

# République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA –BEJAIA-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimie

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention de diplôme de MASTER II  
en Pharmacologie moléculaire

## Thème

Activité antioxydante et antibactérienne des extraits des  
feuilles et des écorces de *Citrus reticulata*  
et *Citrus clementina*

### Présenté par :

M<sup>me</sup> : GUENAN Anée RAHMOUNI Malika

M<sup>elle</sup> : YAICHE Habiba

### Membre de jury :

Présidente : M<sup>me</sup> Benmammar C.

Promoteur : Mr Boudries H.

Examineurs: - Mr Bachir bey M.

- Mr Nabet N.

### Grade et lieu

M.A.A (U.A.M.B).

M.A.A (U.A.M.B).

M.A.A (U.A.M.B).

M.A.A (U.A.M.B).

Année universitaire: 2013- 2014

## *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de technologie alimentaire, département science alimentaire, à l'Université A. MIRA.*

*Ensuite, nombreuses sont les personnes que nous souhaitons remercier pour nous avoir aidée et soutenue durant la réalisation de ce travail.*

*Nous voudrions tout d'abord remercier la présidente du jury M<sup>me</sup> Benmammar C. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Egalement Mr Bachir bey M. et Mr Nabet N. d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*D'un grand soutien pour la compréhension de notre travail, nous voudrions exprimer notre gratitude à notre promoteur M<sup>r</sup> Bouderies H.*

*Ce travail n'aurait pas été possible sans l'appui de l'ensemble du personnel du laboratoire et plus particulièrement les techniciennes : M<sup>me</sup> Dib S et M<sup>elle</sup> Guedjali S. Sans oublier M<sup>elle</sup> Atila la technicienne de laboratoire mycologie et M<sup>me</sup> Mennas attachée de laboratoire.*

*Nos Remerciements les plus sincères vont à nos enseignants : M<sup>me</sup> Boudries la responsable de partie microbiologique. M<sup>r</sup> Harfi T, M<sup>r</sup> Boukhalifa F, M<sup>elle</sup> Adrar S, M<sup>elle</sup> Touati N, M<sup>me</sup> Guamgharre H, pour leur aide, leurs conseils, leurs explications et leur gentillesse.*

*Nous voudrions remercier M<sup>r</sup> KATI Dj.E., le chef de département de science alimentaire pour sa compréhension et pour nous avoir permis de réaliser ce travail au sein de laboratoire*

*De nombreuses autres personnes ont aussi contribué à ce travail et aux résultats obtenus. Ils nous ont aidés par leurs connaissances, leur avis et leurs critiques sur notre travail : M<sup>elle</sup> Ydjed Siham, Hanane, Hayat, M<sup>r</sup> Touati N, M<sup>elle</sup> Adrar A.*

## *Dédicaces*

- *Je dédie ce modeste travail :*
- *A la mémoire de mon père*
- *A toi chère mère, que j'aimerai à tout jamais*
- *Pour ta tendresse et tes sacrifices.*
- *A ma chère belle-mère*
- *A mon cher mari : WALID*
- *A mon cher futur bébé*
- *A la mémoire de mon beau-père.*
- *A mes chers frères : Saïd et Mohamed*
- *A mes chères soeurs : Aldjaïa, Saïda, fatiha et FOUFA*
- *A mes belles soeurs : Akila, Sabrina et baya*
- *A toi cher Massi*
- *A mes neveux : Islam, Lamine, Mourad ,Nassim, Koceyla et Kahina*
- *A mes beaux frères :El hadi, el khier, djelloul et fatah*
- *A mon oncle : LAYACHI.*
- *A toute la famille Guenana et Rahmouni*
- *A mes copines : khokha, malika, kahina, fatiha, et lila*
- *A ma binôme : Habiba et à toute sa famille.*

G.MALIKA

## *Dédicaces*

*Au nom d'Allah, Le très Miséricordieux, Le tout Miséricordieux « Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que tu nous as appris. Certes c'est Toi l'Omniscient, le Sage » : Sourate 2, Verset 32 (Saint Corant).*

*Louange et Gloire à Dieu, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.*

*Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète Mohamed, Paix et Salut sur lui, le seau des prophètes, ainsi que ses compagnons, pour nous avoir apporté une religion comme l'Islam.*

*Ensuite, en guise de reconnaissance, je dédie ce travail:*

*A mes chers parents*

*A mes chères sœurs: Amel, Ilham et Rebekka.*

*A mes chers frères: A. elhak. Lahcen et A. errahim.*

*A ma chère nièce: Mona*

*A mon cher neveu: Wadoud*

*A mon beau frère Ridha*

*A mes chères amies: Amel, Amina, Rachida et Malika.*

*A toute la promotion pharmacologie 2014*

*Habiba*

## Sommaire

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste tableaux*

*Introduction* ..... 1

### *Synthèse bibliographique*

#### *Chapitre I: Généralités sur les agrumes*

*I.1. Origine et distribution*..... 3

*I.2. Classification* ..... 3

*I.3. Morphologie*..... 4

*I.4. Reproduction*..... 6

*I.5. Compositions chimiques* .....7

*I.6. Effets thérapeutiques* .....7

#### *Chapitre II: Activité antioxydante et antimicrobienne*

*II.1. Activité antioxydante* ..... 10

*II.2. Activité antimicrobienne des polyphénols* ..... 19

#### *Partie Expérimentale*

#### *Chapitre I: matériel et méthodes*

*I. Matériel végétal* ..... 25

*I.1. Echantillonnage* ..... 25

*II. Préparation du matériel végétal pour l'extraction*..... 25

*II.1. Séchage*..... 25

*II.2. Broyage et tamisage* ..... 25

*III. Extraction des polyphénols* ..... 26

*III.1. Macération* ..... 26

*III.2. Filtration et évaporation:*..... 27

---

<i>IV. Dosage des composés phénoliques.....</i>	<i>27</i>
<i>IV.1.Dosage des polyphénols totaux .....</i>	<i>27</i>
<b><i>Chapitre II: Résultats et discussions</i></b>	
<i>II.1. Rendement d'extraction.....</i>	<i>36</i>
<i>II.2.1. Dosage des polyphénols .....</i>	<i>37</i>
<i>II.2.3. Dosage des tannins totaux.....</i>	<i>40</i>
<i>II.2.4. Dosage des caroténoïdes.....</i>	<i>41</i>
<i>II.3. Evaluation de l'activité antioxydant.....</i>	<i>42</i>
<i>II.3.1. Pouvoir réducteur.....</i>	<i>42</i>
<i>II.3.1.1. Test de ferricyanure de potassium.....</i>	<i>42</i>
<i>II.3.1.2. Test de phosphomolybdate.....</i>	<i>44</i>
<i>II.3.2. Activité antiradicalaire.....</i>	<i>45</i>
<i>II.3.2.1. Test de DPPH.....</i>	<i>45</i>
<i>II.3.2.2. Test d'ABTS.....</i>	<i>46</i>
<i>II.4. Activité antimicrobienne.....</i>	<i>49</i>
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	<i>51</i>
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

**Liste des abréviations**

**Abs:** Absorbance.

**ABTS:** sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

**ADN :** Acide désoxyribonucléique.

**AG :** Acide gallique.

**AlCl<sub>3</sub>:** Trichlorure d'aluminium.

**ANOVA :** Analyse de la variance (Analysis Of Variance).

**BSA :**Sérum d'Albumine Bovine

**C :** Citrus

**[C] :** Concentration.

**DPPH:** 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

**EAG :** Equivalent d'acide gallique

**EC :** Equivalent en Catéchine

**EQ :** Equivalent en Quercétine

**EAT:** équivalent en acide tannique

**E $\beta$ C:** Équivalent en  $\beta$ -Carotène

**HDL:** High density lipoprotein.

**HIV:** Human Immuno-deficiency Virus

**IC<sub>50</sub>:** Concentration inhibitrice de 50 % de radical DPPH.

**LDL:** Low density lipoprotein.

**LOO•:** Radical peroxy lipidique.

**LSD :** Least Significant Difference

**M :** Molaire

**MS :** Matière Sèche

**PL:** Polyphénols.

**ROS:** Reactive oxygen species

**Rpm:** Rotation par minute

**SARM :** *staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

**SDS/TEA:** sodium dodecyl sulfate (anionic surfactant)/ triethanolamine.

**UV :** Ultra-violet.

**Liste des figures**

<b>Figure 1 :</b> une coupe longitudinale et transversale d'un fruit d'agrumes .....	5
<b>Figure 2 :</b> schéma de couche épidermique des écorces des agrumes.....	6
<b>Figure 3 :</b> Structures des acides hydroxycinnamique . .....	10
<b>Figure 4 :</b> Structures des acides hydroxybenzoïques .....	11
<b>Figure 5 :</b> Structure de base des flavonoïdes . .....	12
<b>Figure6 :</b> Flavanones des oranges .....	12
<b>Figure 7:</b> Structure de sinensétine et de nobilétine. ....	13
<b>Figure 8:</b> Structures chimiques de la quercétine et de kaempférol.....	13
<b>Figure 9:</b> Structure de base des anthocyanines .....	13
<b>Figure 10 :</b> Structure chimique des tannins condensés et des tannins hydrolysables .....	14
<b>Figure 11 :</b> Structure chimique de quelques caroténoïdes.....	16
<b>Figure 12 :</b> Structure chimique de l' $\alpha$ -tocophérol .....	16
<b>Figure 13 :</b> mécanisme d'action des $\alpha$ -tocophérols . .....	17
<b>Figure 14 :</b> Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métallique.....	18
<b>Figure 15 :</b> Piégeage des radicaux libres ( $R^\circ$ ) par les polyphénols .....	19
<b>Figure 16 :</b> Comparaison des rendements d'extraction des quatre échantillons par quatre solvants. ....	36
<b>Figure 17 :</b> les teneurs en polyphénols totaux présents dans les quatre échantillons par les quatre solvants. ....	38
<b>Figure 18 :</b> les teneurs en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des deux variétés. ....	39
<b>Figure 19:</b> les teneurs en tannins totaux dans les extraitséthanolique des feuilles et des écorces des deux variétés. ....	40
<b>Figure 20 :</b> les teneurs en caroténoïdes dans les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des deux variétés. ....	41
<b>Figure 21 :</b> Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques et celui des standard. ....	43
<b>Figure 22 :</b> Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de $Mo^{+6}$ par les 4 extraits .....	44
<b>Figure 23:</b> Evolution du pourcentage d'inhibition du radical $DPPH^\circ$ par les différents extraits. ....	45
<b>Figure 24:</b> évolution de pourcentage d'inhibition de radical $ABTS^{+}$ en fonction de temps .....	47
<b>Figure 25:</b> Evolution du pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{+}$ par les différents extraits. ....	47



**Liste des tableaux**

<b>Tableau I:</b> Classification commerciale des agrumes.....	4
<b>Tableau II :</b> mécanismes d'action de certains composés phénoliques. ....	22
<b>Tableau III :</b> Les concentrations des extraits des feuilles qui inhibent 50% de DPPH. ....	46
<b>Tableau IV :</b> Les concentrations des extraits des qui inhibent 50% le radical ABTS <sup>+</sup> . ....	48
<b>Tableau V:</b> coefficients de corrélation entre la teneur en polyphenol totaux et l'activité antiradicalaire .....	49
<b>Tableau VI:</b> Diamètres des zones d'inhibition.....	49

# *Introduction*

## Introduction

Les plantes produisent les composés phénoliques pour agir comme des molécules de signalisation de la cellule, antioxydant ou bien des toxines aux animaux nuisibles envahissants (Brenner *et al.*, 2010). Ils ont aussi un multiple effets sur les processus de maturation des tissus, et les qualités sensorielle (Jiriet *et al.*, 2011) et nutritionnelle où ils sont responsable sur la couleurs, la saveurs et le goûts de plusieurs plantes (Li *et al.*, 2006).

Récemment, l'intérêt a augmenté considérablement dans le découvert des antioxydants qui se trouvent naturellement, pour les utiliser dans l'alimentation ou les applications pharmaceutiques, qui peuvent protéger le corps humain contre les radicaux libres et retarder la progression des maladies chroniques. En effet, plusieurs composés antioxydants extraits des plantes ont été identifiés comme un chélateur des radicaux libres ou de l'oxygène actif (Guimarães *et al.*, 2010).

Le genre de citrus appartenant à la famille des Rutaceae (Gmitter *et al.*, 2007) est l'une des cultures les plus largement cultivés dans le monde à cause de leurs bénéfices nutritionnelles (Zhang *et al.*, 2011). Ils ont principalement utilisé dans les industries alimentaires pour la production des jus et les écorces sont le principal sous-produit durant leurs transformation (Khizar *et al.*, 2010). Ces dernières n'ayant pas généralement reçu l'attention en vue d'être utilisé ou recyclé plutôt qu'a déchargé (Okonogi *et al.*, 2007).

Au cours des dernières décennies, un grand nombre d'études ont été menées dans le but d'identifier les composants bioactifs présents dans les différentes parties de fruits des agrumes, dans une tentative de gagner une compréhension plus profonde de la corrélation entre le régime alimentaire, les prestations de santé et la réduction du risque des maladies (Barreca *et al.*, 2011).

Les écorces des agrumes, en particulier, sont une source riche en flavonoïdes naturels et elles contiennent une grande quantité de phénols en comparant avec la portion comestible (Ma *et al.*, 2009). Les feuilles de ces plantes contiennent également des composés phénoliques à haute propriétés pharmacologiques (flavonoïdes, acides phénoliques, phytostérols, tannins, etc) (Teixeira *et al.*, 2006), qui sont utilisé aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie sous forme d'infusion en générale, pour traiter certaines maladies grave telles que les cancers, les crises d'épilepsie, hypertension, etc (Iserin, 2001).

Jusqu'à présent, les études sur les composés bioactifs et l'activité antioxydante des agrumes ont principalement porté sur les fruits (écorces, pulpes et jus), fractions polaires **(Guimarães *et al.*, 2010)**.

L'objectif de la présente étude est de doser, composés phénoliques, les flavonoïdes, les tannins totaux et les caroténoïdes contenus dans les écorces et les feuilles de deux variétés des agrumes *citrus réticulata* et *citrus clementina*, ainsi que d'évaluer leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes.

*Synthèse*  
*bibliographique*

*Chapitre I*

*Généralités sur les*  
*agrumes*

### I.1. Origine et distribution

Différentes hypothèses ont été élaborées sur l'histoire et l'origine géographique des agrumes (**Ahmad Khan, 2007**). L'histoire de leur domestication et de leur culture remonte jusqu'à 2100 avant JC (**Gmitter et al., 2007**) et leur origine semble être le sud-est de l'Asie bien que sa culture a probablement commencé en Chine (**Peña et al., 2007**) (la Province du Yunnan au sud-ouest de Chine) à cause de la diversité des espèces qui s'y trouvent (**Gmitter et al., 2007**).

L'acheminement des agrumes à travers le monde a été accompli par les explorateurs, les commerçants et les missionnaires de l'église (**Gmitter et al., 2007**). Ils ont été apportés à l'Amérique par les conquistadores espagnols et portugais (**Dugo et Giacomo, 2002**). Actuellement, les agrumes se poussent dans plus de 130 pays, (**Jackson et Linskens, 2002**), dont le climat est tropical, subtropical ou méditerranéen (**Ahmad Khan, 2007**), principalement entre les latitudes de 40°N et 40°S (**Gmitter et al., 2007**). Ils sont distribués en Inde, Chine, Malaisie, Sri Lanka et l'Australie (**Fadlinizal et al., 2010**).

### I.2. Classification

Jusqu'au milieu des années 1970, les taxonomistes du Citrus ont fondé leurs conclusions uniquement sur des données morphologiques et géographiques. Cela a mené à une divergence importante dans la classification des espèces au sein du sous-genre de *Citrus*. Le deuxième facteur qui a rendu la classification taxonomique difficile est la biologie reproductive du genre (**Gloria, 2001**). Toutefois, les études avancées basées sur les caractéristiques biochimiques et morphologiques suggèrent qu'il existe seulement trois vraies espèces : citron (*C. medica L.*), mandarine (*C. reticulata Blanco*), et pummélo (*C. maxima L. Osbeck* ou *C. medica*) (**Abedinpour et al., 2014**), l'hybridation de ces espèces a donné naissance aux autres espèces (**Gmitter et al., 2007**).

Comme toutes les espèces commerciales des agrumes, la mandarine (*Citrus reticulata Blanco*) et la clémentine (*Citrus clémentina*) sont des monocotylédones appartenant à la sous-division des Angiospermes (**Dupont et Guignard, 2007**), famille des Rutaceae, la sous-famille des Aurantoidea, l'ordre des Geraniales (**Ahmad Khan, 2007**) et le genre des *Citrus* à l'exception de kumquats (*Fortunella spp.*) et l'orange trifolié (*Poncirus trifoliate L. Raf.*), qui sont utilisés exclusivement comme des porte-greffes. Ces fruits se regroupent en plusieurs groupes (Tableau I) (**Peña et al., 2007**)

**Tableau I:** Classification commerciale des agrumes (Gloria, 2001 ; Ahmad Khan, 2007 ; Peña et al., 2007 ; Gmitter et al., 2007 ;).

Nom commun	Nom scientifique
<b>Espèces les plus importantes</b>	
Orange douce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck = ( <i>C. grandis</i> × <i>C. reticulata</i> )
<b>Mandarines,</b> Tangerine	<i>Citrus reticulata</i> Blanco
Pamplemousses	<i>Citrus paradisi</i> Macfad = ( <i>C. grandis</i> × <i>C. sinensis</i> )
Pomelos	<i>C. grandis</i> (L.) Osb
Citrons	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. F= ( <i>C. medica</i> L × <i>C. aurantifolia</i>
Limes	<i>C. aurantifolia</i> Christm
<b>Espèces moins importantes</b>	
Oranges amère	( <i>C. aurantium</i> L.)= ( <i>C. grandis</i> × <i>C. reticulata</i> )
Cédrats	( <i>C. medica</i> L.) parent male
Bergamotes	( <i>C. bergamia</i> Risso & Poit)
<b>Hybrides d'intérêt commercial</b>	
Citranges	(orange douce × orange trifolie)
Citrumelos	(pomelos × orange trifolie)
Tangelos	(mandarine × pomelos)
Tangors	(mandarine × orange douce)
<b>Clementine</b>	(Mandarine × orange)

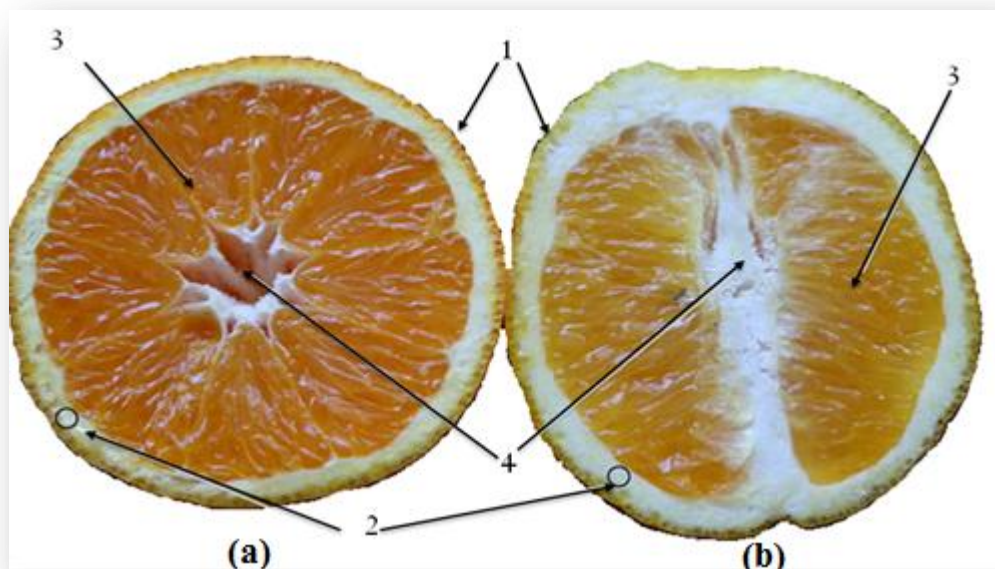
### I.3. Morphologie

- Les plantes des agrumes sont petites, avec des branches étendues, de 2 à 15 m de haut (Gmitter et al., 2007)
- **Feuilles** : simples en général, elles sont trifoliées ou unifoliées chez les espèces les plus primitives. Dans les deux cas, le pétiole est ailé et articulé (Spichiger et al., 2004 ; Dupont et Guignard, 2007).
- **Fruit** : (ou agrume) est une baie. L'écorce, comprend, à l'intérieur une zone spongieuse blanche (Albédo) et à l'extérieur, de très nombreuses poches à essence



colorées en jaune ou en orange par des caroténoïdes, ces poches sont bien visibles à l'œil nu (Flavédo) (Dupont et Guignard, 2007; Guimarães et al., 2010). La partie intérieure du fruit ou l'endocarpe est composée de segments (quartiers) contiennent des vésicules de jus (Guimarães et al., 2010). Dans chaque quartier on trouve une ou plusieurs graines fixées au placenta axile : Ce sont les « pépins » (Dupont et Guignard, 2007).

La figure 1 représente une coupe longitudinale et une coupe transversale d'un fruit d'agrumes avec ses différentes parties et le figure 2 représente la structure de couche épidermique de l'écorce des agrumes.



**Figure 1** : une coupe transversale (a) et longitudinale (b) d'un fruit d'agrumes (Guimarães et al., 2010).

- 1- Flavédo (La surface périphérique d'écorce ou l'épicarpe)
- 2- Albédo (La couche moyenne blanchâtre avec des fibres doux de l'écorce)
- 3- La partie intérieure du fruit ou l'endocarpe
- 4- Colonne centrale (médulla ou placenta).

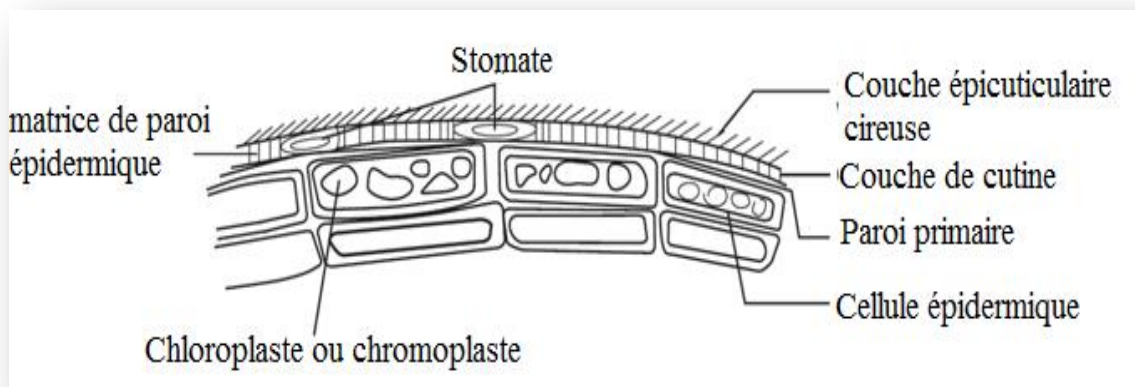


Figure 2 : schéma de couche épidermique des écorces des agrumes (Ladanya, 2008).

### Mandarine

C'est le groupe le plus important parmi les agrumes frais commercialisés, en raison de ses apparences attrayantes, son goût agréable avec la facilité d'épluchage, (Ladaniya, 2008).

Le fruit est de forme aplati (Dugo et Giacomo, 2002), l'écorce est d'épaisseur moyen, non adhérente, surface relativement lisse, dans laquelle se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles (Bousbia, 2011).

### Clémentine

La clémentine est un hybride entre deux espèces des *Citrus* produit par le Père Clément Rodier à Misserghin près d'Oran en Algérie. (Ahmad Khan, 2007). Elle est d'une grande importance dans l'industrie des agrumes méditerranéen. C'est un Fruits de petit à moyen calibre, forme légèrement aplatie ou globuleuse, sans pépins à l'exception d'hybride Monreal. L'écorce est d'épaisseur moyen, surface lisse et brillante, ainsi elle est moyennement ferme et adhérente mais facile à éplucher. La couleur est orange foncé à rouge-orange. Les arbres sont déférents à ceux de la mandarine commun par une foliation dense et couvre le fruit (Ladanya, 2008).

## I.4. Reproduction

Les espèces des *Citrus* ont une biologie reproductive complexe (Peña et al., 2007). La plupart d'entre elles sont diploïdes ( $2x$ ) où  $x=9$ , mais certaines sont triploïdes ( $3x$ ) et autotétraploïdes ( $4x$ ) spontanées ont été identifiées chez les plants. (Hussain et al., 2012). La majorité des espèces sont partiellement apomictiques, ce qui signifie que les embryons fortuits s'amorcent directement des cellules de nucell maternelles en empêchant le

développement des embryons zygotiques, ainsi la récupération des progénitures sexuelles. (Peña *et al.*, 2007).

### I.5. Compositions chimiques

Les feuilles et les écorces d'agrumes présentent une composition diversifiée. Elles contiennent des glucides, des protides, des fibres, des sels minéraux et des acides organiques tel que l'acide malique, tartrique et citrique.

Les agrumes sont aussi connues par leur richesse en vitamines, en particulier la vitamine C, la vitamine B3 (nicotinamide), la B5 (acide pantothénique) et la vitamine A (rétinol) (Salunkhe et Kadam, 1995).

### I.6. Effet thérapeutique des agrumes

Beaucoup de fruits et légumes contiennent des quantités élevées de composés qui ont des effets bénéfiques pour la santé, y compris les polyphénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les tocophérols. (Ercan *et al.*, 2011). Les plantes du genre citrus ont été évaluées premièrement pour leurs fruits comestibles, mais aussi ils ont une valeur dans la médecine traditionnelle (Choi *et al.*, 2007). Comme ils présentent plusieurs activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse (Del-Rio *et al.*, 2004; Tripoli *et al.*, 2007). Alors, la consommation d'agrumes frais ou de leurs jus semble être associée à une amélioration des profils lipidiques sanguins, la survie chez les personnes âgées, moins de risque de cancers, l'abaissement de la pression artérielle, ainsi que la réduction des risques d'accident vasculaire cérébral, les maladies cardiaques coronariennes, traiter l'obésité (Ramful *et al.*, 2011) et aussi éliminer la mucosité (Ye, 2011). Par ailleurs La consommation des écorces des agrumes a été associée avec une réduction significative du sérum total et des niveaux de HDL-cholestérol (Elleuch *et al.*, 2011). Le taux de cholestérol peut être diminué et le rapport LDL / HDL peut être amélioré, sans changer de mode d'alimentation et / ou de suivre un régime, seulement par ajout de jus frais de pamplemousse à l'alimentation ; une étude a démontré que la pectine de pamplemousse peut abaisser le cholestérol dans le plasma jusqu'à 30% et améliorer le rapport de LDL / HDL de 31% chez les porcs (Ladanya, 2008), elles ont aussi un rôle dans la protection contre l'athérosclérose et la dysfonctionnement de la thyroïde induites par l'alimentation sur un modèle de rat (Elleuch *et al.*, 2011).

les fruits d'agrumes ont également des propriétés antiallergiques qui sont dues à sa richesse en quercétine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, qui est un

neurotransmetteur impliqué dans les réactions allergiques et inflammatoires (**González-Molina *et al.*, 2010**).

Récemment, l'influence des flavonoïdes de citron sur le cancer a été mise à jour (**González-Molina *et al.*, 2010**), l'activité anticancéreuse des citroflavonoïdes peut se produire par deux effets selon (**Tripoliet *al.*, 2007**) :

**Effet antimutagène:** des études ont montré que la naringénine et la rutine ont un effet photo-protecteur contre les UV, à l'origine des différentes mutations de l'ADN.

**Effet antiprolifératif:** les citroflavonoïdes ont démontrés qu'ils pouvaient ralentir la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses et diminuer la croissance des métastases. Ces propriétés pourraient servir à l'élaboration de thérapies antitumorales.

## *Chapitre II*

# *Activité antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques*

## II.1. Activité antioxydante

### II.1.1. Antioxydants

Selon **Gülçin *et al.* (2007, 2010)**, les antioxydants sont définis comme étant des composés réducteurs ou inhibiteurs des oxydants par l'inhibition de l'initiation ou de la propagation de la chaîne des réactions d'oxydation. Ils peuvent aussi se mêler dans le processus d'oxydation par réaction avec les radicaux libres, chélation des métaux catalyseurs et encore par l'intervention comme étant un délateur d'oxygène.

En effet ces agents protecteurs réduisent les dommages oxydatifs induits par les espèces réactives d'oxygène (ROS) et retardent la progression de plusieurs maladies chroniques aussi bien que la peroxydation des lipides.

#### II.1.1.1. Composés phénoliques

- **Acides phénoliques**

Les composés phénoliques sont présents naturellement en forme d'acides phénoliques (**Choi, 2011**), ces derniers peuvent être divisés en deux classes, les dérivés d'acides benzoïques et cinnamiques. Ils existent en formes liées, telles que des dérivés glycosylés ou des esters d'acide quinique, shikimique, tartrique ou d'autres acides organiques (**Jiri *et al.*, 2011**).

##### Les acides hydroxycinnamiques

Représentent une classe très importante dont la structure de base est (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), dérivent de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (Figure 3) (**Psotova *et al.*, 2003**). Les composants principaux sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique, qui sont des précurseurs des anthocyanines (**González-Molina *et al.*, 2010**), ils sont observés plus fréquemment que les dérivés de l'acide benzoïque ou des acides hydroxybenzoïques (**Jiri *et al.*, 2011**).

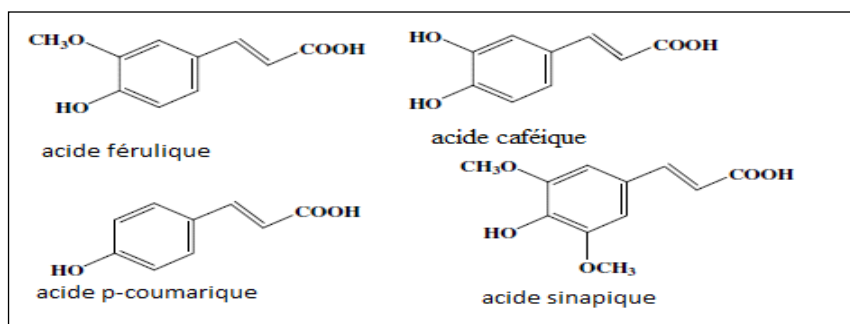


Figure 3 : Structures des acides hydroxycinnamiques (Ma et Chen, 2009).

### Acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque qui ont une formule de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) (figure 4). Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides, ils sont généralement des composés phénoliques mineurs dans les plantes comestibles, telles que les tanins hydrolysables. (Jiri et al., 2011).

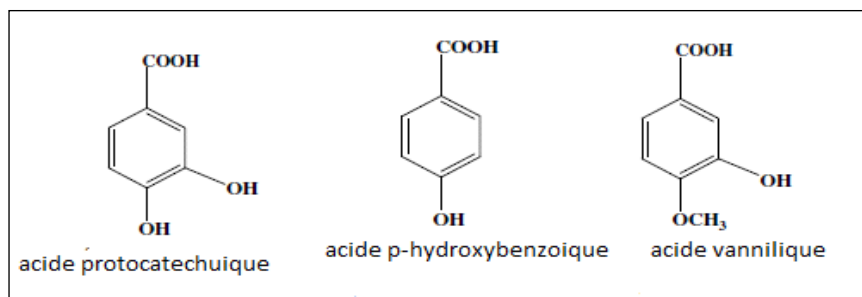


Figure 4 : Structures des acides hydroxybenzoïques (Ma et Chen, 2009).

Les acides phénoliques exercent leurs effets en piégeant les radicaux libres, inhibant leur formation et en prévenant les dommages oxydatifs de l'ADN (Jiri et al., 2011).

- **Polyphénols**

Les polyphénols, étant des métabolites secondaires des plantes (Kamran-khan, 2010), constituent une famille de molécules organiques hétérogènes (Antoine et al., 2010). Ils sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière (Nkhili, 2009).

Ces composés constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales (Khan, 2010). Ils sont des antioxydants puissants et pourraient participer au contrôle du stress oxydatif (Antoine et al., 2010). De plus, ils ont une activité antibactérienne, anti-inflammatoire, antiallergique, antivirale, anti-cancérogène, hépato-protective et vasodilatatrice (Ramful et al., 2011).

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des antioxydants hydrosolubles, constituant l'un des groupes les plus importants des phénols (Caristi et al., 2006). Ils sont omniprésents chez les végétaux supérieurs. (Dufour et Loonis, 2007). Plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés (Cook et Samman, 1996). Ils sont caractérisés par la structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, subdivisés selon la

nature de C3 en anthocyanines, chalcones, dihydrochalcones, flavanols, flavanones, flavones, flavonols et isoflavones (Figure 5)(Andersan et Markham, 2006).

Ces composés sont bénéfiques pour les plantes comme agents protecteurs et pour la santé humaine (Caristi et al., 2006). De plus, Ils contribuent aux caractéristiques des aliments telles que le goût, la couleur ou la durée de conservation (Antoine et al., 2010).

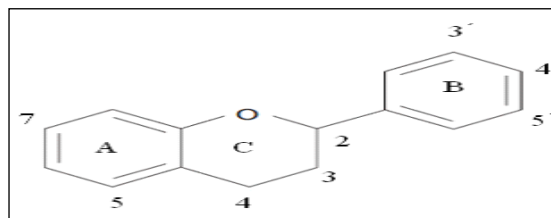


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (Derbel et Ghedira, 2005).

### a. Flavanones

Les flavanones se présentent sous une forme glycosylée (néohespéridosides et rutinosides) ou sous une forme aglycone (narirutine et hespétine).

Les structures des flavanones des agrumes (orange) sont illustrées dans la figure 6.

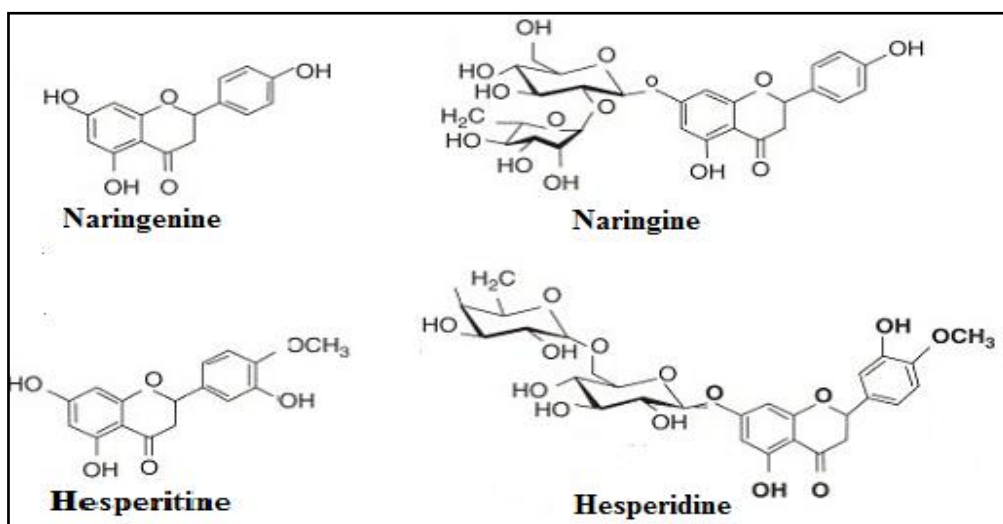


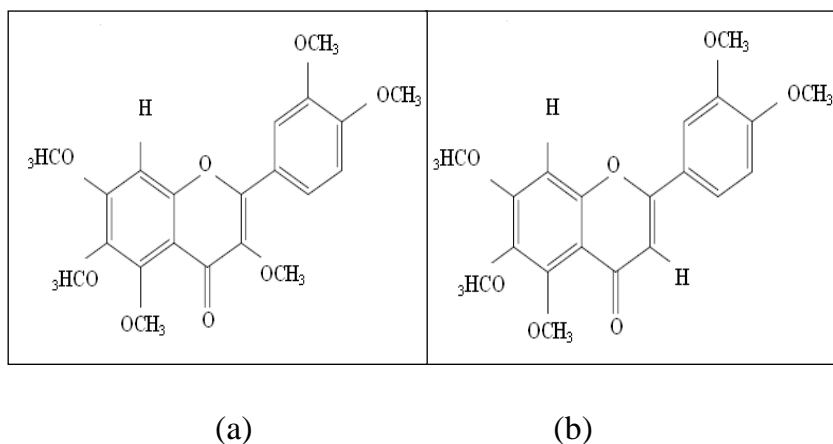
Figure 6: Flavanones des oranges (Peterson et al., 2006).

### b. Flavones

Présents en faibles concentrations dans les tissus des agrumes dont les plus abondants sont la sinensétine et le nobilétine (Tripoli et al., 2007).

Les structures des principaux flavones sont représentées dans la figure 7.



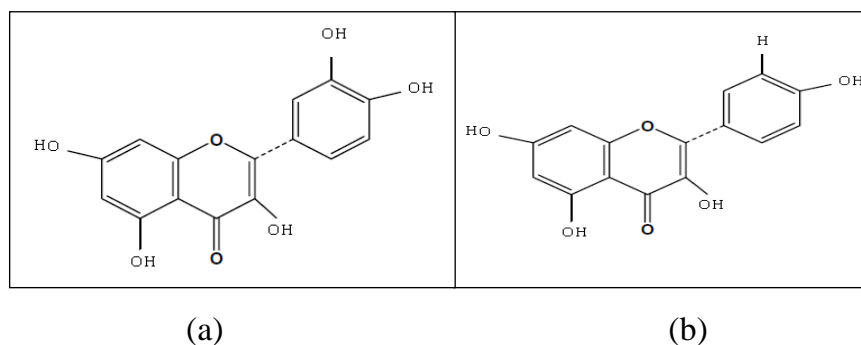


**Figure 7 :** Structure de sinensétine (a) et de nobilétine (b) (Tripoli *et al.*, 2007).

### c. Flavonols

Présents à des concentrations peu élevées et sous forme glycosylées, les plus abondants sont la quercétine et le kaempférol. Les flavonols se concentrent beaucoup plus au niveau de la peau des fruits (Charles et Benbrook, 2005).

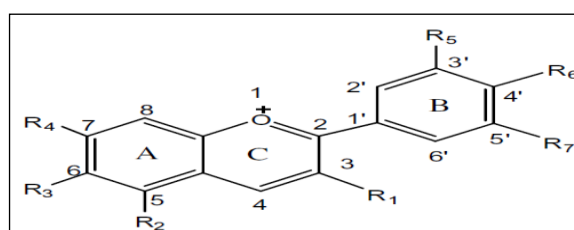
Les structures des principaux flavonols des oranges sont représentées dans la figure 8.



**Figure 8 :** Structures chimiques de la quercétine (a) et de kaempférol (b) (Tripoli *et al.*, 2007).

### d. Anthocyanines

Les anthocyanines sont des pigments naturels responsables de coloration rouge, orange, rose, violet et bleu dans la plupart des fleurs, fruits et légumes (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). La structure de base des anthocyanines est représentée dans la figure 9.



**Figure 9 :** Structure de base des anthocyanines (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

- **Tannins**

Les tannins sont des molécules à poids moléculaire élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques. Ainsi, les tannins se réfèrent à l'acide tannique, il a une structure qui est composé d'un glucose centrale et 10 groupes galloyl, ce sont des polyphénols soluble dans l'eau et sont présents dans les écorces des fruits de quelques plantes (Gülçinet *al.*, 2010).

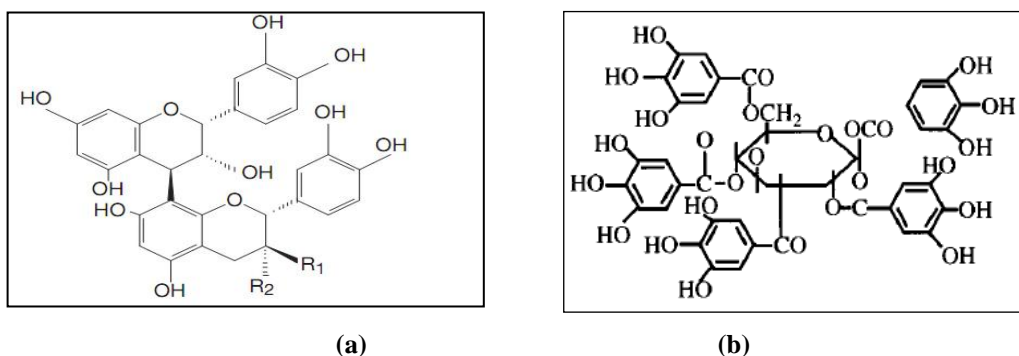
Sur le plan structural, les tannins sont divisés en tannins hydrolysables et tannins condensés (Al-Zoreky, 2009).

- **Les tannins condensés**

Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (figure 10 a). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Cowan, 1999).

- **Les tannins hydrolysables**

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide éllagique (figure 10 b) (Cowan, 1999).



**Figure 10 :** Structure chimique des tannins condensés (a) et des tannins hydrolysables (b) (Cowan, 1999, Derbel et Ghedira, 2005).

La nature polyphénolique de l'acide tannique qui est hydrophobe est le caractère responsable de l'action antioxydant, et son mécanisme antioxydant est encore loin d'être complètement compris;

En présence de cuivre métallique l'acide tannique agit soit comme un prooxydant, ou comme un antioxydant suppresseur du radical hydroxyle. (Gülçinet *al.*, 2010). Les

proanthocyanidines inhibent la formation des superoxydes, tandis que les tannins hydrolysables empêchent la peroxydation lipidique (**Derbel et Ghedira, 2005**).

Comme beaucoup de polyphenols, l'acide tannique possède des propriétés antimutagéniques et antimicrobiennes (**Cowan, 1999**).

### II.1.1.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangé ou rouge (**Curtay et Robin, 2000**), qui sont responsables de la couleur externe et interne des agrumes (**Goulas et Manganaris, 2012**). Ces composés naturels sont de longues molécules qui possèdent pour la plupart dans leur structure chimique de très nombreuses doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de leur activité antioxydante, la figure 11 représente la structure de quelques caroténoïdes (**Pincemail et al., 1998**).

Les principaux caroténoïdes sont le 9-cis et tout-trans- $\beta$ -carotène (provitamine A), le lycopène et la lutéine. Malgré la similarité de leur structure, ils exercent différentes fonctions biologiques, dont certaines préviennent ou contrôlent efficacement la génération des radicaux libres (**Curtay et Robin, 2000**).

Comme agents antioxydants, les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alkoxydes en capturant les radicaux libres et le manque de ces pigments liposolubles comme les tocophérols, cause des maladies dégénératives. Il a été signalé, par ailleurs, que dans le cas de ces maladies, une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraîne la destruction des neurones par le phénomène de nécrose ou par celui d'apoptose. En plus de leur intervention dans les maladies dégénératives, les caroténoïdes semblent diminuer les risques de certains cancers (**Houta et al., 2012**).

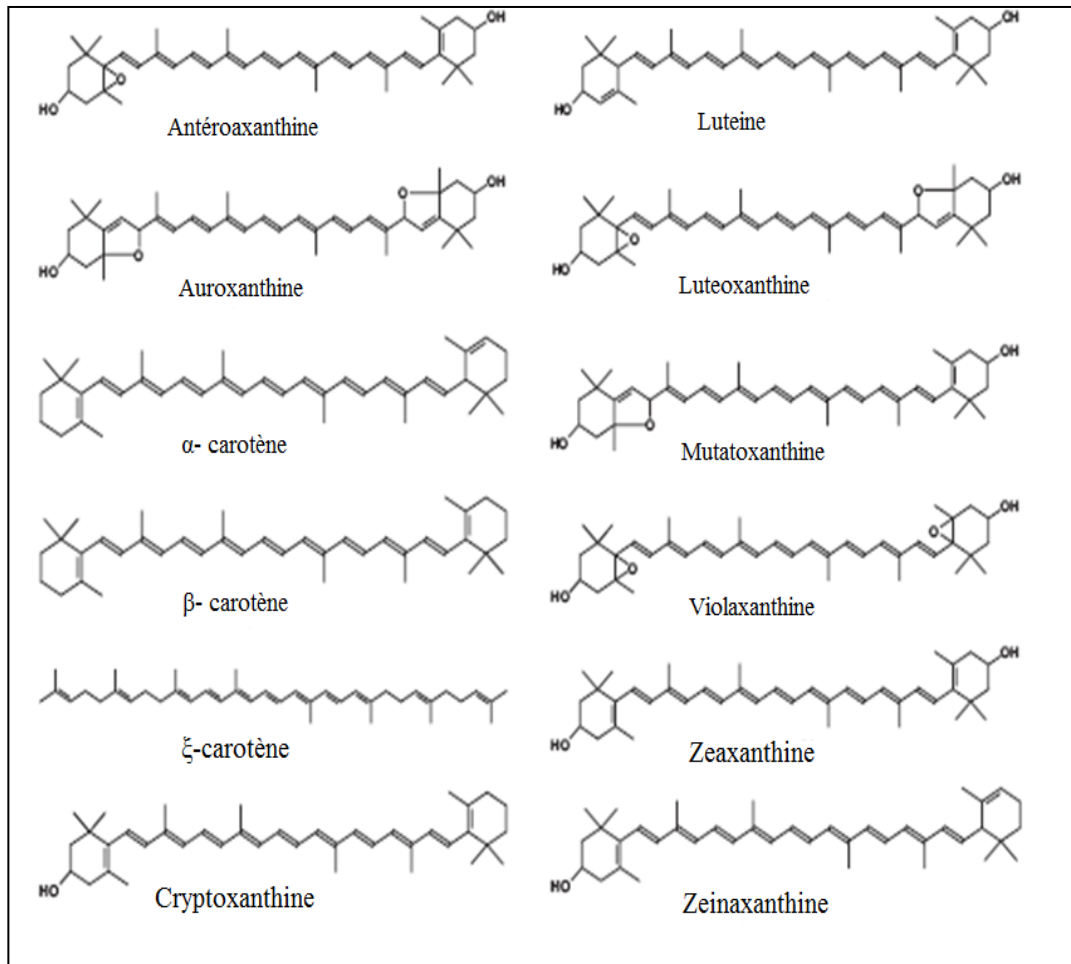


Figure 11 :Structure chimique de quelques caroténoïdes(Meléndez-Martinez et al., 2007).

### II.1.1.3. Vitamines

- Vitamine E

La vitamine E est un antioxydant naturel important. Sa forme la plus connue biologiquement active est l' $\alpha$ -tocophérol. (Curtay et Robin, 2000). La figure 12 présente la structure de l' $\alpha$ -tocophérol.

le terme vitamine E est utilisé pour deux groupe de molécule; les tocophérols et les tocotriénols. (Cuvelier et al., 2003) comme il désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols et tocotriénols (Curtay et Robin, 2000)

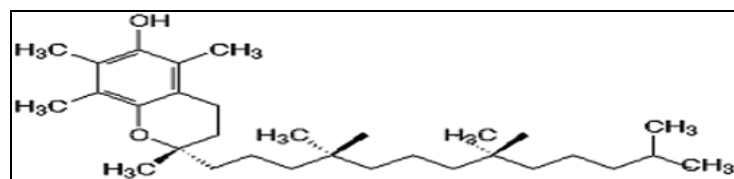


Figure 12:Structure chimique de l' $\alpha$ -tocophérol (Engin, 2009).

Les tocophérols les plus retrouvés au niveau du plasma sont l' $\alpha$  et le  $\gamma$  -tocophérol. (Curtay et Robin, 2000). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique riche en acides gras polyinsaturés (RH) où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique, la figure (13) représente le mécanisme d'action des  $\alpha$ -tocophérols. (Pincemail *et al.*, 1998). La vitamine E ne peut pas se limiter à ses effets antioxydants, elle participe directement au contrôle de l'expression de certains gènes (Antoine *et al.*, 2010), un protecteur cardiovasculaire, capable de piéger les peroxy-nitrites particulièrement dangereux pour les neurones. (Curtay et Robin, 2000).

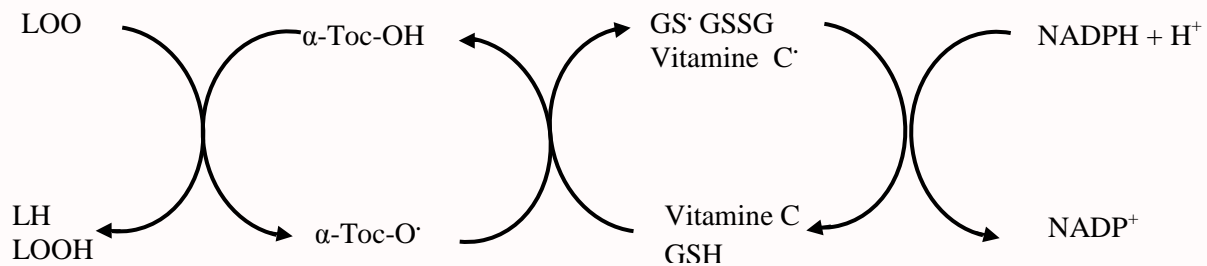


Figure 13 :mécanisme d'action des  $\alpha$ -tocophérols (Engin, 2009).

- **Vitamine C**

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble majeur, la plupart des mammifères sont capables de la synthétiser dans leur foie ou dans leurs reins, contrairement à l'homme qui doit l'assurer par l'alimentation (Haleng *et al.*, 2007)

L'acide ascorbique est une molécule antioxydante fortement réductrice, elle est capable de piéger l'oxygène singulet et les radicaux libres dont le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (Afolabi *et al.*, 2007). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. (González-Molina *et al.*, 2010)

La vitamine C est considérée comme l'un des antioxydants les plus importants en raison de son activité contre les radicaux libres, la carcinogenèse et les maladies cardiovasculaires, ainsi que dans la stimulation du système immunitaire humain. (Luigi *et al.*, 2011).

#### II.1.1.4. Oligoéléments

Les fruits des agrumes contiennent des quantités considérables de cations, principalement le potassium, le calcium et le magnésium (Ladaniya, 2008), qui sont essentiels pour la santé humaine (Horzic *et al.*, 2009). Certains enzymes ont besoin des ions

métalliques pour leurs activités (Afolabi *et al.*, 2007) comme le sélénium qui est un oligo-élément indispensable à une enzyme antioxydante dite la glutathion-peroxydase (Curtay et Robin, 2000).

### II.1.2. Mécanismes antioxydants des polyphénols

Plusieurs modes d'action de l'activité anti-oxydante des polyphénols ont été décrits :

#### a. Chélation des métaux de transition

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) (Laguerre *et al.*, 2007). La chélation fait intervenir les groupes hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B, l'hydroxyle en 5 et le groupe carbonyle en 4, l'hydroxyle en 5 et le groupe carbonyle en 4 (figure 14) (Pietta, 2000).

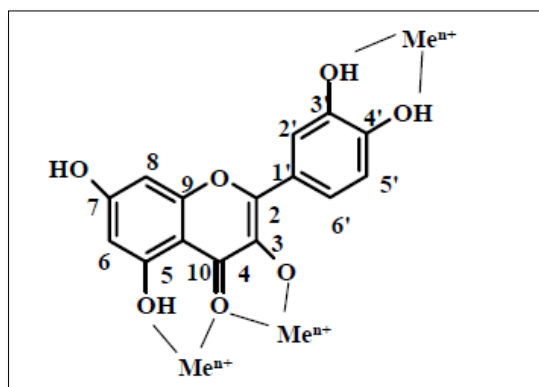


Figure 14 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métallique ( $\text{Me}^{n+}$ ) (Pietta, 2000).

#### b. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Densiov et Afanas'ev, 2005).

#### c. Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (Javanovic *et al.*, 1994). Les flavonoïdes (FI-OH) sont,

thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Acker *et al.*, 1996). Le radical résultant (Fl-O<sup>•</sup>) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (figure 15).

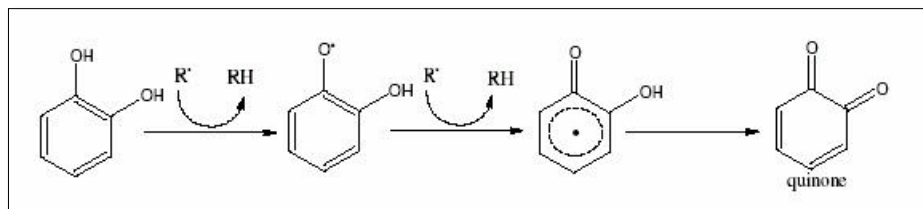


Figure 15 : Piégeage des radicaux libres (R<sup>•</sup>) par les polyphénols (Pietta, 2000).

## II.2. Activité antimicrobienne des polyphénols

Les plantes aromatiques et médicinales sont reconnues par la production de certaines molécules bioactives qui régissent avec d'autres organismes dans l'environnement, en inhibant la croissance bactérienne ou fongique (activité antimicrobienne) (Boulekbache *et al.*, 2013). Depuis l'apparition des antibiotiques en 1950, l'utilisation des dérivés de plantes comme des antimicrobiens a été pratiquement inexistante (Cowan, 1999)

La propagation des microbes résistants aux antibiotiques tel *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (Al-Zoreky, 2009), la conscience de peuple aux problèmes de la prescription énorme et du mauvais emploi d'antibiotiques traditionnels et le but des microbiologistes clinique d'ajouter des substances phyto-chimiques à l'arsenal des médicaments antimicrobiens (Cowan, 1999), ont réanimé la recherche des composés antimicrobiens à partir des sources naturelles (Al-Zoreky, 2009, Cowan, 1999). Les substances qui peuvent inhiber la croissance des microbes et soient peu toxiques pour les cellules hôtes, sont considérées comme des candidates pour le développement des nouveaux médicaments antimicrobiens (Boulekbache *et al.*, 2013).

Des inhibiteurs naturels, extraits de nombreuses plantes, pour des microorganismes pathogènes ont été explorés, parmi lesquels on trouve les polyphénols qui ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années. L'activité antimicrobienne des polyphénols, des tannins et des flavonoïdes est bien documenté (Al-Zoreky, 2009). En outre, les activités antimicrobiennes de ces extraits bruts sont difficiles à corrélérer à un composé spécifique en raison de leur complexité et leur variabilité. Néanmoins, certains chercheurs ont signalé qu'il

existe une relation étroite entre la composition chimique en composés, les plus abondants, et l'activité antimicrobienne (Djenane *et al.*, 2012).

### II.2.1. Modes d'action des composés phénoliques sur les bactéries (Tableau II)

Les composés polyphénoliques sont reconnus d'être synthétisés par les plantes en réponse à l'infection microbienne. Donc il est logique qu'ils aient trouvé que ces composés soient des substances antimicrobiennes efficaces avec un large spectre *in vitro* (Boulekbache *et al.*, 2013).

Les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. La force et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon le type d'extrait et le type de bactéries (Djenane *et al.*, 2012).

#### a. Action sur la membrane cellulaire

Les composés phénoliques peuvent agir à deux niveaux différents: la membrane cellulaire et la paroi de la cellule des micro-organismes. Ils peuvent réagir avec les protéines membranaires de bactéries par une liaison d'hydrogène à travers leurs groupements hydroxyles et comme résultats ils entraînent une modification de la perméabilité membranaire puis la destruction cellulaire. Ils peuvent pénétrer aussi dans les cellules bactériennes et coaguler le contenu cellulaire (Boulekbache *et al.*, 2013). Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques (Djenane *et al.*, 2012). La raison, qui rend ces bactéries (à gram positif) plus sensibles aux extraits phénoliques par rapport à celle à gram négatif, peut être attribuée à la différence entre la composition de leur paroi cellulaire (Negi et Jayaprakasha, 2001); OÙchez les bactéries à Gram positif il y a un contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens (Djenane *et al.*, 2012).

#### b. Action sur les enzymes et privation de substrat

Le mécanisme responsable à la toxicité des polyphénols sur les microorganismes inclue l'inhibition des enzymes par les composés oxydés, probablement à travers l'interaction des polyphénols, en particulier les quinones et les tannins, avec les protéines enzymatiques en



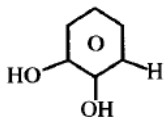
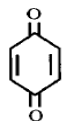
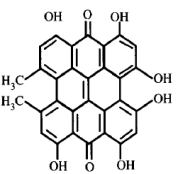
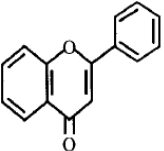
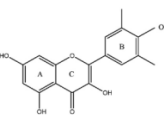
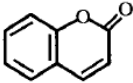
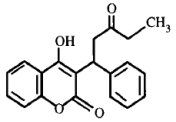
se fixant sur leurs sites actifs, induisant l'inhibition de son l'activité (**Cowan, 1999**). En outre, Les flavonoïdes ont montré une grande activité antimicrobienne, la quercetine et d'autres composés réagissent essentiellement par l'inhibition de l'enzyme ADN-gyrase (**Pereira, 2007**).

D'autres parts, les composés phénoliques peuvent aussi se lier aux molécules substrat rendant ces dernières moins accessibles aux enzymes (**Al-Zoreky, 2009**).

**c. Privation des métaux**

L'inhibition de l'activité bactérienne par la formation du complexe ion métallique-composé phénolique (**Ksouri et al., 2009**).

Tableau II : mécanismes d'action de certains composés phénoliques (Cowan, 1999).

Composés	Exemples	Mécanismes
Phenol simple 	Catéchol Epicatechine	Privation de substrat Interruption de membrane
Acides phénoliques	Acide cinamique	Se lie aux adhésines Formation de complexe avec la paroi cellulaire Inactivation d'enzyme
Quinines 	Hypericine 	Se lie aux adhésines Formation de complexe avec la paroi cellulaire Inactivation d'enzyme
Falvonoides 	Chrysin	Se lie aux adhésines Formation de complexe avec la paroi cellulaire
Flavonoles 	Abyssinone	Inhibition d'enzyme (transcriptase inverse de VIH)
Coumarines 	Warfarine 	Interaction avec l'AND eucaryotique activité antiviral.
Tannins	Egallitannin	Se lie aux protéines Se lie aux adhésines Inhibition d'enzyme Privation de substrat Formation de complexe avec la paroi cellulaire Interruption de la membrane

# *Partie pratique*

*Matériel  
et méthodes*

## I. Matériel végétal

### I.1. Echantillonnage

#### Description et collecte de matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles et les écorces de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina* appelées localement mandarine et clémentine, que nous avons récolté durant le mois de janvier 2014 au niveau de la ville de Samaoun, située à 65 Km de la ville de Bejaia. L'échantillonnage a été réalisé de manière aléatoire à partir de différents arbres et dans un endroit propre.

Les échantillons de feuilles et de fruits sont prélevés à partir des arbres sains, bien développés et ne présentant aucune lésion. Ces échantillons ont été donc emballés dans des sacs, étiquetés, puis transportés au laboratoire en vue de réaliser l'extraction et le dosage des différentes classes d'antioxydants ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne.

## II. Préparation du matériel végétal pour l'extraction

### II.1. Séchage:

#### Principe

Dans les cellules végétales, certaines enzymes telles que les polyphénols oxydases, et les glycosidases peuvent provoquer des modifications des composés phénoliques des plantes. Un séchage adéquat du matériel végétal peut remédier à ces pertes, en éliminant ces activités enzymatiques et conserver ainsi l'échantillon (Owen et Johns, 1999).

#### Mode opératoire

Les feuilles et les fruits de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina* sont lavées avec de l'eau de robinet, et débarrassées de la poussière et d'autres particules, puis les fruits sont épluchés et les écorces ont été récupérées. Les échantillons sont soumis à un séchage dans une étuve à 40°C, le séchage complet est confirmé par la stabilisation du poids de l'échantillon.

### II.2. Broyage et tamisage

Après le séchage, les feuilles et les écorces de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina* sont broyées séparément à l'aide d'un broyeur électrique, afin d'avoir une poudre fine qui sera ensuite tamisée par un tamiseur électrique composé de plusieurs tamis à différents

diamètre. Seule la poudre dont le diamètre est inférieur à 250 $\mu$ m va servir pour la préparation de l'extrait, parce que plus le diamètre des grains est petit plus la surface d'échange entre l'échantillon et le solvant d'extraction est grande, et plus le rendement d'extraction est meilleur (**Diallo et al., 2004**).

La poudre ainsi obtenue est ensuite conservée dans un récipient en verre, fermé hermétiquement et stocké à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité, pour les prochaines utilisations.

### III. Extraction des polyphénols

L'extraction a pour but de libérer les polyphénols présents dans les structures par rupture du tissu végétal, et par diffusion (**Robards, 2003**). Dans cette étude une extraction de type solide /liquide (par macération) a été réalisée selon la méthode de **Owen et Johns (1999)**, avec quelques modifications. Le procédé d'extraction est réalisé comme suit :

#### III.1. Macération

##### Principe

La macération consiste à laisser tremper la matière végétale dans l'eau ou dans un autre solvant organique à température ambiante, sous agitation continue. L'extraction a lieu par pénétration du solvant dans la cellule végétale, phénomène provoquant leur gonflement et la rupture des liaisons moléculaires de faible énergie. Les extractibles sont alors dissous et diffusent progressivement des cellules vers le solvant (**Royer et al., 2010**).

##### Mode opératoire

Plusieurs solvants peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques, quatre solvants purs de polarité différente, sont utilisés dans cette étude : le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'hexane.

- 3 g de la poudre dans un bécher sont ajustés à 50 ml de chaque solvant.
- Les mélanges sont soumis à une agitation, à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 12 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. L'agitation des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéité du milieu.

### III.2. Filtration et évaporation:

- Après macération, les mélanges ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre.
- Les filtrats sont mis dans des béchers ensuite séchés à l'étuve à 40°C jusqu'à l'évaporation totale du solvant d'extraction.
- La pesée de l'extrait a été réalisée après évaporation totale du solvant et stabilisation du poids du bécher.
- Le taux d'extraction est estimé comme suit :

$$\text{Taux de la matière extraite (\%)} = ((p1-p0) / E) \times 100$$

Où :

- P0: Poids du bécher vide (g) ;
- P1: poids du bécher après évaporation (g) ;
- E : poids de l'échantillon (3g de poudre).

La matière extraite est reconstituée avec le solvant correspondant.

## IV. Dosage des composés phénoliques

### IV.1. Dosage des polyphénols totaux

La détermination quantitative des polyphénols totaux contenus dans les quatre extraits : méthanolique, éthanolique, acétonique et hexanique des feuilles et des écorces de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina* est réalisée par spectrophotométrie, selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)**., cette méthode repose sur l'utilisation du réactif de Folin – Ciocalteu.

#### Principe

Cette méthode est basée sur les réactions d'oxydoréduction, Le réactif de Folin-Ciocalteu, acide de couleur jaune, est utilisé comme oxydant, il est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Lors de l'oxydation des polyphénols, le Folin est réduit en un mélange bleu d'oxyde de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) et ça en présence de carbonate de sodium. L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux des polyphénols présents dans les extraits (**Ribereau- Gayon, 1968**).

### Mode opératoire

100 µl de chaque extrait sont mélangés avec 6 ml d'eau distillée et 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu. 1.5 ml de carbonate de sodium (20%) et 1.9 ml d'eau distillée sont additionnés. Un blanc, contenant tous les réactifs, excepté l'échantillon, a été préparé dans les mêmes conditions. Après 2 heures d'incubation à l'obscurité, la lecture a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm.

La concentration en composés phénoliques a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue par l'acide gallique comme standard (annexe I.1). Les résultats sont exprimés en mg EAG/100gMS. (Où : EAG = équivalent acide gallique ; MS= matières sèches).

## IV.2. Dosage des flavonoïdes

### Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement OH libre en position 5 susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $Al^{3+}$ , la coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (**Ribereau-Gayon, 1968**).

### Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode colorimétrique de **Lamaison et Carnat (1991)**, rapportée par **Bahorunet al. (1996)**.

2 ml d'une solution éthanolique de chlorure d'aluminium hydraté ( $AlCl_3, 6 H_2O$ ) à 2% sont additionnés à 2 ml d'extrait éthanolique. Le mélange est vigoureusement homogénéisé et laissé au repos pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Un blanc contenant le chlorure d'aluminium hydraté ( $AlCl_3, 6 H_2O$ ), a été préparé dans les mêmes conditions. Les absorbances des échantillons sont lues au spectrophotomètre à 430 nm.

La quantité des flavonoïdes contenus dans les extraits est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la catéchine (annexe I.2). Les résultats sont exprimés en mg EC /100mgMS. (EC : équivalent de la catéchine).

## IV.3. Dosage des tannins

### Principe

Le principe du dosage des tannins, est basé sur leur capacité à former des complexes insolubles avec la protéine BSA, et de former des solutions colorées avec certains métaux



(chlorure ferrique) de couleur bleue-vert-violacée (**Ribereau-Gayon, 1968 ; Hagerman et Butler, 1978**).

### Mode opératoire

La teneur en tannins totaux a été déterminée selon le protocole proposé par **Hagerman et Butler (1978)** basé sur la précipitation des protéines (BSA).

1 ml de la solution BSA est ajouté à 1 ml de solution d'extrait. Après 24 heures d'incubation à 4°C, on procède à une centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min. Le culot récupéré est dissout dans 2 ml de la solution SDS/TEA pendant 15 min, puis additionné avec 0,5 ml de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) à 0,1%. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement avant d'être laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 15 min. Les absorbances des échantillons sont lues au spectrophotomètre à 510 nm.

La teneur en tannins est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS), figure 3 (Annexes I).

## V. Dosage des Caroténoïdes

### Principe

Les caroténoïdes contiennent dans leurs structures plusieurs doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de l'absorption de la lumière par excitation des électrons des liaisons  $\pi$  (**Rodriguez-amaya, 2001**).

### Mode opératoire

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée selon la méthode de (**Sass-Kiss et al. 2005**) avec quelques modifications.

2 g de poudre de chaque échantillon sont broyés avec un pilon, dans 40 ml de solvant d'extraction (hexane, acétone/éthanol, 5, 5/2, 5/2), ce dernier est récupéré dans une ampoule à décanter, après agitation, on laisse le mélange se reposer et lors de la séparation des deux phases, la phase hexanique supérieure est récupérée et protégée de la lumière par du papier aluminium.

L'opération est répétée jusqu' à l'épuisement total de la couleur jaune. On ajoute quelques gouttes de KOH pour les extraits de feuilles afin de séparer les chlorophylles des caroténoïdes.

La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de la phase hexanique à 450 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de  $\beta$ -carotène par 100 g de matière sèche en se référant à une courbe d'étalonnage figure 4 (Annexe I).

## VI. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités antioxydantes des quatre extraits éthanoliques en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants. Cette étude a porté sur la détermination du pouvoir antiradicalaire en utilisant le radical " DPPH ", et " ABTS ", et par la détermination du pouvoir réducteur qui est basée sur la mesure de la capacité des polyphénols des extraits à réduire les ions métalliques.

### VI.1. Evaluation du pouvoir réducteur

La détermination du pouvoir réducteur des extraits éthanoliques est réalisée en utilisant deux tests : test de ferricyanure de potassium et celui du phosphomolybdate d'ammonium.

#### VI.1.1. Test de ferricyanure de potassium

##### Principe

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits, à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe ferricyanure de potassium, en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits (Chung *et al.*, 2002).

##### Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode d'Oyaizu (1986) rapportée par (Khizar *et al.* 2010).

Un volume de 1ml de chaque extrait, à différentes concentrations, est ajouté à 2,5ml de tampon phosphate (pH 6,6 ; à 0,2M), suivi de 2,5 ml de Ferricyanure de Potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à 1%, après agitation, le mélange est soumis à l'incubation dans un bain-marie à

50 °C pendant 20 min. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont additionnés au mélange et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min.

Un volume de 2,5 ml du surnageant est ajouté à 2,5 ml d'eau distillée, puis 0,5 ml de chlorure ferrique à (0,1%) sont ajoutés au mélange. Le mélange homogénéisé préalablement, est incubé pendant 10 min à l'abri de la lumière et l'absorbance est lue à 700 nm.

### VI.1.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium

#### Principe

Ce test a été employé pour déterminer la capacité antioxydante, basée sur la réduction de l'ion  $\text{Mo}^{+6}$  en ion  $\text{Mo}^{+5}$  par les polyphénols contenus dans les extraits et formation d'un complexe phosphate- $\text{Mo}^{+5}$  de couleur verdâtre, en milieu acide, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits (Prieto *et al.*, 1999; Baskaret *al.*, 2007).

#### Mode opératoire

Le protocole expérimental est celui décrit par (Meot-Duros *et al.*, 2008). 2 ml de réactif de molybdate (préparé à partir de molybdate d'ammonium à 4 mM, du phosphate de sodium à 26 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 mM) sont ajoutés à 200  $\mu\text{L}$  des extraits à différentes concentrations. Après incubation à 90 °C pendant 90 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 695 nm.

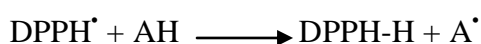
## VI.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire

### VI. 2.1. Neutralisation du radical DPPH'

#### Principe

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH' (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le radical DPPH' est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antiradicalaire (Milardovic *et al.*, 2006).

le mécanisme est récapitulé dans la réaction suivante (Guimarães *et al.*, 2010).



Dont : AH : donneur de l'hydrogène.

### Mode opératoire

Le protocole utilisé dans cette méthode est celui de **Milardovic et al. (2006)**. Il consiste à mélanger 2,9 ml de la solution DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  M) avec 0,1 ml de chaque extrait à différentes concentrations; la mesure de la réaction de réduction de la solution du DPPH a été faite à 517 nm après une incubation pendant 30 min.

Les valeurs IC50 (concentration inhibitrice) ont été déterminées pour chaque extrait, et définies comme étant la concentration du substrat qui cause l'inhibition de 50 % de l'activité du DPPH.

Le pourcentage de neutralisation du radical de DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de DPPH} = ((\text{Abs témoin} - \text{Abs échantillon}) / (\text{Abs témoin})) \times 100$$

### VI.2.2. Inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup>

#### Principe

L'activité antiradicalaire des extraits est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical ABTS<sup>•+</sup> «2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) » qui est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydant des échantillons. Ce radical cationique est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleue (**Prouillac, 2006**).

L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cationique entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante des composés testés, du temps et de la concentration (**Re et al., 1999**).

#### Mode opératoire

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> est évalué par la méthode de **Bhourri et al.(2011)** avec quelques modifications.

La solution d'ABTS<sup>•+</sup> est préparé par mélange de 7 mM d'ABTS et de 2,45mM de persulfate de potassium incubé pendant 12-16h à l'abri de la lumière et à température ambiante avant l'utilisation. La solution d'ABTS est diluée avec l'éthanol jusqu'à l'obtention

d'une absorbance de 0.7 ( $\pm 0.02$ ) à 734 nm. 1ml de la solution d'ABTS est additionné à 20 $\mu$ l de l'extrait à différentes concentrations.

On mesure de la réaction de réduction de la solution d'ABTS chaque minute durant 5 minutes à 734 nm, la capacité antioxydante, des extrais testés, est exprimée par rapport aux concentrations de standard Trolox (TEAC), ce qui donne des indications utiles sur le potentiel antioxydant de l'extrait de plantes.

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> :

$$\text{PI \%} = \left[ \frac{\text{Abs Contrôle} - \text{Abs Extrait}}{\text{Abs Contrôle}} \right] \times 100$$

Où :

Abs Contrôle : Absorbance du témoin.

Abs Extrait : Absorbance de l'extrait.

## VII. Evaluation de l'activité antimicrobienne

### VII.1. Test des disques

#### VII.1.1. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes et la levure *Candida albicans* utilisées comme germes cibles sont ré-isolées sur gélose nutritive à l'exception de *S. aureus* et SARM qui sont ensemencés sur le milieu Chapman. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24h. Un nombre de colonies bien isolées, est déterminé préalablement selon un dénombrement antérieur, est prélevé à partir de ces boîtes, puis dilué dans 5ml d'eau physiologique stérile de manière à avoir une charge microbienne de 10<sup>8</sup> germe/ml.

#### VII.1.2. Réalisation du test d'activité

Les activités antimicrobiennes des différents extraits méthanoliques sont déterminées par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton. Le mode opératoire utilisé est celui décrit par (Younes *et al.* 2009) avec quelques modifications. En effet, des boîtes de milieu Muller-Hinton sont ensemencées par écouvillonnage avec des inocula de 10<sup>7</sup> germe/ml des germes cibles utilisés et des disques vierges d'antibiographie stériles ayant un diamètre de 6 mm sont déposés aseptiquement sur la gélose. 20  $\mu$ l de chaque extrait à une concentration de 100mg/ml et de contrôle négative (méthanol pure) sont déposés sur les disques. Les boîtes sont

ensuite laissées pendant 2h à 4°C afin de permettre une bonne diffusion des extraits testées avant d'être incubées à 37°C pendant 18 à 24h pour les bactéries et de 24 à 48h pour *C. albicans*. L'activité antimicrobienne est déterminée par la mesure des zones d'inhibition apparues autour des disques (y compris le diamètre du disque).

### **VII. Analyse statistique**

Une analyse descriptive des résultats de trois essais a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007.

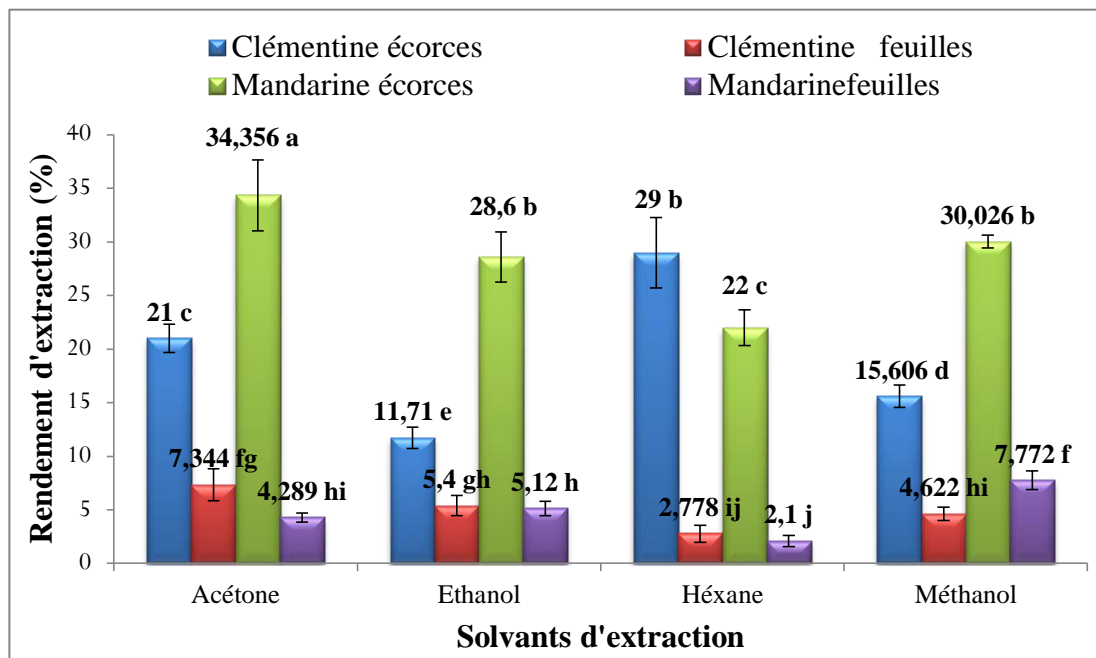
Une étude statistique a été faite par l'analyse de la variance (ANOVA), en utilisant le test LSD, à un facteur pour les différents dosages. Avec le logiciel STATISTICA 5.5 Fr. Quant à l'analyse statistique des résultats du pouvoir réducteur, neutralisation du radical DPPH et ABTS ainsi que le test phosphomolybdate d'ammonium a été réalisée à deux facteurs et cela pour la comparaison de ces résultats et la mise en évidence des différences significatives ou non entre les échantillons.

# *Résultats et discussions*

### II.1. Rendement d'extraction

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité : la méthode d'extraction, la granulométrie des particules, la durée d'extraction, la nature et le volume du solvant utilisé (Levizou *et al.*, 2004). Ainsi que la présence de substances interférentes (Naczek et Shahidi, 2004).

La méthode d'extraction par macération en utilisant l'éthanol, le méthanol, l'hexane et l'acétone comme des solvants d'extraction, a permis d'obtenir des taux d'extraction présentés dans le tableau I (annexe V) et la figure 16 :



**Figure 16 :** Comparaison des rendements d'extraction des quatre échantillons par quatre solvants.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ). Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d > \dots > j$ .

Les barres verticales représentent les écarts-types.

D'après ces résultats on remarque que les taux d'extraction des extraits des feuilles et des écorces des deux variétés (*Citrus clémentina* et *Citrus reticulata*) les plus élevés sont ceux des écorces de mandarine (22%- 34,35%) suivis par les écorces de clémentines (11,71% – 29%), exception faite pour l'hexane où le rendement de la clémentine dépasse celui de la mandarine. Les extraits des feuilles de clémentine viennent en troisième position avec des valeurs qui varient de 2,77 jusqu'à 7,34 %, suivis des feuilles de mandarine (2,1%- 7,77%). Pour les écorces de la mandarine, L'extrait acétonique a donné le meilleur rendement (34.356%), suivi du méthanol et de l'éthanol avec des valeurs proches de 30.026% et de



28.60%, respectivement. Par ailleurs, l'hexane (29%) et l'acétone (21%) sont les solvants qui ont donné les meilleurs rendements pour les écorces de la clémentine.

L'utilisation de méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange par **Guimarães et al. (2009)** a donné un taux d'extraction de 37,27%, ce qui est légèrement supérieur à nos résultats.

Les taux d'extraction obtenus dans la présente étude est inférieur à celui rapporté par **Huang et Ho (2010)** qui est de 31%. Alors que **Goulas et Manganaris (2012)** ont obtenus un rendement d'extraction de 70,2%, ce qui est largement supérieur aux résultats trouvés dans notre étude.

Le meilleur rendement des extraits des feuilles de la mandarine est noté pour l'extrait méthanolique avec un taux de :  $7.772 \pm 0.877\%$  et l'extrait acétonique pour les feuilles de la clémentine avec un rendement de :  $7.344 \pm 1.477\%$ .

D'après une étude réalisée par **Muthiah et al. (2012)** l'utilisation d'éthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques a donné un taux d'extraction de 17,5% pour les feuilles de bigarade, ce qui est supérieur au résultat trouvé lors de cette étude.

Les études de **Jamilah et al. (2011)**, **Minichini et al (2011)**, et **Tachakittirungrod et al. (2007)** sur les feuilles de *citrus hystrix* ont montré les résultats suivants : 9.00%, 8.2%, 7.42% respectivement ce qui est proche de ce qu'on a trouvé.

En vue d'ensemble de la figure 18, nous permet de constater une légère différence entre le rendement d'extraction des feuilles des deux variétés. On revanche il existe une différence appréciable entre le rendement d'extraction des écorces des deux variétés.

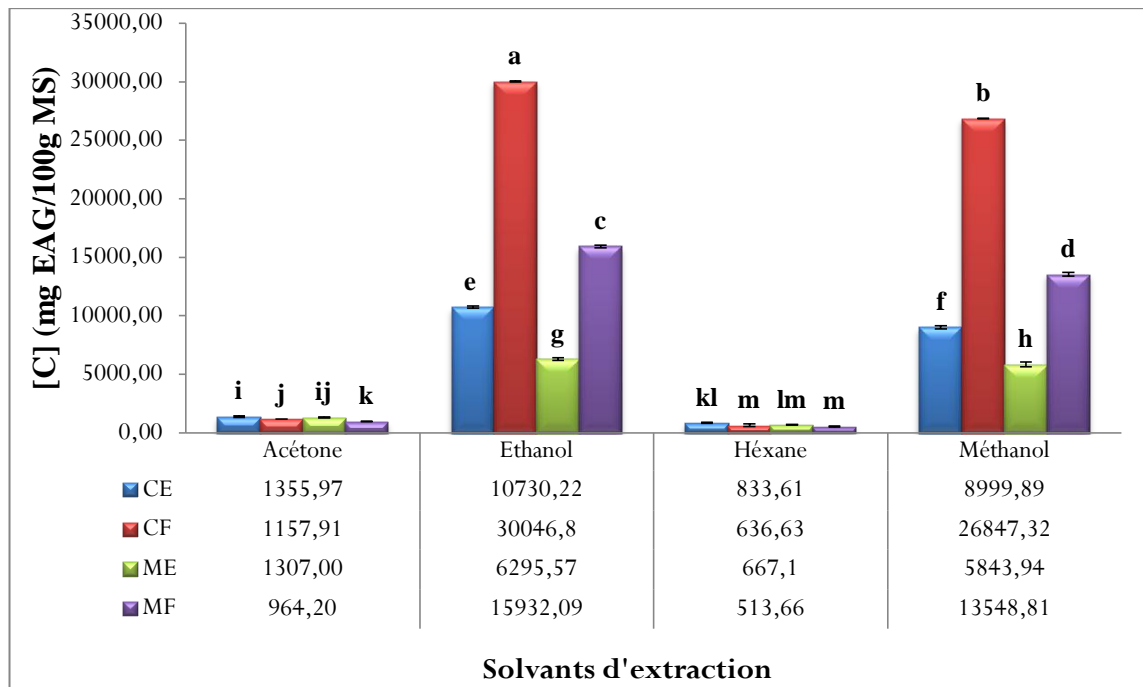
Selon **Amarti et al (2010)** la composition chimique des composés phénolique, du point de vue qualitatif et quantitatif, peut varier. Ces variations sont en rapport avec certains facteurs écologiques, la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante ou même les facteurs génétiques.

## II.2. Dosage des composés phénoliques

### II.2.1. Dosage des polyphénols

Au cours du dosage des polyphénols totaux des 16 extraits des feuilles et des écorces, une coloration bleue est apparue après 2h de l'ajout du réactif Folin-ciocalteu et de carbonate

de sodium, ceci témoigne la présence de polyphénols totaux dans ces extraits (**Guimarães et al., 2009**).



**Figure17** : les teneurs en polyphénols totaux présents dans les quatre échantillons par les quatre solvants.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ). Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d > \dots > m$ .

Les barres verticales représentent les écarts-types

Les résultats obtenus (figure17) révèlent que les meilleurs teneurs sont notés au niveau des extraits éthanoliques pour tous les échantillons, suivis de ceux du méthanol avec des valeurs assez proches. Cela pourrait être expliqué par la capacité de l'éthanol à dissoudre la majorité des composés phénoliques (**Cowan 1999**). Par ailleurs l'extrait héxanique a donné le plus faible rendement pour tous les extraits.

D'après les résultats obtenus dans la figure17. On remarque que la clémentine est très riche en phénols totaux par rapport à la mandarine concernant les deux parties (feuilles, écorces).

Une étude réalisée par **Ghasmi et al. (2009)** sur les écorces et les tissus de 13 variétés de Citrus exhibe des valeurs variant entre 10420 et 17210 mg EAG/100mg MS, ce qui est supérieur à nos résultats obtenus pour l'extrait éthanolique (clémentine :  $10730,22 \pm$

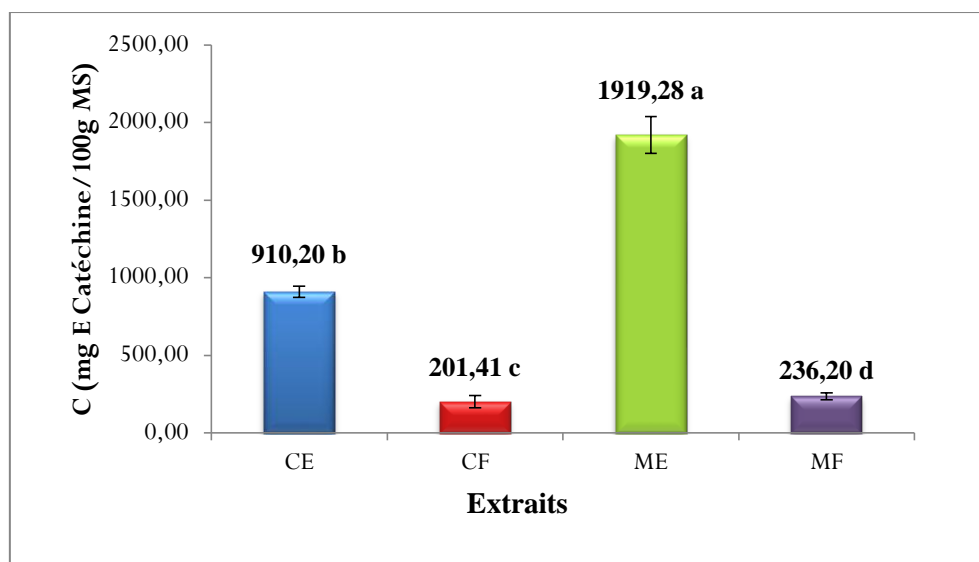
98,4 mg EAG/100mg MS, mandarine : 6295,57  $\pm$  106,21 mg EAG/100mg MS), cette différence est probablement due à la méthode d'extraction (lyophilisation).

En outre on remarque que ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Guimaraes (2010)** sur l'orange (7975 mgEAG/100g MS) cette variabilité pourrait être due à la composition chimique qui se diffère entre les deux espèces.

Selon les résultats de **Minichini et al. (2011)**, la teneur moyenne en polyphénols totaux des feuilles de *Citrus medica* L. est de 401,60  $\pm$  5,1 mg EAG /100g MS qui est largement inférieur aux résultats des feuilles de la clémentine (30046,8  $\pm$  114,66 mgEAG/100g MS) et la mandarine (15932,09  $\pm$  117,71 mg EAG /100g MS).

### II.2.2. Dosage des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits des feuilles et des écorces après l'addition de la solution de chlorure d'Aluminium ( $AlCl_3$ ), cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extrais analysés.



**Figure 18** : les teneurs en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des deux variétés.

*Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)*

*Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ). Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d$ .*

*Les barres verticales représentent les écarts-types*

D'après cette figure nous constatons que l'écorce de la mandarine montre la plus grande teneur en flavonoïdes (1919,28  $\pm$  118,154 mg EC/100 g MS) qui est largement

supérieur aux teneurs déterminés par **Guimaraes (2010)** lors de son étude sur les écorces d'oranges en utilisant la même méthode qui est de  $397 \pm 0,021$  mg EC/100g MS.

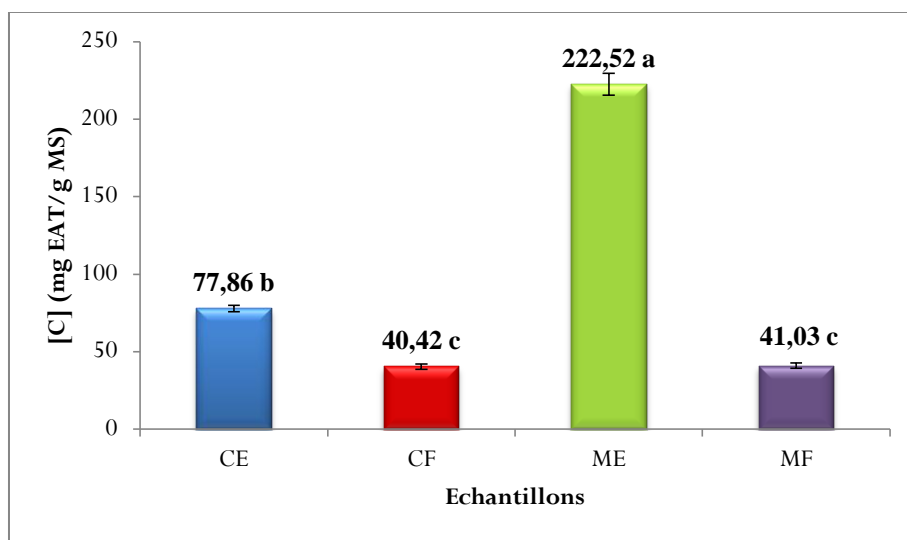
En ce qui concerne les extraits des feuilles pour les deux variétés sont proche, ils représentent  $236,20 \pm 38,716$  mg EC/100 g MS pour la mandarine et  $201,41 \pm 38,716$  mg EC/100 g MS pour la clémentine.

Selon **Minichini et al. (2011)**, la teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique des feuilles de *Citrus medica* est de  $97,5 \pm 2.8$  mg EC/100g MS, elle est deux fois inférieur à celle trouvée dans la présente étude ( $236,20 \pm 38,716$  mg EC/ g MS). Cette différence est peut être due à la différence de l'espèce étudiée.

### II.2.3. Dosage des tannins totaux

La méthode utilisée pour le dosage des tannins est basée sur la capacité des tannins à former des complexes insolubles avec la protéine BSA et de former des solutions colorées avec certains métaux. Les teneurs en tannins sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique mg/ml figure 3 (annexe I).

Les résultats des dosages ont mis en évidence la présence de tannins totaux dans les quatre échantillons (Figure 19).



**Figure19:** les teneurs en tannins totaux dans les extraitséthanolique des feuilles et des écorces des deux variétés.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ). Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d$ .

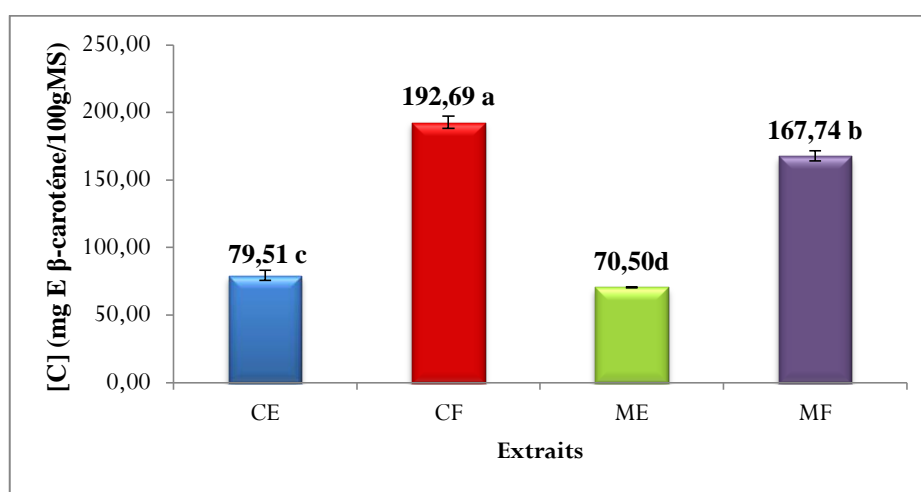
*Les barres verticales représentent les écarts-types*

Selon ces résultats, la teneur en tannins la plus élevée est noté par l'écorce de mandarine ( $222,52 \pm 7,09$  mg équivalent d'acide tannique/ 100g MS)). Concernant les feuilles leur teneurs en tannins sont assez proche ( $40,42 \pm 1,64$  mg EAT/100gMS pour la clémentine et  $41,03 \pm 1,63$  mg EAT/100gMS pour la mandarine) pour les deux variétés.

Aucun résultat n'a été trouvé, lors de notre recherche, sur la teneur en tannins des feuilles d'agrumes.

#### II.2.4. Dosage des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques tels que l'acétone, l'héxane, etc (Delia et Rodriguez-Amaya, 2001). Au cours de leur extraction, deux phases bien distinctes se sont formées : une phase apolaire lipophile à partir de laquelle ont été isolés les caroténoïdes et une phase polaire qui renferme des molécules hydrophiles tels que les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes. Les teneurs en caroténoïdes sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec  $\beta$ -carotène mg/ml figure 4 (annexe I).



**Figure 20** : les teneurs en caroténoïdes dans les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des deux variétés.

*Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)*

*Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d$ .*

*Les barres verticales représentent les écarts-types*

En vued'ensemble de la figure 20 les extraits des feuilles des deux variétés sont plus riche en caroténoïdes avec des taux de  $192,69 \pm 4,64$ mg équivalent de  $\beta$ -carotène /100 g MS)

,167,74 ± 3,78mg équivalent de β-carotène /100 g MS) respectivement, et pour la teneur des écorces des deux variétés en caroténoïdes sont proche dont les concentrations sont :79,51 ± 3,8mg équivalent de β-carotène /100 g MS) pour la clémentine et 70,50 ± 0,47mg équivalent de β-carotène /100 g MS).

**Delia et Rodriguez-Amaya (2001) et Dias *et al.* (2009)**, ont indiqué que la concentration en caroténoïdes varie non seulement avec les espèces mais aussi avec les variétés, les facteurs naturels (la lumière, le sol, le degré de maturation, le climat, l'origine géographique et les conditions de culture) et les conditions de conservation et de stockage, en effet l'exposition des agrumes à la lumière et à des températures élevées favorise les pertes en caroténoïdes.

### II.3. Evaluation de l'activité antioxydant

Les composés antioxydants sont capables de donner des électrons aux radicaux réactifs, en les réduisant en espèces plus stables et non réactifs (**Koksal *et al.*, 2011**). Bien qu'il y a beaucoup de méthodes pour la détermination de l'activité antioxydante des extraits des plantes, chacune avait ses propres limites. De plus, il a été discuté que l'activité antioxydant des extraits ne peut pas être raisonnablement validée par une seule méthode, à cause de la nature complexe des composés phytochimiques et leurs interactions. Par conséquent l'importance de l'utilisation de multi systèmes avec des indices différents (**Ramful *et al.*, 2011**). Dans cette étude les activités antioxydantes des écorces et des feuilles des deux variétés ont été évaluées en utilisant quatre méthodes : test de ferricyanure de potassium, test de phosphomolybdate, test de DPPH et test d'ABTS.

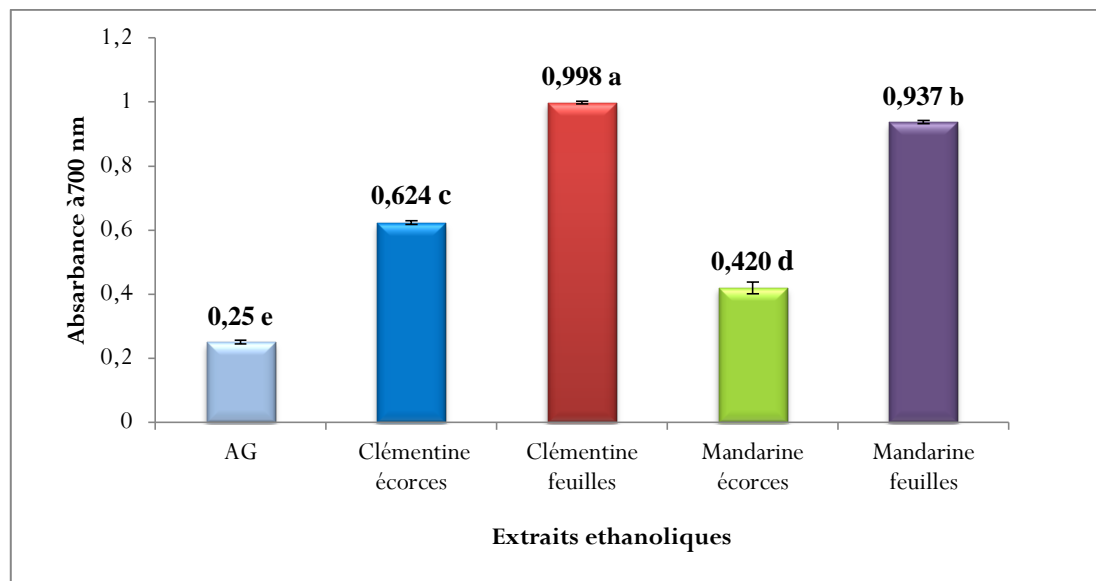
#### II.3.1. Pouvoir réducteur

##### II.3.1.1. Test de ferricyanure de potassium

La réduction de fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) est un test souvent employé pour évaluer la capacité réductrice d'un échantillon donné, cette aptitude de réduction est un indicateur significatif de son activité antioxydante (**Koksal *et al.*, 2011**).

Au cours du dosage, la couleur jaune du ferricyanure de potassium vire vers une Couleur verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait (**Gulçin, 2010 ; Gulçin *et al.*, 2011**). La présence d'antioxydants dans les extraits des écorces et des feuilles testés entraîne la réduction du complexe fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) en sa forme réduite fer ferreux

(Fe<sup>+2</sup>). Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits et celui de standard à une concentration de 50µg/ml est illustrés dans la figure 21.



**Figure 21** : Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques et celui de standard.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ).

Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d > e$ .

Les barres verticales représentent les écarts-types

D'après cette représentation graphique, on remarque en premier lieu que les extraits des feuilles et des écorces possèdent un pouvoir réducteur élevé en comparant à l'acide gallique. Aussi, il est important de noter que l'activité réductrice de fer dépend de la concentration des extraits, plus la concentration est élevée plus le pouvoir réducteur augmente.

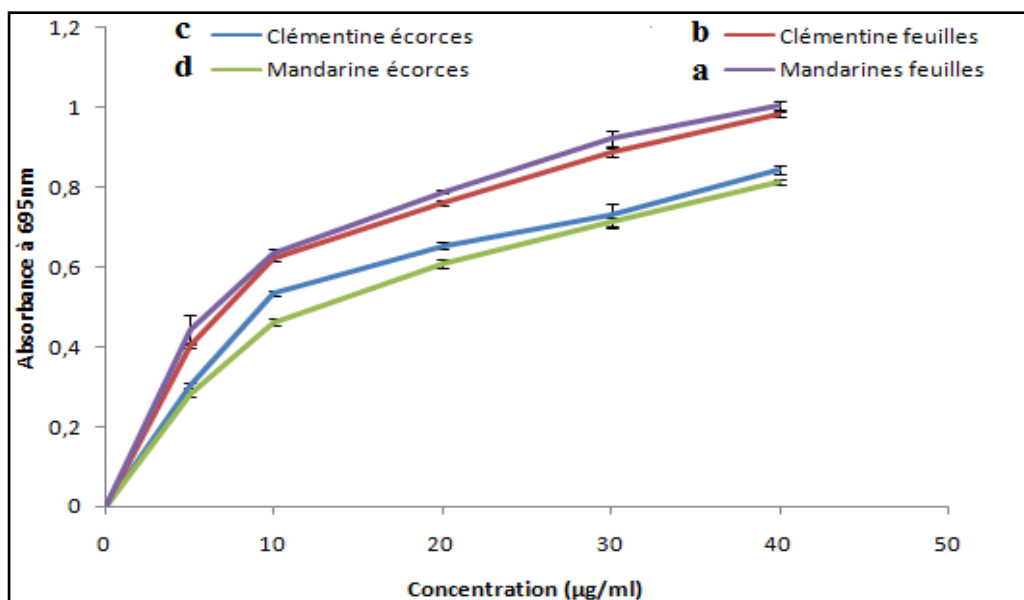
Le pouvoir réducteur obtenu dans notre extrait éthanolique est plus puissant que celui trouvé par **Lagha et Madani (2013)** qui ont travaillé sur l'extrait méthanol-eau des écorces et des feuilles de différentes variétés d'oranges. Les extraits des écorces ont une absorbance de 0,07- 0,25, alors que, à une concentration de 50µg/ml de notre extrait a donné une absorbance de  $0,624 \pm 0,006$  pour la clémentine et  $0,420 \pm 0,018$  pour la mandarine. Tandis que les mêmes auteurs ont trouvé une absorbance entre 0,114 et 0,251 pour les feuilles qui est largement inférieure à nos résultats concernant les feuilles (clémentine :  $0,998 \pm 0,004$ , mandarine :  $0,420 \pm 0,006$ ). Cette différence peut être due à l'endroit et la période de la récolte, aux facteurs environnementaux, aux conditions d'extraction et à la différence de la polarité des solvants utilisés.

Si on compare les résultats qu'on a trouvé au terme de variété on constate que la clémentine qui présente la plus grande activité. Cette différence dans la capacité réductrice est probablement due à la différence de teneurs en polyphénols qui se diffèrent d'un extrait à un autre.

Une corrélation positive entre l'activité réductrice des extraits et la teneur en polyphénols a été trouvée ( $R=0,87$ ).

### II.3.1.2. Test de phosphomolybdate

L'évaluation de pouvoir réducteur en fonction des différentes concentrations des extraits et celles des standards utilisés est montrée dans la figure 22 et figure 6 (annexe II) respectivement. Les résultats représentés dans les figures montrent que l'augmentation de la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (extraits).



**Figure 22 :** Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de  $Mo^{+6}$  par les 4 extraits

*Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )*

*Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0,05$ ).*

*Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b$ .*

*Les barres verticales représentent les écarts-types*

En vue d'ensemble de la figure 25 on remarque que les 4 extraits révèlent une forte activité réductrice en vers l'ion  $Mo^{+6}$ .



Une corrélation positive entre l'activité réductrice des extraits et la teneur en polyphénols a été trouvée ( $R=0,78$ ).

### II.3.2. Activité antiradicalaire

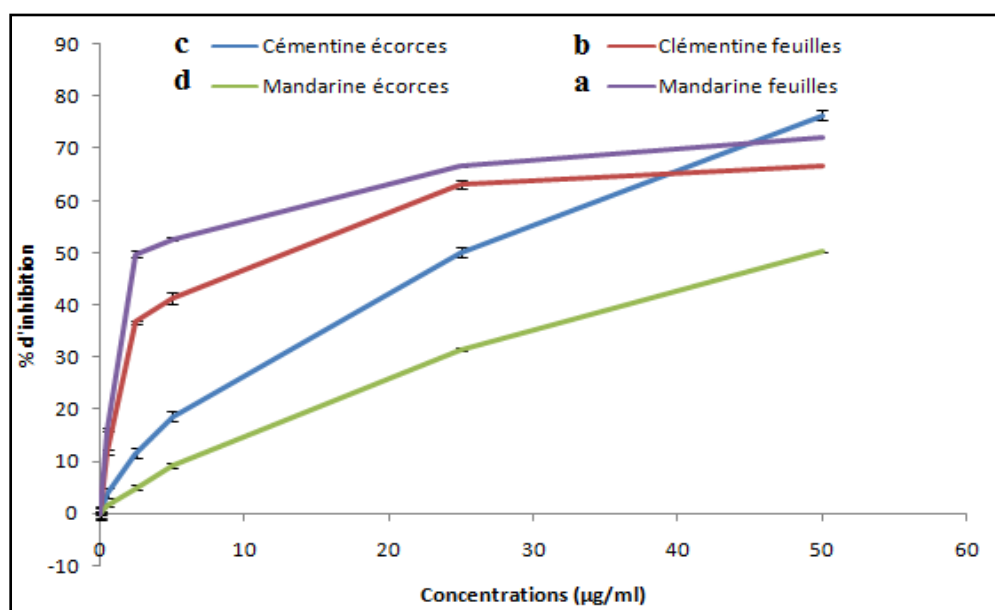
#### II.3.2.1. Test de DPPH

Après 30 mn d'incubation de la solution DPPH-extrait (à différentes concentrations (0,5, 2,5, 5, 25 et 50  $\mu\text{g/ml}$ ), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les quatre extraits, ce changement de couleur est le résultat de la réduction de DPPH, ce qui montre que les quatre extraits des feuilles et des écorces des deux variétés ont un effet scavenger de radical DPPH.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des écorces et des feuilles des deux variétés sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH, par rapport aux différentes concentrations des extraits.

L'évaluation de l'activité scavenger des quatre extraits ainsi que celle d'antioxydant de référence utilisés (acide gallique) est représentée dans la figure 23 et figure 8 (annexe II) respectivement. Cette activité est positivement corrélée avec les concentrations croissantes.

Les résultats figurant dans la figure 23 et le tableau III (annexe VI) illustrent l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH $^{\bullet}$ .



**Figure 23:** Evolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH $^{\bullet}$  par les différents extraits.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ )

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ).

Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ;  $a > b > c > d$ .

Les barres verticales représentent les écarts-types

**Tableau III** : Les concentrations des extraits des feuilles qui inhibent 50% de DPPH.

Extraits	CE	CF	ME	MF
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	23,11±0,02	5,77±0,10	47,76±0,14	3,069±0,9

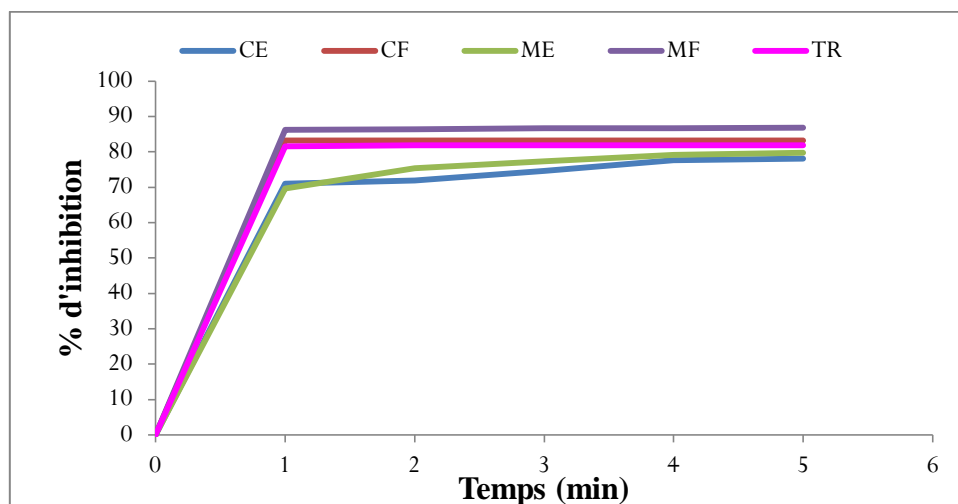
D'après ces résultats les extraits des feuilles des deux variétés ont exhibé les meilleures capacités antioxydantes vis-à-vis du radical DPPH<sup>\*</sup>, enregistrant des IC<sub>50</sub> de 3,069±0,9 µg/ml pour la mandarine et de 5,77±0,10 µg/ml pour la clémentine. Tandis que les grandes IC<sub>50</sub> sont noté pour l'écorce de la clémentine (23,11±0,02µg/ml) et de la mandarine (47,76±0,14µg/ml). Il est à noter que l'IC<sub>50</sub> est inversement lié à la capacité antioxydant de composé, comme elle est exprimée : la quantité des antioxydants qu'il faut pour réduire la concentration de radical à 50%. La IC<sub>50</sub> le plus petite évalue le mieux l'activité antioxydante d'un composé (**Kelebekt *al.*, 2009**).

La grande teneur en phénols et en flavonoides dans les écorces de *C. reticulata* var. ponkan peut être en cause de la forte activité antioxydante de cette plante. Comme il a été déjà rapporté, l'activité antioxydant de fruits et légumes augmente avec la présence de concentrations élevées de composés polyphénoliques (**Ghasemiet *al.*, 2009**).

Il est reconnue que seulement les flavonoïdes à certaines structures et particulièrement la position de l'hydroxyle dans la molécule peuvent agir comme un donneur de proton et montre une activité antiradicalaire. En outre les extraits sont des mélanges très complexes de différents composés avec différentes activités (**Ghasemiet *al.*, 2009**).

### II.3.2.2. Test d'ABTS

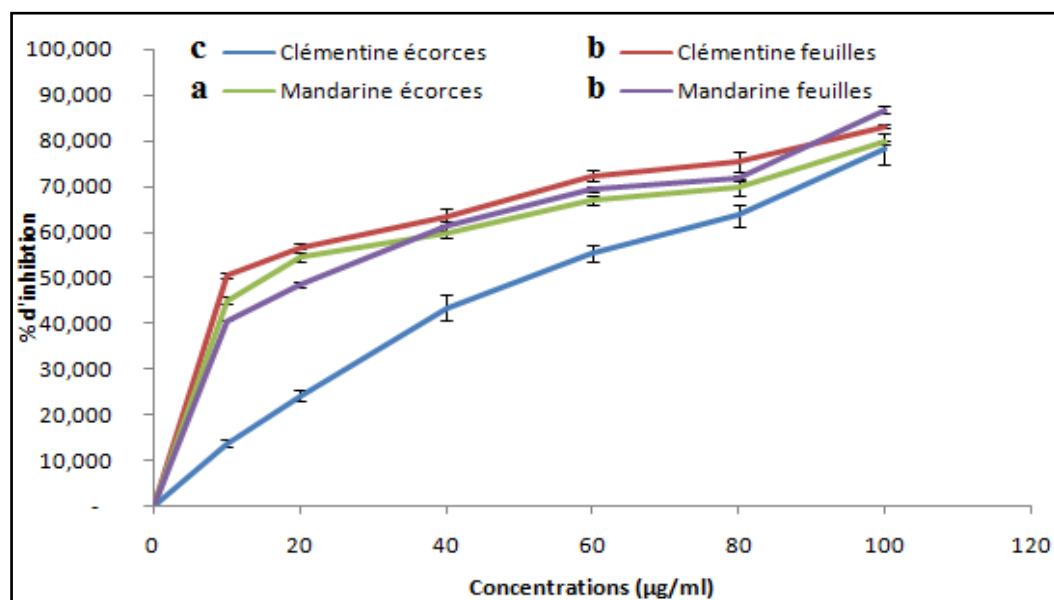
Pour chaque composé et pour chaque concentration une cinétique d'inhibition est réalisée. D'une façon générale pour l'ensemble des extraits testés. Nous observons une importante inhibition dès la première minute. Après une minute, la réaction se stabilise et nous obtenons un plateau. C'est pourquoi les IC<sub>50</sub> sont calculées à 1 minute.



**Figure 24:** évolution de pourcentage d'inhibition de radical ABTS<sup>•+</sup> en fonction de temps

Le radical ABTS<sup>•+</sup> est plus réactif que le radical DPPH<sup>•</sup>. Contrairement à ce dernier qui nécessite le transfert d'un atome d'hydrogène, la réaction avec le radical ABTS<sup>•+</sup> nécessite le transfert d'un électron (Gülçin, 2010).

Le radical ABTS<sup>•+</sup> est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits des plantes. En contact avec un donneur d'hydrogène conduit à la forme réduite de l'ABTS et à la décoloration de la solution. L'activité scavenging du radical ABTS<sup>•+</sup> des différents extraits est représentée dans la figure 25.



**Figure 25 :** Evolution du pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> par les différents extraits.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives (p< 0.05).

Les résultats sont classés par l'ordre décroissant ; a > b > c.

Les barres verticales représentent les écarts-types

D'après les résultats présentés dans le graphe 25 et le tableau IV (annexe VI) on remarque que l'activité scavenging augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits. En outre les quatre extraits ont dévoilé une bonne activité scavenger du radical  $ABTS^{\bullet+}$ . Si on compare les deux variétés, à une concentration de (100  $\mu\text{g/ml}$ ) d'extrait des écorces on remarque qu'il y a pas une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre la clémentine et la mandarine. Concernant les feuilles, il n'existe pas une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les deux variétés (Clémentine :  $83,225 \pm 0,31\%$ . Mandarine :  $86,831 \pm 0,68\%$ ). Comparant ces résultats avec celle de standard on constate qu'il a un pourcentage antiradicalaire de ( $81,517 \pm 0,41\%$ ) à une concentration de (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ce qui est proche aux résultats obtenus pour les feuilles de la clémentine ( $83,225 \pm 0,31\%$ ) et les écorces de la mandarine ( $79,736 \pm 0,42\%$ ), inférieur à celui des feuilles de la mandarine ( $86,831 \pm 0,68$ ) et supérieur à celui des écorces de la clémentine ( $78,270 \pm 3,41\%$ ).

L'activité des extraits est exprimée par la capacité antioxydante équivalente du Trolox qui correspond à la concentration de Trolox donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration du composé testé. Le tableau IV présente les  $IC_{50}$  des quatre extraits :

**Tableau IV** : Les concentrations des extraits des qui inhibent 50% le radical  $ABTS^{\bullet+}$ .

Extraits	CE	CF	ME	MF
$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$50,96 \pm 2$	$14,62 \pm 0,6$	$12,49 \pm 0,9$	$20,14 \pm 1$

L' $IC_{50}$  est la concentration qui correspond à 50% d'inhibition du radical  $ABTS^{\bullet+}$ , la valeur la plus faible correspond à l'efficacité la plus élevée par conséquent une activité anti-radicalaire plus importante. D'après ces résultats on révèle que les écorces de la mandarine montrent la plus faible valeur d' $IC_{50}$  ( $12,49 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$ ) et les écorces de la clémentine présente la plus grande valeur ( $50,96 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ ), tandis que l' $IC_{50}$  de standard est de ( $55,45 \pm 2,23 \mu\text{g/ml}$ ). On déduit que tous les extraits présentent une meilleure activité par rapport au standard.

La corrélation entre la teneur en polyphénol totaux et en flavonoïdes et l'activité antiradicalaire des 4 extraits éthanoliques de deux variétés a été effectuée :

**Tableau V:** coefficients de corrélation entre la teneur en polyphénol totaux et l'activité antiradicalaire

Composés phénoliques	Pouvoir antiradicalaire	
	DPPH*	ABTS*
Polyphénols	0,53	0,49

#### II.4. Activité antimicrobienne

Les activités antimicrobiennes des différents extraits méthanoliques sont déterminées par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton. Qui a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de 8 bactéries et une levure.

Le tableau VI montre l'activité antibactérienne des polyphénols des 4 extraits (CE, CF, ME, MF).

**Tableau VI:** Diamètres des zones d'inhibition

Microorganismes	Diamètre des zones d'inhibition (en mm) après 24 heures d'incubation à 37°C			
	CE	CF	ME	MF
<i>E. coli</i>	10,3	10,98	0	8,38
<i>P. aeruginosa</i>	0	6,89	0	6,8
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	7,75
<i>S. aureus</i>	7	11,77	7,38	8,57
<i>SARM</i>	0	7,86	9,78	9,72
<i>L. innocua</i>	0	9,43	10,51	11,05
<i>S. typhi</i>	0	8,29	0	0
<i>V. cholerae</i>	0	9,33	0	0
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0

CE : clémentine écorces, CF : clémentine feuilles, ME : mandarine écorces, MF : mandarines feuilles

En vue d'ensemble, les 8 bactéries ont montré une certaine sensibilité vis-à-vis des 4 extraits étudiés. Par contre la levure *C. albicans* résiste aux 4 extraits.

Les zones d'inhibitions les plus élevés sont obtenues par des extraits méthanolique des feuilles de clémentine vis-à-vis de *E.coli* ,*P. aeruginosa* ,*S.aureus* , , *S. typhi* , *V. cholerae* , avec des diamètres de 10.98 mm ,6.89 mm ,11.77 mm , 8.29 mm , 9.33 mm respectivement, sauf pour *SARM* ,et *L. innocua* ,qui sont plus sensible aux extraits des écorces et des feuilles de la mandarine avec des zone d'inhibition de 9.78 mm, 10.51 respectivement pour l'extrait des écorces et des diamètres d'inhibitions de 9.72 mm , 11.05 mm respectivement pour les extraits des feuilles .

Parmi les 8 bactéries testés; 5 bactéries peuvent résister aux extraits des écorces de la mandarine tandis que l'effet de cet extrait sur les trois autres (*S. aureus*, *SARM*, *L. innocua*,)présenté avec des zones d'inhibition de 7.38 mm et 9.78 mm et 10,51 mm respectivement. Ainsi l'extrait des écorces de la clémentine ne peut inhiber que deux souche bactériennes (*E. coli*,*S. aureus* avec des zone d'inhibition de 10,3 mm et 7 mm respectivement ).

les résultats obtenus dans la présente étude, en ce qui concerne l'activité inhibitrice des composés phénoliques sont inférieurs à ceux obtenus par **Meledez et Capriles (2006)** pour *bacillus subtilis* et *S.aureus*.

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

Selon Cowan (Cowan, 1999). Les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes.

Plusieurs études sur l'activité antibactérienne de polyphénols purifiés ont été publiées. Cependant, aucun résultat n'a pu être directement comparé à cause des différentes méthodes d'évaluation appliquées et des diverses espèces bactériennes utilisées.

*Conclusion  
et perspectives*

### Conclusion et perspectives

La présente étude avait pour objectif le dosage des différentes classes de composés phénoliques des feuilles et des écorces de *Citrus reticulata* et de *Citrus clementina* ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Dans ce but une extraction par macération en utilisant quatre solvant (éthanol, méthanol, hexane, acétone) a été réalisée dont le plus grand rendement est observé dans l'extrait acétonique des feuilles de *Citrus reticulata*. Les résultats des différents dosages ont permis de mettre en évidence la richesse des extraits de feuilles et des écorces de *Citrus reticulata* et de *Citrus clementina* en différentes classes de composés phénoliques (les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les tannins totaux et les caroténoïdes), les teneurs en ces composés se diffèrent d'un extrait à un autre ce qui révèle l'effet de choix de solvant sur le taux d'extraction, dont l'éthanol été le meilleur solvant d'extraction.

L'ensemble des extraits étudiés ont révélé des propriétés antioxydantes intéressantes, notamment l'activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup> à 100µg/ml par rapport aux standards utilisée, tandis que l'activité scavenger du radical DPPH<sup>•</sup> a été proche mais à une concentration de 50µg/ml.

Concernant l'activité antimicrobienne les extraits ont exhibé une appréciable activité vis-à-vis d'un nombre important de bactéries.

Une très bonne corrélation linéaire est obtenue entre les teneurs en composés phénoliques totaux et le pouvoir réducteur des extraits et une corrélation moyenne de leur activité antiradicalaire, ce qui révèle que les composés phénoliques de ces extraits contribuent à leur activité antioxydante.

Au terme de cette étude, il serait nécessaire de signaler que les écorces et feuilles de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina* sont une bonne source de composés phénoliques qui a montré efficacement son potentiel antioxydant naturel qui pourrait être utilisé comme un substituant dans la conservation alimentaire ou encore se protéger contre les radicaux libres qui sont liés à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies.

Dans cette perspective et dans le but de compléter cette étude qui est préliminaire et superficielle:

Il serait intéressant de procéder à une caractérisation qualitative plus poussée, des extraits des feuilles et des écorces de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina* par la détermination



des structures et des propriétés chimiques de leurs composés phénoliques et d'évaluer la capacité antioxydante de chaque composé tout seul et l'existence d'une synergie possible entre ces composés.

Il serait également intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant *in vivo* et pour s'assurer de la non toxicité de ces feuilles et de ces écorces.

Des études plus profondes sur d'autres propriétés biologiques (antivirale, anti-inflammatoire, antimicrobienne...) s'avèrent aussi très importante à effectuer.

Des études sur la biodisponibilité et le mode d'utilisation de ces métabolites secondaires mérite d'être menés afin d'envisager la formulation d'un médicament doué d'une activité antioxydante qui peut être une alternative aux médicaments synthétiques et qui peuvent faire face aux maladies liés au stress oxydatif.

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Abedinpour H., Ranjbar G. A, Jelodar N.B. et Golein B. (2014). Evaluation of Genetic Diversity in Citrus Genotypes by IRAP Molecular Marker. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. **3** (2): 230-234.
- Acker V., S.A.B.E., Berg V.D., Tromp D.J. M.N.J.L., Griffioen H.D., Bennkom V.W.P., Vijgh V.D W.J.F.et Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20** (3): 331-342.
- Afolabi C., Akinmoladun., E. O. Ibukun., Afor E., Akinrinlola B. L., Onibon T. R., Akinboboye A. O., Obuotor E. M. et Farombi E. O.(2007) .Chemical constituents and antioxidant activity of *Alstonia boonei*. *African Journal of Biotechnology*, **6** (10): 1197-1201.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*,**74**: 636-643.
- Alessandra B., Marie-Elisabeth C., Hubert R., et Claudette B. (1998). Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts Laboratoire. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**46**:2123-2129.
- Al-Zoreky N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, **134**:244–248.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M et Chaouch A. (2009). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **14** :141-148.
- Andersen Ø. M . et Markham K. R. (2006). Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications. CRC Press Taylor and francis Group.
- Antoine A., Karen L. et catherine B. (2010).Thé, chocolat, raisin...ou les polyphénols comme outils de prévention du diabète de Type 2. Montpellier, 125-136.
- Antonio A.J. et Beltran J. (1982). Quantitative Determination of the Protein Content of Citrus Leaf Extracts. A Comparative Study Analytical Biochemistry, **127**: 368-371.
- Attila A., Veronika N., Zoltán S., László M., Róbert O. et József D. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1–5.

- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Research*, **46**: 1086–1108.
- Barreca D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U. et Gattuso G. (2011). Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium L.* Juice. *Food Chemistry*, **124**: 576–582.
- Baskar R., Rajeswari V. et sathishkumar T. (2007). In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, **45**: 480-485.
- Bekhechir C. et Abelouahid D. (2010). Les huiles essentielles. *Office des publications universitaires*, pp. 1.
- Bhourri W., Mohamed B.S., Soumaya., Ines B., Marie-Geneviève., Dijoux-Franca , Kamel G et Leila, C. G. (2011). Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae), Kaempferol 3-O-bisorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-bisorhamninoside *Food and Chemical Toxicology*, **49**: 1167–1173.
- Boulekbache-Makhlouf L., Slimani S et Madani K.(2013). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, **41**: 85– 89.
- Bousbia N. (2011).Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. thèse doctorat. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Alger).
- Brenner L. Freeman., Dennis L., Eggett. et Tory L. Parker.( 2010). Synergistic and Antagonistic Interactions of Phenolic Compounds Found in Navel Oranges. *Journal of Food Science*, **6** (75).
- Caristi C., Bellocco E., Gargiulli C., Toscano G. et Leuzzi U .(2006) .Flavone-di-C-glycosides in citrus juices from Southern Italy, *Food Chemistry* ,**95**:431–437.
- Castaneda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M.D., Paez-Hernandez M.A., Rodriguez J. A. Et Galan-Vidal C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins. *Food Chemistry*, **113**: 859–871.
- Charles M. et Benbrook P.D. (2005). Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques.Rapport sur l'état des connaissances scientifique.the organic Center.Pp.84.

- Charrier A., Jacquot M., Hamon S et Dominique N. (1997) .L'amélioration des plantes tropicales. Editeurs scientifiques CIRAD et ORSTOM, **623** : 13-36
- Choi M .Y., Chai C., Park J. H., Lim J, Lee J, KwonS. W.(2011). Effects of storage period and heat treatment on phenolic compound composition in dried Citrus peels (Chenpi) and discrimination of Chenpi with different storage periods through targeted metabolomic study using HPLC-DAD analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54**: 638–645.
- Choi S. , Hee-Chul K. , Soo-Youn K. , Joon-Ho H. , Ji-Gweon P. , Shin-Hae K., Sang-HunH., Su-Hyun .et Se-Jae K.(2007). Correlation between Flavonoid Content and the no Production Inhibitory Activity of Peel Extracts from Various *Citrus* Fruits.*Biol.Pharm.Bull.***30**(4): 772—778.
- Chung Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F. et Chou S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2454-2458.
- Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents.*Clinical Microbiology Reviews*, 564–582.
- Curtay J. P. et Robin J. M .(2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie*. 14.
- Cuvelier C., Dotreppe O. et Istasse L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **147** : 315-324.
- Delia B. et Rodriguez- Amaya Ph. D. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. International Life Sciences Institute Press, 1-71.
- Denisov, E.T. et Afanas'ev, B.I. (2005). Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. Taylor and Francis. 992p.
- Derbel S. Et Ghedira K.( 2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et Nutrition*, **1** : 28-34.
- Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly, K. et Maiza, A. (2004). Etude des constituants des feuilles de *ziziphus mauritiana lam.*(Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali.*C.R.Chimie.***7** : 1073-1080.
- Dias M.G., Camões M.F. et Oliveira L. (2009). Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **113** : 808-815.
- Diaz S., Espinosa S. et Brignole E.A. (2005). Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids Optimal process and solvent cycle design. *J. of Supercritical Fluids*, **35**: 49–61.

- Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. (2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Revue « Nature et Technologie », (07). 53 – 61.
- Dufour C et Loonis M. (2007). Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1770:958–965.
- Dugo G. et Giacomo A. D. (2002). Citrus: The Genus Citrus. University l'Industria Italy. 1-34.
- Dupont F et Guignard J. L. (2007). Abrégés Botanique systématique moléculaire. 14<sup>e</sup> édition. MASSON, France. **285** : 189-191.
- Elleuch M., Bedigian D., Roiseux O., Besbes S., Blecker C., Attia H (2011) Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications:: A review *Food Chemistry*, **124** : 411–421.
- Engin K.N. (2009). Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*, **15**: 855-860.
- Ercan B. et İlhami Gü. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, **44**: 1482–1489.
- Fadlinzal M. A, Prasad N. K., Weng K.K et Amin Ismail. (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*, **9**(3): 326-330,
- Ghasemi K., Yosef G. et zedh M.A.E. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak.J.Pharm.Sci*, **3** (22): 277-281.
- Gloria A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers.. Moore. Forum: TRENDS in Genetics, 17.(9).
- Gmitter G., Chunxian Jr., Chen, Nageswara M. Rao . et Jaya R. Soneji. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Fruits and Nuts. C. Kole. Florida. 4:CHAP14.
- González-Molina E., Domínguez-Perles R., Moreno D.A. et García-Viguera. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**: 327- 345.

- Goulas V. et Manganaris G.A. (2012) .Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*, **131**: 39–47.
- Guimarães R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa M. J., Carvalho A.M. et Ferreira I.C. (2010). Targeting excessive radical with peels and juice of citrus fruits grapefruit, lemon and orange. *Food Chemistry*, **48**: 99-106.
- Gülçin I. Köksal E., Gülçin I., Öztürk Sarıkaya S.B. et Bursal E. (2008). On the in vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **24**:395–405.
- Gülçin İ., Elias R., Gepdiremen A., Boyer L. et Köksal E. (2007) A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) Extracts *African Journal of Biotechnology*, **6** (4):410-418.
- Gülçin I., Huyut Z.B., Elmastas M., Hassan Y. et Aboul-Enein d.(2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. **3**: 43- 53.
- Hagerman A.E et Butler L.G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin. *Journal agriculture and Food Chemistry*,**26**: 809-812.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C et Capelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Lieg*,**62** (10): 628-638.
- Horzic D., Drazhenka Komes., Ana B., Ganic K. K., Damir Ivekovic et Damir Karlovic. (2009).The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food chemistry*, **115**:441–448.
- Houta O., Chouaeb H., Neffati M. et Amri H. (2012). Criblage chimique preliminaire des proteines et carotenoides presents dans un *crithmum maritimum* cultivé en tunisie. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, **14** :77-82.
- Huang Y.S. et Ho S.C. (2010). Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*, **119**: 868–873
- Hussain S., Curk F., Dhuique-Mayer C., Urbanc L., Ollitrault P., Luro F., Morillon R. (2012). Autotetraploid trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. *Scientia Horticulturae*, **134**: 100–107.
- Iserin P., Masson M., Restellini J. P. et Ybert E. (2001). Encyclopédie des Plantes Médicinales. Larousse.

- Jamilah B., Abdulkadir G.M., Suhaila M. et Md.Zaidul I.S. (2011). Phenolics in *Citrus hystrix* leaves obtained using supercritical carbon dioxide extraction. *International Food Research Journal*, **18**: 941-948.
- Jiri G., Ayaz F.A., Torun H et Strnad M. (2011). Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) Fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry*, **124**: 271–277.
- John F., Jackson et Hans F. Linskens. (2002). molecular methods of plant analysis: analysis of taste and aroma. (21). springer. Germany, **269**:123-153.
- Jovanovic,V., Steenken,S., Tomic, M., Marjanovic, B et Simic, M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *J.Am. Chem. Soc*, **166** : 4846-4851
- Kamran-khan M., Abert-Vian M., Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Dangles O., Farid Chemat F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) Peel. *Food Chemistry*, **119**:851–858.
- Kelebek H., Selli S., Canbas A. et Cabaroglu T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish. *Cv. Microchemical Journal*, **91**: 187–192.
- Khizar H., Zhang X., Chen H., Xia S., Jia C. et Zhong F. (2010). Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, **73**: 371–376.
- Koksal. E, Bursal E, Dikici E., Tozoglu F., Gulcin I. (2011).Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**(2): 217-222.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, ChaiebK, Bakrouf A, Magné C, Abdelly C. (2009) . Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, xxx: xxx–xxx).
- Kuljarachanan T., Devahastin S et Chiewchan N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry*, **113**: 944–949.
- Ladanya M. S.(2008). *Citrus fruit biology, technology and evaluation*.elseiver, 1-585.
- Lagha-Benamrouche S. et Madani K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria:Peels and leaves. **50**: 723– 730.
- Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M et Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL VOL*, **14**(5): 278-292.



- Lamaison J.L et Carnat A. (1991). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. Et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. En fonction de la végétation. *Plants in Medicine and Phytotherapy*, **25**: 12 - 16.
- Levizou, E., Petropoulou Y., et Manetas Y. (2004). Total carotenoid amount in
- Li B.B., Smith B et. Hossain Md. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels Solvent extraction method , *Separation and Purification Technology* **48**: 182–188.
- Liu Lota M.L., Rocca Serra D., Jacquemond C., Tomi F., Casanova J. (2001). Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. *Flavour and Fragrance Journal*, **16** : 89–96.
- Ma Y-Q , Chen J-C, Liu D-H et Ye X-Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* **16**: 57–62.
- Mathur A., Verma S.K., Purohit R ., Gupta V.,Dua V.K.,Prasad G.B.K.S., Mathur D., Singh S.K et Singh S.(2011) .Evaluation of in vitro antimicrobial and antioxidant activities of peel and pulp of some citrus fruits ;IJPI'S JOURNAL of biotechnology and biotherapeutics, **1**(2): 1-16.
- Melendez P.A.,Capriles V.A ., (2006).Antibacterial properties of tropical plants from puerto Rico;phytochemistry, **13**: 272-276.
- Menichini.F., Monica R., Loizzo., Bonesi M., Conforti F ., Luca D.D., Giancarlo A., Statti., Cindio B., Menichini F.et Tundis R. (2011). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. Cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages . *Food and Chemical Toxicology*, **49**:1549–1555.
- Meot-Duros.L., Gaetan G.L. et Magné C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**: 258-262.
- Milardovic S., Ivekovic D. et Bozidar S.G. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, **68**:175-180.
- MilellaL., CarusoM., Galgano F., Favati F.,Padula M. C. et Martelli G .(2011)(Role of the Cultivar in Choosing Clementine Fruits with a High Level of Health-Promoting Compounds.*Journal of agricultural and food chemistry*. **59**: 5293–5298).

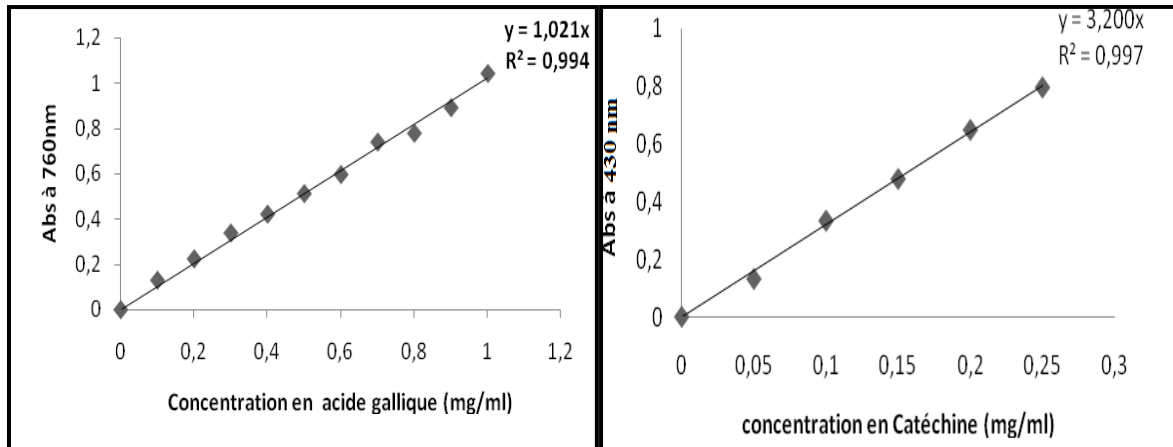
- Muthiah, P.L., Umamaheswari, M., et Asokkumar, K. (2012). *In vitro* antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of Citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, **2** (1): 13-20.
- Naczki, M. et Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Negi P. S. Jayaprakasha G. K. (2001). Antibacterial activity of grapefruit (Citrus paradisi) peel extracts. *European Food Res Technology*. **213**:484-487.
- Nkhili E.Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse Ecole Doctorale 306 – SPSA, Montpellier thèse en cotutelle.
- Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, et Chowwanapoonpohn S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry* **103**: 839-846.
- Ortiz M. J. (2002). Botany: Taxonomy, Morphology and Physiology of Fruit, Leaves and Flowers. In: «*Citrus: The Genus Citrus*». Edition: Taylor and Francis, London, 16-35.
- Owen, P. L. et Johns T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern north American plant remedies used for gout. *Ethn-pharmacology*, **64**:149-160.
- Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**: 307-315.
- Peña L., Cervera M., Fagoaga C., Romero J., Juárez J., Pina J.A. et Navarro L. (2007). Citrus. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, **60**: 35-49.
- Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A, Valenta P.c., Andrade PB., Ferreira I C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R., Estevinho LC. (2007). Walnut (*Juglans regia L*) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars *Food and Chemical Toxicology*. **45**: 2287-2295.
- Peterson J. J., Dwyer J.T., Beecher G. R., Bhagwat S. A., Gebhardt S. E., Haytowitz D. B. et Holden J. M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 66-73.
- Peyron L. (1965). Petit grain oils in perfumery. *Soap Perfum and Cosmetics*, **38**: 769-780.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**(7): 1035-1042.

- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O. (1998). Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Médi-Sphere*, **73**: 1-4.
- Prieto P., Pineda M. Et 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**: 337-341.
- Prouillac C. (2006). Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action *in vitro*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier de Toulouse III.
- Psotová, J., Lasovsky, J., et Vicar, J. (2003). Metal-chelating Propertys, Electrochemical Behaviour, Scavenging and Cytoprotective Activities of Six Natural Phenolic. *Biomed. Papers*, 147 (2), 147-153.
- Ramful D., Tarnus E., Aruoma O., Bourdon E et Bahorun T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, **44**: 2088–2099.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. et Rice-Evans C. (1999). Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26** : 1231–1237.
- Ribereau-Gayon P. (1968). Notion générale sur les composés phénoliques. In: Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, 1-40.
- Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 657-691.
- Royer M., Houde R., et stevanovic T. (2010). Technologies de conversion. In potentiel de développement lié aux extractibles: état des connaissances et revue des marchés, 118 p.
- Salunkhe D. K. et Kadem S. S. (1995). *Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage*. Edition CRC Press, New York, 39-59.
- Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M. M. ET Toth-Markus M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, **38**:1023-1029.
- Singleton V.L. et Rossi J.A. (1965) .Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdite-phosphotungstic acids reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**:144-158.

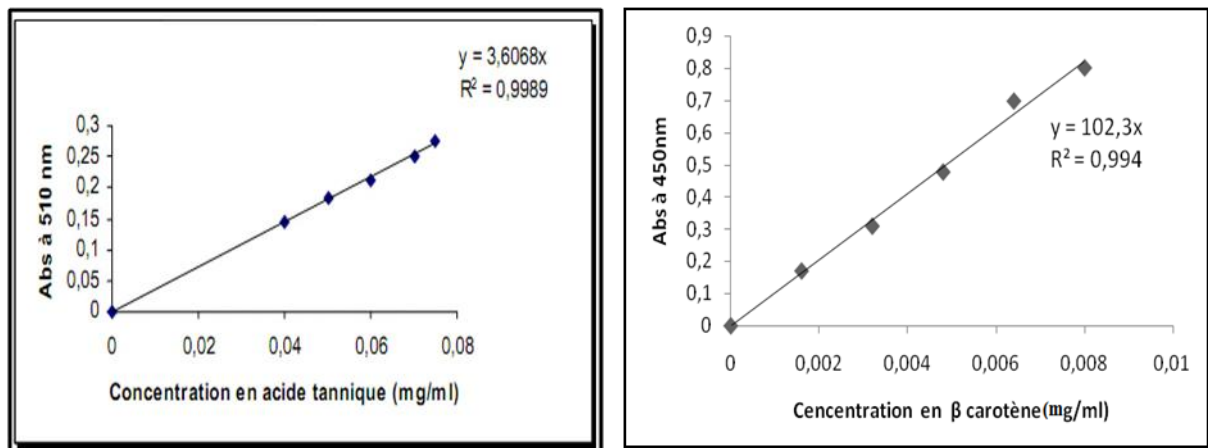
- Spichiger R.E., Vincent V., Figeat S.M. et Jeanmonod D. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérés et tropicales. 3<sup>e</sup> édition. Presses polytechniques et université Romandes. **413** :272-273. Lausanne.
- Tachakittirungrod S., Okonogi S., etchowwanapoonpohn S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, **103** : 381-388.
- Teixeira D.M., Potao R.F. et Coelho A.V. (2006). Comparison between sample disruption methods and solid – liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of chromatography A* 1103: 22- 28.
- Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D. Et Giammanco M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, **104**: 466–479.
- Turra C., Fernandes E. A. D. N., Bacchi M. A., Júnior F. B., Sarriés G. A et Blumer L (2011). Chemical Elements in Organic and Conventional Sweet Oranges. *Biology of Trace Elements Res*, **144**:1289–1294.
- Ye X., Chen J. , Liu D. , Jiang P. , Shi J. , Xue S. , Wu D., Xu J. , Kakuda Y.(2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, **124**:1561–1566.

# *Annexes*

**Annexes I : courbes d'étalonnage pour les différents dosages**

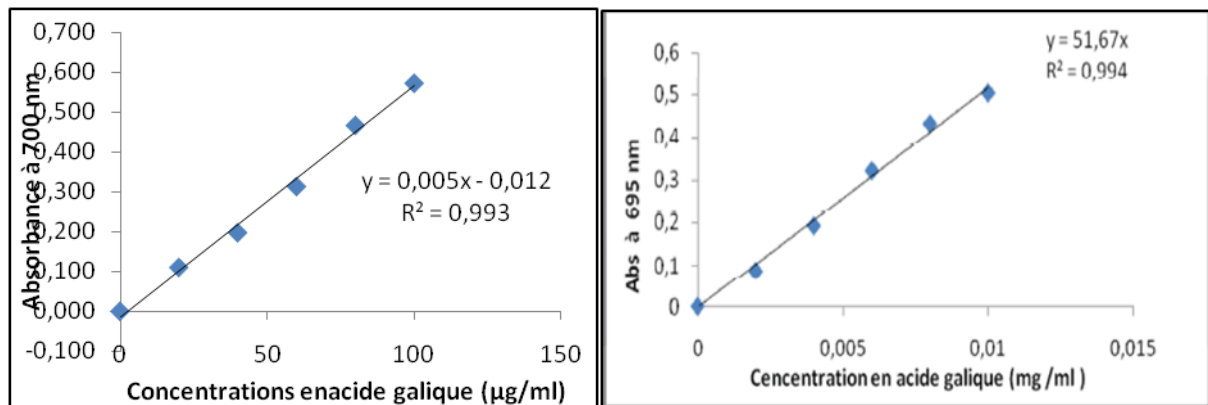


**Figure 1:** Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux. **Figure2:** Courbe d'étalonnage des flavonoides.



**Figure3:** courbe d'étalonnage des tannins totaux.**Figure4:** courbe d'étalonnage caroténoïdes.

**Annexes II : courbes d'étalonnage pour l'activité antioxydant**



**Figure 5:** courbe d'étalonnage pour le test de fer ferrique

**Figure 6 :** courbe d'étalonnage pour le test de phosphomolybdate

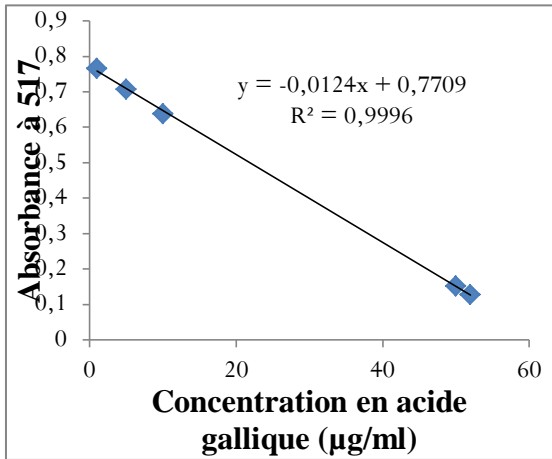


Figure 7: courbe d'étalonnage pour le test de DPPH

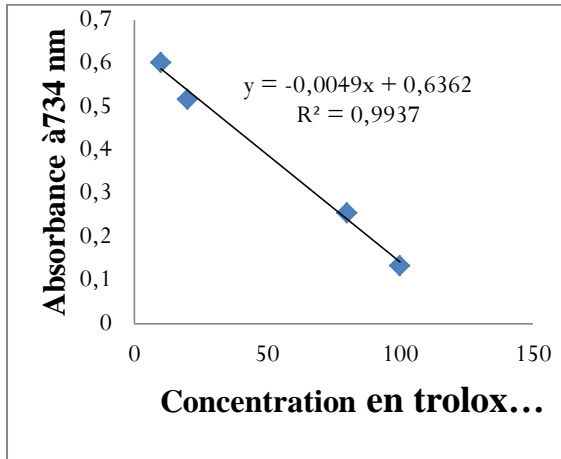


Figure 8 : courbe d'étalonnage pour le test de l'ABT

Annexes III: courbes obtenus par Origin8 pour le calcul des IC50 l'activité scavenger du DPPH et de L'ABTS.

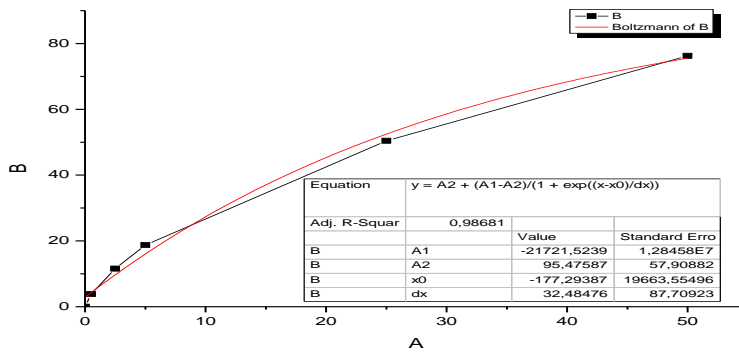


Figure 9 :Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des écorces de la clémentine (DPPH)

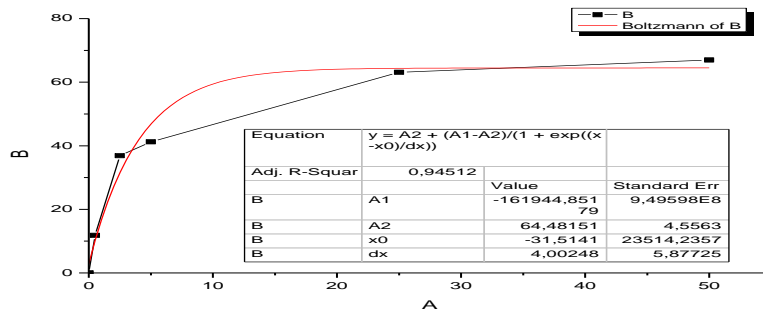


Figure10 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des feuilles de la clémentine (DPPH)

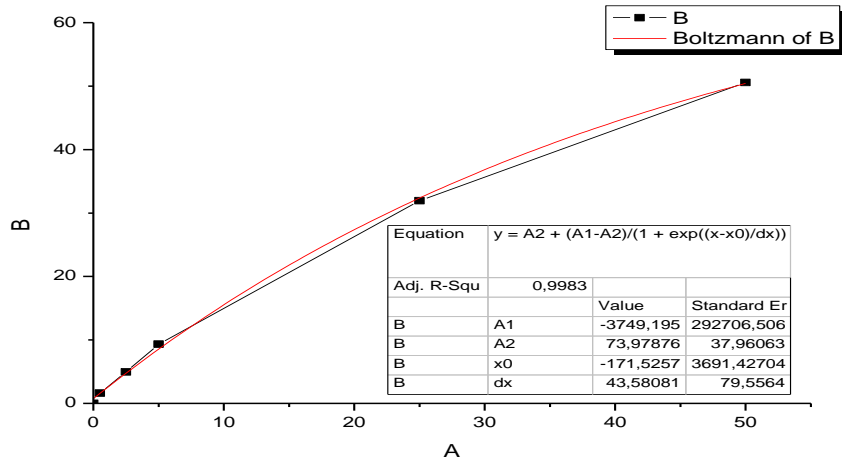


Figure 11 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des écorces de la mandarine (DPPH).

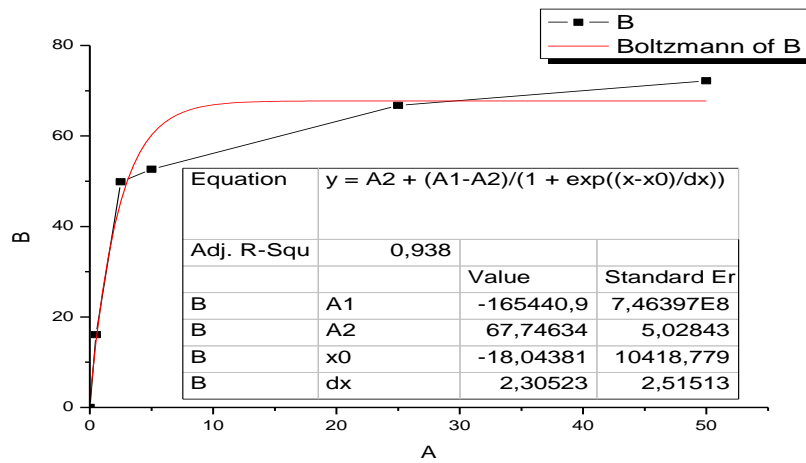


Figure12 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des feuilles de la mandarine (DPPH).

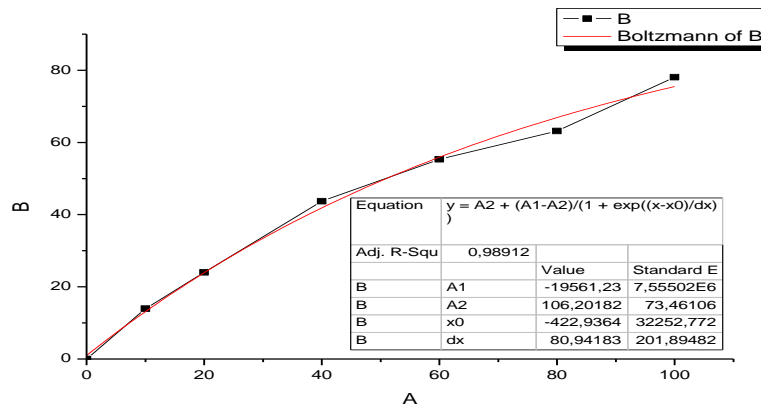


Figure 13 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des écorces de la mandarine (ABTS).



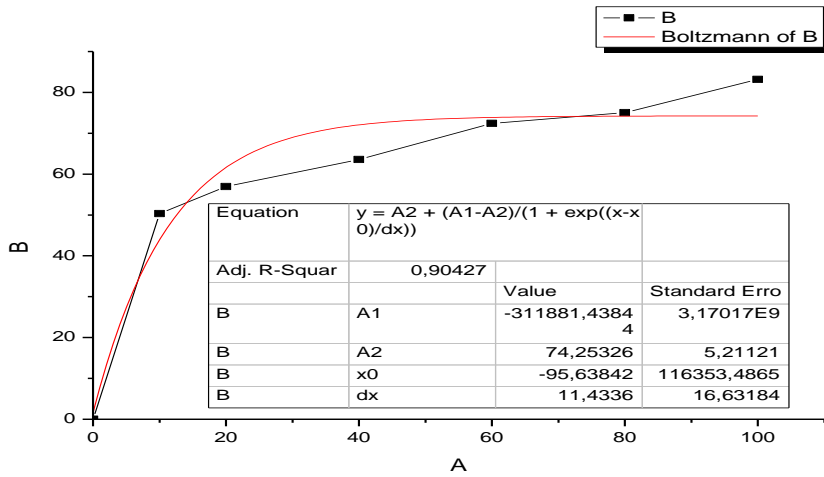


Figure 14 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des feuilles de la mandarine (ABTS).

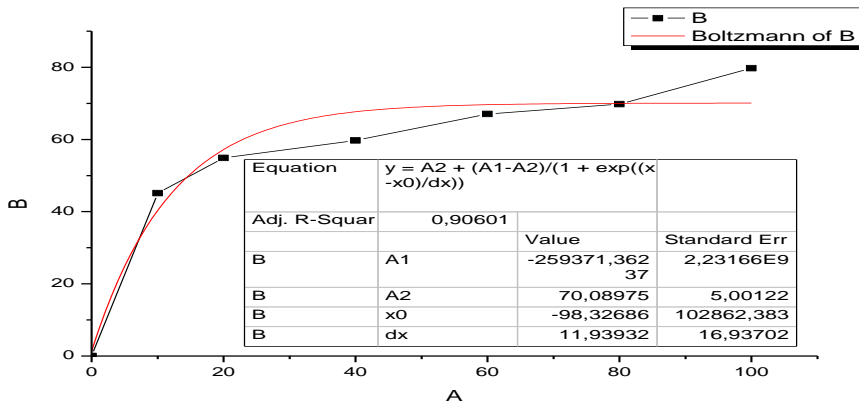


Figure 15 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des écorces de la mandarine (ABTS).

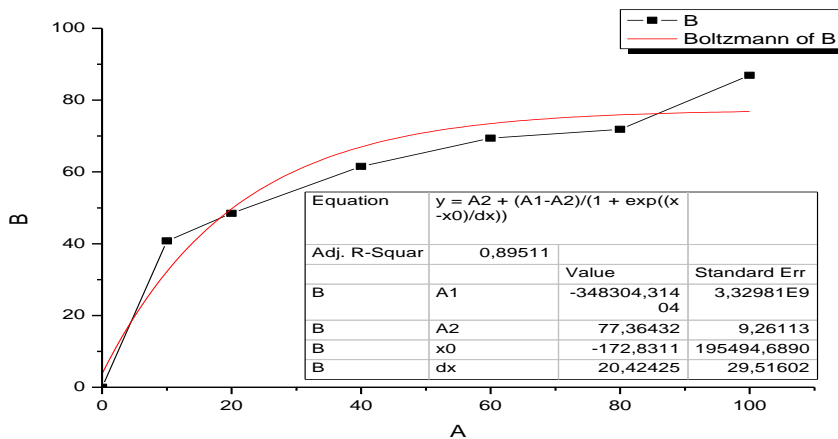
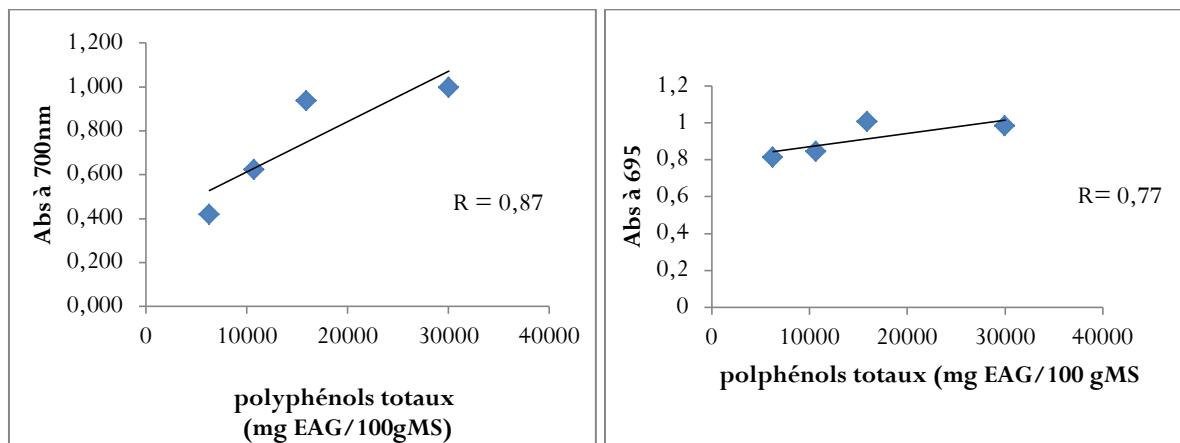


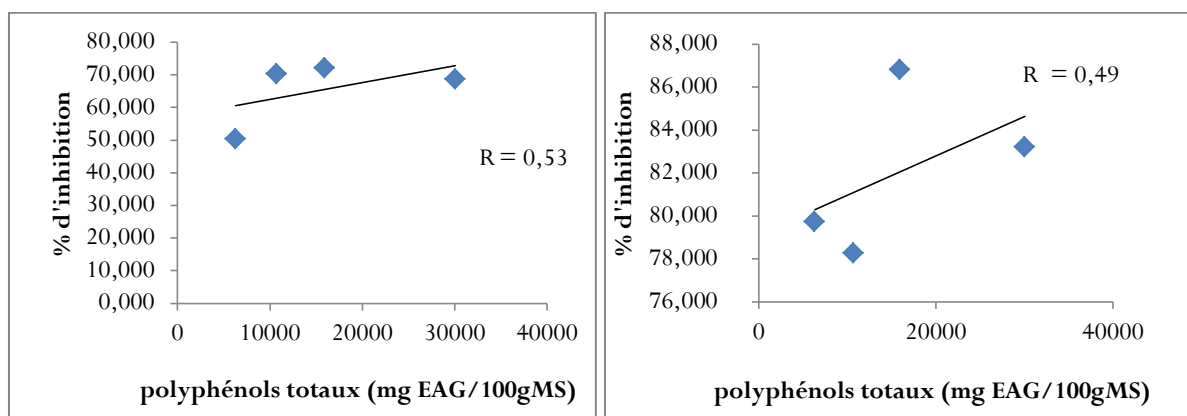
Figure 16 : Courbe pour le calcul de IC50 de l'extrait éthanolique des feuilles de la mandarine (ABTS).

**Annexe IV:** les courbes de corrélation entre la concentration des composés phénoliques et leur activité antioxydante.



**Figure17:** Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur.

**Figure 18:** Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le test de phosphomolybdate.



**Figure 19 :** Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir anti radicalaire (DPPH).

**Figure 20 :** Corrélation entre la teneur en polyphénols phénoliques et le pouvoir anti radicalaire (ABTS).

## Annexe V : Résultats de rendement d'extraction et de dosage des polyphénols

**Tableau I :** résultats de rendements d'extraction (%).

Variétés	organe	éthanol	méthanol	hexane	acétone
Clémentine	écorces	11.71±1%	15.606±1.07%	29± 3.27%	21±1.333%
	feuilles	5.4± 0.93%	4.622±0.61%	2.778±0.79%	7.344±1.48%
Mandarine	écorces	28.60±2.34%	30.026±0.61%	22±1.67%	34.356±3.31%
	feuilles	5.12±0.68%	7.772±0.88%	2.1±052%	4.289±0.43%

**Tableau II :** Résultats des dosages des polyphénols totaux en mg /100g SM.

Variétés	Organe	Extrait Acétonique	Extrait Ethanolique	Extrait Héxanique	Extrait Méthanolique
<b>Clémentine</b>	Ecorces	1355,97±66,7	10730,22±98,4	833,61±39,49	8999,89±138,83
	Feuilles	1157,91±52,27	30046,8±114,66	636,63±19,59	26847,32±212,42
<b>Mandarine</b>	Ecorces	1307±39,22	6295,57±106,21	667,1±24,5	5843,94±213,46
	Feuilles	964,20±18,56	15932,09±117,71	513,66±44,33	13548,81±172,76

## Annexe VI : résultats de l'activité antiradicalaire

**Tableau III :** Résultats du pourcentage d'inhibition de DPPH.

Concentrations (µg/ml)	% de scavenging			
	CE	CF	ME	MF
<b>0,5</b>	3,838±0,590	11,713±1,270	1,660±0,421	16,077±0,323
<b>2,5</b>	11,572±0,439	36,746±0,458	4,829±0,249	49,857±0,401
<b>5</b>	18,740±0,500	41,299±0,347	9,416±0,541	52,664±0,557
<b>25</b>	50,069±0,383	63,126±1,127	31,520±0,767	66,763±0,387
<b>50</b>	76,419±0,524	66,715±0,785	50,429±0,285	72,206±0,236

**Tableau IV** : Résultats du pourcentage d'inhibition d'ABTS

<b>Concentrations (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>% de scavenging</b>			
	<b>CE</b>	<b>CF</b>	<b>ME</b>	<b>MF</b>
<b>10</b>	13,821 $\pm$ 1,35	50,480 $\pm$ 0,56	45,069 $\pm$ 0,73	40,639 $\pm$ 0,12
<b>20</b>	24,225 $\pm$ 1,35	56,807 $\pm$ 0,64	54,639 $\pm$ 1,07	48,509 $\pm$ 0,56
<b>40</b>	43,493 $\pm$ 2,89	63,461 $\pm$ 1,77	59,557 $\pm$ 0,92	61,374 $\pm$ 1,06
<b>60</b>	55,343 $\pm$ 1,81	72,387 $\pm$ 1,26	67,042 $\pm$ 0,88	69,381 $\pm$ 0,60
<b>80</b>	63,619 $\pm$ 2,31	75,452 $\pm$ 2,16	69,742 $\pm$ 1,71	71,756 $\pm$ 0,73
<b>100</b>	78,270 $\pm$ 3,41	83,225 $\pm$ 0,31	79,736 $\pm$ 0,42	86,831 $\pm$ 0,68

**Résumé :** Notre travail vise à faire une étude phytochimique qui porte sur le dosage des polyphénols totaux des extraits méthanolique, éthanolique, acétonique et hexanique des feuilles et des écorces *Citrus reticulata* et *Citrus clementina*,

Les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces ont été étudiés pour déterminer leur contenu en substances bioactives (flavonoïdes, tannins et caroténoïdes) ainsi que, l'évaluation de leur activité antioxydant, tandis que l'activité antimicrobienne est testée avec les extraits méthanolique.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence la présence des polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins et caroténoïdes dans les différents extraits avec des teneurs variables, les meilleures teneurs observées pour ces quatre classes de composés phénoliques sont : CF(30046,8 mgEAG/100gMS), ME(19191,28mgEC/100Gms), ME (222,52 mg EAT/100gMS), CF (192,69 mg E  $\beta$ -carotène/100gMS) respectivement.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par quatre tests la réduction du fer, la réduction de phosphomolybdate, le piégeage du radical libre DPPH et le radical libre ABTS les résultats d'IC50 obtenus (MF : 3,069  $\mu$ g/ml pour le DPPH et ME : 12,49  $\mu$ g/ml pour l'ABTS).

**Mots clés :** feuilles, écorces, *Citrus clementina*, *Citrus reticulata*, composé phénoliques, activité antioxydant, activité antimicrobienne.

**Abstract:** Our work aims to make a phytochemical study focuses on the determination of total polyphenols in methanolic, ethanolic,acetonic and hexanic extracts leaves and peels in *Citrus reticulata* and *Citrus clementina*

Ethanolic extracts of peels and leaves have been studied to determine their content of bioactive substances (flavonoids, tannins and carotenoids) as well as the assessment of their antioxidant activity, while the antimicrobial activity is tested with methanolic extracts.

Phytochemicals tests made it possible to demonstrate the presence of total polyphenols, flavonoids, tannins and carotenoids in different extracts with variable contents, best observed for these four classes of compounds contents phenolic are: LC (30046,8 mgEAG/100gDM), PM(19191,28mgEC/100gDM), PM( 222,52 mg EAT/100gDM), LC (192,69mgE $\beta$ -caroten/100gDM)respectively. The antioxidant activity of different extracts was evaluated by four tests: iron reduction, reduction of phosphomolybdate, scavenging activity of DPPH free radical and ABTS free radical. The results obtained for the IC50 are: LM: 3,069 $\mu$ g/ml for DPPH test and PM: 12, 49  $\mu$ g/ml for ABTS test).

**Key words:** leaves, peel, *Citrus reticulate*, *Citrus clementina*, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.