonoïdes s'attachent facilement à la surface des enzymes, donc ce sont des inhibiteurs de plusieurs systèmes enzymatiques par exemple :

-inhibition de l'estérase.

-inhibition de la hyaluronidase, ce qui permet la conservation de l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire.

-inhibition de l'histidine de carboxylase.

-inhibition non spécifique de la catéchol-o-méthyltransférerase, qui provoque l'élévation de la résistance vasculaire par l'augmentation de la catécholamine.

-inhibition de la phosphodiésterase.

-inhibition de le kaempferol par le quercetol.

-inhibition de l'aldose réductase, les flavonols monomère et bi flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de la lipo oxygénase ce qui est en relation directe avec leur capacité à piéger les radicaux libres. Ces propriétés expliquent les activités anti-inflammatoires et antiallergiques.

-la stimulation de la proline hydroxylase favorise l'établissement de pontage entre les fibres de collagène et renforcent leur acidité, leur stabilité en s'opposant à leur dénaturation. F.A.T Barberan., F. Ferreres., F. Tomas baic, (1985).

III.1.1.4.3 intérêt pharmacologique :

Grace à leurs propriétés thérapeutiques, les flavonoïdes sont classés comme des médicaments :

-Des protecteurs de la fragilité des capillaires sanguins (action de la vitamine p) qui est utilisé comme réductrice des hémorragies.

-Diminuent la perméabilité vasculaire.

-Traitement de certain cancer : certain flavonoïdes peuvent être efficace dans le cas de cancer de l'œsophage humain qui est le résultat de la consommation excessive des tanins de thé et des café.

-des inhibitions de l'adhésion, de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaire. Les phénomènes de la thrombose sont inhibés par la rutine et laquercetine.

-Les flavonoïdes peuvent être des : antispasmodique, anti-ulcèresgastrique, anti-inflammatoires, anti-allergique, hypocholestérolémiants,

Hepatoprotecteurs, anti-bactérienne, activité anti-virale, une activitéostéogène. J.Torel et Call., (1986).

-Les flavonoïdes ont des capacités anti-oxydante dépend de ses affinité pour les radicaux libres de sa structure. La présence de deux hydroxyles en ortho sur le noyau B, la conjugaison du noyau B au groupe oxo en 4 et la double liaison en 2.3 sont des éléments favorables. Kevilie .Kath, (1995).

III.1.1.4.4 Intérêt économique :

-Ils sont utilisés dans l'industrie cosmétique puisque les dérivés de la lutéoline réduisent l'hyperpigmentation de la peau.

-Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour prévenir le rancissement des lipides. Boukezzat H., (1998).

III.1.1.5 Distribution des Flavonoïdes :

La diversité structurale des Flavonoïdes est maximales chez les Angiospermes (une trentaine types Flavonoïdes ont être identifiés chez les Astéracée) ainsi que chez les Gymnospermes, les proutocyanidoles sont remarquablement constants .Les -O-hétérosides

Flavonoïdes dominent chez les fougères, pour certaines on trouve Chalcones ou deprontocyanidoles, les psylotales et seloginellales étant caractérisées par la présence de Biflavonoïdes. Les O et C-hétérosides Flavonique et les dérivés O-auroniques sont fréquents chez les Bryophytes (mousses), enfin la présence de Flavonoïdes chez les Algues n'a pas été démontrée. Brune Ton J., (1993).

III.1.1.6 Localisation :

Les Flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles, et selon les espèces se concentrent dans l'épiderme des feuilles, ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile, dans le cas fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques. Brune Ton J., (1993).



*MTERILS ET
METHODES*

Matériels et méthodes :

Partie III : MATERIELS ET METHODES

I. Matériel végétale utilisé :

Notre étude est portée sur deux organes (feuilles et fleurs) de la plante citronnier de la famille : *Rutaceae*

Nous nous sommes intéressés par les métabolites secondaires plus précis les flavonoïdes de la plante.

I.1 Zone de Récolte:

Nos différents organes utilisés :

- ✓ feuilles de la plante de Citronnier utilisés au cours de notre étude ont été récoltées dans un jardin de Bni Hmidane et un jardin à belle vue à Constantine et aussi a Zouaghi.
- ✓ les fleurs ont été récoltées à l'ITAF du Hamma Bouziane à Constantine.

Les feuilles récoltées durant la période du 25 Mars-01 Avril, en raison de la richesse de la plante utilisée en composés de métabolisme secondaire (flavonoïdes).

Nos échantillons sont laissées sécher à l'ombre (pour garder la chlorophylle) et dans une température ambiante 25-30°C pendant 15 jours.



Figure 7: Fleurs et feuilles du Citronnier.

I.2 conservation :

Les différentes organes de citronnier sont nettoyées, séchées à l'ombre et à température ambiante puis stockées (conservées) à l'abri de la lumière. Les parties utilisées sont : fleurs, feuilles.

Matériels et méthodes :

I.3 broyage de parties sèches :

Les différentes parties de l'espèce sont broyées finement et entièrement à l'aide d'un moulin électrique.



Figure 8 : Moulin électrique



Figure 9 : Fleurs broyées



Figure 10 : Feuilles broyées

II. Criblage des flavonoïdes :

La mise en évidence des flavonoïdes peut être effectuée par des tests simples et rapides (réactions à la cyanidine). Krumi et al, (2004), in Amirech, (2013).

Dans un premier temps on prépare l'extrait hydroalcoolique de chaque partie de la plante (feuilles, fleurs). A partir de 1g de matériel végétale coupé et broyé, on rajoute

Matériels et méthodes :

10ml d'un mélange méthanol/eau (7/3), le rapport solvant/matériel végétale utilisé est 10/1 (ml/g).

Après 24h on filtre le broyat sur papier filtre, après on ajoute 10 ml de cyclohexane à notre filtrat pendant 24h pour éliminer la chlorophylle, seulement l'extrait des feuilles sont des pigments les fleurs ne contiennent pas de la chlorophylle.

Le tube 1 sera comme témoin

Dans le deuxième tube on ajoute quelques gouttes de Hcl concentré à 50%, on laisse agir 5 minutes. La coloration rouge implique la présence des flavonoïdes, coloration rouge pourpre implique la présence des flavonols et la coloration rouge violacée implique la présence des Flavonones et flavonols

Dans le troisième tube on ajoute quelques gouttes d'Hcl et 1 ml d'eau distillé et 1 ml d'alcool isoamilique, c'est la coloration de la phase supérieure qui est prise en compte.

Dans le quatrième tube on ajoute 0.5 ml d' Hcl puis on le met dans le bain marie pendant 30 minutes. La coloration rouge implique la présence de leuco anthocyanes.

Matériels et méthodes :

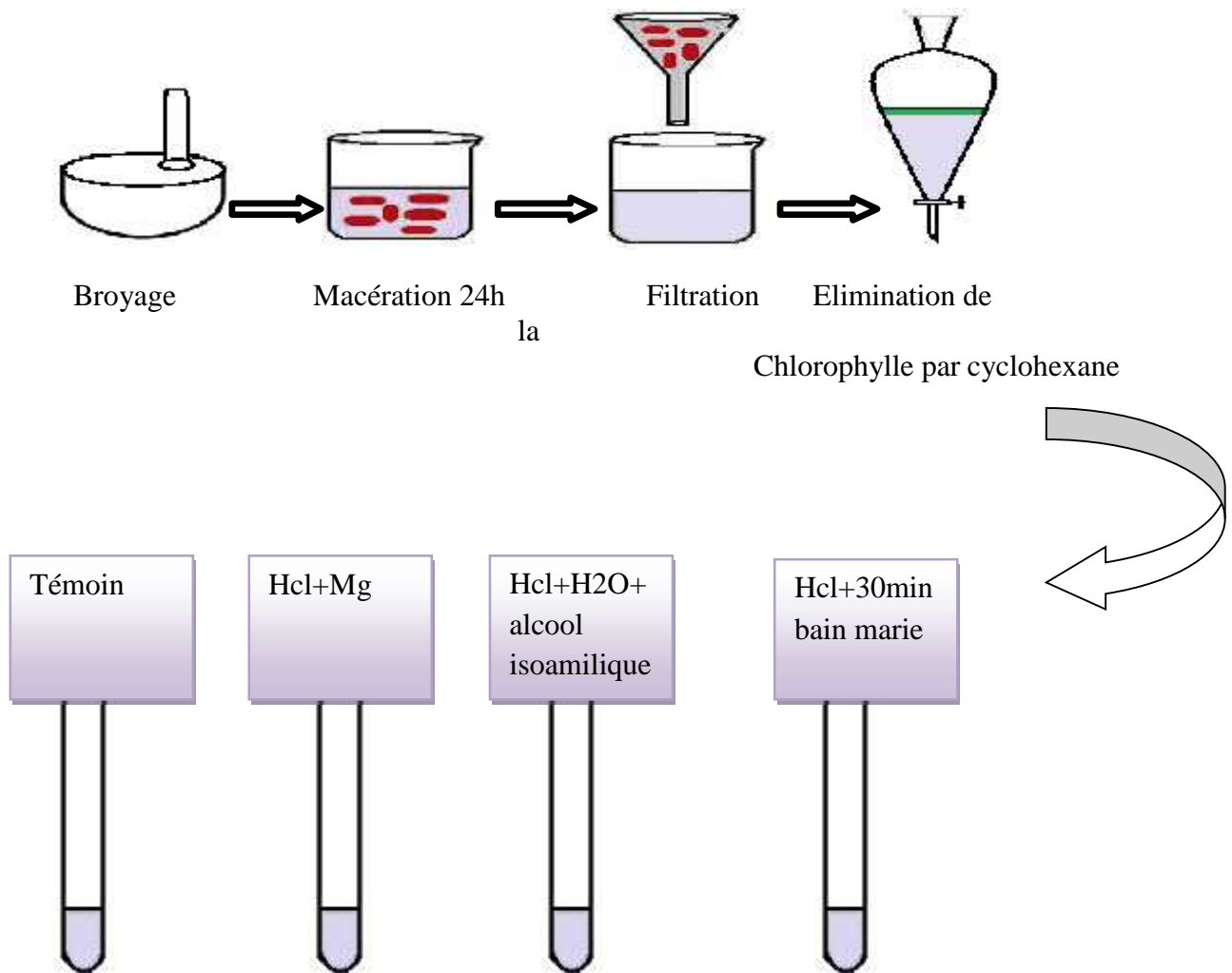


Figure 11 : Protocole de screening phytochimique des flavonoïdes réalisés sur les différents organes de Citronnier (feuilles et fleurs). (Chadi Jalal, 2014)

Matériels et méthodes :

III. Dosage des flavonoïdes :

Pour l'extrait des feuilles on a utilisé 50g du matériel végétal et pour les fleurs on a utilisé 20g. Le rapport matériel végétal-solvant utilisé était 1g-10ml et le rapport du mélange méthanol-eau : 7-3(V/V).

Les flavonoïdes contenus dans les extraits méthanoliques du Citronnier sont estimés par la méthode d'ALCL₃.

- 1ml d'une solution éthanolique d'ALCL₃ (2) est ajouté à 1ml de l'extrait de la plante.
- Après 30min d'incubation à une température ambiante l'absorbance du mélange est lue à 420nm.

IV. Extraction des flavonoïdes :

IV.1. Macération et préparation des extraits éthanolique et méthanoliques

IV.1.1. Méthode d'extraction :

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenus dans les parties aériennes de la plante en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

IV.1.2 .Protocol d'extraction :

Suivant le Protocol d'extraction décrit par Mergheme et al, (1995), le matériel végétal broyé feuilles (50g) et fleurs (20g) est soumis à une extraction par macération dans un mélange méthanol/eau et un autre éthanol /eau distillée (7/3 : V/V) pendant 72 heures (pour éliminer les résines qui peut gêner la suite des opérations) avec renouvellement du solvant chaque 24h et agitation de temps en temps.

- Le rapport matériel végétal/solvant utilisé était : 1g/10ml.
- Le mélange méthanol/eau 7/3(V/V).

Pour 50g de la poudre du matériel végétal on a utilisé comme mélange MeOH/eau : 350/150 : V/V.

Matériels et méthodes :



Macération pendant 72h dans un mélange MeOH et EtOH



Renouvellement du solvant chaque 24h et agitation de temps en temps.



Matériels et méthodes :

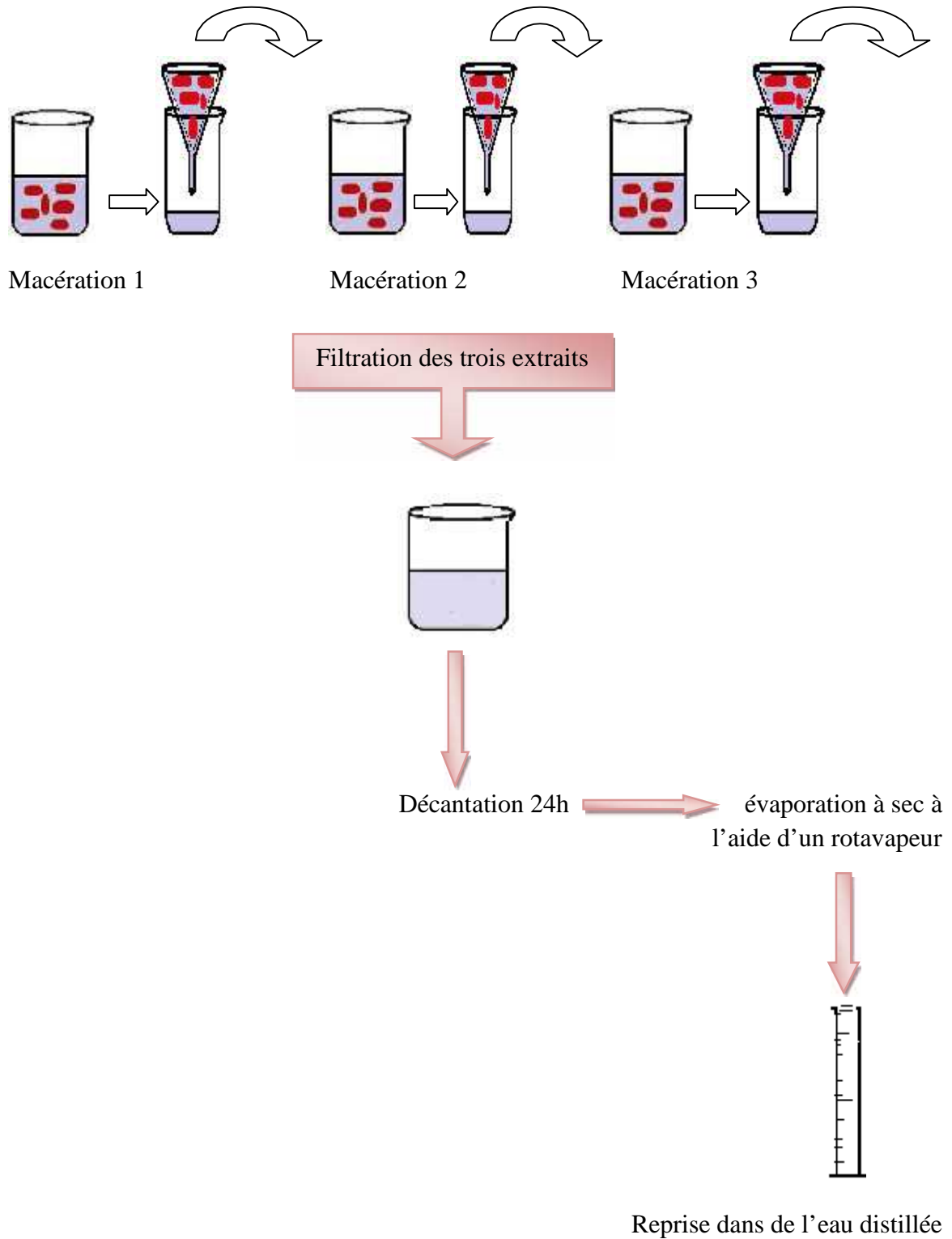


Figure 12: Protocol de préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques.
Chadi Jalal, (2014).

Matériels et méthodes :

Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif à 50°C.

Le résidu sec est repris dans 100ml d'eau distillée (pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation).

IV.2. Fractionnement des extraits bruts Extraction Liquide-Liquide (ELL) :

L'objectif de cette étape est d'identifier les flavonoïdes présents dans notre extrait ainsi pour déterminer la richesse du Citronnier en ces composés. On a utilisé Ether de Pétrole, Ether di éthylique, acétate d'éthyle et le Butanol .Ces derniers sont des solvants de polarité différente allant du moins polaire au plus polaire.

- L'affrontement de la phase éther de pétrole contient les composés non phénoliques (les acides gras, les huiles, la chlorophylle...). Cette phase est rejetée.
- L'affrontement de la phase éther di éthylique soutirait les aglycones.
- L'affrontement de la phase acétate d'éthyle soutirait les flavonoïdes non glycolysés.
- L'affrontement de la phase Butanol soutirait les flavonoïdes di-glycolysés et les flavonoïdes tri-glycolysés.
- L'affrontement de la phase aqueuse contenait les flavonoïdes non saturés.

Les extraits EtOH et MeOH ont été ramenés à un volume de 100ml dans l'eau distillée, la même quantité du solvant à été utilisée (1/1 : V/V).

- Agiter bien la phase aqueuse et le solvant et laisser 24h au repos dans des ampoules à décantation avec des supports.
- Après chaque 24h, on a récupérer chaque phase et l'évaporée et récupérée avec 5ml du méthanol.

Matériels et méthodes :

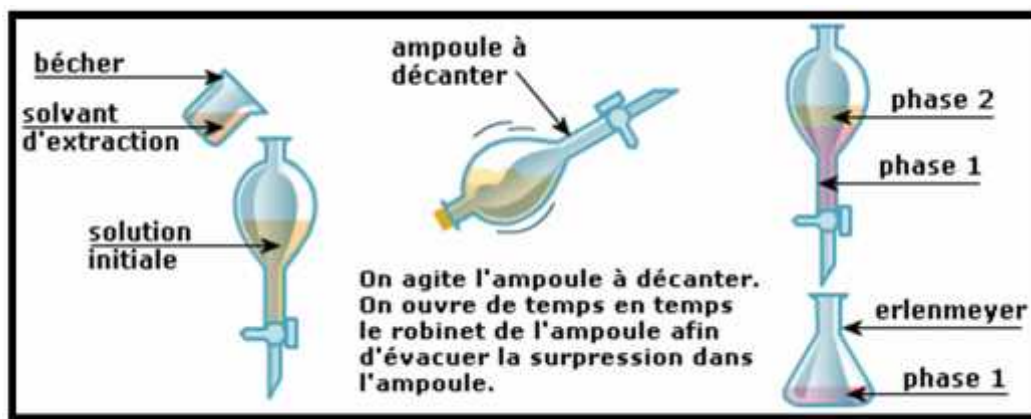


Figure 13 : Protocol des fractionnements des extraits bruts par ELL.

IV.3. Séparation des extraits bruts MeOH et EtOH par chromatographie sur couche mince (CCM):

La chromatographie est aujourd'hui une méthode largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans le mélange complexe (analyse qualitative et quantitative). Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité et la charge électrique.

IV.3.1. Principe :

La chromatographie sur couche mince est une technique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et l'identification des métabolites.

C'est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvants) le long d'une phase stationnaire (gel de polyamide, gel de silice, alumine) maintenir sur une plaque en verre ou en pastique rigid en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. La révélation se fait sous contrôle UV ou à la suite pulvérisation de réactifs spécifiques pour les composés recherchés.

La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tels que :

- **Une cuve chromatographique:** c'est un récipient en verre, de forme variable (selon les manipulations à effectuer) fermé par un couvercle

Matériels et méthodes :

maintenu étanche .

- **Une phase stationnaire:** c'est une couche d'adsorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 20 x 10 cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm. La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice : 60G ; 20x20cm a 0.5cm d'épaisseur sont commercialisées.
- **La phase mobile:** c'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.

Lors du choix de la phase mobile pour le développement des plaques de CCM, il est important de s'assurer que le solvant ne réagit pas chimiquement avec les substances du mélange à analyser. Dans notre analyse nous avons utilisé le système suivant:

Butanol / Acide acétique / H₂O : 60V / 15V/ 75V.

IV.3.2. Depots:

Le dépôt des échantillons à séparer est l'étape la plus délicate. Il s'effectue à l'aide d'un capillaire. On dépose de façon perpendiculaire quelques microlitres d'échantillon et on sèche (pour éviter la diffusion de la tache) et on fait évaporer le solvant. On répète l'opération plusieurs fois.

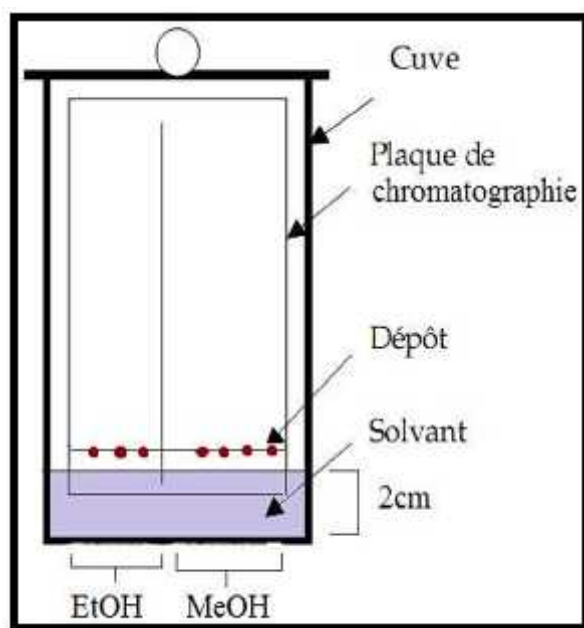


Figure 14: Schéma de l'analyse CCM des flavonoids des extraits des feuilles et des fleurs du Citron.

Matériels et méthodes :

IV.3.3. Développement des plaques:

La plaque est déposée verticalement dans la phase mobile constituée, comme indiqué auparavant, par un ou plusieurs solvants organiques. Pour une bonne élution, la cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée, le solvant monte par capillarité, et les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes.

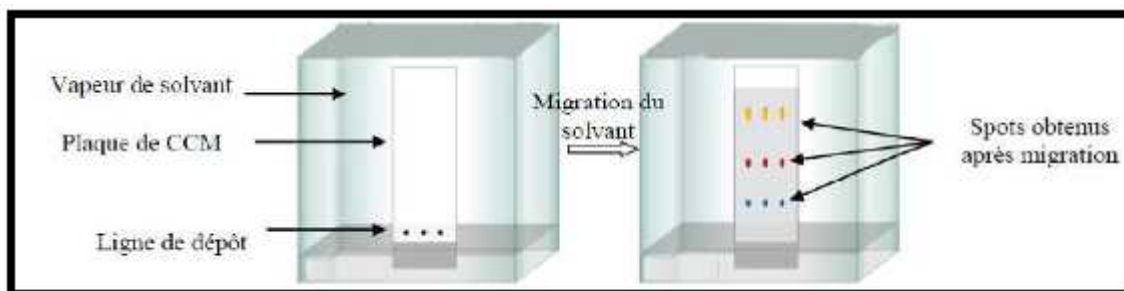


Figure 15 : Migration des constituants de l'extrait lors d'une CCM analytique.

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est retirée puis séchée à température ambiante puis examinée à l'œil nu, soit sous l'UV dans une chambre noire, ou après pulvérisation avec des réactifs spécifiques.

IV.3.4. Révélation des plaques (Visualisation des tâches) :

Après le développement et l'évaporation du solvant de migration les tâches sont visualisées.

- A l'œil nu
- Sous l'UV à 250nm et à 365nm.

V. Etude de l'activité antibactérienne :

V.1.Objectif :

On réalise des testes sur deux souches bactériennes afin de déterminer la préparation qui contient la bactérie Gram positif et Gram négatif la plus inhibitrice et ainsi évaluer ses composés flavoniques en faisant un contact direct avec un milieu solide.

Matériels et méthodes :

V.2.Principe

L'activité est déterminée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition (halo ou auréole d'inhibition) de la croissance microbienne qui apparaît autour d'un disque imprégné d'une substance active.

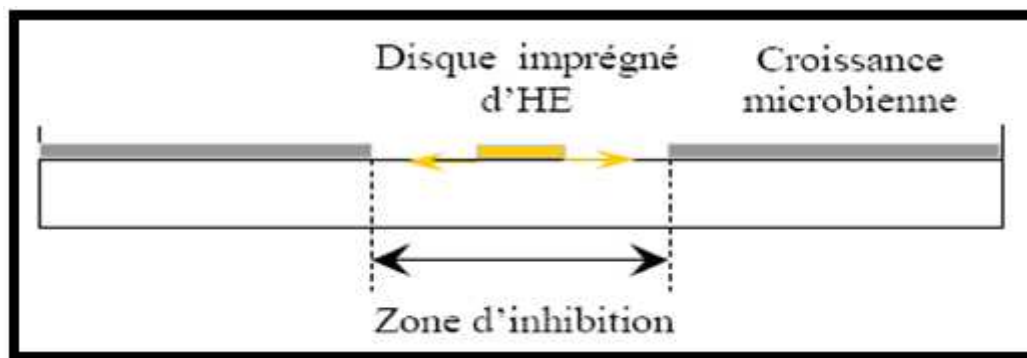


Figure 16 : Schéma simplifié du principe de la méthode des disques

V.3. Préparation des souches bactériennes :

Les souches bactériennes proviennent du laboratoire de l'hôpital « Boudrae Salah – Constantine » (Algérie).

Il s'agit des espèces suivantes :

Nom	Classe
<i>E. coli</i>	Gram négatif
<i>Staphylococcies aureus</i>	Gram positif

➤ Les souches bactériennes sontensemencées dans de bouillons nutritifs :

- ❖ *E. coli* (Hechtoen, GN)
- ❖ *Staphylococcies aureus* (Chapman, GN)

Ces derniers sont incubés dans le milieu nutritif à 37°C pendant 3 jours pour optimiser leurs croissance.

➤ La détermination de l'activité antibactérienne d'une substance est effectuée par la méthode de diffusion en milieu solide ou méthode des disques.

Matériels et méthodes :

V.4. Culture des bactéries :

Dans cette manipulation on a utilisé un extrait méthanolique obtenu à partir des feuilles et des fleurs du Citron.

Le test comprend quatre étapes :

- Première étape : Afin de s'assurer de leur pureté, les souches conservées dans les conditions du laboratoire sont repiquées en boîte de Pétri sur le milieu gélosé adéquat, à savoir le milieu de MUELLER HINTON pour *Escherichia coli*, et *Staphylococcus aureus*.
- Deuxième étape : La pureté des souches étant vérifiée par l'obtention de colonies homogènes, une ansée de colonie est mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Une dilution appropriée est effectuée jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) égale à 0,125, équivalent à 10^6 germes/ml.

Selon la technique d'inondation, la suspension bactérienne est ensemencée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu approprié pour chaque germe. Les boîtes ensemencées sont laissées quelques minutes sur la paillasse pour que les bactéries se fixent à la surface du milieu de culture, puis l'excès de suspension est aspiré à l'aide d'une pipette stérile.

- Troisième étape : Les disques de papier filtre stérile sont déposés sur les milieux ensemencés à l'aide d'une pince fine stérile. L'extrait à étudier de concentration bien déterminée et préalablement filtré est déposé sur les disques d'antibiogramme.

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h pour *Escherichia coli*, et *Staphylococcus aureus*.

- Quatrième étape : Les diamètres des halos d'inhibition sont mesurés et les résultats sont lus selon les normes préconisées par l'IPM.

Matériels et méthodes :

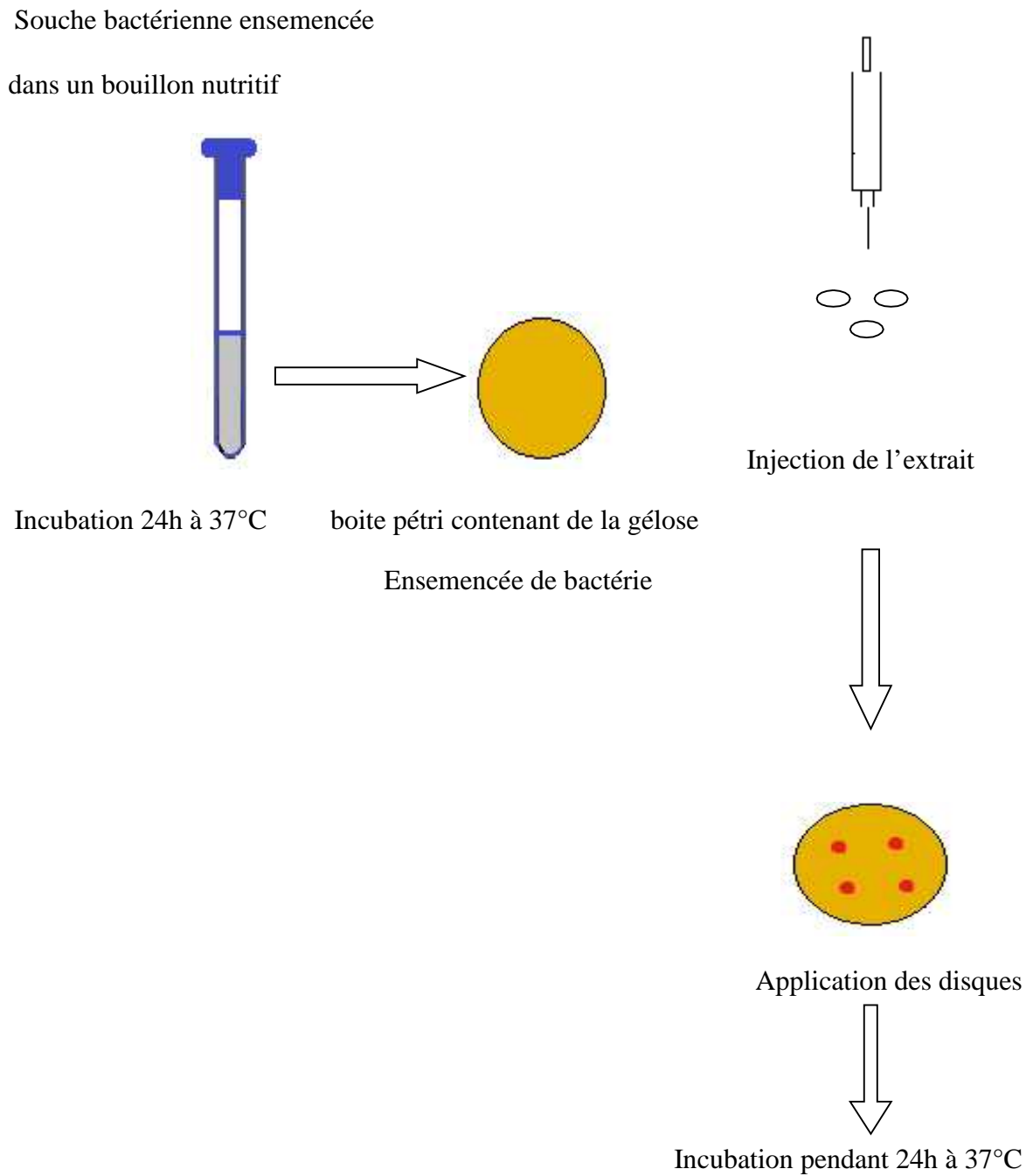


Figure 17 : Protocol du test de l'activité antibactérienne des extraits (Techniques des disques). Amirech,(2013)



*RESULTATS ET
DISCUSSION*

Résultat et discussions

Résultats et discussions :

I. Criblage de flavonoïdes :

I.1. Résultats :

Les résultats de criblages des flavonoïdes sont classés selon l'apparition en :

- Réaction très positive : ++++
- Réaction positive : +++
- Réaction moyennement positive : +
- Réaction négative : -

Les Tests	La couleur	Feuilles	Fleurs
Témoin		-	-
Test 1 (flavonoïdes libres)	Rouge	+++	+++
Test 2 (anthocyanes)		-	-
Test 3 (leuco anthocyane)	Rouge pourpre	+++	+++

Tableau 4 : Résultats des tests

- Témoin : extrait des feuilles ou des fleurs seulement.
- Test 1 : quelques gouttes de l'Hcl + quelques cristaux de Mg (test de wilstater).
- Test 2 : 0,5 ml d'Hcl (5%) + 1ml H₂O + 1ml alcool iso-amélique.
- Test 3 : 0,5 ml Hcl + mettre au bain marie 30 minute (Bate-Smith).

Résultat et discussions







Les réactifs	Feuilles	Fleurs
Test 1 : 0,5 ml HCl + quelque cristaux de Mg.		
Test 2 : 0,5 ml HCl + 1 ml H ₂ O + 1 ml alcool isoamérique.		
Test 3 : 0,5 ml HCl mettre au bain marie 30 min.		

Tableau 5 : Les résultats de criblages des flavonoïdes des feuilles et des fleurs de *Citrus limon*.

Résultat et discussions

I.2. Discussion :

Pour déterminer la présence des flavonoïdes dans notre plante « *Citrus limon* » précisément dans les feuilles et les fleurs, nous avons réalisé le criblage photochimique au niveau de ces organes. (Les 3 tests)

- La couleur rouge indique que l'Hcl réduit les flavonoïdes en Anthocyanidine avec l'élimination d'une molécule de l'H₂O.

Selon ces résultats, les feuilles et les fleurs contiennent les différents types de molécules du métabolisme secondaire comme : les flavonoïdes, les anthocyanes et les leuco anthocyan.

II. Dosage des flavonoïdes :

II.1. Résultats :

L'étude quantitative des extraits méthanoliques bruts MeOH, au moyen des dosages spectrophotométrique, avait pour objectif de déterminer la teneur totale des flavonoïdes chez le *Citrus limon* (feuilles et fleurs).

Une courbe d'étalonnage a été tracée pour cet objectif, réalisée avec un extrait de quercétine à différentes concentrations, des mesures de densité pour l'extrait sont réalisées à 420nm. Amirech, (2013).

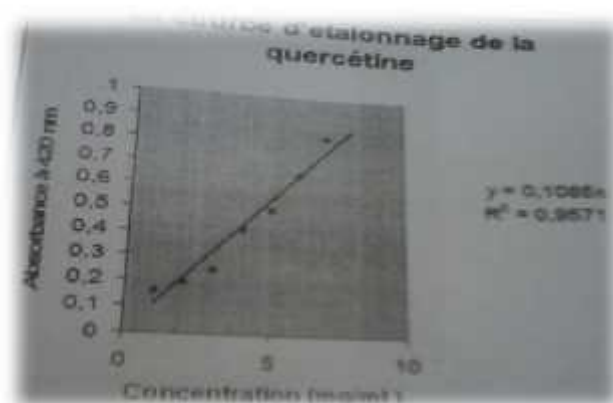


Figure 18 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes. Amirech, Y. (2013).

Résultat et discussions

La quantité des flavonoïdes correspondants ont été en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminé par l'équation de type : $(y = ax + b)$.

	Répétition	Absorbance
Extrait brut des feuilles	A1	0,256
	A2	0,252
	A3	0,346
	Moyenne	0,284
Extrait brut des fleurs	A1	0,140
	A2	0,172
	A3	0,179
	Moyenne	0,163

Tableau 6 : Absorbance lues au spectrophotomètre à 420nm.

- Le total des composés flavonoïdiques est déterminé selon l'équation suivante :

$$T = C.V/M$$

C : La concentration d'extrait méthanolique équivalente à la quercétine qu'on obtient à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : le volume d'extrait méthanolique (ml).

M : le poids sec d'extrait méthanolique de la plante (g).

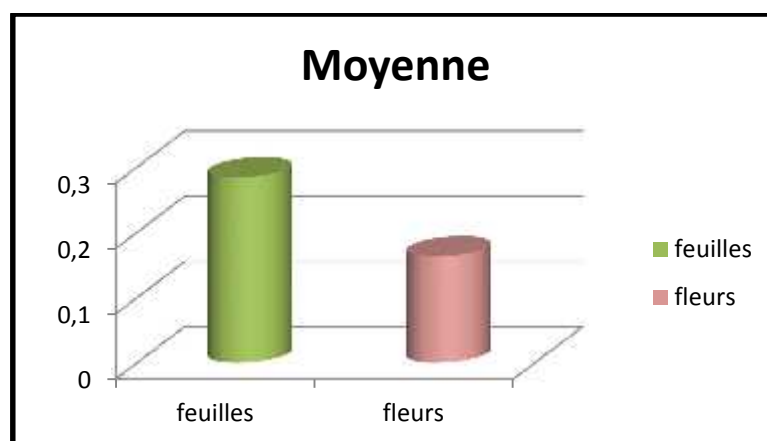


Figure 19 : Contenu relatif des flavonoïdes des feuilles et des fleurs de *Citrus limon*.

Les résultats obtenus par la méthode d' $AlCl_3$ montrent que les organes étudiés (feuilles et fleurs) contiennent des flavonoïdes avec des proportions variantes et inégales.

Résultat et discussions

Les feuilles du *Citrus limon* sont plus riches en flavonoïdes que les fleurs.

II.2. Discussion :

Selon Ebrahim zadeh et al. (2008), la quantité de flavonoïdes dans différents organes de la plante dépend de plusieurs facteurs tel que :

- ✓ L'origine.
- ✓ La variété.
- ✓ La saison de culture.
- ✓ La saison de récolte.
- ✓ Les différentes maladies qui peuvent affecter la plante.
- ✓ Les conditions climatiques.
- ✓ La durée de conservation.

Les auteurs Falleh., Gehin et al ; (2006), montrent que la répartition des composés phénoliques et flavonoidiques dans les différents organes d'une plante est inégale.

On remarque que les feuilles de *Citrus limon* sont quantitativement plus riches en flavonoïdes que les fleurs.

Cette répartition inégale des flavonoïdes pourrait s'expliquer par le fait de l'utilisation de l'étuve pour accélérer le séchage des fleurs (parce que dans la période de floraison, les fleurs sont très riches en composés du métabolisme secondaire précisément les flavonoïdes).

III. Séparation des extraits bruts MeOH et EtOH par la CCM :

III.1. Résultats :

Le développement de la chromatographie sur couche mince dépend de l'éluant utilisé.

- On a utilisé dans notre CCM le système solvant suivant : (Butanol/acide acétique/eau distillée, 60ml/15ml/15ml) sous une lumière d'UV (250nm) et (365nm).

Résultat et discussions

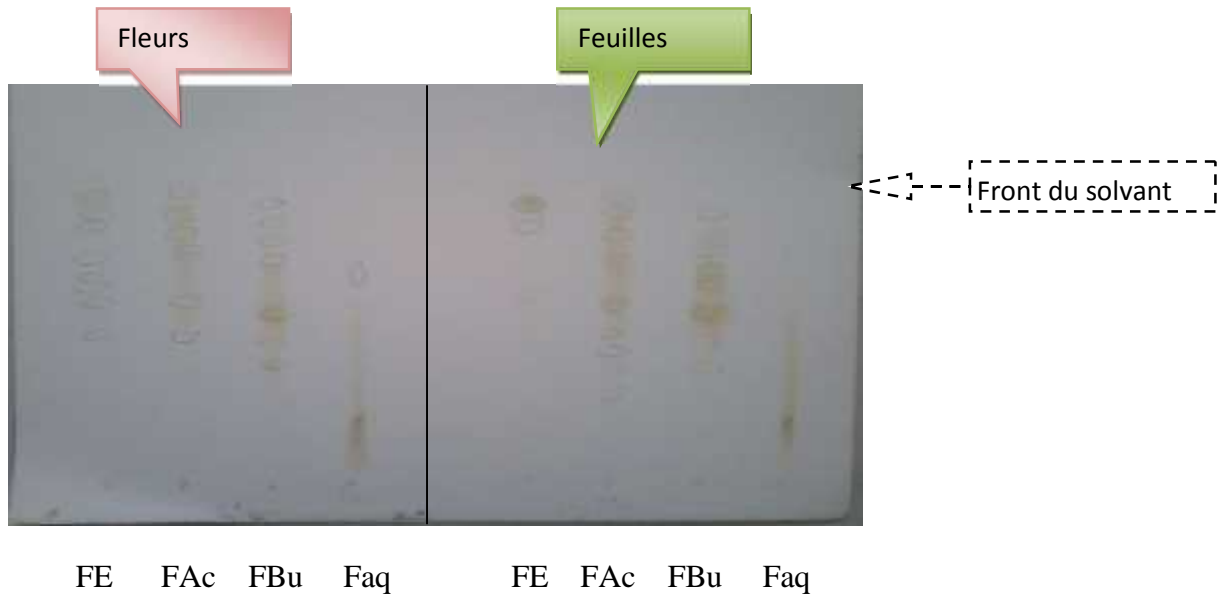


Figure 20 : Détection visible du chromatogramme des différentes phases d'un extrait méthanolique chez *Citrus limon*.

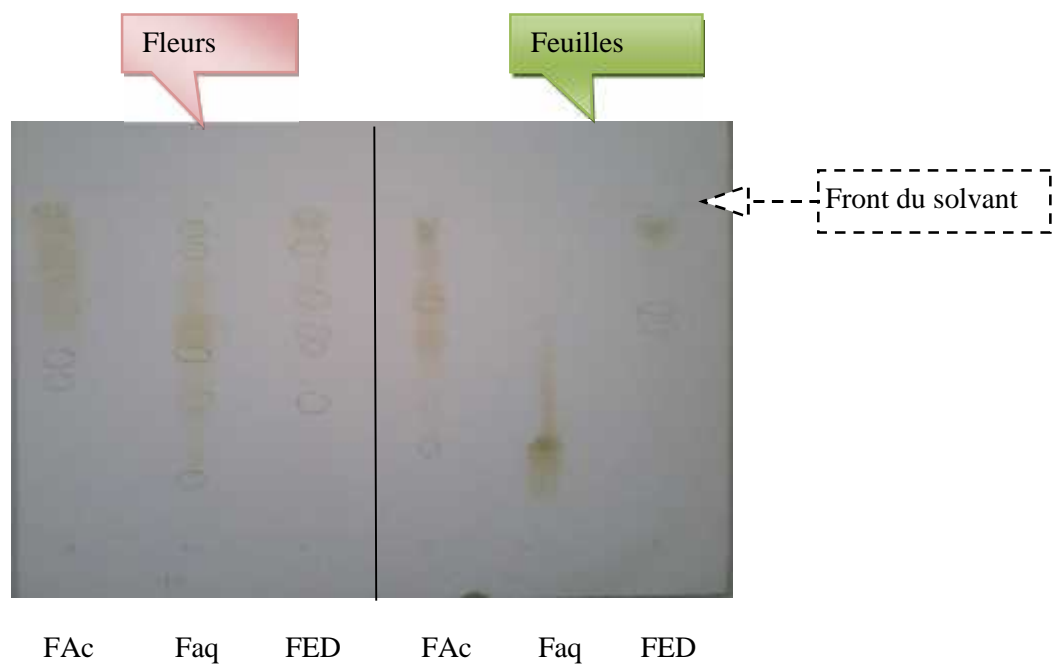


Figure 21 : Détection visible du chromatogramme des différentes phases d'un extrait éthanolique chez *Citrus limon*.

FE : fraction éther FAc : fraction acétate FBu : fraction butanol Faq : fraction aqueuse

Résultat et discussions

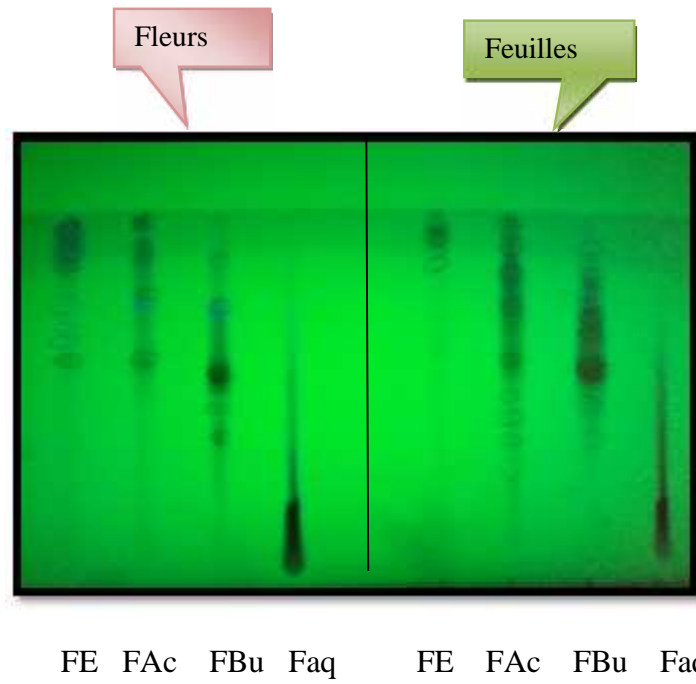


Figure 22 : Révélation par UV (250nm) d'un extrait méthanolique.

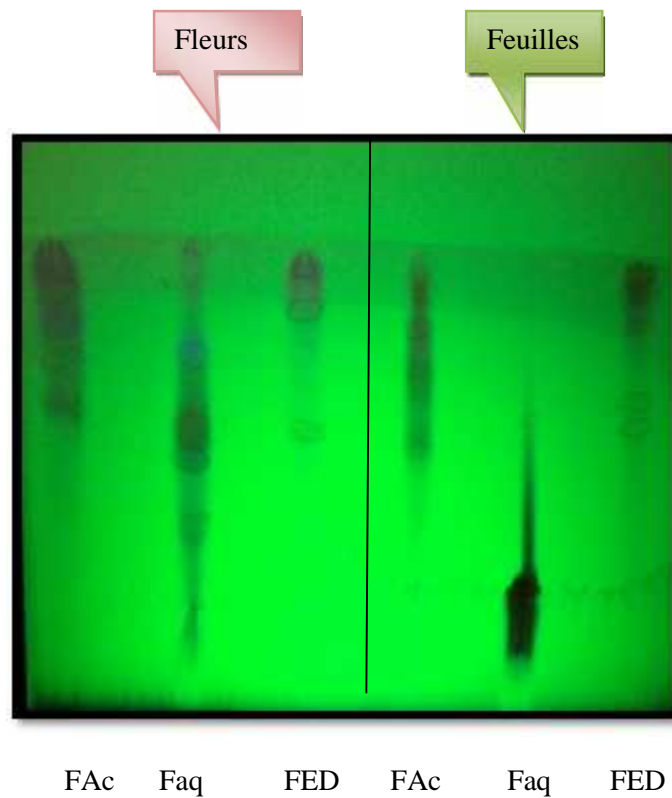


Figure 23 : Révélation par UV (250nm) d'un extrait éthanolique.

Résultat et discussions

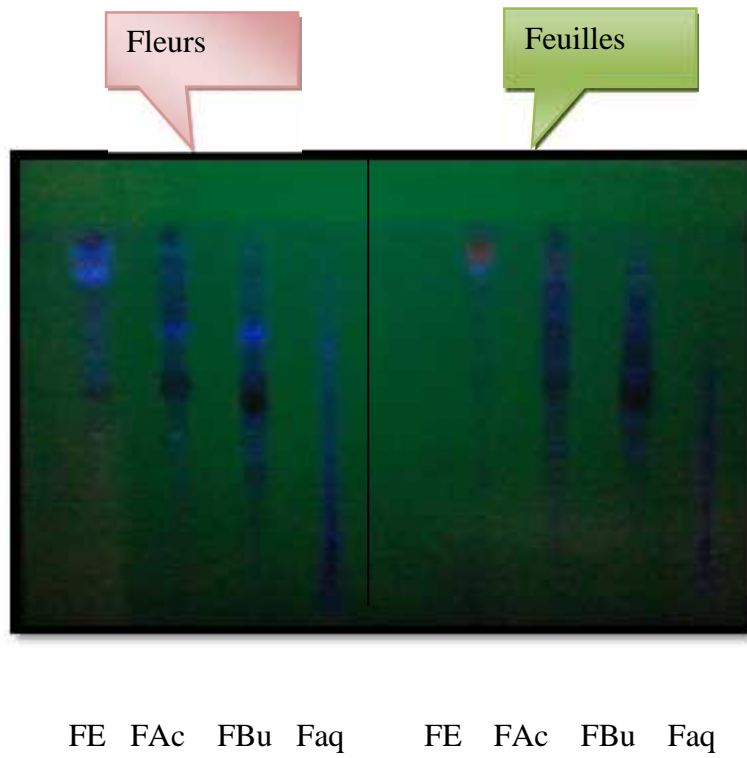


Figure 24 : Révélation par UV (365nm) d'un extrait méthanolique.

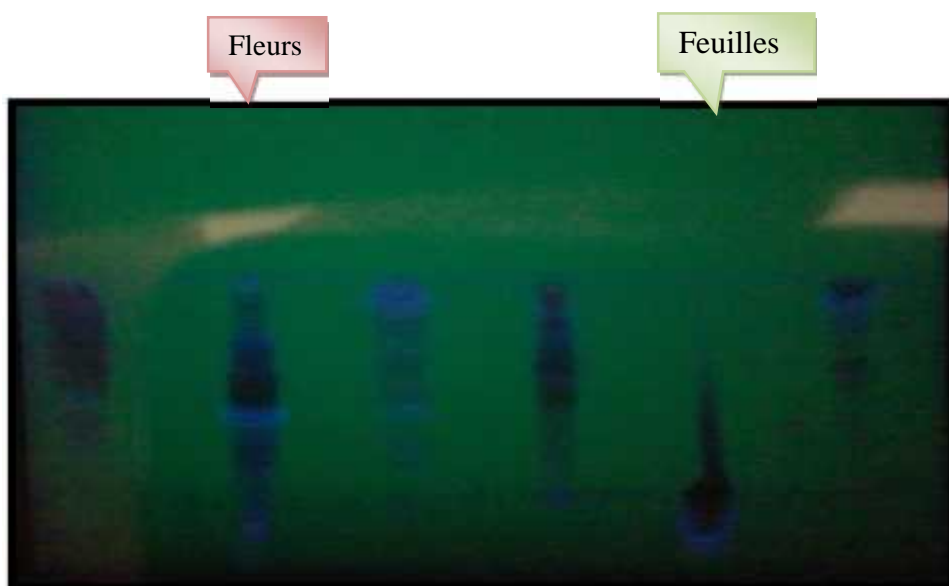


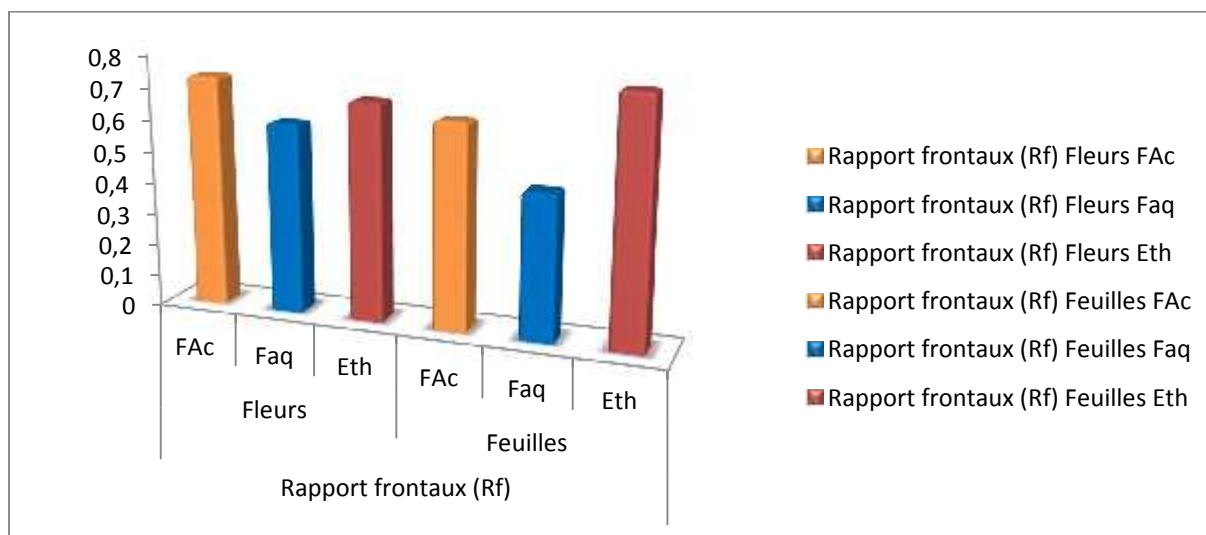
Figure 25 : Révélation par UV (365nm) d'un extrait éthanolique.

Résultat et discussions

	Rapport frontaux (Rf)					
	Fleurs			Feuilles		
	FAC	Faq	Eth	FAC	Faq	Eth
Spot 1	0,466	0,171	0,390	0,257	0,276	0,619
Spot 2	0,533	0,228	0,552	0,409	0,638	0,676
Spot 3	0,676	0,409	0,6	0,580		0,838
Spot 4	0,752	0,533	0,695	0,685		0,933
Spot 5	0,828	0,6	0,761	0,733		
Spot 6	0,895	0,761	0,857	0,904		
Spot 7	0,980	0,838	0,952	0,952		
Spot 8		0,904				
Spot 9		0,980				

	Rapport frontaux (Rf)					
	Fleurs			Feuilles		
	FAC	Faq	Eth	FAC	Faq	Eth
moyenne	0,732	0,602	0,686	0,645	0,457	0,766

Le tableau 7 : les Rf des différents spots d'un extrait éthanolique :



FED : fraction éther di éthylique. **FAC** : fraction acétate d'éthyle. **Faq** : fraction aqueuse.

Le chromatogramme de l'analyse de l'extrait EtOH des feuilles montre 13 spots appartenant à différents classes poly phénoliques et 21 spots de l'extrait MeOH des mêmes organes (feuilles).

Résultat et discussions

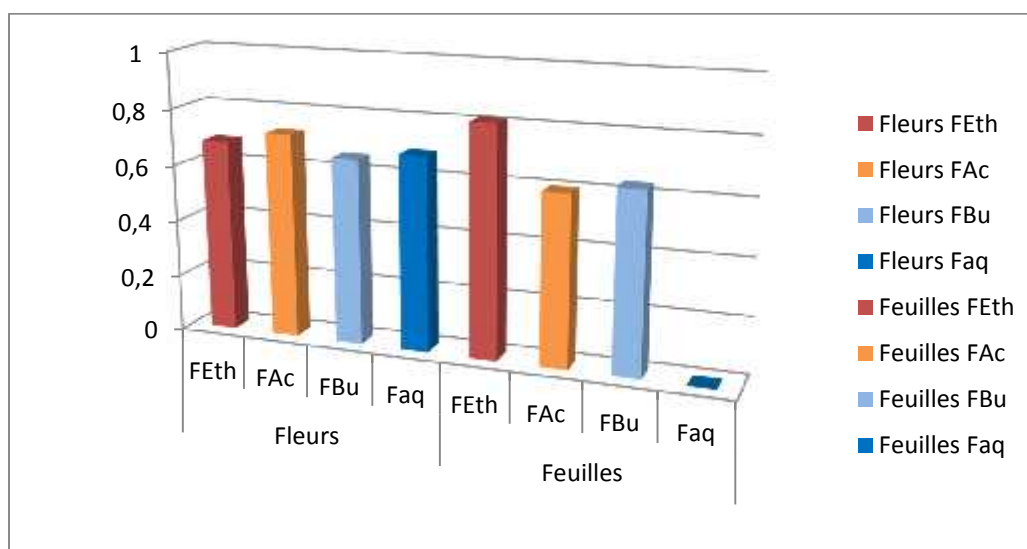
On remarque aussi que les composés flavonoïdiques majoritaires présentent dans l'extrait EtOH se trouvent dans la Faq (9 spots), FAc et FED (7spots) des fleurs.

Selon le tableau 3 et le tableau 4, on remarque que la FAc a donné presque les mêmes spots pour les deux extraits EtOH et MeOH chez les fleurs car les spots ont les mêmes (Rf) c.à.d. qu'ils contiennent les mêmes composants.

	Fleurs				Feuilles			
	FEth	FAc	FBu	Faq	FEth	FAc	FBu	Faq
Spot 1	0,166	0,450	0,352	0,686	0,607	0,254	0,333	
Spot 2	0,578	0,568	0,431		0,843	0,333	0,431	
Spot 3	0,637	0,735	0,539		0,882	0,401	0,539	
Spot 4	0,666	0,764	0,715		0,921	0,450	0,637	
Spot 5	0,735	0,814	0,784			0,578	0,686	
Spot 6	0,843	0,882	0,852			0,725	0,764	
Spot 7	0,882	0,921	0,921			0,823	0,813	
Spot 8	0,950					0,901	0,892	
Spot 9						0,950		

Le tableau 8 : les Rf des différents spots d'un extrait méthanolique :

	Fleurs				Feuilles			
	FEth	FAc	FBu	Faq	FEth	FAc	FBu	Faq
moyenne	0,682	0,724	0,656	0,686	0,813	0,601	0,636	0



FED : fraction éther di éthylique. **FBu** : fraction butanol. **FAc** : fraction acétate d'éthyle.
Faq : fraction aqueuse.

Résultat et discussions

Le chromatogramme de l'analyse de l'extrait MeOH des feuilles montre 21 spots appartenant à différents classes poly phénoliques et 23 spots des mêmes organes (feuilles).

On remarque aussi que les composés flavonoidiques majoritaires présentent dans l'extrait MeOH se trouvent dans la FAc (9 spots), FBu (8 spots) des feuilles. Et FED (8spots), FAc FBu (7 spots) des fleurs.

III.2. Discussions :

En comparant nos résultats avec ceux d'une étude réalisée par Zeghad, (2009) sur les flavonoïdes naturels, à sur deux plantes médicinales *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* sur les flavonoïdes naturels, à décelé des Rf pour la FAc proches à ceux qu'an trouvés dans notre travail.

D'après nos résultats et selon de Mergheme, (1982) in Akroum, (2011), le screening phytochimique réalisé dans notre travail confirme la richesse de *Citrus limon* en flavonoïdes et aussi leur présence sous différentes formes : Flavones, flavonols, qui pouvait être sous forme aglycone, monoglycolysée, bi et triglycolysée.

Les feuilles et les fleurs de *Citrus limon* contiennent des flavonoïdes de même nature, mais les fleurs contiennent plus de composés que les feuilles.

V. Evaluation de l'activité antibactérienne :

V.1. Résultats :

Nous avons étudié in vitro le pouvoir anti bactérien des extraits méthanolique brut des fleurs et des feuilles isolées de *Citrus limon* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu Glose solide Mueller-Hinton. Cette activité est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits méthanoliques à tester vis-à-vis des deux souches des bactéries E. coli S.aureus après 24h d'incubation à une température adéquate de 37°C. Les figures suivantes montrent les résultats obtenus par cette méthode :

Résultat et discussions

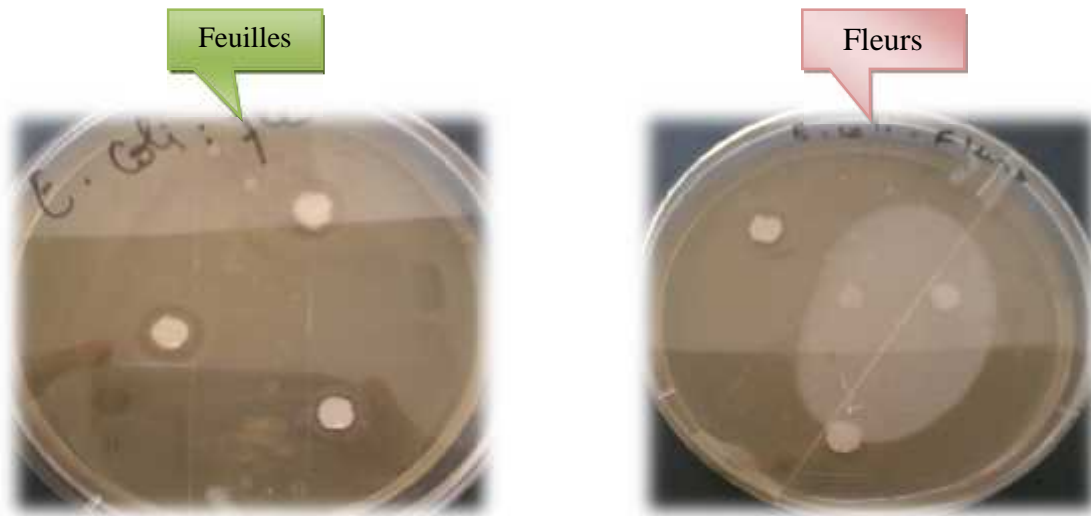


Figure 26 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut du *Citrus limon*.

La bactérie : *E. coli*.

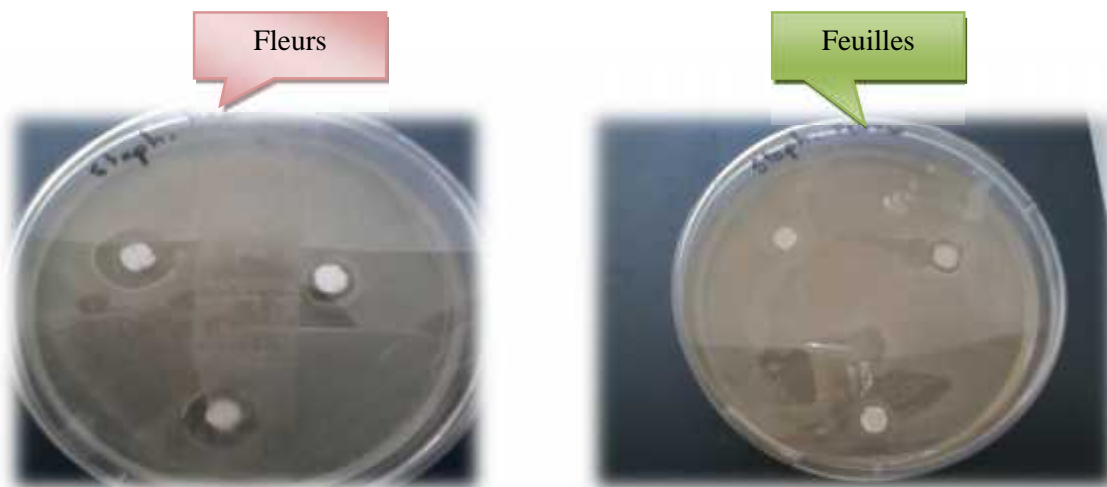


Figure 27: Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut du *Citrus limon*.

La bactérie : *Staphylococcies aureus*.

On a utilisé la technique des disques pour tester le pouvoir antibactérien de l'extrait brut issu des affrontements de l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs de *Citrus limon*.

Résultat et discussions

Microorganisme	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Fleurs	Feuilles
E .coli	10.5	12.5
S.aureus	14	14.5
Développement de la colonie	++	++

Tableau 9 : Diamètre de zone d'inhibition pour l'extrait brut des feuilles et des fleurs.

V.2. Discussion :

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que les flavonoïdes contenus dans l'extrait brut des fleurs et des feuilles exercent une activité antibactérienne plus ou moins importante selon le type de la bactérie.

Autre, d'après Pereia, (2006) la zone d'inhibition doit être égale ou supérieure à 10 mm, pour Seokown et al. (2006) elle est supérieure à 6mm.les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que *Staphylococcies aureus* apparait sensible vis-à-vis des flavonoïdes contenues dans l'extrait brut entre (14 et 14,5mm), ces mêmes flavonoïdes développent des zones d'inhibition moyennement vis-à-vis de *Escherichia coli* dont les zones d'inhibition varient entre (10,5 et 12,5mm).

Selon les résultats du tableau (5), on peut constater que l'extrait brut MeOH des fleurs et des feuilles a une activité bactérienne plus importante contre les bactéries à Gram positif que celle contre les bactéries à Gram négatif. Car cet extrait a donné une forte inhibition pour la bactérie *Staphylococcies aureus*.

Conclusion :

La découverte de ressources naturels du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

Notre étude sur l'espèce *Citrus limon* qui appartient à la famille des *Rutacées*, l'une des familles les plus importantes dans la flore algérienne, et le plus utilisé dans la médecine traditionnelle a pour le but de déterminer la richesse de cette plante en métabolites secondaires et plus précisément en flavonoïdes.

On a réalisé cette étude à partir des feuilles et des fleurs du Citronnier, après avoir soumis ces organes sous des tests de criblage des flavonoïdes. Ils nous donnent des résultats positifs.

Le dosage des flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 a montré des teneurs considérables chez les feuilles et les fleurs du *Citrus limon*.

L'analyse par la technique de séparation des molécules (CCM), montre que les extraits utilisés (EtOH et MeOH) des feuilles et des fleurs du *Citrus limon* renferment plusieurs types de ces composés (flavonols, Flavonones, ...).

Ainsi que les résultats de screening phytochimique montrent que les feuilles du Citronnier sont très riches en flavonoïdes par rapport à celle des fleurs.

Ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode des disques, nos résultats montrent que l'extrait brut des feuilles et des fleurs a un effet positif pour la croissance des deux bactéries étudiées.

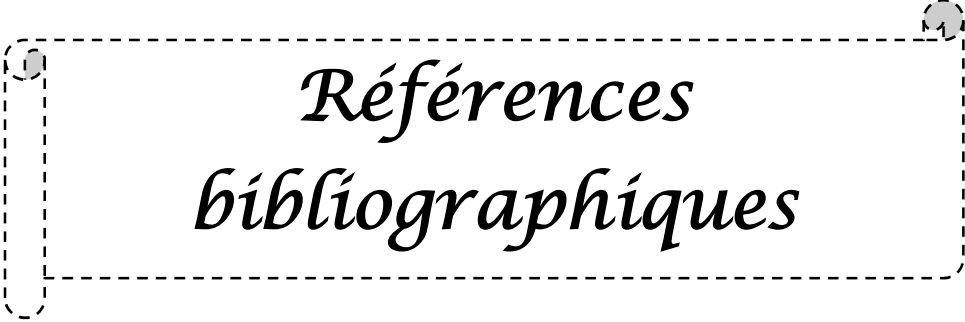
L'espèce *Citrus limon* qu'on a choisie, est très riche en métabolites secondaires, indique un pouvoir antibactérien significatif, ce qui implique une autre recherche profonde sur ces composés au futur.

PERSPECTIVES

Comme perspective il serait intéressant de mener une étude approfondie sur le *Citrus limon* à fin d'isoler et identifier les principes actifs de cette plante, en utilisant des techniques plus modernes comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), ou chromatographie en phase gazeuse (CPG) coupler à spectrophotomètre de masse.

La plante *Citrus limon* est riche en autres composés du métabolisme secondaire notamment les anthocyanes responsables de la couleur rouge pourpre de ses feuilles, les anthocyanes ont une action antioxydante et antimicrobienne, c'est pour cela qu'il serait important d'élaborer des études approfondis et complémentaires pour identifier de nouvelles substances bioactives.

Les plantes et les arbres d'ornement se distinguent des plantes destinées à une production économique, qui sont l'objet de l'agriculture ou de la sylviculture. Cela n'empêche pas toutefois qu'une espèce particulière puis être à la fois l'objet d'une culture économique et appréciée dans un jardin pour ses qualités ornementales. Alors, notre plante) *Citrus limon* a un feuillage riche en flavonoïdes et ces derniers ont des vertus thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires. Alors Pourquoi n'envisagerons pas une culture du *Citrus limon* à des fins économiques aussi?.



*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques :

1. **A. F. BARRERO, E. CABRERA, I. RODRIGUEZ, EVA M. FERNANDEZ-GALLEG0, (1994).** Phytochemistry, 35,189-194.
2. **ADJDIR ET BENSNOUSSI, (2009) :** Bilan d'une Agrumeraie, cas de la ferme pilote Moussadek Abdelkader (Remchi Wilaya de Tlemcen). Mémoire d'ingénieur, Univ. Tlemcen, 81 p.
3. **AMIRECH, Y. (2013) :** Contribution à l'étude des flavonoïdes naturels chez l'espèce (*Rosa damascena*) et évaluation de leur pouvoir antibactérien. Université de Constantine I mémoire Master 2.
4. **BOUDI, (2005) :** Vulgarisation agricole et pratiques des agrumiculteurs de la Mitidja. Institut national agronomique, El Harrach, Alger, 133 p.
5. **BOUKEZZAT H. (1998) :** Contribution à l'étude des composés p^hénoliques d'une ombellifère Algérienne , thèse de majistère , institut de chimie . université de Constantine.
6. **BRUNE TON J. (1993) :** Pharmacogenosie et phytochimie 2^{iem} edition ,Lavoisier et DOC Paris.
7. **CHADI JALAL, (2014) :** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez l'espèce *Prunus cerasifera atropurpurea* L. et évaluation de leur pouvoir antibactérien. Université de Constantine I mémoire Master 2.
8. **ECONOMOS ET CLAY, (1998):** Nutritional and health benefits of citrus fruits. Paper presented at the Twelfth Session of the Intergovernmental Group on Citrus Fruit.
9. **ESCLAPON, (1975) :** Les agrumes. Ed. La Somivac, Corse, n° 68, 12 p.
10. **F.A.T BARBERAN F. FERRERES AND F. TOMAS BAIC, (1985).**
11. **GERHARD RICHTER, (2006) :** Métabolisme des végétales physiologies et biochimie.
12. **J.B. HARBON .T.J.MABUYAND .H MABUY. (1975):** The flavonoides Tome .Ed chapman and Hall , london .

- 13.J.TOREL ET CALL, (1986):** Antioxydant Activity of flavonoids and Reactivity With Peroscy Radial, phytochemistry 25 ,383-385 .
- 14.KEVILIE .KATH, (1995) :** Lencyclopedia des plantes de santé edition Rustica.
- 15.KRUMI, Y., ONYEYILI,P .A ET OGUGBUAJA, V.O. (2004) :** Identification of actif principal of *M. balsamia* (Balsam Apple) Leaf Extract. P : 179-182.
- 16.LIGIN , HAI SHENG CHEN , ZHEA BAO XIANG , SHNAN GLIANG , YONG SHENG JINAND JIAN GUO LIU BAIC , (2007) :** Chines Chemical Letters ,18, 158-160.
- 17.LOUSSERT, (1989) :** Les agrumes arboriculture. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113 p.
- 19.MERGHEME ET AL, (1995) :** Five 8-C benzyleed flavonoid from *Thymus hirtus* (Labiatae). Phytochemistry., 38 (3) : 637-640.
- 18.MERGHEME, (1982) IN AKROUM, (2011) :** Techniques of flavonoïdes identification. Ed Academic Press. p6-10.
- 19.PEREIA, (2006) :** anti-microbial activity of *indigofera suffruticosa*.
- 20.PRALORAN, (1971) :** Les agrumes, techniques agricoles et productions tropicale. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 561 p.
- 21.REBOUR, (1966) :** Manuel de culture des Citrus pour le bassin Méditerranéen. Ed. Bailliére et fils, Paris, 264 p.
- 22.SEOKWON, K (2006) :** anti-bacterial and antifungal avtivity of sulfurcontaning compound from *pectiveria alliacea*.Tetrahedron, 5733-5740
- 23.WESTPHAL E., EMBRECHTS J., FERWEDA J. D., VAN-GILS-MEEUS H. A. E., MUTSAERSH.W. Et WESPHAL-STEVELS J. M. C., (1985) :** Cultures vivrières tropicales avec référence spéciale au Cameroun. Wageningen, Netherlands. p. 5.
- 24.Y. ARATANEHEMUGE, H. HIBASAMI, K. SANPIN, H. KATSUUAKI, K. IMAI, T. KOMIYA, (2004) :** Oncology Report, 11,289-292.
- 25.ZEGHAD, N. (2009) :** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister de l'université de Constantine. p : 12, 18- 19, 36-37.

Les sites :

[Http// members. Multimania .fr / mourad /Flavonoïdes .html.](http://members.Multimania.fr/mourad/Flavonoïdes.html)

[Http//fr .Wikipedia. org /wiki /metabolite secondaire.](http://fr.Wikipedia.org/wiki/metabolite_secondaire)

[Http//hature.jardin.free.fr/arbuste/nmauric_cirtus LIMON.htm](http://hature.jardin.free.fr/arbuste/nmauric_cirtus_LIMON.htm)

Nom et Prénom : ATROUS FATIMA

MENZRI YASMINA

Mémoire pour l'obtention du diplôme de : MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biodiversité et reproduction végétale

Spécialité : Biologie et physiologie végétale

Option : Métabolisme secondaires et molécules bioactives

Thème :

*Contribution à l'étude phytochimique et biologique des flavonoïdes chez l'espèce *Citrus limon* et évaluation de leur pouvoir anti bactérien.*

Résumé :

Notre travail porte sur l'étude phytochimique et des Activités anti bactérienne de *Citrus limon* de la wilaya de Constantine.

L'arbre du Citronnier *Citrus limon* est une plante poussant dans la région méditerranéenne. Elle est aromatique médicinale utilisée comme Anti inflammatoire, Stimulant, Anti bactérien.

Le screening phytochimique a permet de faire une évaluation quantitative et qualitative de flavonoïdes extraits à partir des feuilles et des fleurs de cette plante. Tandis que des tests biologiques ont été utilisés pour l'évaluation du pouvoir anti bactérien.

Les résultats de ces travaux nous on permit d'affirmer la richesse des extraits étudiés de *Citrus limon* en flavonoïdes, ces derniers on montré un pouvoir anti bactérien significatif qui pourrait nous permettre de la recommander dans la biotechnologie.

Mots clés : *Citrus limon*, flavonoïdes, phytochimique, Activité anti bactérienne.

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me} HAMMOUDA BOUSBIA DOUNIA (MCB- Mentouri I).

Rapporteur : M^{me} BOUCHOUKH IMANE (MAA – Mentouri I).

Examineur : M^{me} KARA KARIMA (MCB – Mentouri I).

Année universitaire : 2014/2015