

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A.MIRA-BEJAIA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique  
Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de*

**MAGISTER**

*en Biologie*

*Option : Ingénierie Biochimie et Biotechnologie*

**Thème :**

*Effets antioxydants et anti-enzymes du brunissement des  
extraits de feuilles de citrus*

*Présenté :*

*Mr Tighilet Karim*

*Membres de jury :*

<i>Présidente :</i>	M <sup>me</sup> Bedjou Fatiha.	Pr, Université de Bejaia.
<i>Examineur :</i>	Mr Ouchemoukh Salim.	M.C.A, Université de Bejaia.
<i>Examineur :</i>	Mr Belhamel Kamel.	Pr, Université de Bejaia.
<i>Promotrice :</i>	M <sup>me</sup> Khettal Bachera.	M.C.A, Université de Bejaia.

*Promotion : 2013/2014*

# Remerciements

*Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant pour m'avoir donné la santé, la force, le courage et l'intelligence nécessaires pour réaliser ce modeste travail dans le but de réalisation de mémoire de magistère de la faculté des sciences de la nature et de la vie, dont le sujet fait partie de la thématique de recherche de laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique.*

*Mes vifs remerciements vont également au Pr BEDJOU F. d'avoir accepté de présider le jury chargé d'évaluer ce travail.*

*Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance à ma promotrice Dr. KHETTAL B. et de lui exprimer mon immense gratitude pour ses conseils, son soutien constant, sa générosité, sa disponibilité, pour la qualité de son encadrement et le temps qu'elle a consacré à la préparation de diverses présentations.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr OUCHEMOUKH S. et Dr BELHAMEL K, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un remerciement particulier aux ingénieurs et techniciens du laboratoire pédagogique d'enzymologie pour leur aides, leur conseils, leur serviabilité, leur gentillesse et leur contribution à l'accomplissement de ce travail; Merci M<sup>lle</sup> Belhadi S. Merci M<sup>lle</sup> MAMMASSE. H.*

*Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail, Dr GHIDDOUCHE A/R, Dr MESSIS A, Dr BATTACHE A, Dr LAADJOUZI R, M<sup>r</sup> ADJEBLI A, M<sup>r</sup> SAADI N.*



# Dédicaces

*Aux êtres les plus chers au monde « Mes parents » pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir réussir. Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur présence permanente, leur affection, leur disponibilité et pour tout le mal qu'ils se donnent pour moi.*

*A mes grands parents.*

*A mes chères sœurs "Salima et Souad".*

*A mes chers frères.*

*À toute ma famille et mes proches.*

*A M<sup>me</sup> AYAD M. responsable au niveau de la direction de la sante.*

*A M<sup>lle</sup> HAMMA S, M<sup>lle</sup> CHALLAL S, M<sup>lle</sup> HAMANA L, M<sup>r</sup> MAMMASSE H, M<sup>r</sup> Khoullalene K, Bouchama M, M<sup>r</sup> OURARI A/G et à tout le personnel de laboratoire d'hygiène de wilaya de Bejaia.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

*A tous ceux qui me sont chers.*



*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Liste des annexes*

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

## *Synthèse bibliographique*

### **Chapitre I : Les citrus**

<b>I.1. Généralités.....</b>	<b>4</b>
I-1-1. Définition et distribution géographique.....	4
I.1.2. Production des agrumes dans le monde .....	5
I.1.3. Production des agrumes en Algérie .....	6
<b>I.2. Classification botanique et taxonomie .....</b>	<b>8</b>
<b>I.3. Caractéristiques générales des citrus .....</b>	<b>9</b>
<b>I.4. Valeur nutritive des citrus .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5. Propriétés biologiques des citrus .....</b>	<b>15</b>
I.5.1. Propriétés nutritionnelles .....	15
I.5.2. Propriétés thérapeutiques .....	16

### **Chapitre II : Le stress oxydant et les antioxydants**

<b>II.1. Généralités .....</b>	<b>18</b>
<b>II.2. Les radicaux libres .....</b>	<b>18</b>
<b>II.3. Les antioxydants .....</b>	<b>20</b>
II.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	21
II.3.2. Les antioxydants non enzymatiques .....	23
II.3.2.1. Les antioxydants endogènes .....	23
II.3.2.2. Les antioxydants exogènes .....	24
1. La vitamine C .....	24
2. La vitamine E .....	25
3. Les Caroténoïdes .....	26
4. Les composés phénoliques .....	26
<b>II.4. Les antioxydants des citrus .....</b>	<b>30</b>

## Chapitre III : Le brunissement enzymatique

<b>III.1. Définition</b> .....	<b>33</b>
<b>III.2. Réaction du brunissement non enzymatique</b> .....	<b>33</b>
III.2.1. Réaction de Maillard .....	33
III.2.2. Réaction de caramélisation .....	35
<b>III.3. Le brunissement enzymatique</b> .....	<b>36</b>
<b>III.4. Réactions du brunissement enzymatique</b> .....	<b>36</b>
<b>III.5. Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation</b> .....	<b>37</b>
<b>III.6. Les enzymes du brunissement enzymatique</b> .....	<b>38</b>
III.6.1. Caractérisation des peroxydases .....	39
III.6.1.1. Généralités .....	39
III.6.1.2. Classification des peroxydases .....	39
III.6.1.3. Structure des peroxydases de classe III .....	40
III.6.1.4. Rôles physiologiques et application des peroxydases de classe III .....	42
III.6.1.5. Propriétés cinétiques des peroxydases végétales .....	43
III.6.2. Caractérisation des polyphénoloxydases .....	44
III.6.2.1 Définition .....	44
III.6.2.2 Classification des polyphénoloxydases .....	45
III.6.2.3. Structure des polyphénoloxydases .....	46
III.6.2.4 Rôle physiologique des polyphénoloxydases .....	48
III.6.2.5 Propriétés cinétiques des polyphénoloxydases .....	49
<b>III.7. Prévention et inhibition du brunissement enzymatique</b> .....	<b>52</b>
III.7.1. Méthodes physiques .....	53
III.7.2. Méthodes chimiques .....	54

## *Etude expérimentale*

### Chapitre I : Matériel et méthodes

<b>I.1. Matériel végétal</b> .....	<b>55</b>
<b>I.2. Extractions organique et aqueuse</b> .....	<b>55</b>
I.2.1. Préparation de la poudre végétale .....	55
I.2.2. Préparation des extraits de feuilles.....	57
I.2.3. Calcul du rendement .....	58
<b>I.3. Caractérisation des extraits de feuilles de citrus par spectroscopie UV/Visible</b> .....	<b>59</b>

<b>I.4. Dosages des composés phénoliques.....</b>	<b>59</b>
I.4.1. Dosage des polyphénols totaux .....	59
I.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	60
<b>I.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de citrus.....</b>	<b>61</b>
I.5.1. Test du DPPH.....	61
I.5.2. Test du radical ABTS <sup>+</sup> .....	63
I.5.3. Test de réduction du fer .....	65
<b>I.6. Mesure de l'activité anti-enzymatique.....</b>	<b>65</b>
II.6.1. Mesure de l'activité anti-péroxydase .....	66
II.6.2. Mesure de l'activité anti-polyphénoloxydase .....	67
I.7. Analyse statistique .....	68
 <b>Chapitre II : Résultats et discussion</b>	
<b>II.1. Taux d'extraction .....</b>	<b>69</b>
<b>II.2. Propriétés optiques d'absorbance des extraits de citrus.....</b>	<b>70</b>
<b>II.3. Dosages colorimétriques des extraits des feuilles de citrus .....</b>	<b>73</b>
II.3.1. Taux des polyphénols totaux .....	73
II.2.2. Taux des flavonoïdes .....	74
<b>III.3. Activité antioxydante.....</b>	<b>77</b>
III.3.1. Activité scavenging du radical DPPH .....	77
III.3.2. Activité scavenging du radical ABTS .....	82
III.3.3. Test de la réduction du fer .....	86
<b>III.4. Relation entre les différentes activités antioxydantes.....</b>	<b>88</b>
<b>III.5. Activité anti-enzymatique .....</b>	<b>89</b>
III.5.1. Activité anti-péroxydase.....	89
III.5.2. Activité anti-polyphénoloxydase.....	95
<b>Conclusion .....</b>	<b>97</b>

## Références bibliographiques

## Annexes

## *Liste des abréviations*

<b>4-MC</b>	4-Méthylcatéchol
<b>ABTS</b>	Acide 2,20-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-sulphoonique)
<b>AGE</b>	Advanced Glycation End products
<b>BHA</b>	Butyl-hydroxyanisol
<b>BHT</b>	Butyl-hydroxytoluène
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>EAG</b>	Equivalent en Acide Gallique
<b>EQ</b>	Equivalent en Querciténe
<b>ERO</b>	Espèces Réactives d'Oxygène
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydases
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>IC 50</b>	Concentration Inhibitrice de 50%
<b>MIC</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>MS</b>	Matière Sèche
<b>OMS</b>	Organisation Mondial de la Santé
<b>POD</b>	Peroxydase
<b>PPO</b>	Polyphénoloxydase
<b>rpm</b>	Rotation par minute
<b>SOD</b>	Superoxydes dismutases
<b>TBHQ</b>	Tert-butylhydroquinone
<b>TEAC</b>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
<b>TYR</b>	Tyrosinases
<b>UV/Vis</b>	Ultraviolet/Visible

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde .....	6
<b>Figure 2</b> : Proportion de la surface occupée par l'agrumiculture en Algérie .....	7
<b>Figure 3</b> : Photographies des fruits, fleurs et arbres de quelques espèces de citrus .....	13
<b>Figure 4</b> : Origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène .....	19
<b>Figure 5</b> : Système de protection contre les dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène .....	21
<b>Figure 6</b> : Rôle des antioxydants enzymatiques dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène .....	23
<b>Figure 7</b> : Régénération de la vitamine E par la vitamine C .....	25
<b>Figure 8</b> : Structure de quelques acides phénoliques .....	28
<b>Figure 9</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	29
<b>Figure 10</b> : Structure chimique de quelques flavonones et les flavones des citrus .....	31
<b>Figure 11</b> : Schéma simplifié de la réaction de Maillard .....	34
<b>Figure 12</b> : Réactions enzymatiques du brunissement .....	37
<b>Figure 13</b> : Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation dans une cellule végétale.....	38
<b>Figure 14</b> : Structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort.....	41
<b>Figure 15</b> : Réactions catalysés par les polyphényldases .....	44
<b>Figure 16</b> : Réaction catalysée par les polyphénoloxydases .....	45
<b>Figure 17</b> : Représentation en ruban de catécholoxydase de la patate douce.....	48
<b>Figure 18</b> : Structures de quelques substrats des polyphénoloxydases .....	50
<b>Figure 19</b> : Réduction des quinones par l'acide ascorbique .....	55
<b>Figure 20</b> : Réaction de chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes .....	60
<b>Figure 21</b> : Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH <sup>•</sup> et de sa forme réduite... ..	62
<b>Figure 22</b> : Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un donneur d'hydrogène .....	63
<b>Figure 23</b> : Réduction du fer ferrique en fer ferreux par un antioxydant .....	65

<b>Figure 24</b> : Oxydation du gáiacol en tetragaiacol .....	<b>67</b>
<b>Figure 25</b> : Spectre d'absorption des extraits aqueux des feuilles de citrus .....	<b>71</b>
<b>Figure 26</b> : Spectre d'absorption des extraits méthanoliques des feuilles de citrus .....	<b>72</b>
<b>Figure 27</b> : Teneur en polyphénol totaux des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus ...	<b>73</b>
<b>Figure 28</b> : Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus .....	<b>75</b>
<b>Figure 29</b> : Taux des polyphénols et flavonoïdes des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus .....	<b>76</b>
<b>Figure 30</b> : EC50 du radical DPPH des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus.....	<b>78</b>
<b>Figure 31</b> : Relation entre l'efficacité scavenging du radical DPPH et les taux en polyphénol totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus .....	<b>81</b>
<b>Figure 32</b> : Activité scavenging du radical ABTS des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus .....	<b>83</b>
<b>Figure 33</b> : Relation entre l'efficacité scavenging du radical ABTS et les taux en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus.....	<b>85</b>
<b>Figure 34</b> : Pouvoir réducteur des extraits méthanolique et aqueux des feuilles de citrus .....	<b>86</b>
<b>Figure 35</b> : Relation entre l'activité de réduction de fer et les taux en polyphenols totaux et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus.....	<b>87</b>
<b>Figure 36</b> : Représentation selon Lineweaver et Burk de type d'inhibition .....	<b>94</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Origine de quelques espèces de citrus .....	<b>5</b>
<b>Tableau II :</b> Composition variétales et taux de production des agrumes à Béjaïa .....	<b>7</b>
<b>Tableau III :</b> Classification botanique des agrumes .....	<b>8</b>
<b>Tableaux IV :</b> Description de quelques espèces de citrus .....	<b>11</b>
<b>Tableau V :</b> Valeur nutritive de quelques fruits de citrus .....	<b>15</b>
<b>Tableau VI :</b> Principales espèces réactives de l'oxygène et leurs structures chimiques .....	<b>20</b>
<b>Tableau VII :</b> Principales classes des composés phénoliques .....	<b>27</b>
<b>Tableau VIII :</b> Activité des peroxydases de différentes origines .....	<b>43</b>
<b>Tableau IX :</b> Paramètres cinétiques de polyphénoloxydase de différentes origines végétales .....	<b>51</b>
<b>Tableau X :</b> pH et température optimal pour l'activité de quelques polyphénoloxydases .....	<b>52</b>
<b>Tableau XI :</b> Feuilles des espèces de citrus utilisée.....	<b>57</b>
<b>Tableau XII :</b> Source d'enzymes de peroxydase et de polyphénoloxydase .....	<b>66</b>
<b>Tableau XIII :</b> Taux extraction par macération des feuilles des espèces de citrus .....	<b>69</b>
<b>Tableau XIV :</b> Activité scavenging du radicale ABTS des extraits de feuilles de citrus .....	<b>82</b>
<b>Tableau XV :</b> Coefficients de corrélation entres les polyphénols, flavonoïdes, DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur des extraits méthanolique .....	<b>88</b>
<b>Tableau XVI :</b> Coefficients de corrélation entres les polyphénols, flavonoïdes, DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur des extraits aqueux .....	<b>88</b>
<b>Tableau XVII :</b> Effets des extraits méthanoliques des feuilles de citrus sur l'activité des peroxydases .....	<b>90</b>
<b>Tableau XVIII :</b> IC50 des extraits méthanoliques des feuilles de citrus sur l'activité les peroxydases.....	<b>91</b>
<b>Tableau XIX :</b> Effets des extraits aqueux des feuilles de citrus sur l'activité des peroxydases .....	<b>92</b>
<b>Tableaux XX :</b> Effets des extraits aqueux des feuilles de citrus sur l'activité des polyphénoloxydases .....	<b>95</b>

## *Liste des annexes*

**Annexe I :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.

Annexe I.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols des extraits méthanoliques.

Annexe I.2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols des extrais aqueux.

**Annexe II :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe II.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes des extrais méthanolique.

Annexe II.2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes des extrais aqueux.

**Annexe III :** Courbes d'étalonnages des activités antioxydantes.

Annexe III.1 : Courbe d'activité scavenging du radical DPPH des standards

Annexe III.2 : Courbes d'activités scavenging du radical DPPH des extraits aqueux.

Annexe III.3 : Courbes d'activités scavenging du radical DPPH des extraits méthanoliques.

Annexe III.4 : Courbe d'étalonnage de la BHA pour le pouvoir réducteur.

Annexe III.5 : Courbe d'étalonnage de Trolox.

**Annexe IV :** Chromatogrammes HPLC des extraits de *C. clementina* et de *C. limon*.

## *Introduction*

La relation de l'homme avec les plantes remonte à des milliers d'années. Pendant de nombreux siècles, les végétaux ont représentés la seule source de remèdes à de nombreuses pathologies. De nos jours, malgré le développement de la génie pharmaceutique, la médecine traditionnelle à base de plantes reste toujours prépondérante comme en témoigne les rapports de l'organisation mondiale de la santé qui estime à 80% le nombre de la population mondiale qui a recours à ce type de médication (**Winston, 1999**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples dans l'industrie agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Parmi les médicaments obtenus à partir des plantes, on trouve le taxol, isolé de l'if. Il est utilisé dans le traitement des cancers gynécologiques (**Allemana et al., 2010**). L'artémisinine, est une substance isolée de l'armoise, utilisée dans le traitement des formes résistantes de la malaria (**Lévesque et Seeberger, 2012**). On peut encore citer la galanthamine, obtenue de la perce-neige, utilisée depuis peu dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (**Takeda et al., 2006**). Dans l'industrie agro-alimentaire, les substances d'origine végétale peuvent être utilisées comme additifs naturels de conservation des denrées alimentaires. Elles sont utilisées comme agents conservateurs et antioxydants pour le maintien de la fraîcheur et la prévention de la dégradation et altération des aliments. L'acide ascorbique (vitamine C) et le tocophérol (vitamine E) étant des antioxydants très employés pour maintenir la couleur des préparations à base de fruits et légumes et ralentir l'oxydation des huiles et graisses alimentaires. Elles sont aussi utilisées pour amplifier ou améliorer les qualités sensorielles des aliments. Ainsi, la Curcumine, un colorant jaune-orange extrait de racines de *Curcuma longa* est utilisée pour la coloration de plusieurs aliments comme les glaces, les yaourts et les produits de la confiserie (**De Reynal et Multon, 2009**).

En application pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire, la valorisation et l'industrialisation des substances d'origine végétale est en plein essor. Cet intérêt accru pour ces substances est lié surtout à leurs propriétés d'antioxydants et/ou d'anti-enzymatiques. En santé humaine, il est communément admis que de nombreuses pathologies telles que le vieillissement, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson)

(**Glizczynska-Swiglo, 2006**), cardiovasculaires (Athéroscléroses), cancers et les maladies inflammatoires (**Di Matteo et Esposito, 2003**) sont directement ou indirectement, dues à un déséquilibre dans la balance existant au niveau physiologique entre les radicaux oxygénés et les antioxydants (enzymatiques ou non-enzymatiques) suite à un stress oxydatif. Ce déséquilibre en faveur des espèces oxygénées engendre des dommages au niveau cellulaire, qui se traduit par des pathologies pouvant être létales. Afin, de faire face à ces pathologies dues en partie à ces radicaux, des composés antioxydants de synthèses tels que le butyle d'hydroxytoluène (BHT) et le butyle d'hydroxy anisole (BHA) sont utilisés comme principes actifs. Malgré, les résultats encourageants obtenus avec ces antioxydants, il est de plus en plus démontré que leurs utilisations est susceptible de manifester des effets secondaires, voir même toxique, notamment une augmentation du risque d'apparition de certaines tumeurs (**Manian et al., 2008**).

Dans l'industrie alimentaire, les denrées alimentaires subissent lors de leurs stockage ou transformations des altérations et des dégradations menant à une modification de leurs qualités nutritionnelles, sensorielles et organoleptiques. Les altérations résultent soit de phénomènes d'oxydation ou du brunissement, qui se produisent aussi bien pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation qu'au cours du vieillissement d'aliments frais (**Whitaker et Lee, 1995**). Les réactions du brunissement, qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, ne sont pas généralement souhaitables, car elles nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles. Jusqu'à 50% des fruits et des légumes sont perdus en raison de ce phénomène, (**Marqués et Alu, 1995**). Pour remédier à ces phénomènes d'altération, des additifs chimiques de conservation sont utilisés en général, comme agent antioxydant et/ou anti-brunissement.

Les substances chimiques de synthèse, par leurs effets nocifs, nuisent à la santé humaine que ce la soit en application thérapeutique ou alimentaire. Pour atténuer ou abroger les effets de ces antioxydants ou anti-enzymatiques de synthèse, plusieurs études ont mis l'accent sur l'utilisation de substances naturels efficaces, sans ou présentant moins d'effets secondaires, issus de plantes notamment ceux des fruits et légumes qui sont considérées comme source impotente de multiples substances bioactives notamment en composés phénoliques et en vitamines. Ces composés phytochimiques, largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, antiradicaux, antioxydants et inhibiteurs enzymatiques (**Weisburger, 2002**), suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et même des consommateurs.

Dans l'optique de valoriser des substances végétales en application pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire s'inscrit l'objectif de notre travail de recherche qui consiste à la valorisation des substances actives de la flore Algérienne particulièrement les plantes du genre *Citrus* dont les agrumes constitue une des principales cultures pérennes en Algérie, spécialement les groupes appartenant aux oranges et clémentines (**Kerboua, 2002**). En effet, les agrumes, en raison de leur richesse en antioxydants naturels tels que l'acide ascorbique, ont sollicités depuis longtemps l'intention des chercheurs qui ont axé leurs travaux sur le fruit, l'écorce, la pulpe ou le jus de fruit. Par contre, les feuilles des citrus n'ont pas fait objet d'intention particulière par les chercheurs, mis à part quelques études préliminaires (**Pietta et al., 2003 ; Hadrich et al., 2008**).

Pour réaliser notre objectif, nous avons choisi les feuilles de six espèces de citrus de la région de Bejaïa à savoir *Citrus limon*, *Citrus clementina*, *Citrus grandis*, *Citrus aurantium*, *Citrus aurantiifolia*, *Citrus sinensis* (cv. *Thomson navel* et cv. *hamlin*) comme sources d'extraits pour évaluer leurs activités antioxydante et anti-enzymes du brunissement (anti-peroxydase et anti-polyphénoloxydase). Les résultats obtenus sont décrits dans ce manuscrit qui comporte : Une synthèse bibliographique constituée de trois chapitres : les citrus et leurs intérêts thérapeutiques ; Le stress oxydatif, le système de défense antioxydant et les antioxydants du citrus ; et le brunissement enzymatique. Une partie expérimentale décrivant la méthodologie réalisée et les résultats obtenus : dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, les flavonoïdes) des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de six espèces du citrus, évaluation de l'activité antioxydant par tests DPPH, ABTS et FRAP et évaluation de l'activité anti-peroxydase et anti-polyphénoloxydase de ces mêmes extraits de citrus.

## I.1. Généralités

### I.1.1. Définition et distribution géographique

*Citrus* est un genre de plantes de la famille des rutacées, regroupant des arbres et des arbustes, dont plusieurs espèces sont cultivées pour leurs fruits (les agrumes). Le terme d'agrumes provient du mot latin *acrumen*, signifiant "saveur acre" en raison de la présence de l'acide acétique qui leurs confère l'âcreté qui les caractérisent. Ces citrus s'identifient par leur appareil sécréteur constitué par des poches sécrétrices particulières dites schizolysigènes. Ces poches toujours superficielles, sont d'origine épidermique. Il suffit de les écraser légèrement pour qu'une forte odeur d'essence s'en dégage (**Haineault, 2011**).

Il s'est avéré que toutes les espèces appartenant au genre citrus sont originaires des régions tropicales et subtropicales du sud-est asiatique (Malaisie, l'Indonésie, la Chine, la Birmanie et l'Inde) (tableau I), où la température est constante (20 à 25°C) avec une forte humidité. On trouve une première mention de leur culture dans les livres religieux indiens et chinois, entre 800 et 500 av J.C (**Bachése et Bachése, 2011**). Elles ce sont ensuite diffusées au cours du temps vers d'autres continents. Elles ont été introduites dans le bassin méditerranéen notamment en Afrique du nord et le sud de l'Europe grâce aux arabes en raison des échanges commerciaux et les conquêtes militaires. Il est probable que le bigaradier ou l'orange amère fut connu au X<sup>e</sup> siècle, le citronnier de race de cédrat au XII<sup>e</sup> siècle, l'orange doux au XIV<sup>e</sup> siècle et le mandarinier ainsi que le pamplemoussier au XIX<sup>e</sup> siècle (tableau I). Elles ce sont ensuite exportées vers l'Amérique par les espagnoles et les portugais (**Nicolosi, 2000**).

Quant au clémentinier, c'est une espèce locale Algérienne créée par le croisement entre mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco) et un oranger (*Citrus sinensis*), réalisé par le père Clément (Vincent Rodier de son vrai nom) en 1929 à l'orphelinat de Messerghine près de la ville d'Oran (**Chahidi et al., 2008**).

**Tableau I** : Origine de quelques espèces de citrus (**Gmitter et al., 2007**).

Nom	Nom Scientifique	Origine
Citron	<i>Citrus medica</i>	Inde et Chine
Mandarine	<i>Citrus reticulata</i>	Sud-est Asiatique
Lime	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Est d'Inde
Orange amer	<i>Citrus aurantium</i>	Chine
Orange	<i>Citrus sinensis</i>	Chine
Pamplemousse	<i>Citrus grandis</i>	Malaisie et Inde
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i>	Iles Barbade
Clémentine	<i>Citrus clementina</i>	Algérie

### I.1.2. Production des agrumes dans le monde

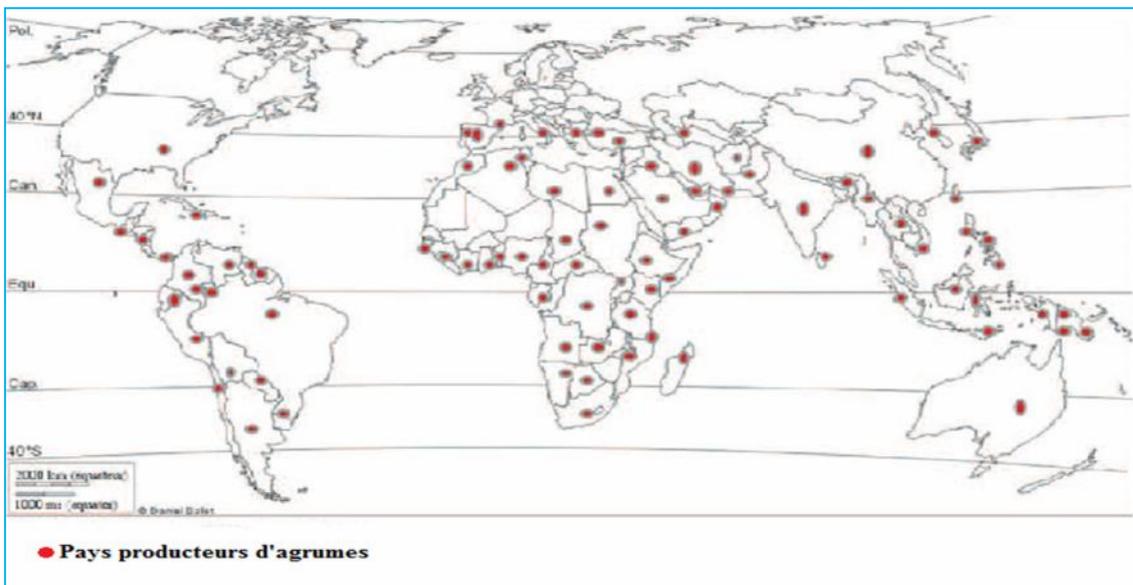
Les agrumes sont considérés comme l'un des fruits les plus consommés au monde. Ils occupent la deuxième place des productions fruitières dans le monde avec un taux de 115 millions de tonnes produites derrière les bananes (125 millions de tonnes) (**Hwang et al., 2012**). Grâce à une grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes, la culture d'agrumes s'étend sur plus de 100 pays principalement situés dans les régions tropicales, subtropicales et dans le bassin méditerranéen, autrement dit entre 40° de l'altitude nord et 40° de l'altitude sud (figure 1). La superficie totale plantée en agrumes est évaluée à plus de 7,6 million d'hectares (**FAO, 2010**).

Sao Paulo au Brésil et la Floride aux États-Unis sont les deux plus grandes régions au monde productrice des produits à base d'orange ( 60 millions de tonnes), suivi de la Chine, l'Inde et du Mexique (chacun environ 7 millions de tonnes). Avec une participation de 10 à 12 % de la production mondiale, l'Espagne est considéré comme le principale agrumicole du bassin méditerranéen (**Ladaniya, 2010**).

Les oranges représentent la plus grande part de cette production (60 %), ensuite les petits agrumes (tangerines, mandarines, clémentines...etc.) qui comprennent

approximativement 20 % de la production, les citrons et les limes (13 %), en fin les pomelos (pamplemousse) avec 4 à 6 %.

Le volume des agrumes transformés est évalué à 35 % de la production totale, il est en constante augmentation, 58% seraient autoconsommés et seulement 12 % feraient l'objet d'échanges internationaux. En Europe, l'Espagne est le premier producteur d'agrumes, alors que le marché de fruit frais est dominé par les clémentines et les mandarines, dont la consommation croît régulièrement (FAO, 2010).

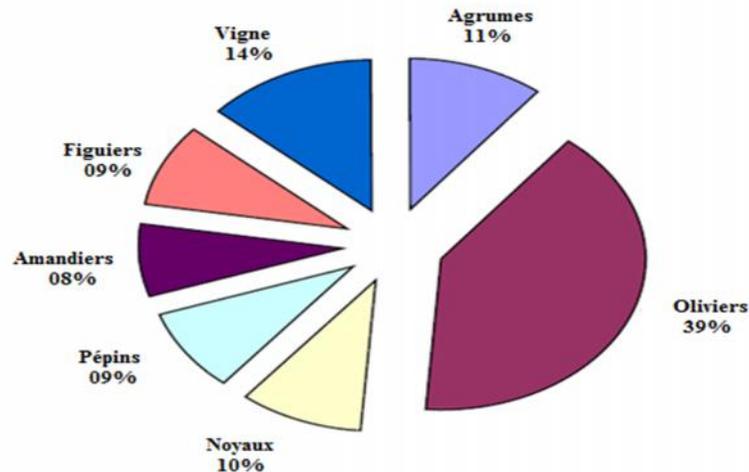


**Figure 1 :** Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde (FAO, 2010).

### I.1.3. Production des agrumes en Algérie

La production nationale d'agrumes est passée de 1 million de quintaux en 1962 à plus de 11 millions de quintaux en 2012. Faisant ainsi de notre pays le 19<sup>ème</sup> producteur d'agrumes au monde. La production nationale couvre 178 variétés d'agrumes dont la majeure partie est réalisée dans le centre du pays, notamment dans les vergers de la Mitidja, avec 5.323.165 quintaux, suivi par la wilaya de Chlef et de Mostaganem (Anonyme, 2012).

A la fin de 20<sup>ème</sup> siècle, le secteur d'agrumiculture couvre une superficie de 45 040 hectares, ce qui représente 11 % de la surface cultivée dans le pays (figure 2), constitué par diverses groupes d'agrumes spécialement les oranges (62,3 %) (Washington navel, Thompson navel, Sanguinelli, Hamlin, Cadenera et Maltaise) suivi des clémentines et mandarines (30,4 %) et du citron (6%) (Kerboua, 2002).



**Figure 2 :** Proportion de la surface occupée par l'agrumiculture en Algérie (Karboua, 2002).

A Béjaïa, les vergers agrumicoles occupent une place importante avec un taux de production de 201380 quintaux. La superficie totale plantée en agrumes a été évaluée à plus de 1749,58 hectares avec une densité de 300 arbres/hectare. La gamme variétale du groupe des oranges est la plus importante (Thomson navel, Washington navel, hamlin, Jaffa, Valencia late, Sanguinelli, Double fine, Portugaise) avec un taux de production de 163 948 quintaux (tableau II). Avec un taux de production de 46 820 quintaux, les vergers d'Amizour sont les plus importants au niveau de la wilaya, suivi de ceux de la région d'El kseur (39 575 quintaux) et de Béjaïa (27 978 quintaux) (DSA, 2012).

**Tableau II :** Composition variétales et taux de production des agrumes à Béjaïa (DSA, 2012).

Groupes	Superficie (ha)	Production (Qx)
Oranges	1337,05	163948
Mandarines & clémentines	365,78	31947
Citrons	46,75	5485
Pomélos	00	00
<b>Total</b>	<b>1749,58</b>	<b>201380</b>

\*Source : Direction des services agricoles de la wilaya de Bejaïa (2012).

## I.2. Classification botanique et taxonomie

Bien que la classification de **Cronquist** est l'une des plus utilisée dans certains ouvrages et bases de données, plusieurs classifications botaniques des citrus ont été également proposées (tableau III). Les classifications des citrus sont basées essentiellement sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques (**Ortiz, 2002**).

**Tableau III** : Classification botanique des agrumes.

	Classification de Cronquist (1981)	Classification de Kimball (1999)	Classification de Khan <i>et al.</i> (2010)
<b>Règne</b>	Plantae	Végétal	Végétal
<b>Embranchement</b>	Tracheobionta	Tracheobionta	Spermaphyte
<b>Division</b>	Magnoliophyta	Embryophyta	Angiosperme
<b>Classe</b>	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Monocotylédoneae
<b>Sous classe</b>	/	/	Archichalmydeae
<b>Ordre</b>	Géraniale	Sapindales	Rosidae
<b>Sous ordre</b>	/	/	Germiineae
<b>Famille</b>	Rutaceae	Rutaceae	Rutaceae
<b>Tribu</b>	/	/	Citreae
<b>Genre</b>	<i>Citrus</i>	<i>Citrus</i>	<i>Fortunela, Poncirus et Citrus</i>

Le genre citrus appartient à la famille des rutacées. Il renferme la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits. Ce genre est subdivisé en deux sous genres : *Citrus* (*Eucitrus*) et *Papeda*. Le sous genre *Papeda* regroupe des espèces aux fruits petits et très acides souvent non comestibles avec la présence de gouttelettes d'huile amère dans les vésicules de pulpe. Parmi ces espèces : *C. celebica* ; *C. macrophylla* ; *C. macroptera* ; *C. kerrii* ; *C. combara* ; *C. excelsa* ; *C. hystrix* et *C. micrantha*. Alors que le sous genre *Eucitrus* comprend des espèces de citrus comestibles tels que : *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. reticulata* Blanco, *C. paradisi*, *C. limon*, *C. médca*, *C. aurantiifolia*, *C. grandis* (**Ortiz, 2002**).

L'étude la plus récente basée sur l'analyse d'enzymes a permis de mettre une taxonomie dans la quelle le sous genre de *Citrus* comprend quatre espèces à savoir *Citrus*

*maxima* ; *Citrus reticulata* ; *Citrus medica* ; et *Citrus halimii*, qui sont à l'origine de toutes les autres espèces issus par mutations naturelles (**Calabrese, 1998**).

Le nombre d'espèces compris dans ce sous genre est très complexe et varie en fonction des botanistes. Ainsi le Japonais Tanaka (1977) recense plus de 162 espèces, alors que l'Américain Swingle (1946) n'en distingue que 16 espèces et chaque espèce contient plusieurs variétés importantes (**Krueger et Roose, 2003**).

Il existe ainsi plus de 2500 espèces et variétés d'agrumes, les orangers à eux seuls en comptent plus de 1000 espèces. Cette diversité est due généralement aux mutations spontanées ainsi qu'aux multiples hybridations (**Polese, 2008**).

### I.3. Caractéristiques générales des citrus

Les citrus sont des petits arbres ou arbustes de taille allant de 5 à 12 m de hauteur. Leur tige varie selon les différentes espèces, mais la plupart élèvent naturellement leur tige droite, nue, très dure et sans branches, jusqu'à la hauteur de deux à quatre mètres, et divisent ensuite en plusieurs branches très ramifiées. L'écorce est mince et assez lisse, d'une couleur grise cendrée est verte chez les jeunes plantations. Les rameaux sont assez souvent couverts d'épines axillaires est très acérées. Il existe plusieurs poussées de végétation dans l'année, la plus importante étant celle du printemps ou les conditions météorologiques sont plus favorables (**Polese, 2008**).

Les feuilles des citrus sont alternes, coriaces, glanduleuses, entières ou légèrement dentées, quelque fois lavées de violet dans leur jeunesse, mais toujours luisantes et d'un vert brillant en dessous de l'état adulte. Elles ce montrent dans toutes les proportions entre la forme linéaire et celle de l'ovale arrondi, avec des longueurs variables selon les espèces (tableau IV) (**Ortiz, 2002**).

Les fleurs sont parfumées, relativement petites, naissent auxiliaires et terminales sur les rameaux, elles sont solitaires ou groupées ensemble et forment des grappes à l'extrémité des rameaux. Généralement, les fleurs des citrus sont de couleur blanche avec 4 à 5 pétales est la période de floraison varie du mois de mars à juillet selon les espèces (**Bachés et Bachés, 2011**).

Le fruit est une grande baie coriace, d'une forme arrondie, ovale ou oblongue, lisse ou raboteuse, avec une couleur verte, jaune, orange ou rouge selon l'espèce. Le fruit est divisé intérieurement en autant de loges qu'il y en avait dans l'ovaire.

Les graines des citrus sont de couleur blanchâtre à verdâtre pale, aplatie et angulaire, au nombre de un à quatre graines dans chaque loge (**Harley *et al.*, 2006**).

Tableaux IV : Description de quelques espèces de citrus.

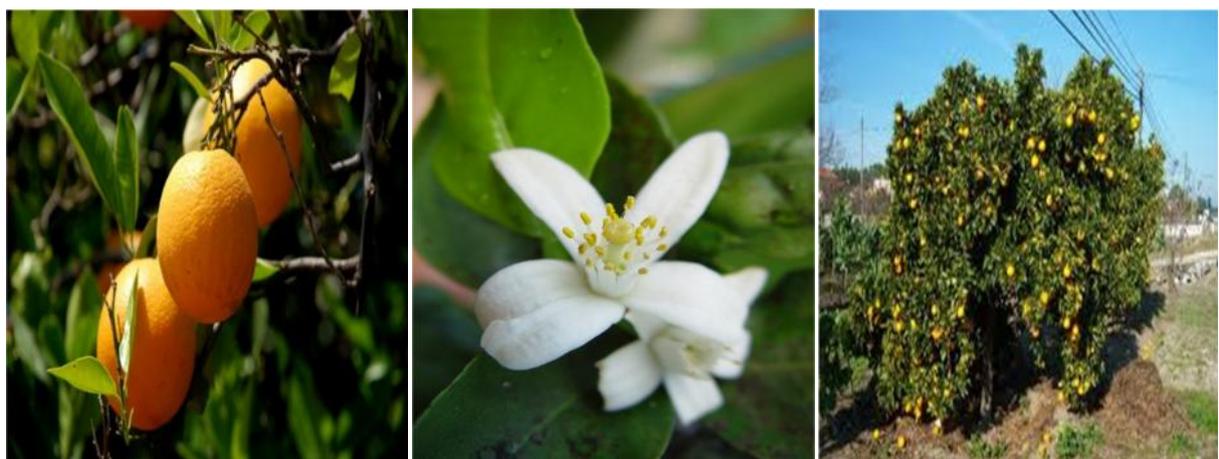
Espèce	Nom commun	Taille de l'arbre	Couleur du fruit	Forme du fruit	La pulpe	épines	Feuilles	Références
<i>C. limon</i>	Citronnier	6 m	Jaunâtre, verdâtre	Ovoïde, 5 à 10 cm de diamètre	Juteuse et acide	Épineux	Large, ovales	<b>Loussert (1989)</b>
<i>C. clementina</i>	Clémentinier	2 à 3 m	Orange	Sphérique et aplatis	Juteuse et sucré	Souvent épineux	Longues et pointues	<b>Bache et al. (2002)</b>
<i>C. sinensis</i>	Orange douce	4 à 5 m	Orange, rougeâtre	Globuleux	Juteuse, sucrée et acidulée	Souvent épineux	Persistantes et lancéolées	<b>Bachés et Bachés (2011)</b>
<i>C. grandis</i>	Pamplemoussier	15 m	Jaune ou vert clair	Très grand, aplatie ou piriforme	Grossière	Sans épines	Ovales, grande et large	<b>Polese (2008)</b>
<i>C. aurantium</i>	Bigaradier	5 à 10 m	Rouge, orange	Taille moyenne, rond ou ovale	Amère et acide	Épineux	Ovales, lancéolées et pointues	<b>Kimball (1999)</b>
<i>C. aurantiifolia</i>	Limettier	4 m	Vert, jaune verdâtre	Petite taille, ovale	Juteuse et très acide	Sans épines	Petite feuilles elliptiques, arrondies	<b>Colombo (2004)</b>
<i>C. reticulata</i>	Mandarinier	9 m	Rouge orangé	Globuleux, aplatis aux deux pôles	Juteuses et sucrées	Souvent épineux	Longue et pointues	<b>Haineault (2011)</b>
<i>C. bergamia</i>	Orange sauvage	5 m	Jaune	Petite, rond et lisse	Juteuse, acide et amère	Peu épineux	Persistantes, ovales	<b>Gmitter et al. (2007)</b>



(A) *Citrus limon*



(B) *Citrus clementina*



(C) *Citrus sinensis*



*(D) Citrus aurantium*



*(E) Citrus grandis*



*(F) Citrus aurantiifolia*

**Figure 3 :** Photographies des fruits, fleurs et arbres de quelques espèces de citrus.

**(A) :** *Citrus limon* ; **(B) :** *Citrus clementina* ; **(C) :** *Citrus sinensis* ; **(D) :** *aurantium* ;  
**(E) :** *Citrus grandis* ; **(F) :** *Citrus aurantiifolia*

#### I.4. Valeur nutritive des citrus

La composition en éléments nutritifs des citrus est différente d'une espèce à une autre (tableau V). Le fruit du citrus est charnu avec une teneur en eau élevée allant de 82,3 % pour l'orange jusqu'à 91 % pour le fruit de lime (**Virbel-Alonso, 2011**).

La clémentine et la mandarine sont les espèces les plus énergétiques, suivi de l'orange et de pamplemousse. Les polysaccharides complexes sont les principaux constituants énergétiques des citrus, principalement le saccharose, fructose et glucose, avec des valeurs allant de 9,5 à 15,5 g/100g, l'orange douce est l'espèce la plus riche avec un taux de 15,5 g/100g de fruit. Les citrus contiennent également des protéines (0,5 à 1,3 g/ 100g de fruit), et un taux très faible de lipides (0,2 à 0,6 g/100 g de fruit), à l'exception du lime qui en contient un taux plus élevé (2,4 g/100g de fruit) (**Haineault, 2011**).

Les citrus contiennent aussi une variété d'oligo-éléments et des substances minérales, constituées principalement de potassium et de calcium. On y trouve également du magnésium, du fer, du zinc ainsi que d'autres oligo-éléments à l'état de traces (**Wu et al., 1996**).

Les citrus en générale, l'orange et le citron en particulier sont des sources très importantes pour la vitamine C, avec des quantités variables en fonction des espèces : de 77 mg/100g de citron, 71 mg/100g pour l'orange et 31 mg/100g pour la mandarine. Les autres vitamines, telles que, la folacine, la provitamine A et la vitamine B (thiamine, riboflavine, vitamine B<sub>6</sub>) quant à eux sont sous forme de traces (**Ortiz, 2002**).

Les constituants phénoliques présents dans les espèces du genre *Citrus* sont importants, en particulier dans diverses variétés d'orange. L'analyse par HPLC des flavonoïdes indique que les fruits des citrus sont riches en flavonoïdes, en particulier les flavanones glycosylées (narirutine, narangine, l'héspéridine, didymine, neoeriocitrine) et en flavones polyméthoxylées (la sinensétine, l'hexaméthoxyflavone, nobilétine, l'heptaméthoxyflavone et la tangéretine), ainsi que d'autres composés : acides organiques (acide citrique, malique, oxalique, caféique, férulique...etc.), et en composés bioactifs tels que limonoïdes, huiles essentiels, caroténoïdes, les polyphénols et d'autre micro-éléments (**Oufedjikh et al., 2000**).

**Tableau V** : Valeur nutritive de quelques fruits de citrus (pour 100g de fruit). (Ortiz, 2002 ; Virbel-Alonso, 2011).

Espèces	Orange	Lime	Pamplemousse	Citron	Mandarine	Clémentine
Teneur en eau (%)	82,3	89,3	88,4	87,4	87	86,9
Energie (cal)	44	32	41	41	46	46
Glucides (g)	15,5	9,5	10,6	10,7	11,6	10,5
Protéines (g)	1,3	0,7	0,5	1,2	0,8	0,7
Lipides (g)	0,3	2,4	0,1	0,3	0,2	0,2
Calcium (mg)	70	33	16	61	40	26
Fer (mg)	0,8	0,6	0,4	0,7	0,4	0,35
Potassium (mg)	196	102	135	145	126	145
Sodium (mg)	2	2	1	3	2	Traces
Provitamine A (IU)	250	10	80	30	420	330
Thiamine VB <sub>1</sub> (mg)	0,1	0,03	0,04	0,05	0,06	0,04
Riboflavin VB <sub>2</sub> (mg)	0,05	0,02	0,02	0,04	0,02	0,03
Vitamine C (mg)	71	37	38	77	31	41
Polyphénols totaux (mg)	279	-	163	60	192	190

\*UI : *Unité Internationale*.

## I.5. Propriétés biologiques des citrus

### I.5.1. Propriétés nutritionnelles

Les fruits des citrus sont classés parmi les fruits les plus désaltérants grâce à leur grande teneur en eau (Souci *et al.*, 1995). Ils offrent un apport énergétique élevé par rapport aux autres fruits ; 46 cal/100 g pour la mandarine et la clémentine ; et 41 cal/100g en moyenne pour les autres espèces. Ils représentent également une source appréciable de calcium dont la bonne assimilation par l'organisme est facilitée par la présence d'acide citrique et de la vitamine C (Virbal-Alonso, 2011).

Ces fruits sont très importants pour l'organisme, car elles permettent de surmonter et prévenir des carences nutritionnelles dans le cas de pathologie liée aux régimes alimentaires. Les citrus sont la première source de jus dans le monde grâce à leurs pulpes juteuses. Ils sont également utilisés dans le domaine agro-alimentaire pour préparer des marmelades, confitures, confiseries...etc. (**Virbal-Alonso, 2011**).

### **I.5.2. Propriétés thérapeutiques**

Les citrus sont utilisés depuis longtemps en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques, et parmi les espèces les plus utilisées : le citron et l'orange amère, comme des antidotes pour le traitement des morsures de serpent (**Arias et Ramon-Laca, 2005**). En effet, plusieurs études scientifiques ont démontré que les extraits de fruit de citron étaient actifs contre les effets létaux et hémorragiques dus aux venins de *Bothrops atrox* (**Otero et al., 2000**). Les fruits de citrus présentent également d'autres effets thérapeutiques grâce à leurs phytoconstituants tels que ; les effets antipyrétiques ; contre les nausées ; perte d'appétit ; contre les varices et les hémorroïdes. La consommation des agrumes riches en vitamine C (citron et orange) permettent de renforcer le système immunitaire et de lutter contre le rhum et ses symptômes. Ils favorisent également la bonne plasticité de la peau par la production de collagène (**Virbel-Alonso, 2011**).

Les citrus améliorent le tonus veineux et peuvent contribuer à la diminution des lipides sanguins ainsi que pour la prévention des thromboses. Alors que la pulpe extraite industriellement est utilisée pour produire des agents antibactériens et antifongiques (**Manner et al., 2006**).

La richesse des citrus en polyphénols et en flavonoïdes représente une source de matière première pour la préparation de médicaments contenant de fortes teneurs en composés purifiés. Les effets thérapeutiques des bioflavonoïdes des citrus sont multiples, les médicaments à base de diosmétine, d'héspéridine et de naringine (constituant principal des flavonoïdes des citrus) améliorent le tonus veineux et le drainage lymphatique, accélèrent la cicatrisation des ulcères veineux et diminuent les processus inflammatoires. Les flavonoïdes aglycones, les terpènes (comme le limonène et les limonoïdes) et les lycopènes (caroténoïdes) exercent également une action anticancéreuse en bloquant la prolifération des cellules cancéreuses (cellules issues du cancer de sein, de la prostate, du colon), comme ils peuvent

bloqué le cycle cellulaire par suppression de la synthèse des kinases impliquées dans les phases de transition (**Macheix *et al.*, 2005**).

Par contre, les huiles essentielles d'agrumes sont utilisées comme des antimicrobiennes, antirides, antidiurétiques et antispasmodiques (**Tranchida *et al.*, 2012**). Les feuilles quand à elles, leurs utilisations est rapportées en médecine naturelle pour leurs propriétés sédatives et adoucissantes. Les extraits des feuilles sont également prescrites pour régler les troubles du sommeil et soigner la nervosité sans développement d'effets secondaires (**Hadrich *et al.*, 2008**).

De nombreuses autres études ont montées les rôles importants des composants de citrus comme : anti-inflammatoires, anti-toxiques, anti-diarrhéiques, prolongement de l'action pharmacodynamique de certains médicaments (en retardent leur dégradation), calmants pulmonaire, remèdes contre les maladies fébriles et les vertiges (**Arias et Ramon-Laca, 2005**).

## II.1. Généralités

Le stress oxydant est un état qui résulte d'un déséquilibre profond -au sein d'un individu- entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation des systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase,...etc.), ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...etc.), qui aboutissent à l'apparition des espèces radicalaires. Une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants ainsi que les exercices physiques intenses contribuent également à l'apparition d'un stress oxydant (**Favier, 1997**).

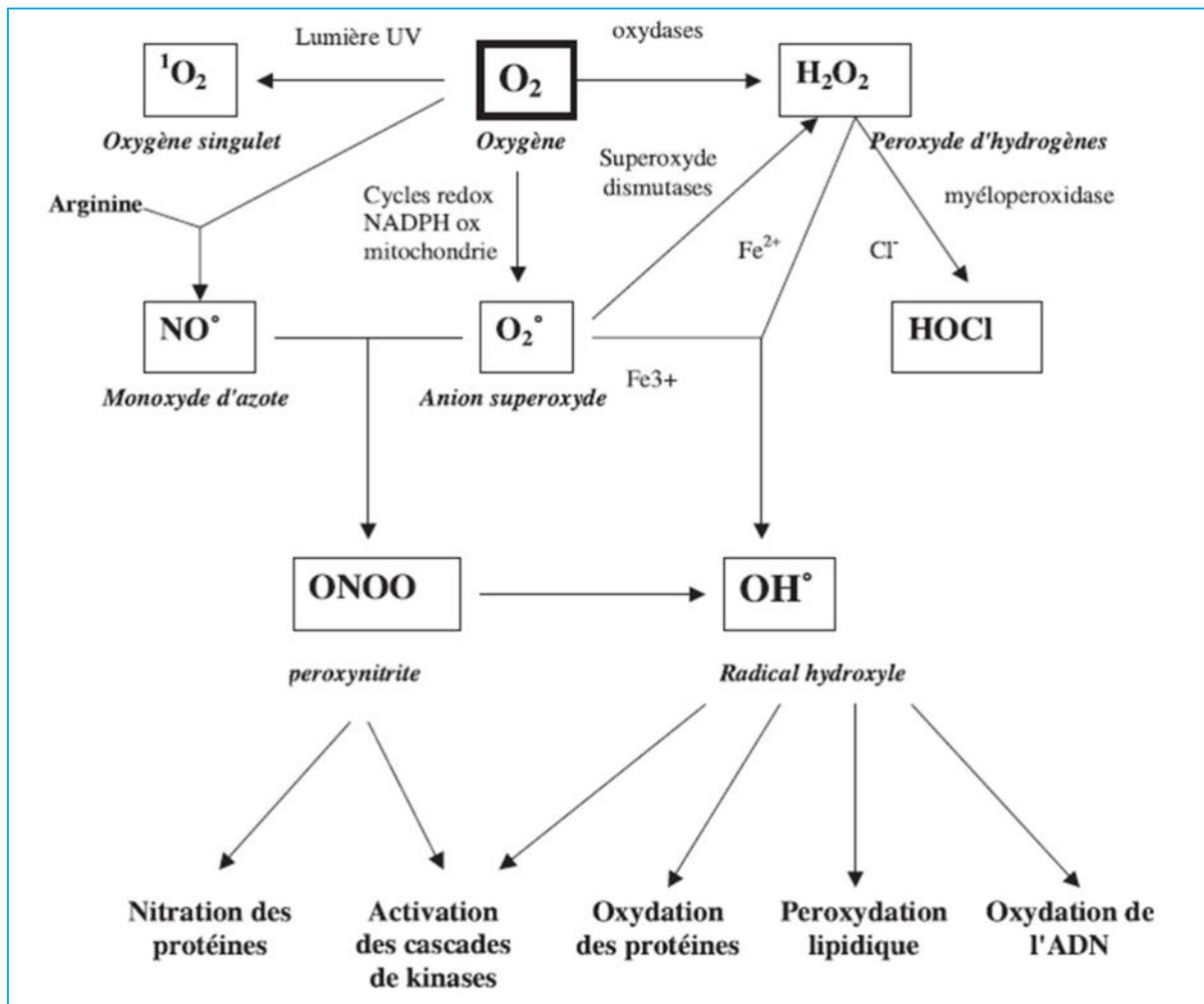
Quand l'un ou l'autre de ces mécanismes est présent, le stress oxydant est initié et contribue par ses conséquences multiples qui touchent les acides nucléiques, les protéines ou les lipides à la pathogénie de certaines maladies telles que le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives ou le cancer. (**Morena et al., 2002**).

## II.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont soit des molécules ou des atomes possédant un ou plusieurs électrons libres sur leurs orbitales externes (électron non apparié). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Du fait de leurs instabilités énergétiques, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule ce qui induit l'apparition des réactions d'oxydations en chaîne (**Asmus et Bonifacic, 2000**).

La formation des radicaux libres est une conséquence normale du métabolisme aérobie chez l'homme dans le cas où l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres est maintenu. C'est le cas lors de la production d'énergie, des mécanismes immunitaires (lors d'infections bactériennes et virales), de l'amélioration du captage musculaire du glucose et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire (**Balon et Nadler, 1994**).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs sont souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (figure 4) (**Favier, 1997**).



**Figure 4 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier, 1997).

Par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est un radical libre. Il possède en effet deux électrons non appariés. Les spins de ces deux électrons célibataires sont parallèles, lui attribuant ainsi une stabilité relativement grande. Cependant, dans l'organisme une partie de cet oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors à la formation des espèces réactives de l'oxygène (tableau VI). La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent (Asmus et Bonifacic, 2000 ; Delattre *et al.*, 2005a).

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être d'origine exogène : une alimentation pauvre en antioxydants, produits des radiations (UV et rayons X), pollution de l'air (N, NO<sub>2</sub>), amiante, métaux toxiques, solvants organiques, anesthésiques, pesticides, drogues. Par contre l'origine endogène des ERO sont principalement les chaînes respiratoires mitochondriales des

cellules des organismes aérobies (environ 2 % de l'oxygène consommé au niveau mitochondriaux sont transformés en ERO particulièrement réactionnelles), le dysfonctionnement du système enzymatique ou par manque d'antioxydants dans l'organisme, ainsi que une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants (**Puppo et Halliwell, 1988**).

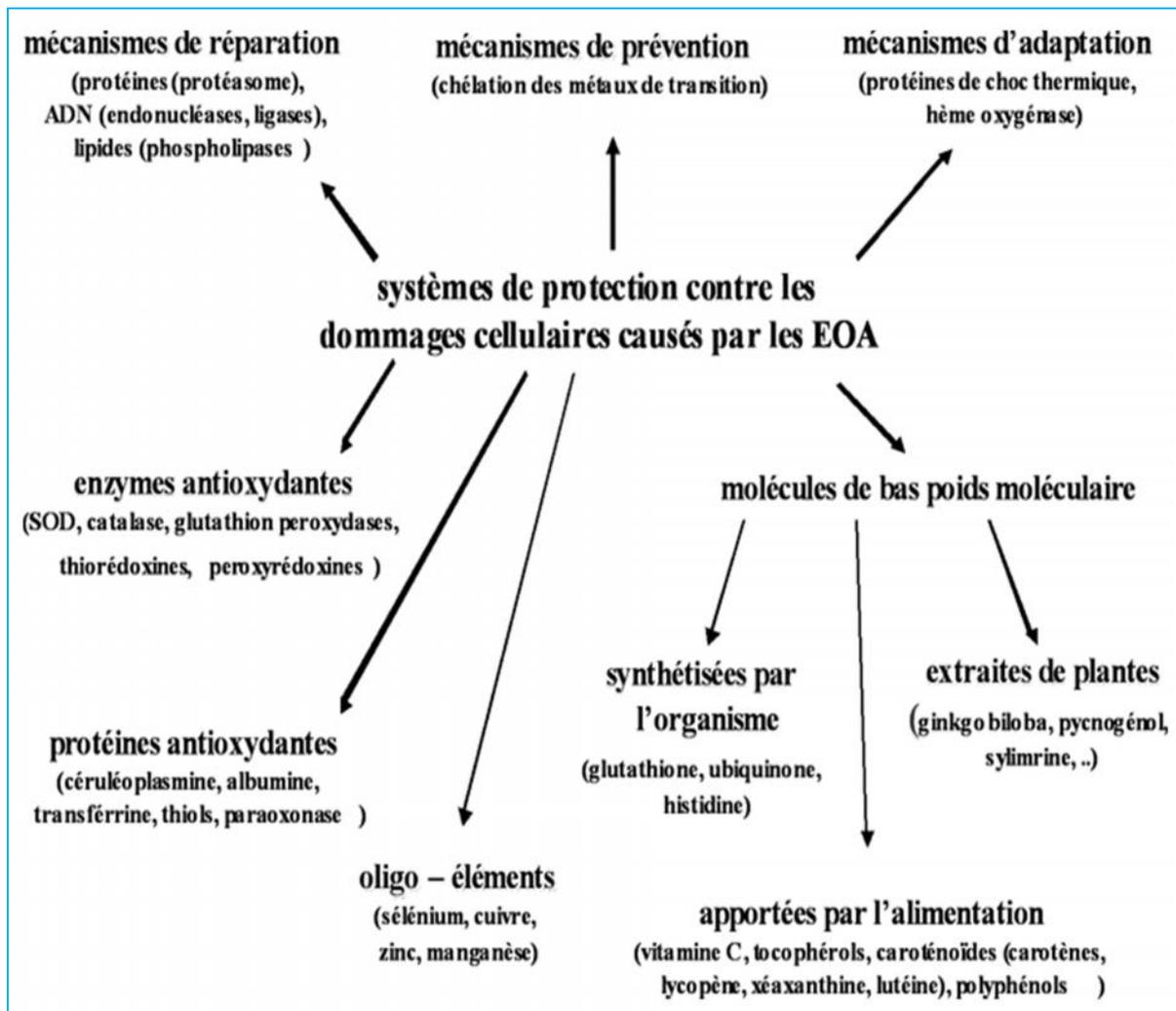
**Tableau VI** : Principales espèces réactives de l'oxygène et leurs structure chimique (**Haton, 2005**).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Radical hydroxyle	$\text{OH}^\bullet$	L'oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Radical alkoxy	$\text{RO}^\bullet$	Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Radical peroxy	$\text{ROO}^\bullet$	Peroxynitrite	$\text{ONOO}^\bullet$
Radical hydroperoxy	$\text{HOO}^\bullet$	Hypochlorite	$^\bullet\text{OCl}$
Radical Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet-}$	/	/

### II.3. Les antioxydants

Afin de lutter contre les effets néfastes des ERO, notre organisme dispose d'un système de protection très sophistiqué (figure 5). D'une part, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes qui assurent la réparation des dommages oxydatifs ainsi que quelques oligo-éléments (sélénium, cuivre et zinc) qui sont des cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydante. D'autre part, une multitude d'antioxydants synthétisés par l'organisme ou apportés par l'alimentation sont utilisés afin de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant pour le bon fonctionnement de l'organisme (**Marongiu et al., 2004**).

Les antioxydants peuvent agir contre l'oxydation par deux manières distinctes : soit en protégeant les lipides cibles des initiateurs de l'oxydation, soit en interrompant la phase de propagation. Dans le premier cas, les antioxydants dits préventifs, empêchent la formation ou piègent les ERO responsables de l'initiation de l'oxydation. Dans le second cas, les antioxydants dits briseurs de chaînes interceptent les radicaux propagateurs de l'oxydation ( $\text{LOO}^\bullet$ ) ou participent indirectement à l'interruption de l'oxydation radicalaire en chaîne (**Laguerre et al., 2007**).



**Figure 5 :** Système de protection contre les dommages cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène (Kohen et Nyska, 2002).

### II.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

L'organisme possède un système enzymatique très efficace pour contrarier les espèces réactives de l'oxygène (figure 6). Il existe une grande variété de systèmes enzymatiques de réduction des ERO qui possèdent des spécificités différentielles. Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase, la catalase, glutathion peroxydase. D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante tels que : glutathion réductase, thioredoxine réductase, glutathion transférase. Le taux cellulaire de ces enzymes est généralement contrôlé et leur activité est conditionnée par la disponibilité en oligo-éléments tels que le cuivre, le manganèse, le zinc, le sélénium (Scandalios, 2005).

➤ **Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les superoxydes dismutases sont des enzymes qui vont catalyser la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Elles sont présentes dans les différents compartiments cellulaires, et permettent d'éviter l'accumulation d'anion superoxyde, qui se diffuse difficilement à travers les membranes lipidiques. Les cellules végétales contiennent trois types de superoxyde dismutases, contenant différents métaux dans leur centre actif. Les Fe-SOD se trouvent dans les chloroplastes, les Cu/Zn-SOD sont cytosoliques et chloroplastiques, tandis que les Mn-SOD sont limitées à la mitochondrie (**Fink et Scandalios, 2002**).

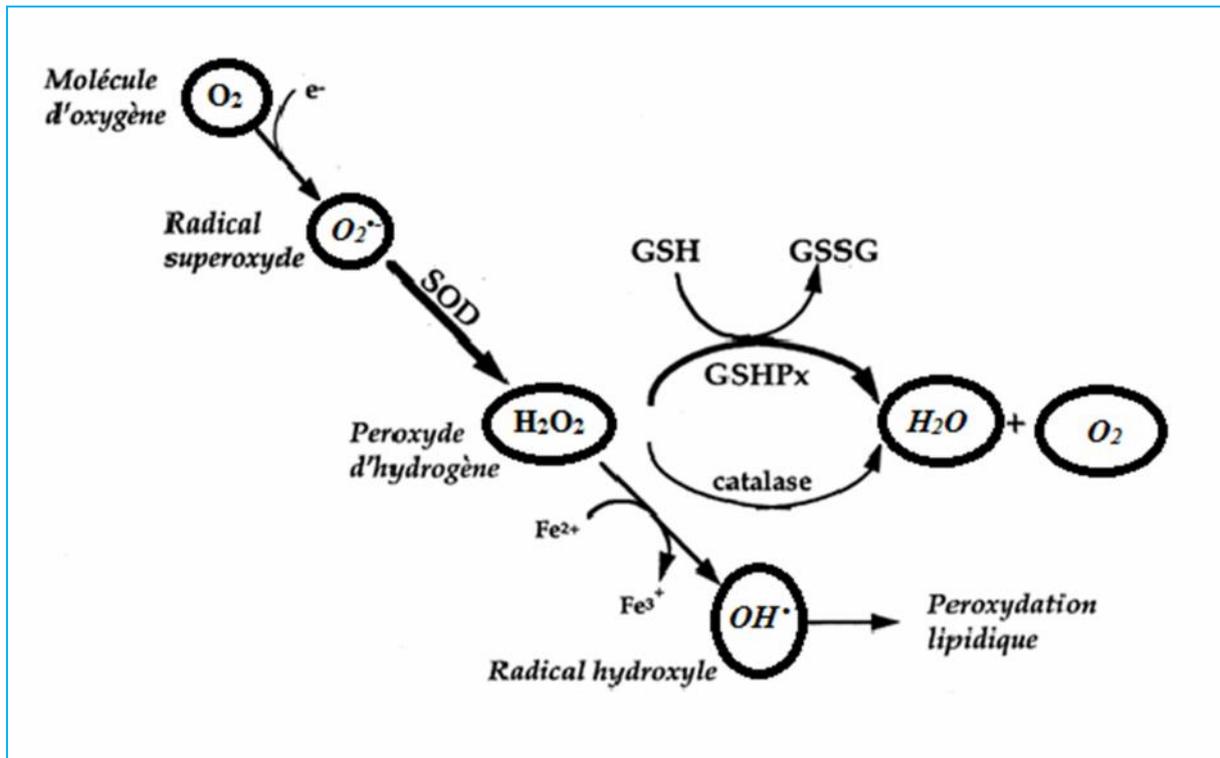


➤ **Les catalases (CAT)**

Les catalases sont des enzymes à hème, actives sous forme tétramérique. Elles sont localisées principalement dans les peroxysomes. Elles catalysent la réduction d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , avec une très grande efficacité sans perturber l'équilibre redox intracellulaire. Ainsi, elles constituent une protection efficace pour la cellule en éliminant l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit en grande quantité dans le peroxysome. Ces enzymes forment une famille multigénique chez les plantes, répondant différenciellement aux conditions de stress (**Scandalios, 2005**).

➤ **Les glutathions peroxydases (GPx)**

Le rôle de la glutathion peroxydase est de réduire le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras ou du cholestérol. Elles utilisent le glutathion réduit et le sélénium comme cofacteur sur lesquels elles transfèrent l'oxygène. Il est important de noter qu'il faut la présence des SOD et des GPx pour avoir un effet protecteur optimum contre les radicaux libres, car la présence des SOD seules génèrent du peroxyde d'hydrogène qui est très toxique (**Goudable et Favier, 1997**).



**Figure 6** : Rôle des antioxydants enzymatiques dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (Goudable et Favier, 1997).

### II.3.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants sont naturellement présents dans les végétaux et les aliments ou incorporés à ceux-ci lors de leur fabrication. Ils sont définis comme étant des substances qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, protéger les cellules contre les réactions d'oxydations provoquées par les radicaux libres soit par la neutralisation de ces radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs, soit par l'élimination des composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation. Dans ce groupe d'antioxydants on peut distinguer deux types : les antioxydants endogènes et les antioxydants exogènes (Ribeiro *et al.*, 2001).

#### II.3.2.1. Les antioxydants endogènes

Les antioxydants non enzymatiques endogènes sont généralement des thiols, parmi lesquelles on peut citer le glutathion (GSH), l'acide lipoïque, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine. Le glutathion (largement présent sous forme réduit) joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre

l'oxydation, il à une fonction de coenzymes des GPx, il exerce également une interaction synergique avec d'autres antioxydants tels que la vitamine E ou la vitamine C (**Gérard-Monnier et Chaudière, 1996**).

L'acide lipoïque quant à lui, est capable de piéger les HO<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup><sub>2</sub>, HOCl et <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, en se liant à des métaux comme le fer et le cuivre. Par contre l'acide urique présente des propriétés antioxydantes contre les radicaux hydroxyles et les radicaux peroxydes (**Delattre et al., 2005a**).

### II.3.2.2. Les antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. La toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés particulièrement dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), et le tert-butylhydroquinone (TBHQ), a conduit à la recherche des sources naturelles d'antioxydants comme les plantes. En effet, ces dernières représentent une source renouvelable et très riche en antioxydants, tels que la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les composés phénoliques (**Marongiu et al., 2004**).

#### 1. La vitamine C

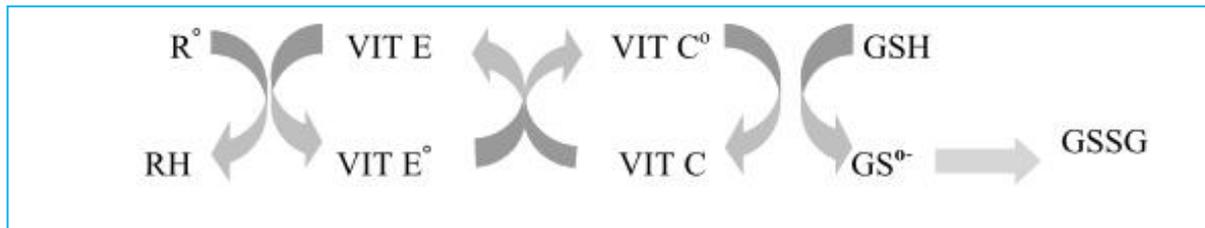
La vitamine C est un nutriment essentiel qui doit être apporté par l'alimentation. Elle tient son nom "acide ascorbique" de la maladie scorbut qui touche les personnes privées de fruits et légumes pendant une longue période. Elle est caractérisée par son puissant potentiel réducteur (**klimczak et al., 2007**).

L'acide ascorbique est un antioxydant par excellence, il permet de capter les radicaux superoxydes (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), l'oxygène singulet, les espèces réactives d'azote (peroxynitrite, nitrogène dioxyde et le radicale nitroxyde) et les radicaux hydroxyles (•OH), grâce à son rôle de donneur d'électrons (potentiel redox élevé) pour donner un radical ascorbyl relativement stable. Elle est dotée également d'une grande capacité de régénération par des réducteurs intracellulaires (glutathion, NAD<sup>+</sup> et NADP<sup>+</sup>) (**Northrop-Clewes et Thurnham, 2007**).

La vitamine C joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (figure 7), en effet la forme radicalaire de la vitamine E (VTE<sup>•</sup>) résulte de l'interaction entre la vitamine

E et un radical lipidique ( $R^\circ$ ). La vitamine C permet de régénérer la vitamine E (VTE) puis, à son tour ce transforme en forme radicalaire (VTC $^\circ$ ).

La régénération de la vitamine C se fait par l'intermédiaire de la forme réduite de glutathion (GSH). L'accumulation de deux radicaux thyles ( $GS^\circ$ ) donne du glutathion oxydé (GSSG) (Bossokpi, 2002).



**Figure 7** : Régénération de la vitamine E par la vitamine C (Bossokpi, 2002).

L'acide ascorbique contribue également au maintien des défenses naturelles de l'organisme, aide à activer la cicatrisation, à la formation des globules rouges et favorise également l'absorption du fer contenu dans les végétaux (Valko *et al.*, 2006).

## 2. La vitamine E

Le terme vitamine E est utilisé généralement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols. Ce sont des composés liposolubles formés d'un noyau polaire et d'une chaîne hydrophobe. La vitamine E a un rôle d'élimination des ERO, et en particulier de l'oxygène singulet  $1O_2$  et du radical peroxy  $OH$ . Elle permet de protéger les structures membranaires et les lipoprotéines du processus d'oxydation grâce à ses fonctions phénols réductrices. En outre, il a été démontré que la vitamine E diminue la susceptibilité des LDL aux phénomènes d'oxydation et joue un rôle dans la protection contre l'athérosclérose. En effet, les lipoprotéines de basse densité oxydées (LDL) ne sont plus reconnues par leurs récepteurs, ils sont alors dégradés par les macrophages. L'accumulation des quantités importantes de cholestérol et de lipides aboutissent à la formation des plaques d'athérome. Les antioxydants, et particulièrement la vitamine E, en piégeant les radicaux  $LOO^\circ$ , réduit l'initiation et le développement de l'oxydation de ces lipides (Jialal *et al.*, 1995).

La vitamine E présente également un effet protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (formation du thrombus), en inhibant l'agrégation et l'adhésion plaquettaire (Steinberg, 1991). Elle a également un effet protecteur contre la cancérogenèse en renforçant

l'inhibition des substances mutagènes, la réparation des membranes et de l'ADN, la réponse aux lymphocytes T...etc.) (Shklar et Schwartz, 1988).

### 3. Les Caroténoïdes

Parmi les photo-protecteurs actifs, les caroténoïdes apparaissent comme des piègeurs efficaces des radicaux libres. Ce sont des pigments naturels jaunes, rouges et orangés retrouvés dans tous les fruits et légumes colorés. Le terme générique de «caroténoïde» regroupe plus de 600 molécules différentes, qui jouent un rôle primordial contre le stress oxydatif grâce à leur longue chaîne carbonée (molécules en C40) polyinsaturée et aux nombreuses doubles liaisons conjuguées (Gardner *et al.*, 2000).

Les caroténoïdes sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les oxocaroténoïdes (xanthophylles), qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence de fonctions hydroxyles (Stahl et Sies, 2003).

- **Les carotènes**, contenant des atomes de carbone et d'hydrogène seulement. Ce sont des précurseurs de la vitamine A, particulièrement présent dans les carottes, les abricots et le melon.
- **Les oxocaroténoïdes** (xanthophylles) qui portent au moins un atome d'oxygène tels que la lutéine, la zéaxanthine, violaxanthine,... etc. Les légumes verts sont de bonnes sources de ces pigments essentiels à la protection oculaire.

Les caroténoïdes sont capables de bloquer les réactions de peroxydations lipidiques. Ils piègent l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) permettant ainsi de réduire le nombre de molécules d'oxygène singulet produites au niveau des membranes thylacoïdales et protégeant de ce fait la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques. Ils possèdent les mêmes fonctions que la vitamine E, mais leurs efficacités est brève car ils ne sont pas régénérés (Lecerf *et al.*, 1994).

### 4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent une famille largement présente dans le règne végétal. Ils sont localisés de façon hétérogène à tous les niveaux de l'organisation végétale. Ces composés se caractérisent par la présence au moins d'un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique

(COOH),...). Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, ils sont impliqués dans la physiologie (lignification, interactions symbiotiques...), dans les mécanismes de défenses (interactions biotiques et abiotiques), ainsi que dans la coloration de la plante (Macheix *et al.*, 2005).

Ces composées se différencient par la complexité du squelette de base, le degré de modifications (méthylation, oxydation, liaisons avec d'autres molécules...etc.), ainsi que leur distribution dans les différentes parties des plantes (tissu et les cellules des feuilles, tiges, fruits). Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes (tableaux VII), allant de composés présentant un simple noyau phénolique à des composés polymériques complexes comme les tanins. En font partie, les flavonoïdes, les tanins, les lignines, les esters et amides hydroxybenzoïques, les stilbènes, les coumarines, les acides hydroxybenzoïques et les xanthonnes (Hopkins, 2003).

**Tableau VII** : Principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

Squelette carboné	Classes	Exemples
C6	Phénols simples	Catéchol
C6 - C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque
C6 - C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, Férulique, Scopolétine, Esculétine
C6 - C4	Naphtoquinones	Juglone
C6 -C1 - C6	Xanthonnes	Mangiferine
C6 -C2 - C6	Stilbènes	Resvératrol
C6 -C3 - C6	Flavonoïdes	Kaempférol, Quercétine, Cyanidine, Catéchine, Epicatéchine, Naringénine, Déidzéine
(C6 - C3)2	Lingnanes	Pinorésinol
(C6 - C3) n	Lignines	
(C6 -C3 - C6) n	Tannins	

Les composés phénoliques possèdent un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques comme antioxydants, anti-mutagéniques, anticancéreux et des activités contre les maladies cardiovasculaires. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres, ainsi qu'à leurs affinités de liaison pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs (Diankov *et al.*, 2011).

#### 4.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se caractérisent par la présence d'une fonction acide et plusieurs fonctions phénoliques (figure 8), ces acides sont rarement présents à l'état libre et ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les acides phénoliques sont divisés en deux classes : les acides hydroxy-benzoïque, dérivés de l'acide benzoïque, (p hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicyclique, gentisique,... etc.) sont généralement présents à très faibles concentrations chez les végétaux comestibles, et les acides hydroxycinnamiques (l'acide p-comarique, chlorogénique, caféique, férulique et l'acide sinapique) représentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) est dérivée de l'acide cinnamique. (Macheix *et al.*, 2005).

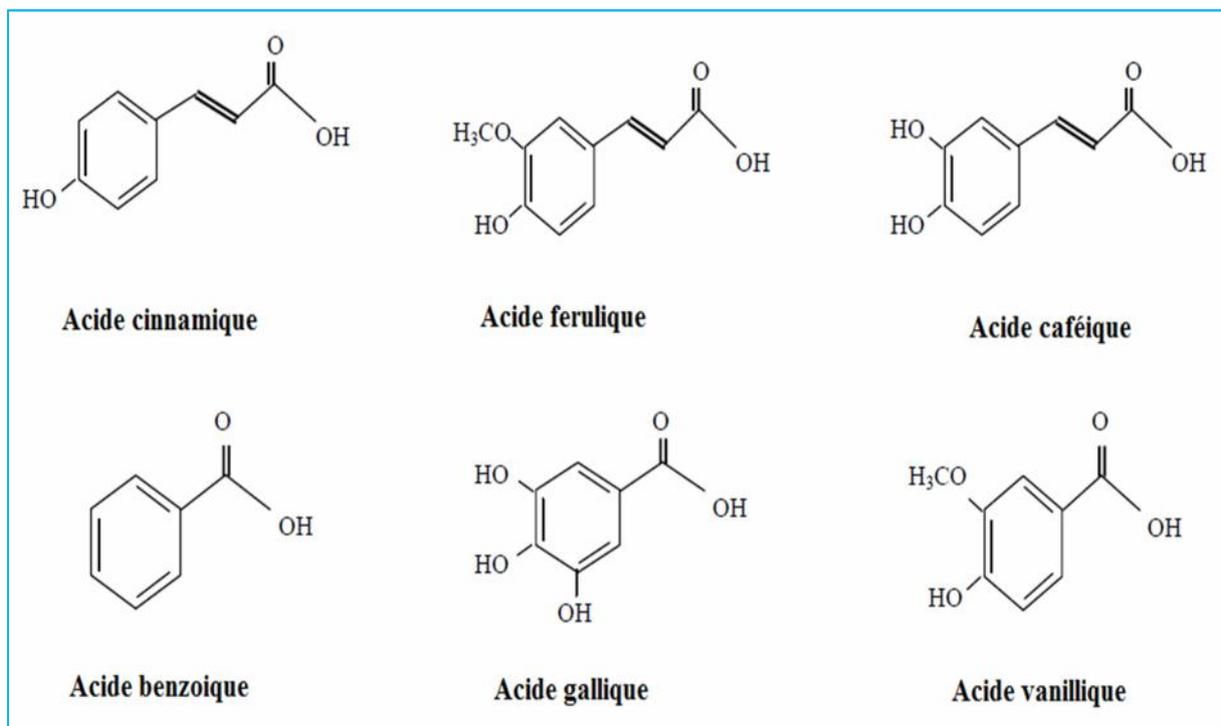
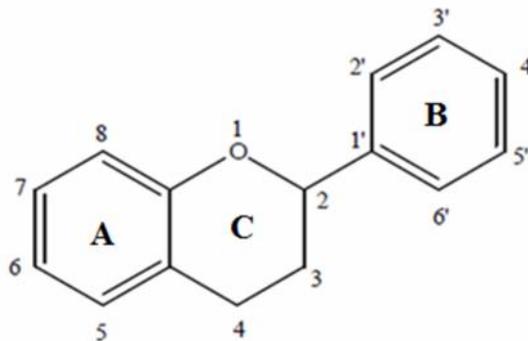


Figure 8 : Structure de quelques acides phénoliques (Wang *et al.*, 2007).

## 4.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une famille large de polyphénols, présents presque à tous les niveaux dans les plantes. D'une structure générale en  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ), ils sont constitués de deux noyaux benzènes A et B, reliés par un noyau pyrène C contenant un oxygène (figure 9). Actuellement, plus de 5000 types de flavonoïdes ont été identifiés chez les plantes. Ils sont divisés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle central : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, anthocyanes, chalcones, aurones et les isoflavonoïdes (**Harborne, 1993**).

A l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base en  $C_{15}$  portent principalement sur le degré d'hydroxylation des différents cycles, le niveau de méthylation (groupement  $O-CH_3$  à la place des seules fonctions phénoliques), ainsi que le niveau de glycosylation (**Macheix *et al.*, 2005**).



**Figure 9** : Structure de base des flavonoïdes (**Macheix *et al.*, 2005**).

Dans les végétaux, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme de dérivés glycosylés. Il en existe deux types : les *O*-glycosides (liés à l'aglycone par une liaison carbone-oxygène) et les *C*-glycosides (liés à l'aglycone par une liaison carbone-carbone). Les sucres les plus courants sont dérivés du glucose et du rhamnose. Les arabinoses, xyloses et les acides glucuroniques sont moins fréquemment rencontrés (**Macheix *et al.*, 2005**).

Les flavonoïdes constituent un groupe d'antioxydants naturels qui présentent un intérêt de plus en plus important grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques, antivirales, antimicrobiennes, anti-tumorales et vasorelaxatrices. En effet, ces métabolites sont capables de réduire les radicaux libres (le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle)

impliqués particulièrement dans la peroxydation lipidique, soit par transfert d'hydrogène ou par la chélation des ions métalliques (Macheix *et al.*, 2005).

### 4.3. Les anthocyanes

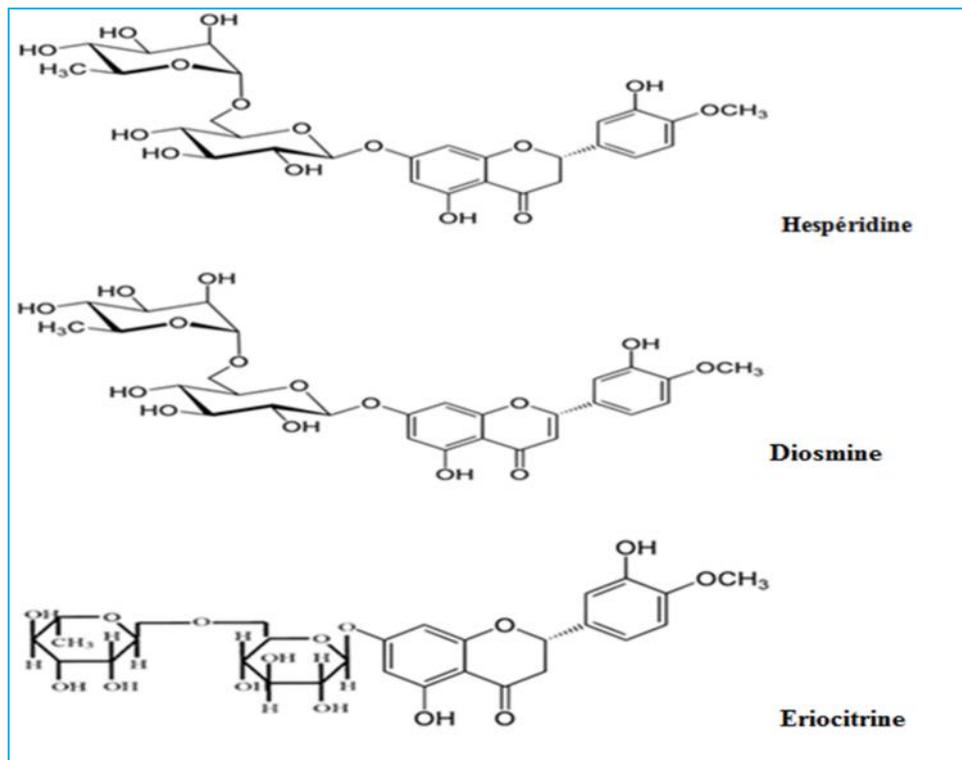
Les anthocyanes font partie de la famille des flavonoïdes, avec une structure de base caractérisée par un noyau flavone généralement glucosylé. Ces pigments constituent les composés de coloration des fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines et graines ; avec des teintes en bleu, rouge, orange, mauve, violette ou rose. Les principaux anthocyanes sont : la pélagonidine, la cyanidine et la delphinidine (Heller et Forkmann, 1993).

### II.4. Les antioxydants des citrus

Les agrumes en général et les citrus en particulier, sont connus pour leurs richesses en substances nutritionnelles et antioxydantes soit au niveau du fruit, zeste, pulpe, jus, fleurs ou encore au niveau des feuilles, tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les vitamines et les pectines. Plus de 170 composés phytochimiques ont été identifiés chez les citrus, et les flavonoïdes représentent une classe très importante (Tripoli *et al.*, 2007). Les citrus sont une source très importante de vitamine C, antioxydant de référence. Selon Gil-Izquierdo *et al.* (2002), 77 à 96 % de l'activité antioxydante globale du jus d'orange est due à la vitamine C. Les citrus sont riches en acides phénoliques avec des teneurs variables d'une espèce à une autre dont l'acides gallique, procatéchique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, salicylique, ainsi que, chlorogénique, caféique, ferulique, sinapique et p-coumarique (Wang *et al.*, 2007).

Les fruits et les feuilles de citrus sont riches en flavonoïdes présents sous la forme glycoside ou aglycone, avec 60 types répartis en cinq classes : flavones, flavanones, flavonols, flavanes et anthocyanines avec une prédominance des flavonones en particulier l'hésperidine (98% des flavonoïdes de pamplemousses, 96% de lime et 90% de citrons sont des flavonones) (González-Molina *et al.*, 2010).

Dans les jus de différentes espèces de citrus, les constituants majoritaires sont l'hésperidine (flavonones), et la diosmine (flavone) (figure 10). La naringine (flavanone) est principalement présente dans le pamplemousse. L'eriocitrin (flavone) (figure 10) quand à elle est très abondante dans le zeste de citron et de lime. Ce flavone possède l'activité antioxydante la plus élevée des flavonoïdes glycosylés (Fuster, 1997).



**Figure 10 :** Structure chimique de quelques flavonones et les flavones des citrus (Del Río *et al.*, 2004).

La distribution de ces flavonoïdes dans les citruses n'est pas uniforme, le zeste par exemple en est plus riche que les graines. Les 7-O-glycosylflavanones (neohesperidoside, naringine, néohespéridine, l'hespéridine, narirutine et le didymine) sont les plus abondants des flavonoïdes dans tous les agrumes. Par contre, les principaux composés des feuilles des citruses sont l'hespéridine, diosmine, l'isorhoifoline, le 6,8-di-C-glucosylapigenine et le 2-O-xylosylvitexin, (Manthey *et al.*, 2000).

De nombreux travaux ont révélé l'intérêt des flavonoïdes des citruses pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine telle que l'activité antivirale, antiallergique, anti-inflammatoire (inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes), antioxydante, antibactérienne, anti-carcinogène, activité protectrice contre les radiations UV, ainsi que des activités contre les maladies cardiovasculaires. Par contre, l'intensité de cette activité dépend du type de flavonoïde utilisé (González-Molina *et al.*, 2010 ; Ortuño *et al.*, 2006 ; Arima *et al.*, 2002).

Les citruses sont riches en huiles essentielles surtout dans l'écorce du fruit « zeste ». L'huile essentielle des feuilles de plusieurs espèces de citruses est dominée par le limonène, le

géraniol, le néral et le phytol, alors que celle du zeste est caractérisée par le limonène et le  $\gamma$ -terpinène. (Venturini, 2012).

En plus des polyphénols et des huiles essentielles, Les agrumes renferment également de nombreux caroténoïdes comme la lutéine, le  $\beta$ -carotène, l' $\alpha$ -carotène, le  $\gamma$ -carotène, la cryptoxanthine et la zéaxanthine (Agocs *et al.*, 2007), ainsi que des anthocyanes tels que les cyanidine-3-glucoside et cyanidine-3-(6''-malonyl)-glucoside (Fattahi *et al.*, 2009).

### III.1. Définition

Le brunissement des denrées alimentaires (fruits, légumes....) consiste en un changement de coloration au cours du vieillissement des aliments frais ou pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation, il résulte des altérations lors de traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (broyage, conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation) ou encore naturels (infections fongiques) (**Vamos-Vigyazo, 1981**).

Chez les végétaux, ces réactions qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, ne sont généralement pas souhaitables, car elles nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles, menant ainsi à des pertes économiques considérables pour de nombreux produits : fruits (pommes, poires, bananes), légumes (pommes de terre, la laitue) et champignons, (**Whitaker et Lee, 1995**). Jusqu' à 50% des fruits et des légumes sont perdus en raison de ce phénomène, (**Marqués et al., 1995**).

Cependant, dans certains cas, comme la fabrication du thé noir ou vert, café et cacao, le brunissement enzymatique est nécessaire au développement de leurs couleurs et saveurs au cours du procédé de fabrication, ce phénomène est aussi responsable de la couleur dorée caractéristique des fruits secs (raisins, prunes, dates et figues) (**Walker, 1976**).

### III.2. Réaction du brunissement non enzymatique

Les réactions du brunissement non enzymatique sont des réactions qui mettent en œuvre une réaction de carbonyle-amination (réaction de Maillard) ou une décomposition par chauffage des sucres réducteurs, tels que les saccharides (réaction de caramélisation). Les réactions du brunissement non enzymatique sont des réactions qui aboutissent principalement à la formation de pigments bruns ou noirs tels que les mëlanoïdines (**Cheriot et al., 2006**).

#### III.2.1. Réaction de Maillard

Cette réaction a une importance énorme dans la chimie des aliments. Elle se produit dans pratiquement tous les aliments et plus spécifiquement dans les aliments qui sont traités thermiquement. Cet ensemble de réactions, appelé encore «brunissement non-enzymatique», conduit à la formation d'une multitude de composés aux propriétés aromatiques, colorantes et

des pigments caractéristiques des aliments cuits. Elle peut aussi donner naissance à des composés cancérigènes et également réduire la valeur nutritionnelle des aliments en dégradant des acides aminés essentiels. (Cheriot *et al.*, 2006).

La réaction de Maillard est l'ensemble des interactions résultant de la réaction initiale entre des sucres réducteurs (glucose, ribose, fructose, xylose,...) et un groupement aminé (protéines, peptides ou acides aminés), cette réaction peut être subdivisée en trois étapes principales (figure 11). La première conduit à la formation réversible de glycosylamines qui se réarrangent selon les réarrangements d'Amadori ou de Heyns. La seconde étape correspond à la dégradation des produits des réarrangements d'Amadori et de Heyns. Elle conduit, notamment, à la formation de composés hétérocycliques responsables des odeurs. La troisième étape correspond à la polymérisation d'intermédiaires réactionnels produits lors de la deuxième étape. Ce brunissement est principalement dépendante de la température, le temps de réaction, la teneur en eau ainsi que la concentration et la nature des précurseurs influencent la réaction de Maillard (Machiels et Istasse, 2002).

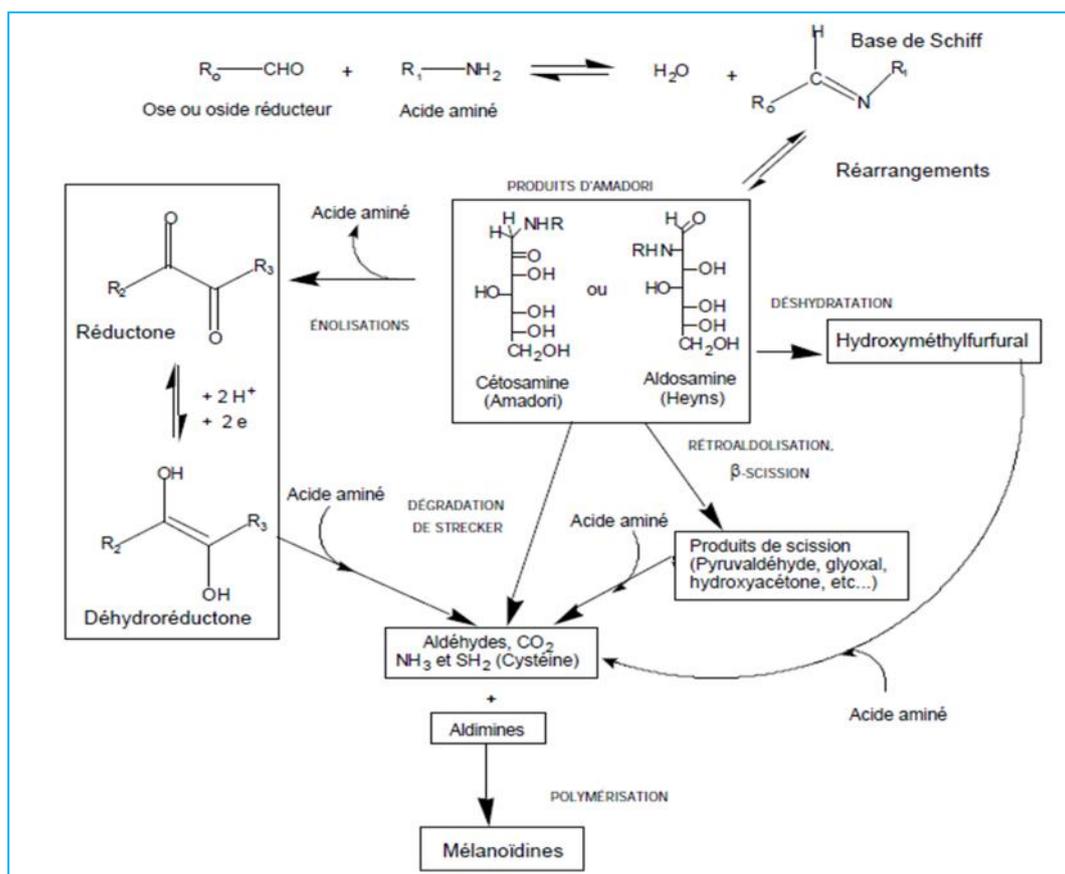


Figure 11 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (Richard *et al.*, 2010).

Selon **Richard *et al.* (2010)**, la réaction de Maillard est subdivisée en trois étapes principales :

1. Etape initiale : c'est des réactions de condensation entre une fonction aldéhyde (ose ou oligoside réducteur) et une fonction amine (acide aminé, peptide, protéine), pour former le produit d'Amadori (cétosamine) et se la dans le cas de l'utilisation des aldoses, ou pour former le produit de Heyns (aldosamine) lorsqu'un cétose est mis en jeu. Ces produits ne sont pas responsables de la couleur ou des arômes, mais réduisent la disponibilité d'acides aminés essentiels dans tous les aliments où la réaction a lieu (**Richard *et al.*, 2010**).
2. Etape de dégradation des produits d'amadori et de Heyns : cette étape est composée de plusieurs réactions, elle dépend du PH et des scissions des aldosamines ou des cétosamines. Cette étape donne lieu à la formation de furfurals comme le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) par déshydratation forte du produit d'Amadori ou de Heyns, ainsi que d'autres petites molécules dicarboxylées telles que la 2,3-butanedione, le méthylglyoxal et le glyoxal. En présence d'acides aminés, elles conduisent à la formation de composés aromatiques mais aussi d'AGE (Advanced Glycation End products) comme la carboxyméthyllysine (**Machiels et Istasse, 2002**).
3. Etape finale : La dernière étape conduit à la formation de polymères bruns : les mélanoidines. Les mélanoidines représentent un mélange hétérogène de composés caractérisés par leur couleur brune et leur haut poids moléculaire allant jusqu'à 100 kDa (**Richard *et al.*, 2010**).

### III.2.2. Réaction de caramélisation

Ce brunissement se développe dans des aliments dont la surface est fortement chauffée. La décomposition des sucres conduit à la formation d'une couleur plus ou moins brune et d'arômes. Ce processus nécessite soit une très forte température ( $T > 120^{\circ}\text{C}$ ), soit des conditions de pH extrêmes ( $\text{pH} < 3$  ou  $\text{pH} > 9$ ). De plus, la réaction de caramélisation est fréquemment catalysée par des acides carboxyliques, des sels et des phosphates (**Kroh, 1994**).

Selon **Greenshields (1973)**, le processus de caramélisation est subdivisé en deux étapes :

- 1) Dans un premier temps, la déshydratation des glucides, entraîne la formation d'aldéhydes et de composés dicarboxylés. Il y a alors apparition de composés non colorés ou jaunes absorbant fortement dans l'ultra-violet ;
- 2) Dans un deuxième temps, des réactions de condensation et de polymérisation se produisent et aboutissent à la formation de composés fortement colorés et de masse molaire élevée.

L'un des principaux produits de dégradation du glucose notamment en milieu acide est le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF). Cependant cette molécule n'est pas spécifique de la caramélisation et peut également être formée par la réaction de Maillard (**Richard *et al.*, 2010**). Les produits de la caramélisation sont retrouvés dans des denrées alimentaires comme le pain, les viennoiseries, la viande grillée, ou les aliments riches en sucres tels que certains jus de fruits et le vin (**Ledl, 1987**).

### III.3. Le brunissement enzymatique

Les réactions du brunissement enzymatique sont constatées chez les végétaux, les micro-organismes, ainsi que chez les invertébrés (crustacés). Ces réactions sont principalement responsables de l'apparition des pigments bruns et entraînent des modifications importantes des qualités organoleptiques, avec généralement une dépréciation des végétaux et de leurs dérivés. Le brunissement enzymatique chez les végétaux peut être superficiel et/ou interne (**Macheix *et al.*, 2005**).

Le brunissement superficiel des végétaux, où la surface touchée se colore plus ou moins rapidement en brun, résulte soit suite à des blessures soit lors d'une attaque par des agents pathogènes. Par contre, le brunissement interne est localisé dans les parties profondes des organes ; il est rencontré généralement lors de maladies qui apparaissent lors de conservation soit lors du séjour à basse température ou après décongélation (**Macheix *et al.*, 2005**).

### III.4. Réactions du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique est le résultat de la transformation par l'intermédiaire d'un système enzymatique spécifique de composés phénoliques en polymères colorés. La réaction d'initiation étant une oxydation des composés phénoliques particulièrement par la

polyphénoloxydase (PPO) et dans certains cas par la peroxydase (POD) (Vamos-Vigyazo, 1981). La réaction d'oxydation conduit à la formation des quinones, composés très instables, dont la polymérisation entraîne la formation de pigments bruns ou sombres ; les mélanines. (figure12). Les produits du brunissement enzymatique, entraînent des changements de couleur et des modifications des qualités sensorielles et nutritionnelles du végétal. La diminution de la teneur en antioxydants phénoliques et en acide ascorbique favorise le processus du brunissement enzymatique (Macheix *et al.*, 2005).

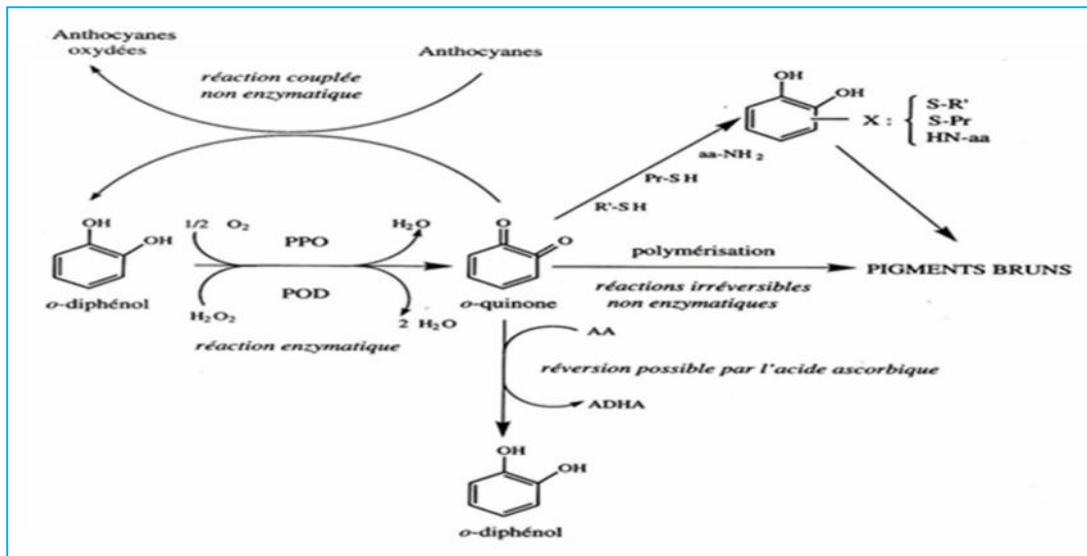


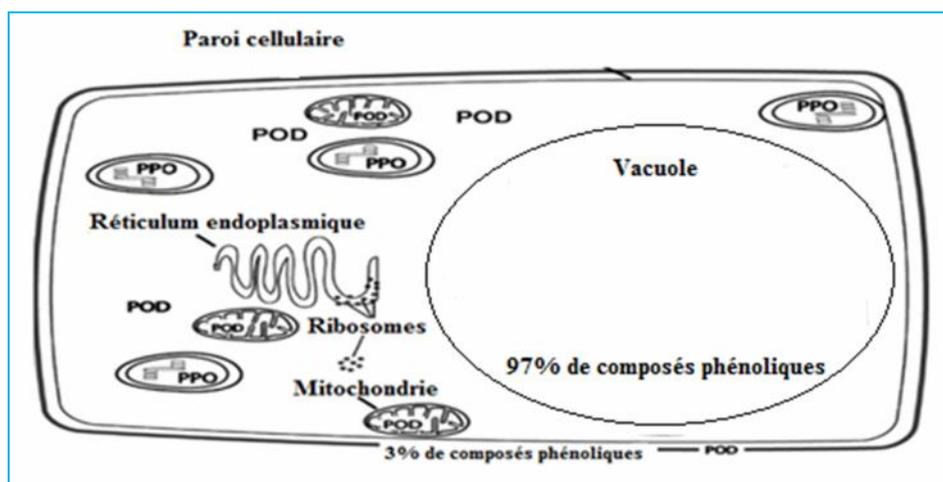
Figure 12 : Réactions enzymatiques du brunissement (Macheix *et al.*, 2005).

### III.5. Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation

Les enzymes de brunissement enzymatique présentent une distribution ubiquitaire et sont localisées dans les différents organes de plantes supérieures : feuilles, fruits, fleurs, racine, tiges et organes de réserves. Leur expression varie selon l'espèce et le degré de maturité (Nicolas *et al.*, 1994 ; Murata *et al.*, 1997). Ainsi, dans la pomme immature, on trouve les activités enzymatiques uniformément réparties dans le fruit alors qu'à maturité ces enzymes sont localisés au niveau de la peau et de la pulpe (Macheix *et al.*, 1990). Bien que l'activité de ces enzymes soit généralement retrouvée dans tous les tissus végétaux, le brunissement enzymatique ne se produit pas sur un végétal sain du fait de l'absence de contact entre les enzymes et leurs substrats. En effet, les substrats du brunissement enzymatique, principalement des composés phénoliques solubles, sont stockés dans les vacuoles, alors que les enzymes sont pour la plupart d'entre elles situées dans les organites cellulaires : mitochondries, chloroplastes et cytoplasme ou dans la paroi (figure 13). Les enzymes du

brunissement se trouvent soit sous forme soluble dans le cytoplasme, c'est le cas des PPO des champignons et des végétaux supérieurs, soit sous forme intégrée aux membranes des organites (membranes interne des chloroplastes, des mitochondries et des peroxyosomes), c'est le cas des PPO de pomme et d'olive. On les retrouve aussi sous forme associée aux parois pectocellulosiques comme par exemple la PPO de bananes ou à la membrane des graines d'amidon comme c'est le cas de la PPO de la pomme de terre (**Toivonen et Brummell, 2008**).

Le déclenchement de la réaction du brunissement enzymatique nécessite donc une décompartmentation cellulaire préalable soit par des facteurs naturels au cours de la maturation, soit suite aux attaques du végétal par les micro-organismes ou à l'intervention humaine au cours des traitements des différents processus technologiques (fabrication, transformation, conservation) mettant les enzymes en contact direct avec leurs substrats provoquant ainsi le déclenchement du phénomène du brunissement (**Macheix et al., 2005**).



**Figure 13 :** Localisation des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation (polyphénoloxydase et peroxydase) dans une cellule végétale (**Toivonen et Brummell, 2008**).

### III.6. Les enzymes du brunissement enzymatique

Les enzymes impliquées dans les réactions du brunissement sont soit des polyphénoloxydases (PPO) dont le substrat oxydant est l'oxygène et/ou des peroxydases (POD) où le substrat oxydant est le peroxyde d'hydrogène. À cause de leur haute affinité pour les substrats naturels, la PPO est considérée comme l'enzyme clé du brunissement. L'ampleur de la participation des peroxydases dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes est demeurée sujet à controverse, car le peroxyde d'hydrogène est généralement présent à des

concentrations très faibles dans les cellules végétales (**Valentines et al., 2005**), et l'activité peroxydasique est rapidement bloquée par les premières quinones formées par les PPO (**Lopez-Serrano et Ros-Barselon, 2002**).

### III.6.1. Caractérisation des peroxydases

#### III.6.1.1. Généralités

Les peroxydases sont largement distribuées dans la nature et peuvent être facilement extraites à partir de la plupart des cellules de plante et à partir de quelques organes et tissus animal. Elles sont parmi les premières enzymes avoir été découvertes. Le nom peroxydase a été employée pour la première fois par **Linossier**, qui l'a isolée à partir du pus humain en 1898. En 1976, **Welinder** a déterminé la première structure primaire complète d'une peroxydase de raifort. Depuis, des peroxydases du cytochrome C (CcP) et du raifort (*Armoracia rusticana*), et notamment l'isoforme basique (HRPC), ont servi de base à l'étude de ces enzymes chez les plantes (**Azevedo et al., 2003**).

#### III.6.1.2. Classification des peroxydases

Les peroxydases (EC. 1.11.1.x) appartiennent au groupe des oxydoréductases utilisant les peroxydes et dont elles sont d'ailleurs les seules représentantes. Elles sont subdivisées en treize groupes. Ce sont des protéines à hème, sauf les NADH et NADPH-peroxydases (EC 1.11.1.1 et 2) qui sont des flavoprotéines et les glutathion-peroxydases (EC 1.11.1.9) qui sont des seleno-protéines. **Welinder (1992)** distingue ainsi trois superfamilles : les peroxydases animales qui comprennent les peroxydases à halogènes, les prostaglandines synthéses, les catalases et les peroxydases végétales. Les peroxydases des plantes sont elles même divisées en 3 classes : la classe I renferme les POD des procaryotes, la classe II renferme les POD fongiques sécrétées et en fin la classe III qui renferme les POD végétales sécrétées (**O'Brien, 2000**).

- ◆ **Peroxydase de classe I** : Elle renferme les peroxydases d'origine procaryotique dont le cytochrome C- peroxydase (CcP) de *Saccharomyces cerevisiae*, les ascorbates peroxydases (AsP) et les catalase-peroxydases (CaP) bactériennes. Ce sont toutes des peroxydases intracellulaires, non glycosylées, sans calcium ni pont disulfure. La CcP est une protéine soluble de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie ou elle doit

servir à la détoxification des peroxydes (Azevedo *et al.*, 2003). Les AsP sont les principales enzymes de détoxification de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des végétaux supérieurs. Elles ont une très grande spécificité et une grande affinité pour l'ascorbate qui leur sert de réducteur dans la destruction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Smirnoff, 2000) ; on les trouve dans le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes et les glyoxysomes (Asada, 1999). Les CaP bactériennes sont des enzymes bifonctionnelles avec, à la fois, une activité catalase importante et une activité peroxydase moindre, mais conséquente. Proches des AsP et de la CcP, elles seraient issues de la duplication d'un gène ancestral (Zamocky *et al.*, 2000). Elles semblent partager les mêmes fonctions, ce qui pourrait également les impliquer en tant que facteurs de virulence de certaines bactéries (Faguy & Doolittle, 2000).

- ◆ **Peroxydase de classe II** : Elle contient les peroxydases secrétées par les champignons. Leur structure ressemble beaucoup à celle des peroxydases de classe III avec la présence de sites de glycosylation, de ponts disulfures, de deux molécules de calcium et d'un peptide signal (Ruiz-Duenas *et al.*, 2001). Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont présentes chez un grand nombre de champignons notamment les basidiomycètes (Varela *et al.*, 2000). Elles sont en général induites dans des conditions de carence nutritive pour le champignon, même s'il existe de nombreuses exceptions (Cullen, 1997). Parmi les peroxydases de la classe II ont cité: les lignine-peroxydases LiP (EC 1.11.1.14), qui oxydent un grand nombre de composés aromatiques non phénoliques dérivés de la lignine (Valli *et al.*, 1990); les peroxydases à manganèse MnP (EC 1.11.1.13), qui oxydent la lignine et les composés phénoliques qui en dérivent via l'oxydation du Mn<sup>2+</sup> en Mn<sup>3+</sup> qui sert d'intermédiaire d'oxydoréduction (Glenn *et al.*, 1986); et les versatiles peroxydases VP (EC 1.11.1.16) (Ruiz-Duenas *et al.*, 2001).
- ◆ **Peroxydase de classe III** : Ces peroxydases sont secrétées dans l'espace extracellulaire ou dans la vacuole. Elles sont en majorité végétales, tels que les peroxydases de navet, tabac, tomate, pomme, d'épinard...etc. (Schuller *et al.*, 1996).

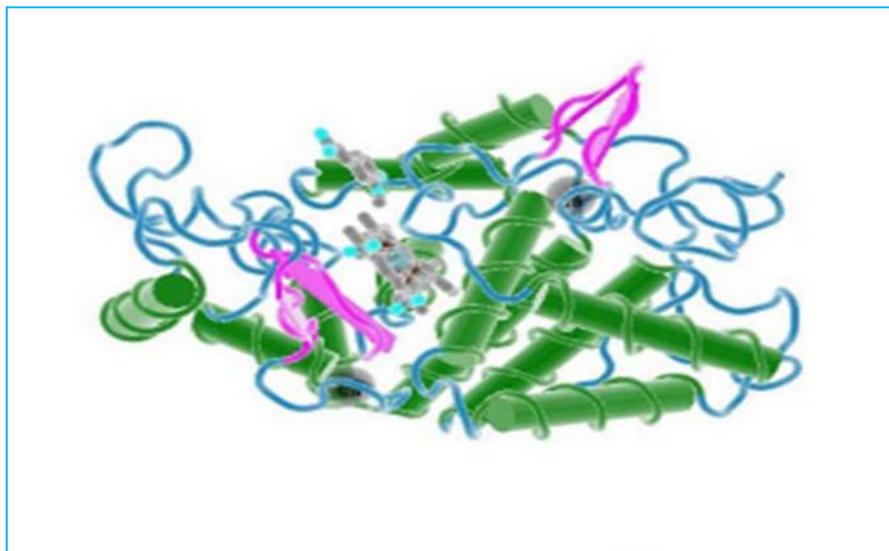
### III.6.1.3. Structure des peroxydases de classe III

Les peroxydases de classe III sont des protéines d'environ 300-330 acides aminés qui présentent une grande variabilité dans leur séquence, tant pour celles appartenant à des espèces différentes que pour des peroxydases de la même plante. On trouve néanmoins des

acides aminés invariants et des domaines conservés au sein de ces protéines (**Delannoy et al., 2004**). Les peroxydases de classe III présentent une structure tertiaire globale similaire contenant dix hélices communes et un hème de type  $\beta$  relie de manière covalente à la protéine par le groupement imidazole d'une histidine (figure 14). On note la présence de quatre ponts disulfures, qui ont pour but de stabiliser la structure tertiaire (**Delannoy et al., 2004**).

Le site actif des peroxydases est centré autour de l'hème qui est une protoporphyrine IX associée à un atome de fer ferrique,  $Fe^{3+}$ . Au repos, cet atome possède quatre liaisons avec des atomes d'azote de la protoporphyrine et une liaison avec le groupement imidazole de l'histidine 170. Le groupement hémique de l'enzyme interagit avec trois acides aminés hautement conservés : arginine 38, phénylalanine 41 et histidine 42. Ces trois résidus servent de site de fixation de l' $H_2O_2$  et interviennent dans la catalyse (**Delannoy et al., 2004**).

Une caractéristique des peroxydases extracellulaires de classe III est l'existence de deux sites de fixation du calcium, un dans chaque domaine, indispensable au bon fonctionnement de la protéine. L'absence des atomes de calcium entraîne de grandes modifications de la structure du site actif et diminue notablement l'activité de ces peroxydases, (**Barber et al., 1995**).



**Figure 14 :** Structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort (**Henriksen et al., 1999**).

Les peroxydases possèdent toutes un peptide signal à leur extrémité N-terminale, conditionnant leur passage dans le réticulum endoplasmique puis leur sécrétion. Néanmoins,

certaines peroxydases possèdent également un peptide clivable à leur extrémité carboxyterminale qui orienterait ces protéines vers la vacuole (**Johansson *et al.*, 1992**). D'autres motifs conservés, sites potentiels de N-glycosylation, existent chez toutes les peroxydases dont le rôle est essentiel au fonctionnement de ces peroxydases (**Nie *et al.*, 2003**).

#### III.6.1.4. Rôles physiologiques et application des peroxydases de classe III

Il est difficile de déduire la fonction précise d'une peroxydase uniquement de par sa séquence en raison de l'existence de plusieurs éléments déterminants liés à la structure du gène, à la spécificité de substrat de l'enzyme et à la localisation subcellulaire de la protéine (**Delannoy *et al.*, 2004**). Néanmoins, ces enzymes sont impliquées directement ou indirectement dans une large gamme de processus physiologiques tous le long du cycle de la plante. De nombreuses études ont associées les peroxydases à la synthèse de subérine et de lignine. En effet, les dernières étapes de la formation de la lignine consistent en la polymérisation des monomères de la lignine, pour former cette structure macromoléculaire rigidifiant la paroi des cellules végétales (**Boudet, 2000**). Elles sont également impliquées dans le catabolisme de l'auxine (AIA) grâce à l'existence d'une relation inverse étroite et qui a été mise en évidence entre une activité peroxydasique et les teneurs AIA des tissus concernés (**Bellani *et al.*, 2002**).

Les peroxydases semblent également impliquées dans le synthétiser l'éthylène, car elles sont capables *in vitro* de synthétiser l'éthylène à partir de son précurseur, l'acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique mais leur rôle *in vivo* reste pour le moment soumis à controverse (**Acosta *et al.*, 1993**). L'activité peroxydase est souvent associée à des processus de développements, notamment celui des racines latérales, la floraison, la germination, l'embryogenèse, l'abscission, etc. Cependant, même si des variations d'activité peuvent constituer des marqueurs de ces processus, il est souvent impossible d'affecter un rôle précis à une isoforme particulière (**Ramu *et al.*, 2002 ; Astarita *et al.*, 2003**).

En cas de stress abiotique (métaux lourds, froid, sécheresse, blessure, chocs thermiques), il est constaté une augmentation de l'activité peroxydasique total de la plante. En effet, tous ces traumatismes s'accompagnent souvent de la production d'espèces activées de l'oxygène (ERO) toxiques pour la plante, et les peroxydases de classe III peuvent participer à la détoxification de ces molécules, car le point commun entre toutes les peroxydases est l'utilisation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Schutzendubel *et al.*, 2002**). D'autres rôles possibles sont attribués à ces

peroxydases comme la réponse aux pathogènes et la dégradation de métabolites secondaires lors des processus de sénescence (**Delannoy *et al.*, 2004**).

Du fait de leur forte activité spécifique, les peroxydases ont trouvé de nombreuses applications industrielles et biotechnologiques. Les peroxydases végétales, et notamment la HRP, se retrouvent dans de très nombreux kits de diagnostic. Elles sont alors liées à un anticorps ou à toute autre molécule spécifique du test pour servir de marqueurs par des réactions colorimétriques ou luminescentes. Elles sont aussi proposées comme un nouveau traitement possible contre le cancer en utilisant la spécificité de l'oxydation de l'AIA par les peroxydases et la génération d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> qui en découle pour cibler et tuer spécifiquement les cellules tumorales (**Kawano, 2003a**). Les peroxydases peuvent également être utilisées en tant que biocatalyseurs de la production de polymères phénoliques et éliminer ainsi l'utilisation de formaldéhyde toxique et polluant (**Delannoy *et al.*, 2004**).

### III.6.1.5. Propriétés cinétiques des peroxydases végétales

L'activité optimale des peroxydases est modulée par plusieurs facteurs physico-chimiques durant toute la vie du végétal. Ainsi, les peroxydases présentent des comportements cinétiques variables en termes de température, de pH et de forces ioniques optimales (tableau VIII). De plus, dans une même plante et au niveau d'un même tissu, plusieurs formes de peroxydases peuvent exister, et atteindre jusqu'à 160 isoenzymes dans certaines plantes comme les céréales (**Pelmont, 1993**).

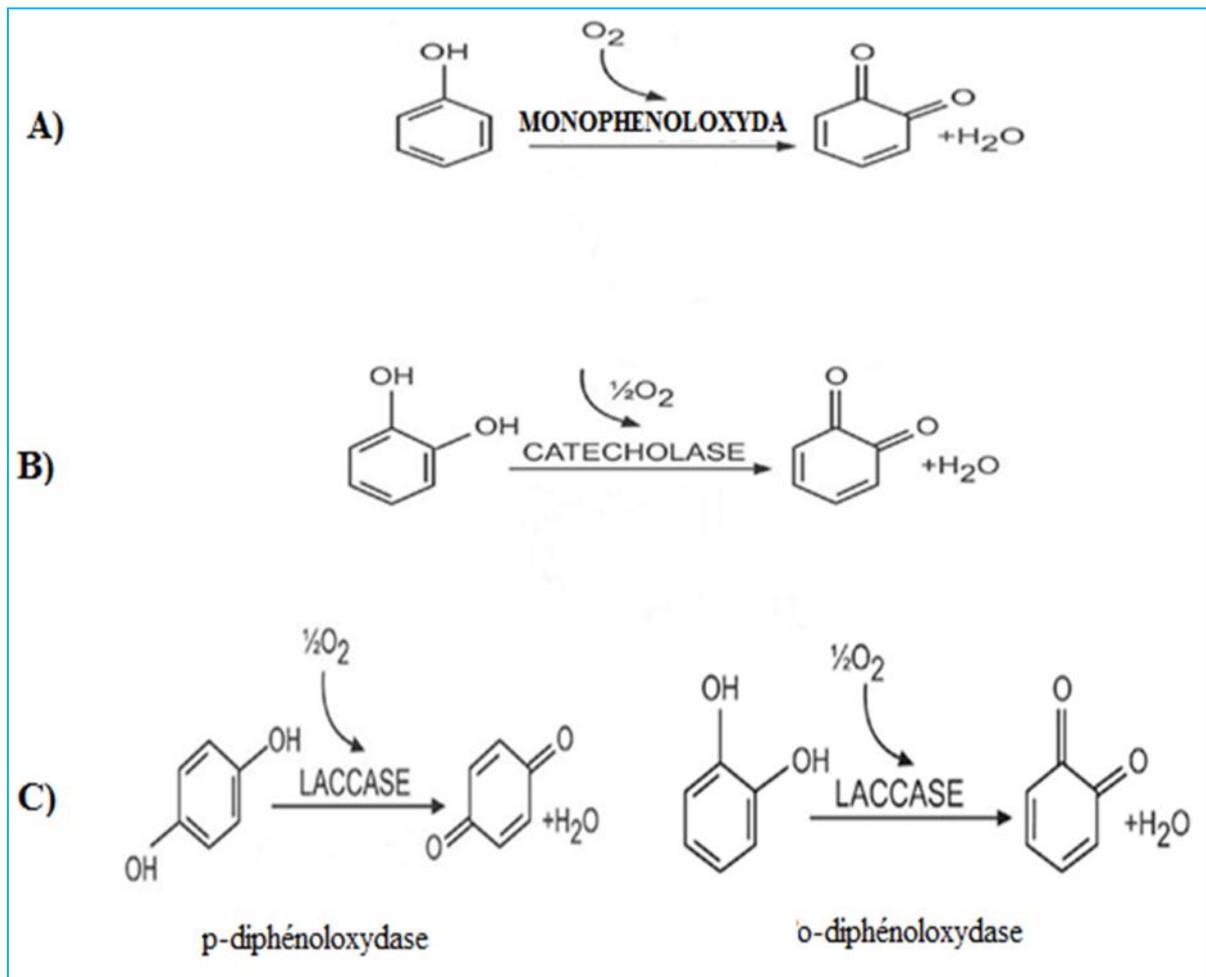
**Tableau VIII** : Activité des peroxydases de différentes origines.

Plantes	pH optimal	T° optimale	Km (mM) pour H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Références
Laitue ( <i>sativa</i> )	6,0-8,5	30 °C	0,33	<b>Altunkaya et Gokmen (2011).</b>
Fraise ( <i>Elsanta</i> )	6,0	25 °C	50,68	<b>Chisari <i>et al.</i> (1998).</b>
Soja	6,4	25°C	0,58	<b>Wright et Nicell (1999).</b>
Chou	6,0	40°C	6,41	<b>Belcarz <i>et al.</i> (2008).</b>
Raifort ( <i>Balady</i> )	5,5	40°C	16,4	<b>Mohamed <i>et al.</i> (2011).</b>
Dattes	5,5	55°C	0,77	<b>Al-Senaidy <i>et al.</i> (2011).</b>
Olive ( <i>Olea europaea</i> )	7,0	34,7°C	41	<b>Saraiva <i>et al.</i> (2007).</b>



### III.6.2.2. Classification des polyphénoloxydases

Les PPO participent à la mélanogénèse chez les mammifères et au brunissement enzymatique des fruits et des légumes. Bien que le terme générique de PPO soit couramment utilisé, il s'agit en réalité d'une vaste famille d'enzymes réunissant les monophénoloxydases (EC 1.14.18.1), les catécholoxydases (EC 1.10.3.1) et les laccases (EC 1.10.3.2). Elles ont toutes la particularité d'utiliser l'oxygène moléculaire comme cofacteur (**Selinheimo et al., 2007**). Les activités catécholases et laccases sont similaires dans le sens où elles catalysent l'oxydation d'un diphenol, cependant la différence majeure réside dans la spécificité de substrat, puisque les catécholases ne sont capables d'oxyder que des *o*-diphénols et les laccases, à la fois des *p*-diphénols et des *o*-diphénols, alors que les monophénolases catalysent uniquement l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (figure 16) (**Mayer, 2006**).



**Figure 16** : Réaction catalysée par les polyphénoloxydases (A : monophénoloxydase ; B : catécholase ; C : laccase) (**Aniszewnicki et al., 2008**).

### I. Monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Selon la nature des substrats on trouve la tyrosinase, dont le substrat monophénolique est la L-tyrosine, et la crésolase dont le substrat est le crésol. Ces enzymes sont connues depuis longtemps dans les champignons, pomme de terre, pêche, raisin, pomme, l'avocat ou la salade, mais l'activité des crésolases est généralement peu étudiée dans les plantes, car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones (Nicolas *et al.*, 1994).

### II. Catécholoxydases (EC 1.10.3.1)

Egalement connue sous le nom d'ortho-diphénolase ou catécholase. Les catécholases se caractérisent par deux réactions, en premier temps, une hydroxylation d'un monophénol en diphénol (activité monophénolase), suivie en deuxième temps par l'oxyder du diphénol en quinone (activité diphénolase), en présence d'oxygène moléculaire. Les catécholases jouent un rôle prédominant dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes, car la plupart des substrats naturels étant des o-diphénols. (Nicolas *et al.*, 1994).

### III. Laccase (EC 1.10.3.2)

Les laccases sont présentes chez les bactéries, champignons, plantes et insectes (Hoegger *et al.*, 2005). C'est des métalloprotéines de 50 à 110 kDa comportant quatre atomes de cuivre, chacun coordonné par trois résidus histidine (Thurston, 1994). Elles sont des protéines glycosylées avec 10 à 45 % de proportion de polysaccharide, avec des sous unités de 50 à 70 kDa. Les laccases se caractérisent par leurs activités para-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité ortho-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques, par cette enzyme, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau (Nitta *et al.*, 2002).

#### III.6.2.3. Structure des polyphénoloxydases

Les études réalisées sur les PPO des plantes montrent que ces enzymes présentent des poids moléculaires variables compris entre 12 et 400 kDa. Cette variabilité de PM est due en partie à la protéolyse partielle de l'enzyme pendant son isolement et aux variabilités génétiques (Flurkey et Inlow, 2008). Elle s'explique aussi par le degré de polymérisation de ces enzymes. En effet, les PPO peuvent être sous forme monomérique, comme c'est le cas de

la PPO des graines de tournesol (40 à 50 kDa), ou sous forme tétramériques comme c'est le cas de la PPO de la laitue (130 à 150 kDa) (**Heimdal *et al.*, 1994**).

La mise en œuvre des techniques de biologie moléculaire associées à des analyses cristallographiques a permis de préciser les informations sur la structure des PPO. Plusieurs études ont montrées que le nombre d'acides aminés des formes monomériques des PPO matures est variable. Ainsi, la PPO de l'haricot, abricot, champignon et pomme sont constituées de 360, 496, 569, et 593 résidus d'acides aminés respectivement.

Les PPO des végétaux supérieurs sont organisés en trois domaines, alors que chez les champignons, il n'en existe que deux. Ces domaines structuraux présentent un degré d'homologie plus ou moins élevé entre espèces (**Eicken *et al.*, 1998**).

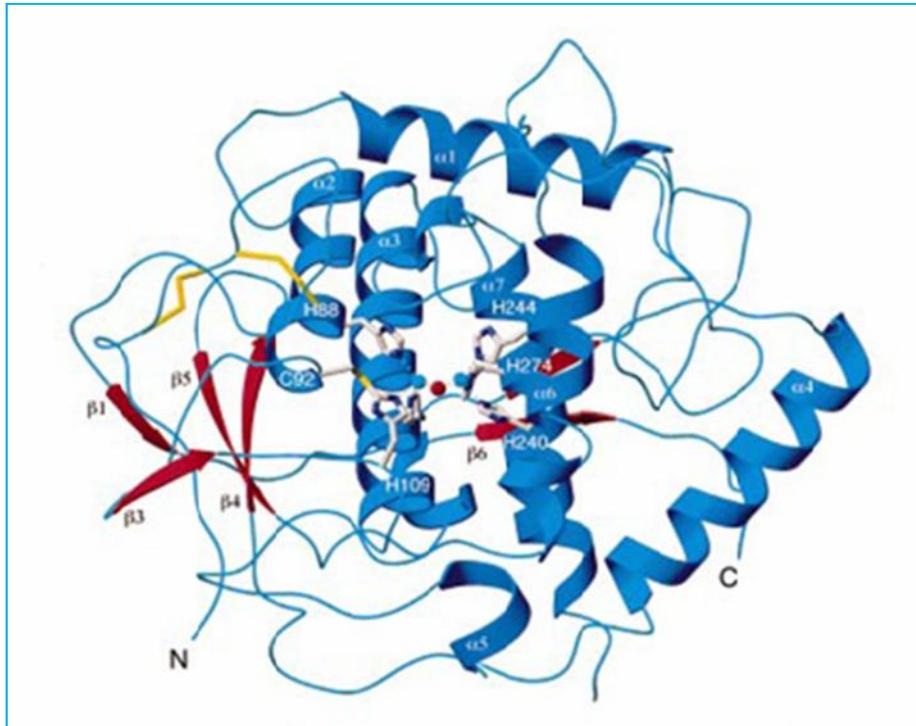
**i-** Le premier domaine correspond à un peptide de transit de 87 à 247 acides aminés selon les espèces, il se trouve dans la région N-terminale des PPO de végétaux supérieurs. Ce peptide, permettrait de diriger la PPO immature vers les thylacoïdes ;

**ii-** Le domaine central des PPO contient les deux sites de fixation des atomes de cuivre, et correspond aux PPO matures. Il est séparé du peptide signal par une séquence de clivage reconnue par certaines protéases végétales ;

**iii-** Le domaine C-terminal est séparé du domaine central par un site de clivage sensible à la protéolyse. Ce domaine n'est présent que dans les formes latentes de PPO de haricot, de raisin, de tyrosinase de champignons et vraisemblablement chez la pomme.

Dans le cas de la PPO mature de tubercule de patate douce, l'étude par cristallographie et diffraction aux rayons X a permis d'ullicider la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Figure 17). Elle se présente sous forme hélicoïdale avec des dimensions de 55x45x45 Å<sup>3</sup> (figure). Cette PPO de 341 acides aminés présente une forme globulaire de masse moléculaire de 39 kDa. La structure secondaire est principalement formée de sept hélices, le noyau de l'enzyme est constitué par quatre hélice-tour-hélice composé par les hélices 2, 3, 6 et 7. La cavité dans laquelle se trouve le site actif est entouré par les hélices 1 et 4 et plusieurs feuillets  $\beta$ . La structure est stabilisée par deux ponts disulfures (Cys 11 –Cys 28 et Cys 27 –Cys 89) qui aide à stabiliser la structure de cette PPO. L'enzyme contient deux atomes de cuivre, chacun est lié par des liaisons covalentes à trois résidus histidines des quatre hélice-tour-hélice. CuA est coordonné par His 88, His 109, et His 118. His 88 est située

au milieu de l'hélice 2, His 109 et His 118 sont localisées au début et au milieu de l'hélice 3. Le second cuivre du site catalytique, CuB, est coordonné par His 240, His 244 et His 274. Ces résidus sont trouvés au milieu des hélices 6 et 7 (**Klabunde *et al.* 1998**).



**Figure 17** : Représentation en ruban de catécholoxydase de la patate douce obtenue par cristallographie aux rayons X (**Klabunde *et al.*, 1998**).

#### III.6.2.4. Rôle physiologique des polyphénoloxydases

Les rôles physiologiques et les mécanismes biologiques des PPO ont été étudiés chez les champignons, les plantes et les insectes, mais ils ne sont pas connus en détail, par contre, de nombreuses hypothèses, concernant le rôle des PPO, sont proposées (**Mayer, 2006**). Il a été démontré que les PPO des champignons présentent au moins deux fonctions différentes : la première consiste à se défendre contre les pathogènes, et la seconde fonction est d'agir en tant que facteur pathogène lors d'une attaque par les champignons sur d'autres organismes, y compris les plantes (**Aniszewnicki *et al.*, 2008**). D'autres auteurs ont montré que les laccases fongiques interviennent directement dans la dégradation de la lignine ainsi que dans la pigmentation (**Anderson et Nicholson, 1996 ; Fernandez *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 1999**).

De nombreux chercheurs ont proposé l'hypothèse concernant le rôle physiologique des PPO dans la résistance aux infections bactériennes, fongiques et virales (**Jukanti, 2005 ;**

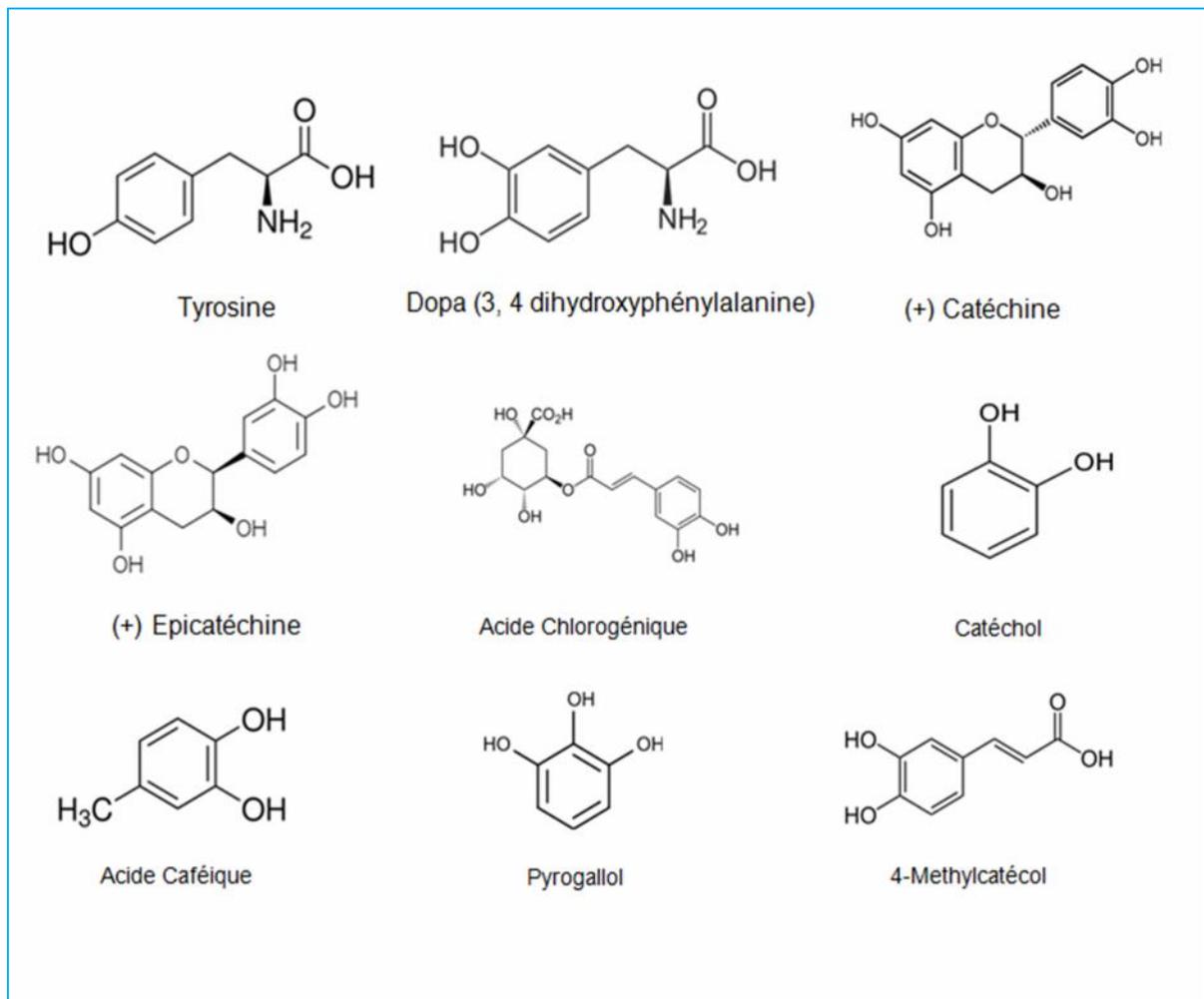
**Thipyapong et al., 2007**). Il a été également suggéré que les quinones, produits de l'oxydation des o-diphénols par les PPO, jouent un rôle dans la défense de la plante contre divers stress biotiques et abiotiques (**Pourcel et al., 2007**). Alors que, **Zawistowski et al. (1991)** attribuent à la PPO un rôle dans le renforcement des parois.

Des travaux sur la PPO d'épinard ont démontré que la PPO avait un rôle dans la facilitation de la mort cellulaire et que les formes actives interviennent directement dans la photosynthèse II (**Kuwabara et Kato, 1999**). Les PPO sont également des composés actifs au cours de la germination des graines. Cette activité est plus grande dans les grandes graines que les petites, et l'activité de PPO au début de la germination est plus élevée que dans les étapes qui suivent (**Demeke et al., 2001**).

### III.6.2.5. Propriétés cinétiques des polyphénoloxydases

Chaque PPO se distingue par sa spécificité de substrat et éventuellement son rôle physiologique. Cette spécificité de substrat est liée à la nature de l'enzyme, l'espèce végétale et à la chimie du substrat (**Schmitz et al., 2008**). La nature et la position des substituants sur les mono ou les o-diphénols sont déterminants pour la réactivité du substrat vis-à-vis de l'enzyme (**Zawistowski et al., 1991**). Le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le 4-tertbutylcatechol, L-DOPA (L-3,4 dihydroxyphénylalanine), (-)-épicatéchine, (+)-catéchine, l'acide chlorogénique et la dopamine sont largement testés comme substrats pour OPP (figure 18). Cependant, la présence in vivo de ces substrats testés n'a toujours pas été démontrée et la pertinence de leur rôle physiologique demeure incertaine. Pour les catécholases, les substrats les plus communs dans de nombreuses plantes sont le catéchol et ses dérivés, catéchine et le 4-méthylcatéchol (**Rapeanu et al., 2006 ; Gawlik-Dziki et al., 2008**).

La nature et la teneur des fruits et légumes en phénols substrats des PPO varient également selon l'espèce, variété, le cultivar, la maturité et les conditions de culture et de stockage (**Pourcel et al., 2005**).



**Figure 18** : Structures de quelques substrats des polyphénoloxydases (Schmitz *et al.*, 2008).

La spécificité des PPO vis-à-vis des substrats phénoliques dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales. Cette spécificité est évaluée selon la valeur de  $K_m$  qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse  $V_m$ . L'affinité varie également selon la source enzymatique (tableau IX). Ainsi, les valeurs de  $K_m$  obtenues (lorsque les cinétiques sont réalisées à concentration constante en oxygène) lors de l'utilisation de 4-méthylcatéchol comme substrat varient de 9,7 à 21 mM selon qu'il s'agit de PPO de persil (Dogru et Erat, 2012), d'haricot (Waliszewski *et al.*, 2009), d'artichaut (Aydemir, 2006) ou de brocoli (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008). Par contre, les valeurs de  $K_m$  apparent vis-à-vis du catéchol oscillent-elles de 7,9 à 85 mM selon l'origine des PPO. Cependant, la diminution de la valeur de  $K_m$  s'accompagne dans ces deux cas d'une forte baisse de la valeur de  $V_m$ .

**Tableau IX** : Paramètres cinétiques de polyphénoloxydase de différentes origines végétales.

Source des PPO	Substrats	Km (mM)	Vmax (U/ml min)	Références
<b>Artichaut</b> (têtes) ( <i>Cynara scolymus</i> )	Catéchol	10,2	19,662	<b>Aydemir (2004)</b>
	4-méthylcatéchol	12,4	12,5	
<b>Pomme</b>	catéchol	69	34,5	<b>Wuyts et al. (2006)</b>
	L-DOPA	5,3	62,4	
<b>Haricot</b>	4-méthylcatéchol	10,6	/	<b>Waliszewski et al. (2009)</b>
	catéchol	85	/	
<b>Brocoli</b> ( <i>Brassica oleracea</i> )	catéchol	12,34	20,00	<b>Gawlik-Dziki et al. (2007)</b>
	4-méthylcatéchol	21	28,2	
<b>Persil</b>	Catéchol	7,9	0,3942	<b>Do ru et Erat (2012)</b>
	4-méthylcatéchol	9,7	0,051	
<b>Laitue</b> ( <i>Lactuca sativa</i> )	Catéchol	15	75,18	<b>Altunkaya et Gokmen (2011)</b>
	Catéchine	22,90	11,94	
<b>Fraise</b> (Elsanta)	DOPA	4,78	0,02	<b>Chisari et al. (1998)</b>

D'autres facteurs influencent également la spécificité des PPO de manière non négligeable tel que le pH et la température des milieux réactionnels (tableau X). Plusieurs études ont indiqué que l'activité optimale des PPO se situe généralement dans une gamme de pH comprise entre 4 et 7. Ainsi, le pH optimal de la PPO de la laitue est de 6,8 lorsque le 4-méthylcatéchol est employé et de 5,5 lors de l'utilisation de catéchol **Gawlik-Dziki et al., 2008**). Alors que l'activité maximale de la PPO de pomme est obtenue à pH 3,5 à 4,5 (**Marques et al., 1995**) et cela de l'artichaut varie entre 6 et 7 (**Aydemir, 2004**).

Les températures des milieux réactionnels pour les quelles l'activité des PPO est optimale varie également selon la source de l'enzyme, elle se situe généralement entre 25 et 35 °C, cependant il existe des PPO qui présentent des activités optimales à des températures plus élevées comme c'est le cas de la PPO de pêche et de la fraise (50 et 55°C respectivement) (**Fraignier et al., 1995 ; Chisari et al., 1998**).

**Tableau X** : pH et température optimale pour l'activité de quelques polyphénoloxydases.

Source des PPO	Substrats	PH	T°	Références
<b>Pomme</b>	4-Methylcatéchol	3,5 - 4,5	30 °C	<b>Marques <i>et al.</i> (1995)</b>
<b>Pêche</b>	4-Methylcatéchol	5,0	55 °C	<b>Fraignier <i>et al.</i> (1995)</b>
<b>Fraise</b> (Elsanta)	Dopa	4,0	50 °C	<b>Chisari <i>et al.</i> (1998)</b>
<b>Banane</b> (Anamur)	Catéchol	7,0	30 °C	<b>Ünal (2007)</b>
<b>Haricot</b>	Catéchol	3,4	37 °C	<b>Waliszewski <i>et al.</i> (2009)</b>
<b>Artichaut (têtes)</b> ( <i>Cynara scolymus</i> )	4-Methylcatéchol	6,0 - 7,0	25 °C	<b>Aydemir (2004)</b>
<b>Laitue</b> ( <i>Lactuca sativa</i> )	4-Methylcatéchol Catéchol	6,8 5,5	35 °C	<b>Gawlik-Dziki <i>et al.</i> (2008)</b>

### III.7. Prévention et inhibition du brunissement enzymatique

La prévention du brunissement enzymatique a toujours été un défi aux scientifiques. Avec une meilleure connaissance du mécanisme des réactions du brunissement, il sera possible de proposer des processus qui évitent ou réduisent au minimum ce phénomène (Nicolas *et al.*, 1994).

De nombreux travaux ont été consacrés à la recherche d'inhibiteurs du brunissement enzymatique et plusieurs techniques et mécanismes ont été développés afin de maintenir la qualité, prolonger la durée de conservation de produit végétale et commander l'activité de ces enzymes. Ces mécanismes agissent sur un ou plusieurs facteurs de la réaction tels que :

- L'élimination de l'oxygène à la surface des fruits et légumes ;
- Inhibition des enzymes de la réaction ;
- Modification des substrats et/ou les produits du brunissement enzymatique ;
- L'abaissement de pH est très efficace pour l'inactivation des peroxydases végétales ;
- Utilisation des agents chélateurs de métaux.

Les techniques qui sont utilisées pour commander le brunissement enzymatique doivent prendre en considération le coût de traitement, l'impact organoleptique et le souci de toxicité (McEvily *et al.*, 1992).

### III.7.1. Méthodes physiques

Il s'agira des techniques physiques qui permettent d'inhiber les réactions du brunissement enzymatique. Elles ont pour objectif l'inactivation des enzymes de brunissement, parmi ces techniques on peut citer: le traitement hydrostatique par pression élevée, l'irradiation gamma, champ électrique pulsé et le traitement thermique (soit par blanchiment ou congélation) qui est la méthode la plus répandue pour stabiliser les fruits et légumes en raison de sa capacité pour détruire des micro-organismes et pour inactiver des enzymes.

Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus appliquées pour contrôler du brunissement enzymatique, cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais (Martinez et Whitaker, 1995). Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inhiber. En général, une exposition des enzymes du brunissement à des températures de l'ordre de 70-90 °C entraîne la destruction de leur activité catalytique, mais le temps requis à l'inactivation dépend du végétal. En contrepartie, cette technique peut être désavantageuse car elle a comme conséquences des changements de saveur, texture, couleur et des pertes en vitamines et d'autres composants (Marshall *et al.*, 2006).

La congélation consiste à conserver des fruits et légumes à basse température (des températures inférieures à -18 °C). L'abaissement de la température a pour effet de ralentir l'activité métabolique des tissus végétaux du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide ce qui provoque une inactivation des enzymes. Cependant, à ces températures là, il y a la formation des cristaux d'eau qui provoquent des dommages au niveau des structures cellulaires des organes des végétaux, ce qui met en contact les enzymes et leur substrats, et le brunissement débute encore une fois quand la température est voisine 0°C (Nicolas *et al.*, 1994).

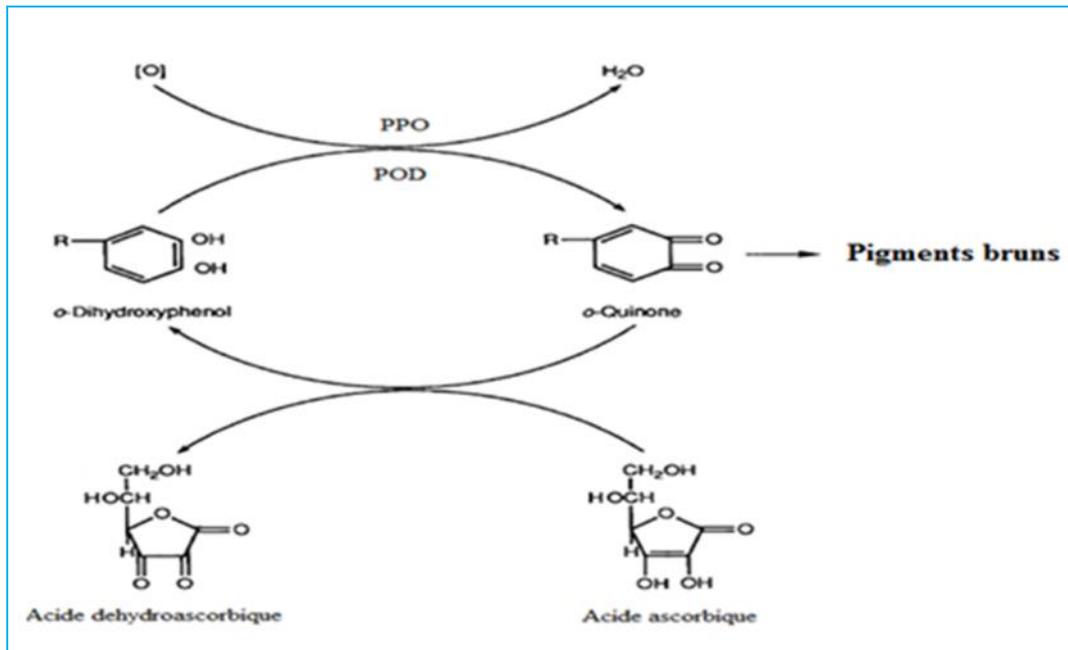
### III.7.2. Méthodes chimiques

Le traitement chimique est le plus généralement utilisé pour empêcher le brunissement enzymatique ; cependant, l'utilisation de ces composés chimiques dans les produits alimentaires est limitée aux composés qui sont non-toxiques et qui ne changeant ni le goût ni la saveur des produits alimentaires. Ainsi plusieurs études ont permis de découvrir de nouveaux composés ayant un effet anti-brunissement. Ces inhibiteurs chimiques peuvent affecter l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction (**McEvily et al., 1992**). Les substances les plus utilisées sont les sulfites et l'acide ascorbique.

Les sulfites, en particulier sulfite de sodium, bisulfite de sodium et métabisulfite de sodium, constituent le moyen le plus efficace et le moins cher pour lutter contre le brunissement enzymatique (**Eskin, 1990**). Ils agissent comme des agents réducteurs en empêchant la formation des mélanines, car les sulfites se combinent avec les quinones pour former des sulfoquions, comme ils peuvent induire l'inactivation des enzymes du brunissement en provoquant la réduction de leurs ponts disulfures (**Martinez et Whitaker, 1995**). Cependant, bien que ces additifs soient efficaces, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a recommandé la limitation de leurs utilisation, autant que possible dans le traitement des produits alimentaires, selon l'OMS la dose journalière autorisée de  $\text{SO}_2$  est de 0,7 mg/kg du poids corporel (**Rapeanu et al., 2005**).

L'Acide Ascorbique (AA), est l'agent réducteur le plus connu alternatif aux sulfites. IL est généralement employé comme un agent anti-brunissement dans la fabrication des jus de fruit, fruites et légumes en boîte et des tranches de fruits coupés congelés. L'acide ascorbique (Vitamine C) empêche la formation des pigments bruns en réduisant les quinones en phénols initiaux (figure 19), il agit également comme un piègeur d'oxygène libre. Il est capable en outre de chélater le cuivre du site actif de la PPO. Cependant, le brunissement reprend juste après l'épuisement de l'acide ascorbique (**Ashie et al., 1996**).

La vitamine C est en général employée avec d'autres inhibiteurs pour une meilleur prévention du brunissement, une combinaison d'acide ascorbique avec l'acide citrique est plus efficace que l'acide ascorbique seul (**Eskin et al., 1990**).



**Figure 19 :** Réduction des quinones par l'acide ascorbique (Walker, 1976).

Il existe d'autres substances chimiques qui peuvent se substituer aux sulfites. Parmi ces inhibiteurs chimiques se trouvent le polyvinylpyrrolidone (PVPP), le charbon actif, la bentonite, les cyclodextrines, les chitosans, les composés chélateurs de métaux qui réagissent, ou certains acides, organiques ou non tels que l'acide malique, tartrique, malonique, phosphorique ou chlorhydrique qui peuvent également être employés à différents niveaux de la réaction. Cependant, leur prix et leur effet sur la qualité gustative des aliments représentent leurs principaux inconvénients (López-Nicolás *et al.*, 2007).

Par ailleurs, malgré la multitude des traitements chimiques et physiques agissant contre le brunissement enzymatique et l'innocuité remise en question des sulfites, aucun substitut efficace, peu cher, pratique et sans effet néfaste sur les propriétés organoleptiques des produits alimentaires n'a pu servir d'alternative à ce produit, d'autre côté, la demande actuelle des consommateurs se tourne de plus en plus vers une alimentation naturelle dépourvue d'additifs synthétiques. Ce qui a poussé les chercheurs à découvrir de nouveaux inhibiteurs d'origine naturelle provenant de plantes médicinales les plus variées, tels que l'acide gallique et ses dérivés alkylés extraits de plantes médicinales africaines (Kubo *et al.*, 2000), la barbarine, extraite de *Barbarea orthoceras* (Seo *et al.*, 1999), ou encore le miel qui est utilisé comme un inhibiteur non compétitif de la PPO, grâce à sa richesse en antioxydants (Chen *et al.*, 2000).

## I.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur l'étude des propriétés antioxydantes et anti-enzymatiques des feuilles de six espèces de genre *Citrus*. Le tableau XI résume l'ensemble des espèces utilisées. Les feuilles de six espèces de citrus faisons l'objet de cette étude ont été récolté à partir d'arbres cultivés dans différentes régions de la wilaya de Béjaia. Ainsi que les feuilles de *C. sinensis* (vr *Thomson navel et hamlin*), *C. clementina* (clémentinier), *C. aurantium* (bigaradier) et *C. limon* (citronnier), ont été cueillies à partir d'arbres cultivés au niveaux de Institut National de Recherche en Agroalimentaire (INRAA) situé dans la région de Oued Ghir, wilaya de Béjaïa (latitude : 36°42'20.25"N ; longitude 4°57'32.69" E ; altitude 89 m). La cueillette à été réalisée de manière aléatoire en janvier 2013. Les feuilles de l'espèce *C. grandis osbeck* (pamplemoussier) et *C. aurantiifolia* (limettier) ont été cueilles dans les vergés de la région de Guendouza commune d'Akbou (75 km à l'ouest de la wilaya, à une altitude de 315 mètres) et Azrou N'bechar commune d'Amizour (50 km de la ville de Béjaïa) respectivement.

## I.2. Extractions organique et aqueuse

### I.2.1. Préparation de la poudre végétale

Une fois récoltées, les feuilles des différentes espèces de citrus à étudier ( tableau XI) ont été nettoyées à l'eau courant et débarrassées de poussières et d'autres impuretés, puis mis à sécher à l'ombre, à température ambiante et sous aération continue pendant sept jours puis transférées à l'étuve à 40°C, jusqu'à stabilisation du poids. Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un moulin à café jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène puis tamisés à l'aide d'un tamiseur de marque «**RETSCH**», en utilisant un tamisage successif à 1mm, 500 µm, 250 µm et 200 µm de diamètre. La taille des particules de l'échantillon influence grandement le rendement d'extraction ; une meilleure extraction est obtenue avec des particules de plus petit calibre dont la surface de contact avec le solvant et beaucoup plus importante (**Naczki et Shahidi, 2004**).

La poudre fine homogène obtenue a été conservée dans des récipients en verre hermétiquement fermés, étiquetés et stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à utilisation.

Tableau XI : Feuilles des espèces de citrus utilisé.

Nom commun	Nom scientifique	Caractéristiques des feuilles		Photos des feuilles
Oranger douce	<i>Citrus sinensis L. cv. Thomson Navel</i>	Les feuilles persistantes, épaisses et lancéolées, à pétiole étroitement ailé avec une couleur verte sombre est une excroissance à leur base.	Les feuilles de la variété <i>Hamlin</i> se caractérisent par une largeur de 6cm et une longueur de 14cm.	
	<i>Citrus sinensis L. cv. hamlin</i>		Les feuilles de <i>Thomson navel</i> sont un peu moins grandes (5 à 5,5 cm de largeur et 12 à 13 cm de longueur).	
Clémentinier	<i>Citrus clementina</i>	Feuilles allongées et pointues de 3 à 4 cm de largeur et de 9 à 10cm de longueur, d'une couleur verte foncé, luisant et lancéolées.		
Citronnier	<i>Citrus limon</i>	Feuilles persistantes, large, ovales et parfumés, de couleur pourpre avec un pétiole légèrement ailé, de taille très variables avec 17 à 18cm de longueur et 7cm de largeur.		
Limettier	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Petites feuilles, elliptiques, de forme un peu arrondies, de couleur verte vif très odorante et très rapprochées, elles sont de 4 à 5cm de large et de 11 à 12cm de longueur.		
Pamplemoussier	<i>Citrus grandis osbeck</i>	Feuilles persistantes, grandes et larges, 15 cm de large et 23 cm de long, ovales, à pétiole très largement ailé et pubescent.		
Bigaradier (orange amère)	<i>Citrus aurantium</i>	Feuilles persistantes, ovales, plus étroitement lancéolées et pointues à pétiole nettement ailé d'1cm (plat et large), avec une largeur de 5 à 6cm et une longueur de 13 à 14 cm.		

### I.2.2. Préparation des extraits de feuilles

La méthode d'extraction utilisée est la macération. Elle consiste en une extraction solide-liquide, la poudre végétal est mise en contact prolongé avec un solvant à température ambiante est sous agitation pour extraire les principes actifs.

#### ➤ Extraction méthanolique

L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par **Falleh *et al.* (2008)**. Une quantité de 20g de poudre de feuilles a été macérée dans 200 ml de méthanol à 99% (un rapport de P/V : 1/10) sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. La macération a été poursuivie sans agitation durant 24 heures à 4°C. Le macérât a été filtré sur papier Wattman N°3 et le filtrat obtenu a été évaporé à sec dans l'étuve à 40°C est cela jusqu'à évaporation complète du méthanol. L'extrait méthanolique récupéré a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière.

#### ➤ Extraction aqueuse

L'extraction aqueuse a été réalisée selon la méthode décrite par **Pérez *et al.* (2010)**. Une quantité de 20g de poudre des feuilles de citrus ont été portés à reflux pendant 3 heures à 60°C dans 200ml d'eau distillée. Le macérât ainsi obtenu a été filtré sur papier Wattman N°3 puis lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur de marque **CRIST**.

### I.2.3. Calcul du rendement

Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la matière sèche initiale selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \{P_{ES} / P_{PI}\} \times 100$$

-  $P_{ES}$  : poids de l'extrait sec (g) ;

-  $P_{PI}$  : poids de la poudre initial (g).

### 1.3 Caractérisation des extraits de feuilles de citrus par spectroscopie d'absorbance UV/Visible

Les spectres d'absorption des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus à concentration de 1 mg/ml ont été mesurés entre 200 et 800 nm contre un blanc contenant soit de l'eau distillé ou du méthanol. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre *analytikjena Specord 50* couplé au logiciel Aspect-plus.

### 1.4. Dosages des composés phénoliques

#### 1.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de citrus a été effectué par la méthode adapté par **Singleton et Rossi (1965)** modifié par **Ryan (2013)**.

C'est une méthode basée sur l'utilisation du réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Elle est basée sur la variation des propriétés colimétriques de ce réactif une fois complexé à certains types de molécules principalement les polyphénols. Le réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ), d'une coloration bleue foncée (**Catalano et al., 1999**). La coloration produite, dont la longueur d'onde d'absorption maximum est comprise entre 725 et 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (**Georgé et al., 2005**).

Un volume de 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1N) est ajouté à 200  $\mu$ l de la solution d'extrait méthanolique ou aqueux des feuilles de citrus préalablement dilués dans le méthanol ou dans l'eau distillée. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium à 6% est additionnée au milieu réactionnel. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2 heures d'incubation à température ambiante par un spectrophotomètre de type «SPECORD 50». Le blanc ne contenant pas d'extrait de feuilles de citrus a été préparé dans les mêmes conditions réactionnelles.

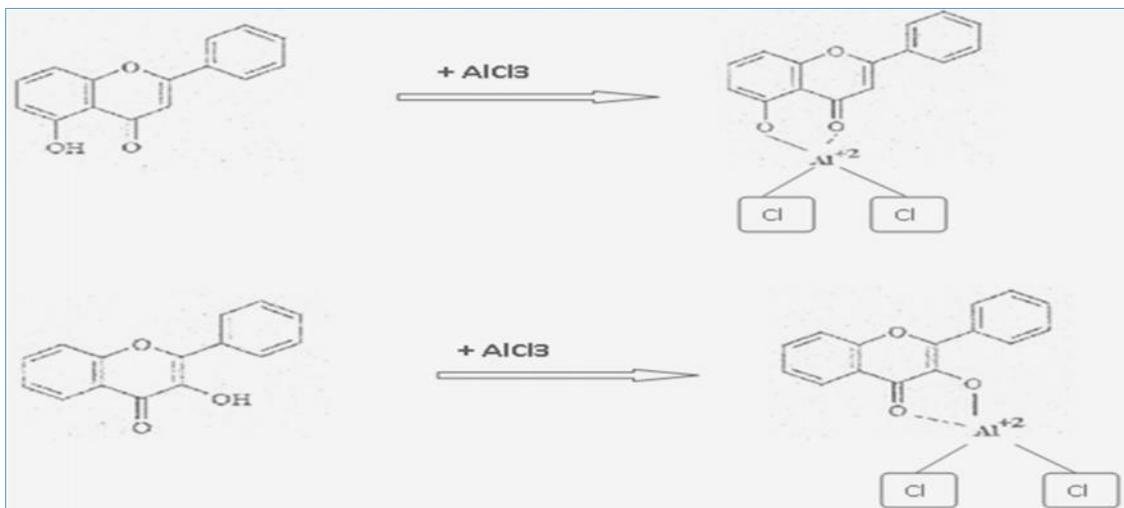
La quantité des polyphénols totaux contenu dans l'extrait végétal est exprimé en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS), en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec comme

polyphénol de référence l'acide gallique (Annexe I). Les différentes expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

#### I.4.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de citrus a été déterminée par la méthode colorimétrique décrite par **Arvouet-Grand *et al.* (1994)**.

En présence de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), les flavonoïdes sont susceptibles de former des complexes de couleur jaunâtre et cela grâce à leurs groupements (OH) libres en position  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_5$  et de l'oxygène en  $\text{C}_4$  (figure 20).



**Figure 20** : Réaction de chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes

Un volume de 1 ml du trichlorure de l'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 2% à été mélangé avec 1ml d'extraits. Des lectures d'absorption à 415 nm ont été prises après 10 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante contre un témoin préparé dans les mêmes conditions et ne content pas d'extrait des feuilles de citrus.

La concentration des flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) en se référant à une courbe d'étalonnage établi dans les mêmes conditions avec la quercétine comme flavonoïde standard (Annexe II). Les différentes expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

## I.5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de citrus

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés anti oxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) et superoxydés ( $\text{O}_2^\bullet$ ) (**Bartosz, 2003**).

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes majeurs : Par transfert d'électron ou par transfert de proton. Un antioxydant à pouvoir réducteur a la capacité de transférer un électron qui réduira les métaux, les carbonyles et les radicaux. Alors qu'un antioxydant donneur d'atome d'hydrogène présente le pouvoir de piéger les radicaux libre.

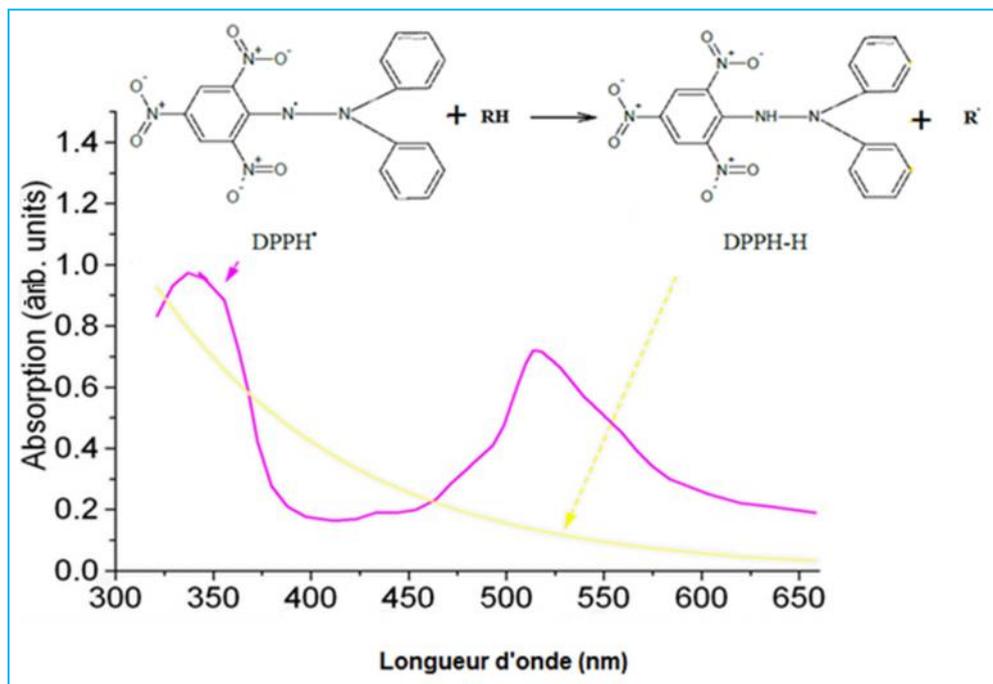
Les tests d'évaluation du pouvoir antioxydant sont basés sur l'un ou/et l'autre des deux mécanismes et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, différents tests de mesure du pouvoir antioxydant sont à effectuer. Par exemples, les tests qui déterminent le pouvoir réducteur comme le test FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power » et les tests qui évaluent le pouvoir anti radicalaire par piégeage des radicaux libres tel que le test DPPH qui utilise le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire ( $\text{DPPH}^\bullet$ ), ou le test ABTS qui utilise le radicale cationique  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante d'un échantillon. Et pour analyser les extraits de plantes et de fruits, Les méthodes  $\text{DPPH}^\bullet$  et  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  sont couramment utilisées (**Prior et al., 2005**).

### I.5.1. Test du DPPH

L'activité antioxydante des composés phénoliques est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle. En présence d'un radical libre ( $\text{R}^\bullet$ ), l'atome d'hydrogène (H) est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable RH.

Le test au DPPH est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule anti-radicalaire, ce qui entraîne la réduction du radical  $\text{DPPH}^\bullet$  de couleur violette en

DPPH de couleur jaune (**Brand-Williams *et al.*, 1995**) selon la réaction schématisée dans la figure 21.



**Figure 21** : Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH• et de sa forme réduite DPPH (**Dransfield *et al.*, 2000**).

Pour déterminer le rôle anti-radicalaire (scavenging activity), de nos échantillons par le test DPPH nous avons utilisé la méthode de **Masuda *et al.* (1999)**.

Un volume de 50 µl de la solution méthanolique du DPPH (5 Mm) est ajouté à 2,45 ml d'extrait aqueux ou méthanolique de feuille de citrus à des concentrations allant de 25 à 400 µg/ml. Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 2,45 ml du méthanol ou d'eau distillée avec 50 µl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution de deux antioxydants standards ; l'acide gallique et la quercétine dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Le test est répété trois fois de façon indépendante.

Le pouvoir antioxydant des extraits de plantes évalué par le test du DPPH est exprimé en pourcentage de réduction du radical DPPH• selon la formule suivante :

$$\% I = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

Avec :

% I = pourcentage de piégeage du radical DPPH ;

$A_0$  = DO du témoin (méthanol + DPPH) ;

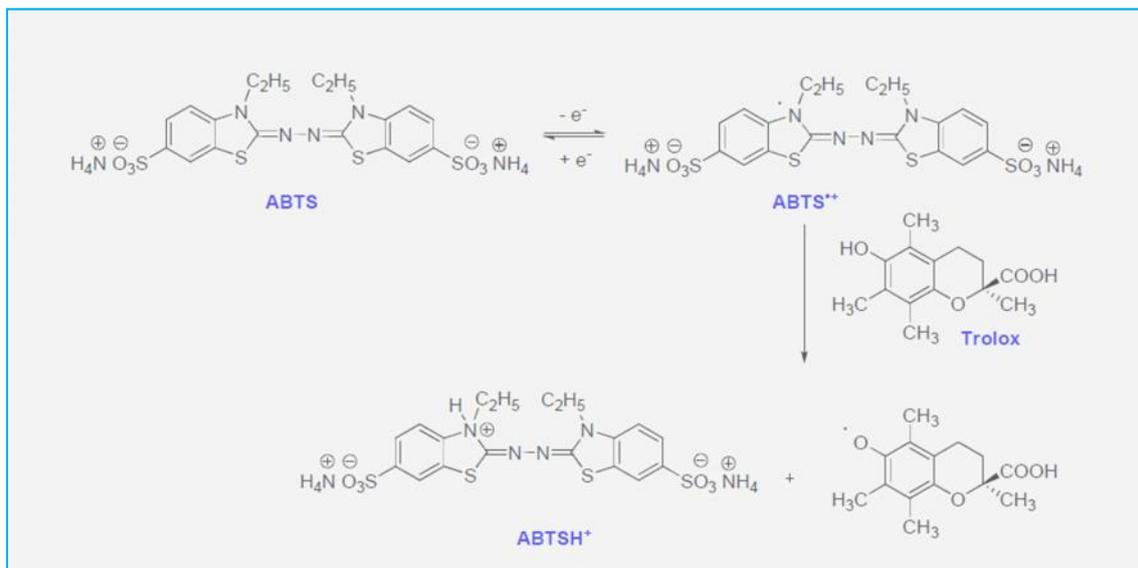
$A_1$  = DO de l'extrait + DPPH ;

$A_2$  = DO du blanc (extrait + méthanol).

L'efficacité de piégeage du radical DPPH est évaluée en EC50, qui correspond à la concentration de l'extrait végétal présentant un taux de réduction du radical DPPH $^{\bullet}$  de 50%.

### I.5.2. Test du radical ABTS $^{+}$

Le test ABTS ou Test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacité) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS $^{+}$  (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique). En milieu réactionnel le radical cationique ABTS $^{+}$  de couleur vert bleu intense, généré par l'oxydation de l'ABTS avec un sel fort tel que le persulfate de potassium qui réagit avec un donneur d'hydrogène (H $^{\bullet}$ ) pour donner une forme non radicalaire et non colorée (figure 22) (Lien *et al.*, 1999).



**Figure 22** : Formation et piégeage du radical ABTS $^{+}$  par un donneur de H $^{\bullet}$ .

Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer le radical ABTS<sup>•+</sup>.

L'activité antiradicalaire des extraits a été évaluée par le piégeage des radicaux ABTS<sup>•+</sup> selon la méthode de **Van den Berg *et al.* (2000)**.

Le radicale ABTS<sup>•+</sup> est obtenu en mélangeant une solution de 7 mM d'ABTS avec une solution de 2,5 mM du persulfate de potassium (K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>) (**Re *et al.*, 1999**). Le mélange est conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 16 heures. Ensuite la solution d'ABTS<sup>•+</sup> est diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une DO de 0,700 ± 0,02 à 734 nm.

A 1,9 ml d'une solution ABTS<sup>•+</sup>, 100 µl de solution d'extrait à différentes concentrations (10 à 200 µg /ml) sont ajoutés. Après 5 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (le Trolox). L'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Pour chaque concentration le test a été réalisé en triplicats.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS des extraits est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec :

**% d'inhibition** : Pourcentage d'inhibition de radical ABTS<sup>•+</sup> ;

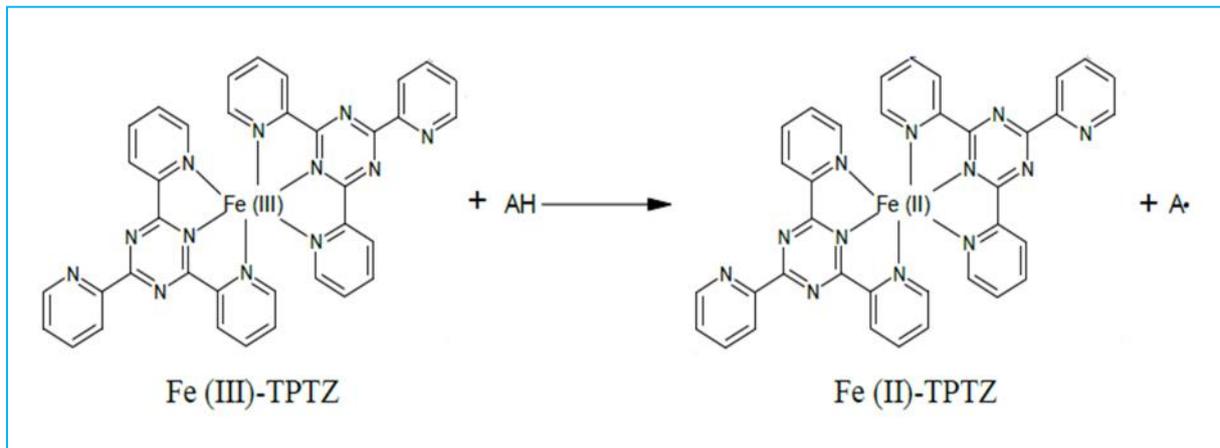
**A<sub>0</sub>** : Absorbance du contrôle (contenant seulement l'ABTS) ;

**A<sub>1</sub>** : Absorbance de l'extrait + ABTS.

Le pouvoir antioxydant par le test ABT sera exprimé en termes de TEAC (Capacité Antioxydante Équivalente Trolox) qui correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en µM ou mM d'équivalent Trolox par g de matière sèche.

### I.5.3. Test de réduction du fer (FRAP)

Le test de FRAP est basé sur la réaction de réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en un fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par un antioxydant (AH), (figure 23). Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleu vert intense apparaît très rapidement. (Amarowicz *et al.*, 2004).



**Figure 23 :** Réduction du fer ferrique en fer ferreux par un antioxydant (AH).

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) rapportée par Amarowicz *et al.* (2004).

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (25 à 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ont mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. Le mélange est incubé à 50°C au bain-marie pendant 20 min. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% ont été ajoutés pour stopper la réaction. Une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min a été réalisée. 2,5 ml de surnageant ont été mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 0,1%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; le butyl-hydroxyanisole (BHA).

### I.6. Mesure de l'activité anti-enzymatique

Les activités anti-enzymatiques ont été évaluées par les enzymes utilisés dans le processus du brunissement enzymatique : la PPO et la POD. A cette effet, différentes sources végétales de ces enzymes ont été utilisées (tableau XII).

**Tableau XII** : Source d'enzymes de peroxydase et de polyphénoloxydase.

Nom binominal	Nom vernaculaire	Famille	Photos
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> . L	Chou rouge	<i>Brassicaceae</i>	
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>alba</i> . L	Chou pommé ou Chou cabus	<i>Brassicaceae</i>	
<i>Cynara cardunculus</i> . L	Cardon ou Cardonette	<i>Astéracées</i>	
<i>Spinacia oleracea</i> . L	Epinard	<i>Spinacia</i>	
<i>Lactuca sativa</i> . L	Laitue	<i>Astéracées</i>	

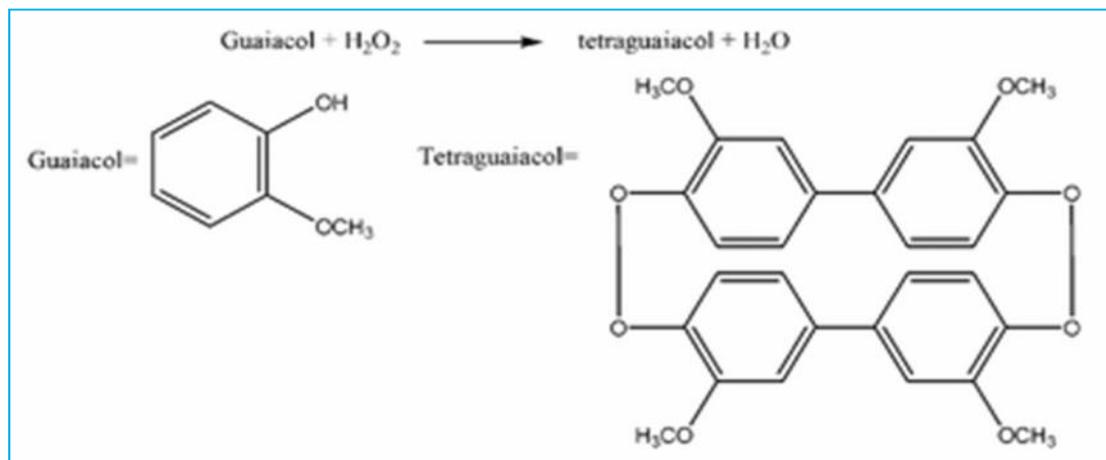
- **Préparation des extraits enzymatiques**

L'extraction des enzymes est réalisée selon le protocole décrit par **Ponce et al. (2004)**. Les végétaux utilisés dans l'étude ont été nettoyés puis broyés et homogénéisés à l'aide d'un mélangeur électrique à grande vitesse pendant 3 min avec 30 ml d'eau distillé à 4°C. Une filtration à l'aide de deux couches de la gaze et une centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes à 4°C ont été réalisées. Le surnageant obtenu a été utilisé comme extrait enzymatique.

### II.6.1. Mesure de l'activité anti-peroxydase

L'inhibition de la peroxydase par les extraits de feuilles de citrus, a été mesurée par méthode colorimétrique en utilisant le protocole décrit par **Ponce et al. (2004)**. L'activité de la peroxydase à été mesurée en présence et en absence des extraits des feuilles de citrus en utilisant le gâiacol comme substrat et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme donneur

d'hydrogène. L'oxydation enzymatique du gaïacol génère du tetragaïacol (figure 24), composé rouge rouille qui absorbe la lumière à environ 470 nm.



**Figure 24 :** Oxydation du gaïacol en tetragaïacol (Corban *et al.*, 2011).

2,87 ml de la solution de substrat constituée de 10 ml de gaïacol à 1%, 10 ml de peroxyde d'hydrogène (0,3%) et 100 ml de tampon phosphate (0,05 M, pH= 6,5), 0,03 ml d'extrait des feuilles de citrus et 0,1 ml d'extrait enzymatique ont été ajoutés. L'activité enzymatique a été suivie par mesure de la variation de l'absorbance à 470 nm pendant 5 min à température ambiante.

#### ➤ Expression du taux d'inhibition (%)

Le taux d'inhibition de la peroxydase exprimé en pourcentage est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Activité initiale}^* - \text{Activité résiduelle}^{**}}{\text{Activité initiale}} \times 100$$

\* Activité enzymatique ( $\Delta\text{DO} / \text{min}$ ) mesurée en absence d'extrait de citrus

\*\*Activité enzymatique ( $\Delta\text{DO} / \text{min}$ ) mesurée en présence d'extrait de citrus

### II.6.2. Mesure de l'activité anti-polyphénoloxydase

Le protocole établi par Lee *et al.* (2007) a permis la mesure de l'activité de la polyphénoloxydase par une méthode spectrophotométrique. Le substrat utilisé dans ce protocole est le pyrocatechol. L'oxydation du pyrocatechol se traduit par l'apparition de la couleur rouge-brun.

1 ml d'extrait de feuille de citrus a été mélangé à 0,1 ml de l'extrait enzymatique et 0,9 ml de tampon phosphate 50 mM, pH6,8). La solution formée a été incubée pendant 5 minutes à 25°C. 1ml de pyrocatechol à 0,2 M a été ajouté. La variation de la DO a été suivie à 420 nm durant 1 minute.

Le taux d'inhibition de la polyphénoloxydase a été calculé selon la relation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Activité initiale}^* - \text{Activité résiduelle}^{**}}{\text{Activité initiale}} \times 100$$

\* Activité enzymatique ( $\Delta DO$  /min) mesurée en absence d'extrait de citrus.

\*\*Activité enzymatique ( $\Delta DO$  /min) mesurée en présence d'extrait de citrus.

### **I.7. Analyse statistique**

Trois essais ont été réalisés pour chaque échantillon. Les résultats ont été présentés sous forme de moyen  $\pm$  écart type à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007.

L'analyse statistique a été effectuée par le test ANOVA/MANOVA en utilisant le logiciel STATISTICA 5.5. Les différences significatives ont été rapportées à  $p < 0,05$ .

## II.1. Taux d'extraction

Les taux d'extraction aqueuse ou méthanolique à partir des feuilles de citrus (tableau XIII) ont montrés que le rendement en extrait sec varie selon l'espèce et l'extrait.

**Tableau XIII** : Taux d'extraction par macération des feuilles des espèces de citrus.

Extrait \ Solvant	Eau %	Méthanol %
<i>Citrus Thomson navel</i>	26,15	09,75
<i>Citrus hamlin</i>	25,30	05,20
<i>Citrus limon</i>	23,40	05,15
<i>Citrus clementina</i>	31,30	12,45
<i>Citrus aurantium</i>	25,20	11,45
<i>Citrus aurantiifolia</i>	27,75	06,70
<i>Citrus grandis</i>	22,30	06,35

Les taux d'extraction par macération avec l'eau comme solvant d'extraction sont nettement supérieurs, avec un facteur de 2 à 4 fois, à ceux obtenus par extraction au méthanol quelque soit l'espèce de citrus utilisée. Étant donné que les conditions d'extraction utilisées avec les 2 solvants sont les mêmes, on peut dire que les feuilles des citrus contiennent plus de métabolites solubles dans l'eau que de métabolites solubles dans le méthanol.

D'autre part, indépendamment du solvant utilisé, il a été noté que l'espèce *C. clementina* présente les meilleurs taux d'extraction avec respectivement 31,3 % pour l'eau et 12,45 % pour le méthanol par rapport aux autres espèces étudiées.

L'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction donne l'espèce *C. grandis* comme étant celle qui présente le taux d'extraction le plus faible (22,3 %), tandis que dans le cas de l'utilisation du méthanol, l'espèce dont le plus faible rendement est *C. limon* (05,15 %). Il est important de noter que malgré le fait que *C. grandis* est l'espèce qui présente le plus faible taux de rendement lors de l'utilisation de l'eau comme solvant, le taux d'extraction observé (22,3 %) reste supérieur au meilleur rendement en utilisant le méthanol (*C. clementina* : 12,45 %).

L'espèce montrant un meilleur rendement par l'extraction aqueuse par rapport à l'extraction méthanolique est l'espèce *C. hamlin*. En effet, le rapport extrait aqueux/extrait

méthanolique est de 5, ce la veut dire que l'espèce *C. hamlin* est plus riche en substances solubles dans l'eau que celles qui sont solubles dans le méthanol.

Des études antérieurs utilisant d'autres variétés de citrus que celle de notre études (**Tawaha et al., 2007 ; Bougandoura et Bendimerad, 2012 ; Muthiah et al., 2012**), ont montrées que le rendement maximal d'extraction en utilisant le méthanol comme solvant est comparable à ce que nous avons obtenus. Toutefois, d'autres études tendent à démontrer que le méthanol représente le meilleur solvant d'extraction en le comparant avec l'eau (**Pérez et al., 2007 ; Karimi et al., 2010 ; Oskoueian et al., 2011**).

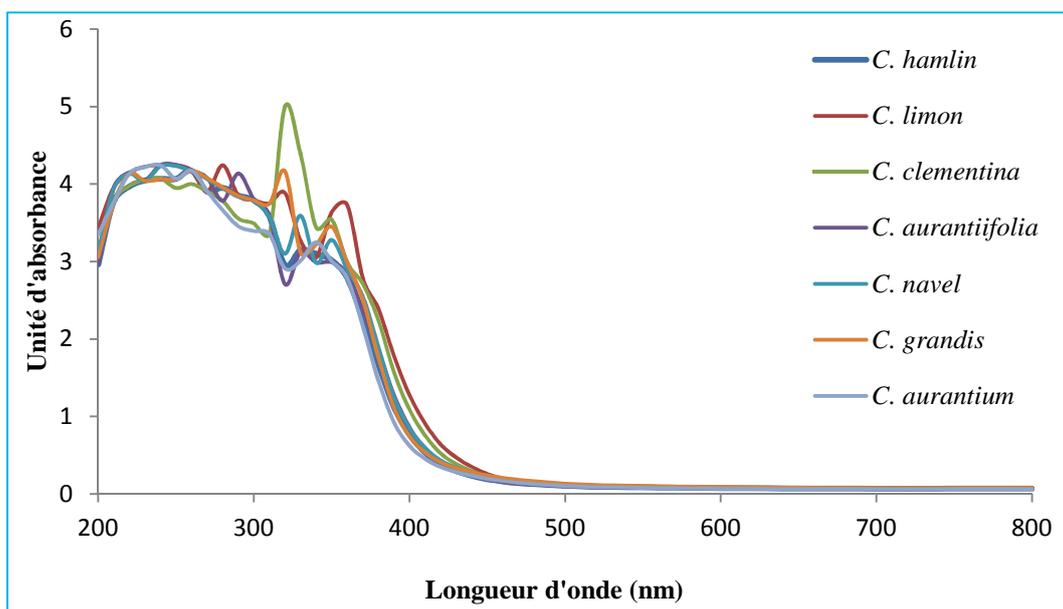
Bien qu'il est difficile de mettre en place des comparaisons avec les données bibliographiques à cause de la multiplicité des paramètres qui influencent les taux d'extractions pour une même espèce végétale, la différence de rendement d'extraction peut être due à plusieurs paramètres. C'est le cas de la température, la méthode d'extraction utilisée, la granulométrie de la poudre, l'origine et le type du matériel végétal utilisés, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leurs degrés de pureté (**Nacz et Shahidi, 2004 ; Hayat et al., 2009**).

## II.2. Propriétés optiques d'absorbance des extraits de citrus

Les spectres d'absorbance des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles des différentes espèces de citrus sont représentés dans les figures 25 et 26. Il ressort de ces spectres d'absorption que les extraits aqueux n'absorbent que dans l'UV et dans la zone charnière entre UV et visible (350-450 nm), alors que les extraits méthanoliques absorbent aussi bien dans l'UV que dans le visible. L'analyse comparative des profils des spectres d'absorption des extraits aqueux, d'une part, et des extraits méthanoliques, d'autre part, des feuilles de citrus ont montrés une certaine variabilité inter espèce en composés hydrosolubles et en composés solubles dans le méthanol.

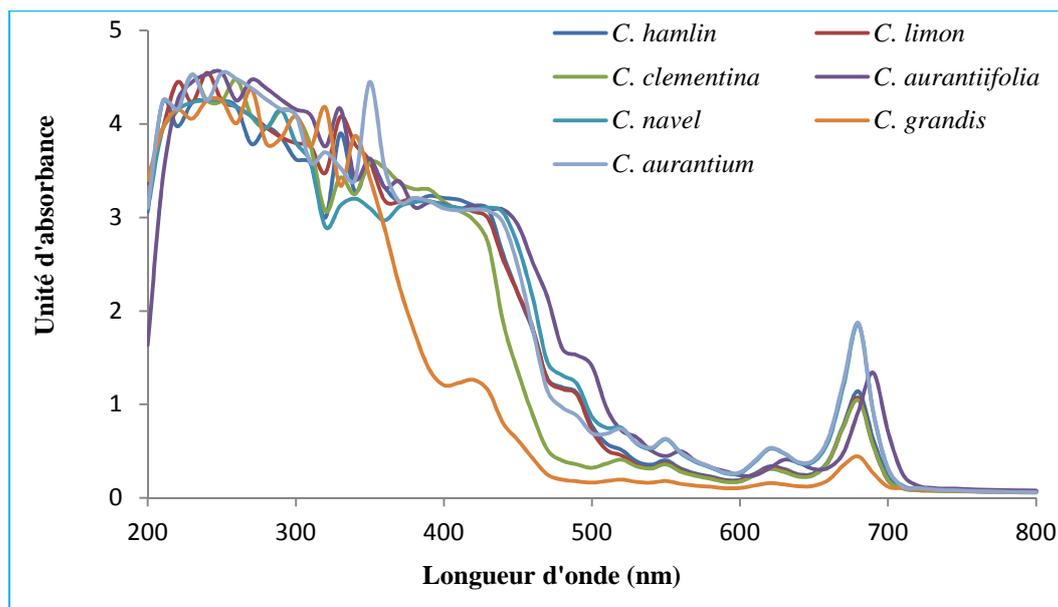
Les spectres d'absorption des extraits aqueux dans la région 250-450 nm (figure 25) présentent des profils caractéristiques avec des maxima entre 240 et 295 nm et entre 300 et 400 nm. Les longueurs d'onde de ces maxima varient en fonction de l'espèce de l'extrait utilisée. Ce qui nous mène à dire que les polyphénols simples comme les acides phénoliques et les flavonoïdes comme les flavones, isoflavones, flavonols et chalcones sont présents dans nos extraits aqueux. Par contre, les anthocyanes et les anthocyanidines ( $\lambda_{\max}$  530-560 nm) ou les tannins ( $\lambda_{\max}$  510 nm) (**Macheix et al., 2005**) semblent être absents dans ces extraits. La

plupart des flavonoïdes étalent sur leurs spectres UV deux bandes d'absorption maximales, l'une entre 240-295 nm (bande II), caractérisant le système benzoyle du cycle A et l'autre entre 300-400 nm (bande I), caractérisant le système cinnamoyle du cycle B. Les intensités de ces bandes dépendent du degré de conjugaison de la structure et les maxima d'absorbance sont en fonction de la classe de ces flavonoïdes ; les flavones (250-280 nm et 310-330 nm, 275-295 nm et 300-330 nm), les flavonols (250-280 nm et 330-360 nm), les isoflavones (245-295 nm et 300-330 nm), les chalcones (230-270 nm et 340-390 nm) ; les aurones (230-270 nm et 380-430 nm) et les anthocyanides, anthocyanin (270-280 nm et 465-500 nm) (**Bruneton, 1999**).



**Figure 25** : Spectre d'absorption des extraits aqueux des feuilles de citrus.

Les spectres d'absorption des extraits méthanoliques (figure 26) présentent des profils non identiques indiquant ainsi une variation dans la composition de ces extraits et qui dépend de l'espèce de citrus utilisée. L'analyse des spectres UV-Vis des extraits méthanoliques indique la présence dans ces extraits des pigments liposolubles comme les chlorophylles a et b dont les absorbances maximales se situent entre 400-450 nm et 650-700 nm et peut être des caroténoïdes ( $\beta$  carotène et xanthophylle, dont les maxima d'absorption sont autour de 420, 440 et 460 nm), des anthocyanidines (530-560 nm), des tannins (510 nm) et aussi des flavonoïdes qui absorbent dans la zone de l'UV (flavones, flavonols, acides cinnamique, phénols simples, quercétine...etc) (**Ribereau-Gayon, 1968**).



**Figure 26 :** Spectre d'absorption des extraits méthanoliques des feuilles de citrus.

Les spectres d'absorbance des deux extraits (méthanoliques et aqueux) des feuilles de citrus utilisées dans ce travail ont montrés que ces extraits n'ont pas dans l'ensemble une composition identique, et que certain composés sont soluble dans un solvant et pas dans l'autre comme le cas des anthocyanidines (530-560 nm), les tannins (510 nm), les chlorophylles a et b (680 nm et 400-450 nm respectivement) qui ne se présentent que dans les extraits méthanoliques (**Ribereau-Gayon, 1968**).

De nombreux travaux ont été consacrés à la détermination du spectre d'absorption des composés phénoliques et leurs utilisations pour les caractériser et les doser. Les variations du spectre d'absorption des composés phénoliques sont en fonction des modifications chimiques (hydroxylations, méthylations, glycosylations, condensation avec d'autres molécules phénoliques ou non). Par exemple, le spectre d'absorption de l'acide chlorogénique ( $\lambda_{\max}$ = 328 nm) est représentatif des nombreux esters naturels des acides hydroxycinnamiques, celui de la (+)-catéchine (maximum à 280 nm) va se retrouver chez les tannins condensés, celui de la quercétine ( $\lambda_{\max}$  = 375 nm, avec un deuxième maximum d'absorbance vers 265 nm) est représentatif de nombreux flavonols et de leurs dérivés glycosylé. Alors que ce lui des anthocyanes montre une absorption vers 500 nm ce qui explique leur couleur rouge naturelle (**Macheix et al., 2005**).

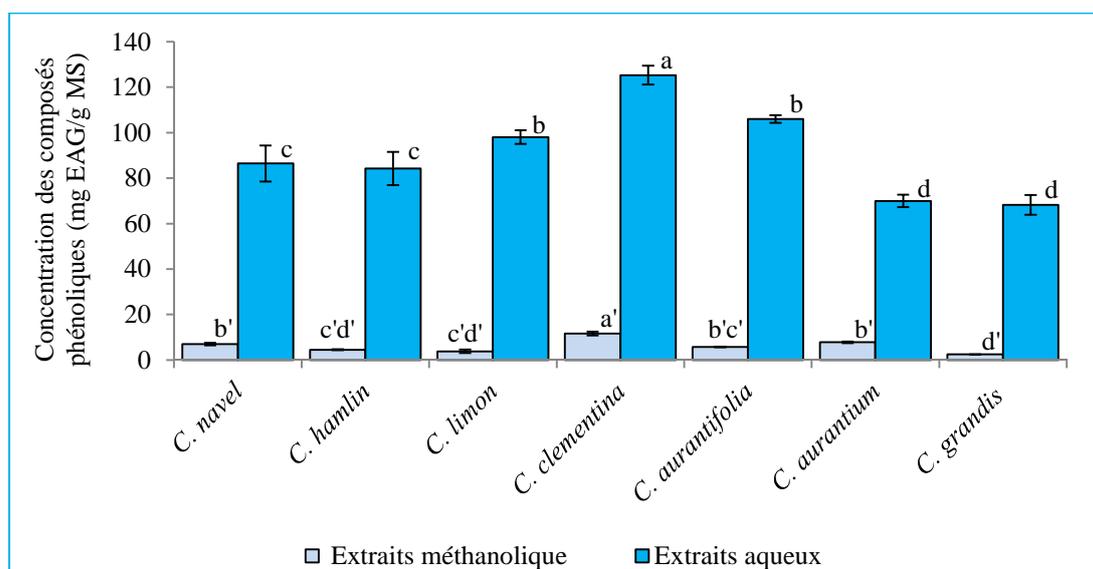
### II.3. Dosages colorimétriques des extraits des feuilles de citrus

#### II.3.1. Taux des polyphénols totaux

Les taux en composés phénoliques dans les extraits des feuilles de citrus obtenus (figure 27) montrent que les feuilles de citrus renferment des teneurs en polyphénols non négligeable au vue de ce qui est rapporté en littérature selon l'espèce de citrus étudié. Les taux varient de 2,477 mg EAG/g MS à 11,668 mg EAG/g MS dans l'extrait méthanolique et de 68,23 mg EAG/g MS à 125,287 mg EAG/g MS dans l'extrait aqueux.

Au vue des résultats obtenus, les teneurs en polyphénols des extraits aqueux sont largement supérieures à celles des extraits méthanoliques (figure 21). Les concentrations des composés phénoliques des extraits méthanoliques de nos feuilles sont comprises entre  $02,477 \pm 0,343$  mg EAG/g MS pour l'espèce *C. grandis* et les extraits de *C. clementina* avec  $11,668 \pm 1,457$  mg EAG/g MS. L'espèce *C. aurantium* représente une teneur de l'ordre de  $7,768 \pm 0,706$  mg EAG/g MS et *C. limon* avec  $03,826 \pm 0,882$  mg EAG/g MS.

Comme pour les extraits méthanoliques, l'extrait aqueux de *C. clementina* est plus riche en composés phénoliques avec un taux de  $125,287 \pm 4,155$  mg EAG/g MS suivie par *C. aurantiifolia* ( $106,048 \pm 1,671$  mg EAG/g MS). Alors que les deux variétés de l'oranger douce (*C. hamlin* et *C. navel*) contiennent des concentrations similaires ( $P > 0,05$ ), ( $84,236 \pm 7,339$  et  $86,478 \pm 7,947$  mg EAG/g MS, respectivement), par contre *C. grandis* contient le taux le plus faible avec  $68,23 \pm 4,320$  mg EAG/g MS.



**Figure 27 :** Teneur en polyphénol totaux des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus. Les valeurs portant des lettres différentes sont différents significativement ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écarts types.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par **Muthiah et al. (2012)** qui ont montrés que la teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits de *C. aurantium*, *C. limetta* et de *C. limon* varient entre 07,39 et 33,05 mg/g dans l'ordre suivant : *C. aurantium* > *C. limetta* > *C. limon*.

Les teneurs en polyphénols totaux obtenus dans les extraits aqueux des feuilles des deux variétés de *Citrus sinensis* à savoir *Thomson navel* et *hamlin* sont très proches de celles trouvées par **Tawaha et al. (2007)** dans l'extrait aqueux du fruit *Citrus sinensis* (23,4 mg EAG/g MS).

La moyenne des taux de polyphénols dans nos extraits méthanoliques de différentes variétés des feuilles de citrus est d'environ 6 mg EAG/g MS. Cette concentration est comparable aux taux des composés phénoliques des extraits méthanoliques d'autres espèces de citrus comme *Citrus medica* vr. *Diamante* (**Menichini et al., 2011**) ou *C. sinensis* (**Kammoun et al., 2012**). La moyenne du taux de polyphénols est indépendante de la partie utilisé que ce soit la feuille ou la fleur, comme la montré l'étude de **Karimi et al. (2012)** sur les fleurs de *C. aurantium*.

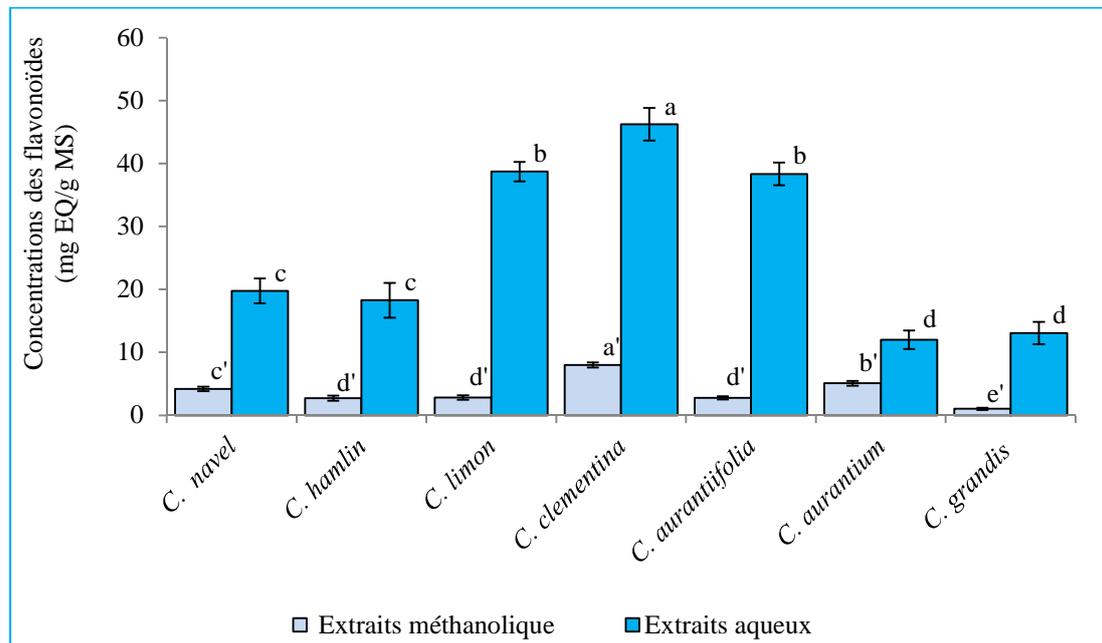
Malgré la différence du mode d'extraction et la concentration de solvant méthanolique par rapport à ce que à été utilisé par **Lagha-Benamrouche et Madani (2013)**, nous observant que le taux des polyphénols est supérieur dont la variété *C. aurantium* en comparaison au *C. navel*.

Plusieurs facteurs peuvent influencés sur les taux des composés phénoliques tels que la présence de certain groupements chimiques (l'acide ascorbique, les acides organiques, les sucres, les amines aromatiques), qui peuvent également réagir avec le réactif de Folin-Ciocalteu (**Abd Ghafar et al., 2010**), mais aussi la période de la récolte et le type de l'espèce (**Makkar et al., 1988**), le mode de conservation des substrats d'extraction et le degrés de maturation des feuilles (**Sharma et al., 2001**).

### II.2.2. Taux des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'un des groupes les plus répandus des métabolites secondaire chez les plantes. Les résultats du dosage des flavonoides dans les extraits de feuilles de citrus présentés dans la figure 28 montrent que le taux des flavonoïdes varie selon l'espèce

et le solvant d'extraction utilisé. La teneur en flavonoïdes dans les extraits aqueux est significativement plus importante que dans les extraits méthanoliques.

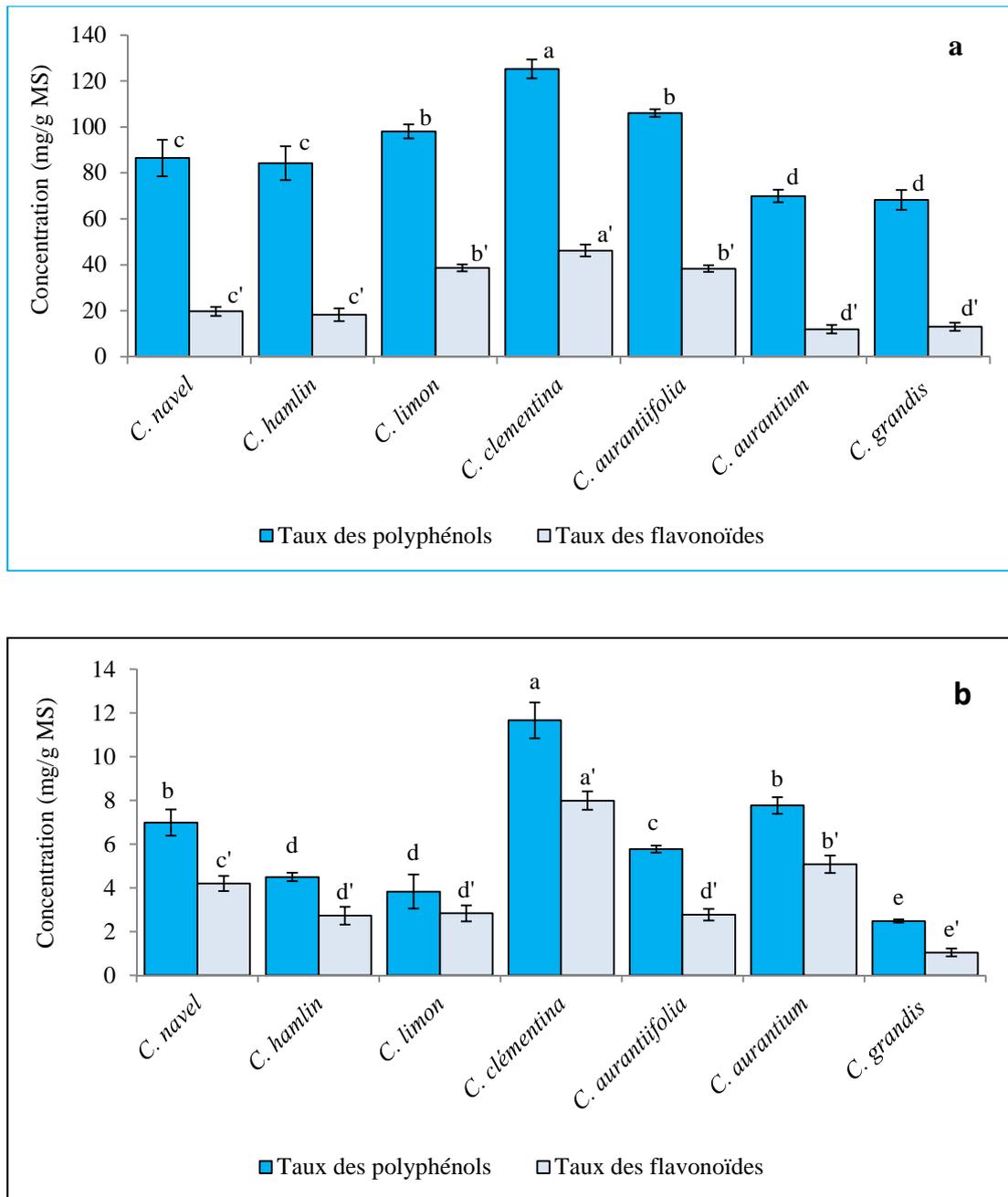


**Figure 28 :** Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus.

Les valeurs portant des lettres différentes sont différents significativement ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écarts types.

L'espèce *C. clementina* présente les teneurs les plus élevées en flavonoïdes que ce soit pour les extraits aqueux ou méthanoliques avec respectivement  $46,248 \pm 2,583$  et  $07,99 \pm 0,417$  mg EQ/g MS ; l'espèce *C. aurantiifolia* quant à elle présente un taux élevé des flavonoïdes dans l'extrait aqueux mais un taux de flavonoïde parmi les plus faibles dans l'extrait méthanolique ( $38,3551 \pm 1,477$  et  $2,772 \pm 0,399$  mg EQ/g MS, respectivement). D'autre part, *C. aurantium* présente le taux le plus faible en flavonoïde dans l'extrait aqueux ( $11,991 \pm 1,803$  mg EQ/g MS), mais un taux de flavonoïde parmi les plus élevés dans l'extrait méthanolique ( $05,081 \pm 0,270$  mg EQ/g MS).

Quelque soit l'espèce étudiée, il semblerait que les flavonoïdes dans les extraits aqueux ne soient pas les polyphénols majoritaires. En effet, selon les résultats de dosage (figure 29a), le rapport polyphénols totaux/flavonoïdes est inférieur à 0,5.



**Figure 29 :** Taux des polyphénols (mg EAG/g MS) et flavonoïdes (mg EQ/g MS) des extraits (a) aqueux (b) méthanoliques des feuilles de citrus. La teneur en polyphénol en mg EAG/mg MS et les flavonoïdes en mg EQ/mg MS. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3). Les barres verticales représentent les écarts types.

Il semblerait que dans les extraits méthanoliques, les flavonoïdes comme polyphénols soient majoritaires (figure 29b) pour toutes les espèces étudiées. Ainsi, la proportion des polyphénols en flavonoïdes dans les extraits méthanolique de feuilles de *C. limon*, *C. clementina*, *C. aurantium* ainsi que *C. navel* sont comprise entre 60,68 % et 74,05 %.

Les résultats obtenues concernent les proportions de flavonoïdes dans les polyphénols totaux sont plus au moins en accord avec ceux rapportés par des études antérieures comme celle de **Bougandoura et Bendimerad (2012)** qui ont déduit que les flavonoïdes représentent 43,24% des phénols totaux dans l'extrait méthanolique, par contre, ce taux ne dépasse pas 24,84 % dans l'extrait aqueux.

Bien que les résultats obtenus tendent à dire que les polyphénols des feuilles de citrus solubles dans le méthanol sont à majorité des flavonoïdes. Des études rapportées par **Muthiah et al. (2012)** suggèrent que les proportions des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux dépendent à la fois de l'espèce de citrus utilisé, mais aussi de la partie étudiée. En effet, les études menées sur *Citrus medica* ont montré que la teneur des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques de cette espèce sont moins importantes (**Menichini et al., 2011**). D'autre part, les dosages des polyphénols dans les extraits de *C. limon*, *C. aurantium* et *C. limetta* a montré que le taux de flavonoïde varie en fonction de la partie de la plante utilisée entre 0,51 et 21,62 mg EQ/g MS, les concentrations ont été classées par ordre décroissant suivant: *C. limetta* (zeste) > *C. aurantium* (zeste) > *C. limon* (zeste) > *C. aurantium* (feuilles) > *C. limetta* (feuilles) > *C. limon* (feuilles) > *C. limetta* (fruit) > *C. aurantium* (fruit) > *C. limon* (fruit). (**Muthiah et al., 2012**).

Parmi les polyphénols et flavonoïdes à large distribution dans les citrus : la rutine (362,85±0,01 µg/g MS), la quercétine (185,37±0,11 µg/g MS) et la naringine (688,11±0,05 µg/g MS), trouvés dans les extraits méthanoliques des fleurs de *C. aurantium* (**Karimi et al., 2012**), tandis que le flavonoïde le plus abondant dans les jeunes feuilles du citronnier est l'hespéridine, (**Del Rio et al., 2004**).

### III.3. Activité antioxydante

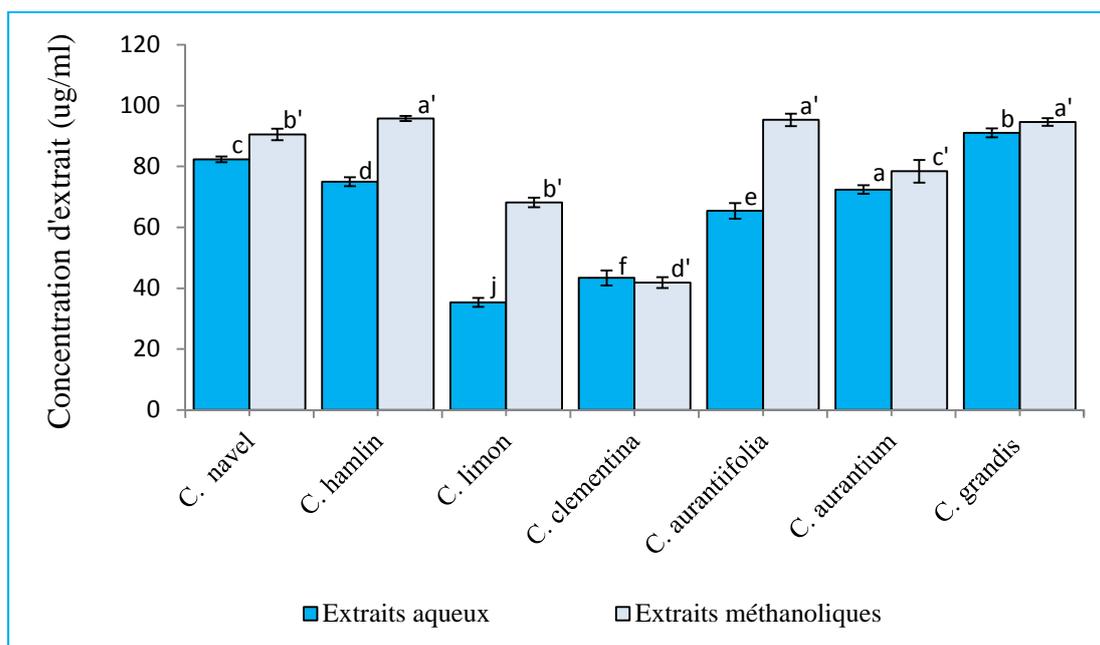
#### III.3.1. Activité scavenging du radical DPPH

De nombreuses études démontrent l'importance portée aux antioxydants naturels dans les domaines de l'industrie agroalimentaire et médicale, mais également leurs rôles protecteurs contre les espèces réactives oxygénées, ainsi que la corrélation existante entre les composés bioactifs des matières végétales et leurs capacités antioxydantes (**Kong et al., 2010**).

Les résultats obtenus montrent que les extraits de feuilles de citrus de différentes espèces testées présentent un pouvoir piégeur du radical DPPH avec des pourcentages

de 48 % et 84 % pour une concentration d'extrait de 0,1 mg/ml. Cette activité scavenger des extraits reste toute fois largement inférieure à celle obtenue avec l'acide gallique (acide phénolique) ou la quercétine (flavonoïde). Ces deux polyphenols purs utilisés comme référence présentent un pouvoir piègeur du DPPH dépassant les 90 % pour une concentration de 0,01 mg/ml (Annexe III).

Pour évaluer l'efficacité antioxydant du radical DPPH des extraits de citrus, les EC50 (concentration qui piège 50% du radical libre DPPH) ont été déterminées (figure 30).



**Figure 30 :** EC50 du radical DPPH des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de citrus. Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les valeurs portant des lettres différentes sont différents significativement ( $P < 0,05$ ), les barres verticales représentent les écartypes.

Les EC50 obtenues montrent que l'efficacité de piéger le radical DPPH est de même ordre de grandeur quelque soit la nature de l'extrait (35µg-96µg). Toutefois, l'extrait à activité scavenger le plus élevé avec le DPPH étant l'extrait aqueux de *C. limon* (35,35 µg/ml) alors que l'extrait à activité plus faible est l'extrait méthanolique de *C. hamlin* (95,78 µg/ml.)

D'autre part, il a été noté pour *C. navel*, *C. grandis*, *C. clementina* que leurs extraits méthanoliques et aqueux ont un même pouvoir anti-radicalaire avec le DPPH ( $P > 0,05$ ). Pour *C. aurantiifolia*, et *C. hamlin*, *C. limon* ce sont les extraits aqueux qui sont légèrement plus efficaces que les extraits méthanolique.

Les résultats obtenus dans ce travail, montrent que les extraits de différentes espèces de citrus étudiées présentent une activité anti-radicalaire proche de celle rapportée par **Muthiah et al. (2012)** pour les feuilles de *C. limetta* et de *C. aurantium* (EC50 de 0,148 mg/ml et 0,142 mg/ml respectivement) et par **Jabri-karoui et Marzouk (2013)** pour *C. aurantium* (EC50= 0,190 mg/ml) mais sensiblement meilleure que celle de l'extrait méthanoliques de feuille de *Citrus medica* vr. *Diamante* (EC50= 0,5 mg/ml) (**Menichini et al., 2011**).

Pour une même espèce végétale, la variabilité des résultats de l'activité anti-radicalaire du DPPH rapportés peut s'expliquer par la nature de la partie utilisée de la plante, son degré de maturation mais aussi par le procédé d'extraction appliqué (**Xu et al., 2008**). L'activité scavenging de radical DPPH des extraits méthanoliques des fleurs de *Citrus aurantium* rapportée par **Karimi et al. (2012)** (EC50 = 300µg/ml) est largement inférieures à celle que nous avons trouvée pour l'extrait méthanolique des feuilles (EC50= 68µg/ml). L'influence du solvant d'extraction sur les résultats du test DPPH.

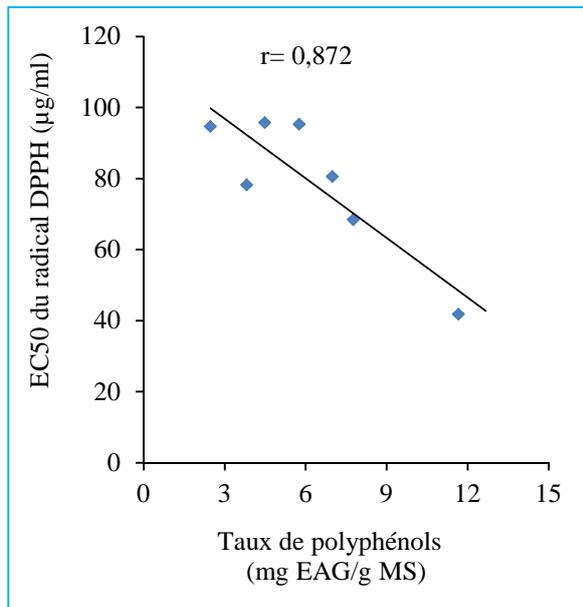
La différence en termes de pouvoir réducteur du radical DPPH par les extraits de différentes espèces de citrus est due probablement à la variabilité de composition de ces espèces en métabolites antioxydants principalement les composés phénoliques l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins (**De Pooter et Schamp, 1986**). Les polyphénols et les flavonoïdes sont de bons donneurs d'électrons et/ou d'hydrogène, et que leur pouvoir antioxydant varie d'un composé à l'autre. (**Naczki et Shahidi, 2004 ; Bourguet et al., 2008**).

A fin d'évaluer si l'activité antioxydant par le test DPPH de nos différents extraits de citrus est dépendante de leurs teneurs en composés phénoliques, nous avons procédé à l'évaluation de relation, par régression linéaire, d'une part, entre pouvoir scavenging du DPPH (exprimée en EC50) et le taux de poly phénols totaux (exprimé en mg EQ acide gallique) / gMS) et d'autre part, entre pouvoir scavenging du DPPH (exprimé par EC50) et le taux de flavonoïdes (exprimé en mg EQ quercétine /g MS).

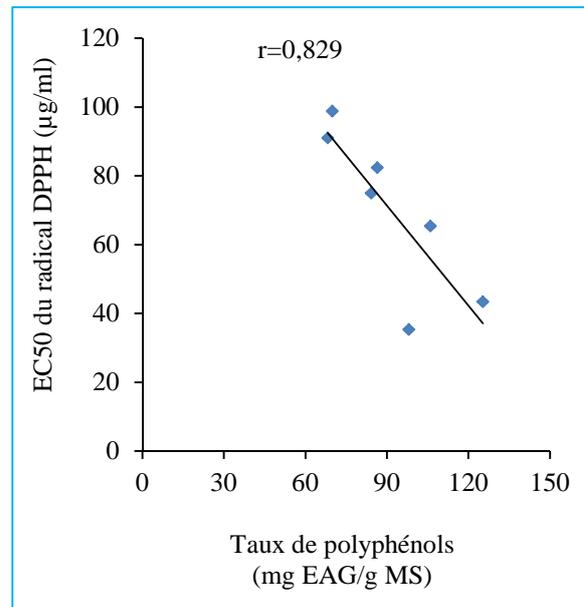
Les résultats obtenus (figures 31) montrent que les citrus présentent une corrélation significativement élevée entre leurs efficacités à piéger le radical DPPH et les taux en polyphénols totaux et en flavonoïdes de leurs extraits méthanoliques ( $r = 0,872$  et  $r = 0,936$  respectivement) et aqueux ( $r = 0,820$  et  $r = 0,914$ , respectivement). Toutefois, cette corrélation est légèrement plus élevée dans le cas où l'extraction est réalisée avec du méthanol.

L'analyse de corrélation a permis de déduire que les poly phénols dans les extraits des feuilles de citrus sont responsables à 83 % et jusqu'à 87 % de la capacité anti-radical du DPPH quelque soit le solvant d'extraction utilisé. D'autre part, en comparant les coefficients de corrélations obtenus, on déduit que les flavonoïdes sont à majorité responsables de l'effet scavenging du radical DPPH que les autres composés phénoliques qui peuvent être présent dans nos extraits cas des acides phénoliques ou même des tanins. En effet, pour les flavonoïdes, les coefficients de corrélation sont de  $r= 0,936$  (extrait méthanolique) et  $r= 0,914$  (extrait aqueux) alors qu'ils ne sont que de  $r= 0,872$  (extrait méthanolique) et  $r= 0,820$  (extrait aqueux) pour les polyphenols totaux. Comme pour d'autres études notamment celle de **Floegel *et al.* (2011)**, pour l'étude que nous avons menés avec les espèces de citrus récoltés en Algérie, il semblerait aussi que les capacités antioxydants d'espèces de citrus soient liées à la concentration de polyphénols est plus particulièrement à celles des flavonoïdes.

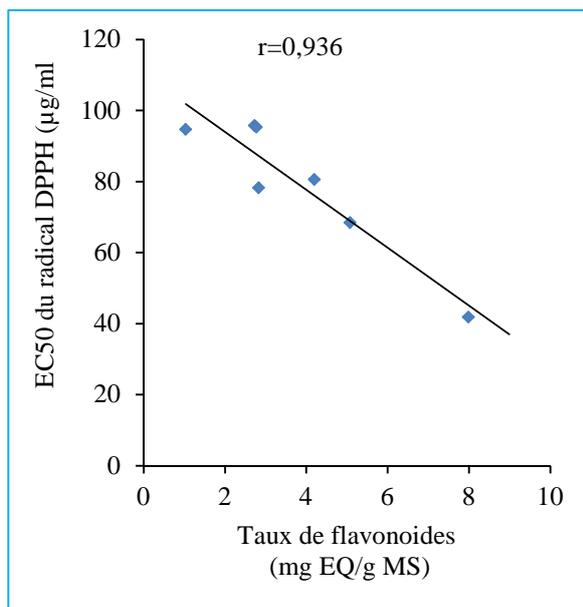
a)



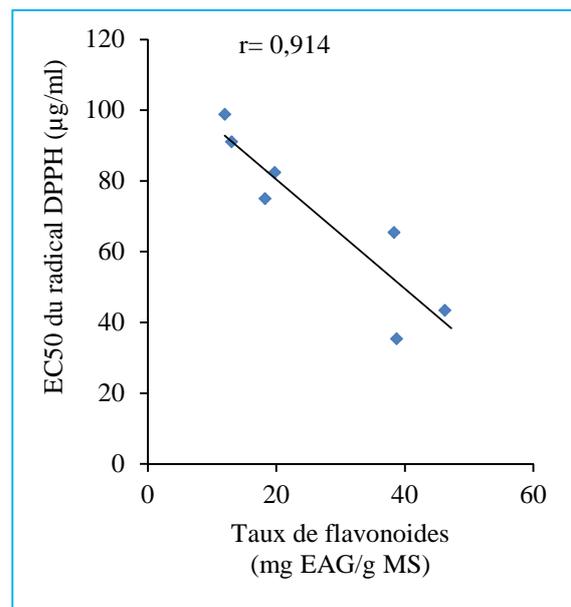
b)



c)



d)



**Figure 31 :** Relation entre l'efficacité scavenging du radical DPPH (EC50) et les taux en polyphénol totaux (a et b) et en flavonoïdes (c et d) des extraits méthanoliques (a et c) et des extraits aqueux (b et d) des feuilles de citrus.

### III.3.2. Activité scavenging du radicale ABTS

Afin de valider les résultats de l'efficacité antioxydants de nos extraits de citrus obtenus précédemment par test anti-radicalaire du DPPH, nous avons utilisés un 2<sup>ème</sup> test basé sur la capacité de piégeage du proton du radical cationique ABTS (**Van-denBerg *et al.*, 2000**).

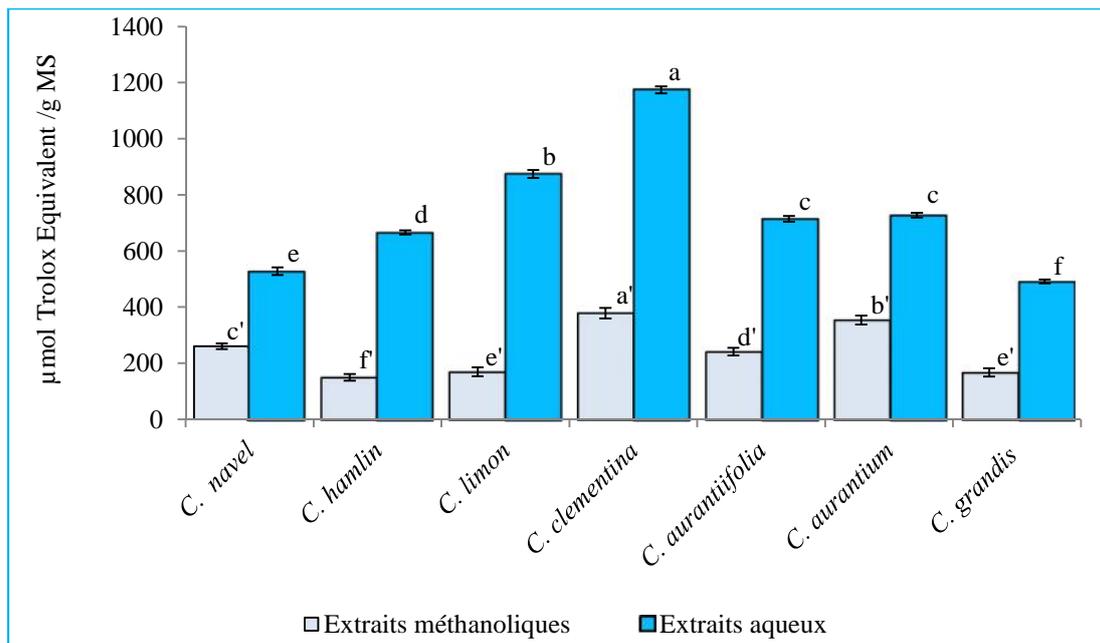
Les résultats du tableau XIV indiquent que pour une concentration de 0,1 mg/ml, le pourcentage d'inhibition du radical ABTS par les extraits méthanoliques des feuilles des citrus étudiées, varie entre 50,38 à 67,33 %. Par contre dans le cas des extraits aqueux, il varie de 56,29 à 84,98 % avec des différences significatives ( $p < 0,05$ ) d'une espèce à une autre et d'un extraits à un autre. Les concentrations efficaces pour piéger 50% du radical ABTS (EC50) des différents extraits de citrus étudiés sont comprises entre 32,65 et 100 µg/ml. Toutefois, l'efficacité anti-radicalaires des extraits aqueux est légèrement meilleure quelque soit l'espèce. Les extraits aqueux de *C. limon* et *C. clementina* enregistrent les activités anti radical-ABTS les plus élevées avec des EC50 de 32,65 et 37,60 µg/ml respectivement, tandis que l'extrait méthanolique de *C. grands* enregistre la plus faible activité (EC50 = 100µg/ml).

**Tableau XIV** : Activité scavenging du radicale ABTS des extraits de feuilles de citrus.

Espèces Etudiées	Pourcentage d'inhibition (%)		EC50 (µg/ml)	
	Extraits méthanoliques (0,1mg/ml)	Extraits aqueux (0,1mg/ml)	Extraits méthanoliques	Extraits aqueux
<i>C. clementina</i>	57,14	82,44	84,07	37,60
<i>C. limon</i>	62,82	84,94	53,94	32,65
<i>C. navel</i>	54,92	56,29	91,56	82,84
<i>C. aurantiifolia</i>	67,33	70,46	66,36	58,49
<i>C. aurantium</i>	59,48	72,05	78,21	55,17
<i>C. hamlin</i>	60,41	74,42	79,08	59,42
<i>C. grandis</i>	50,38	67,24	100,03	66,76

Pour pouvoir comparer l'efficacité antioxydante de nos extraits, avalée par le test ABTS, à des antioxydants naturels (comme δ-tocophérol, flavonoïdes et flavones, caroténoïdes et acide L-ascorbique) (**Moure *et al.*, 2001**), ou de synthèse comme 3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène (BHT); le 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (BHA) ou le

tertiobutylhydroxyquinone (TBHQ), l'efficacité anti-radicalaire a été exprimé en TEAC « Trolox Equivalent Antioxydant Capacity » où le trolox est une substance identique à la vitamine E ( $\delta$ -tocophérol). Plus la valeur de TEAC est grande plus l'antioxydant est puissant (Djeridane *et al.*, 2006). L'expression de l'activité scavenging du radical ABTS des extraits des feuilles de citrus en mM TEAC par g de matière sèche (Figure 32) montre que l'activité antioxydante des extraits aqueux est fortement plus importante que celle des extraits méthanoliques.



**Figure 32** : Activité scavenging vis-à-vis du radical ABTS des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais ( $n=3$ ). Les valeurs portant des lettres différentes sont différents significativement ( $P < 0,05$ ), les barres verticales représentent les écarts types.

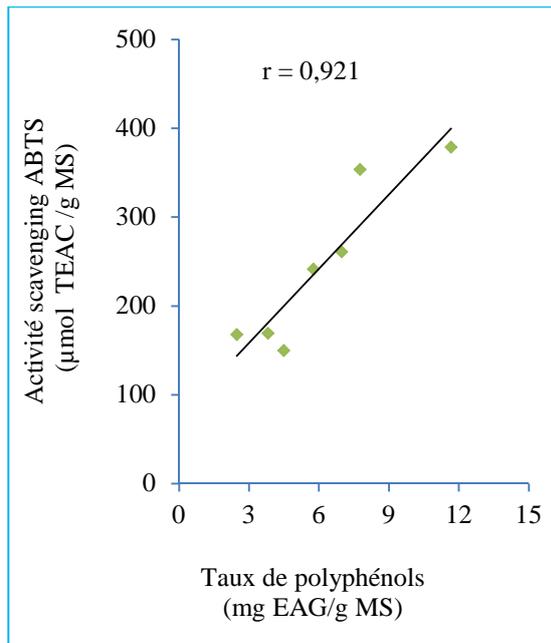
Les valeurs TEAC pour les extraits aqueux des citrus varient entre  $491,631 \pm 14,89$  et  $1174,332 \pm 5,814$   $\mu\text{mol}$  de trolox/g. Par contre, les extraits méthanoliques affichent des valeurs de TEAC allant de  $149,832 \pm 11,695$  jusqu'à  $378,630 \pm 1,607$   $\mu\text{mol}$  de trolox/g MS. Les activités scavenger du radical ABTS des extraits de citrus sont plus faibles que ceux obtenus pour des antioxydants de référence tel que l'acide caféique, acide gallique, quercétine, rutine, BHA, BHT et TBHQ. En effet, il a été rapporté que ces derniers présentent des valeurs de TEAC comprises entre 2,56 et 22,3 mM trolox/g (Olszewska *et al.*, 2012).

La relation entre la teneur en polyphénols totaux ou en flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire de l'ABTS est illustrée dans la figure 33. Les coefficients de corrélation pour les

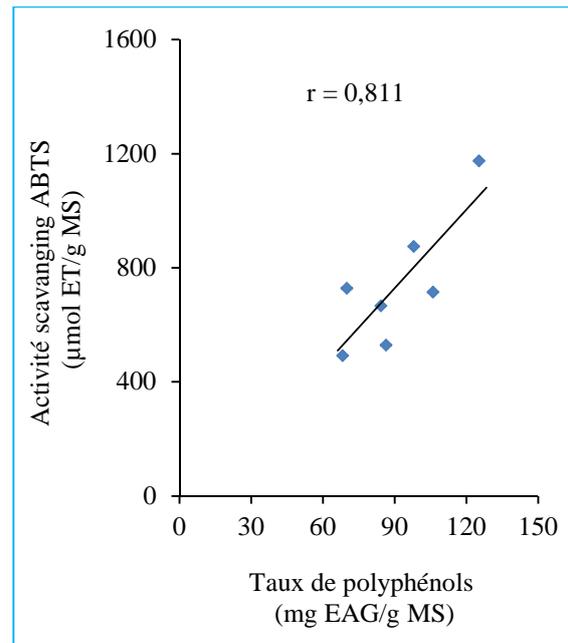
polyphénols ( $r= 0,921$  pour les extraits méthanoliques et  $r= 0,811$  pour les extraits aqueux) ou pour les flavonoïdes ( $r= 0,888$  pour les extraits méthanoliques et  $r= 0,795$  pour les extraits aqueux) attestent que le degré de dépendance entre ces composés phénoliques et le pouvoir antioxydants des extraits de citrus est très élevé. Pour l'extrait aqueux comme pour l'extrait méthanolique, il apparait donc clairement que ce sont les flavonoïdes qui jouent un rôle prépondérant dans l'activité antioxydante.

Des travaux montrant l'implication des composés phénoliques notamment les flavonoïdes dans l'activité scavenger du radical ont été rapportés. **Floegel et al. (2011)** montrent l'existence d'une corrélation positive entre les l'activité scavenging du radical cationique ABTS et la teneur en composés phénoliques ( $r= 0,946$ ) dont 72 % de l'activité scavenging est réalisé par les flavonoïdes.

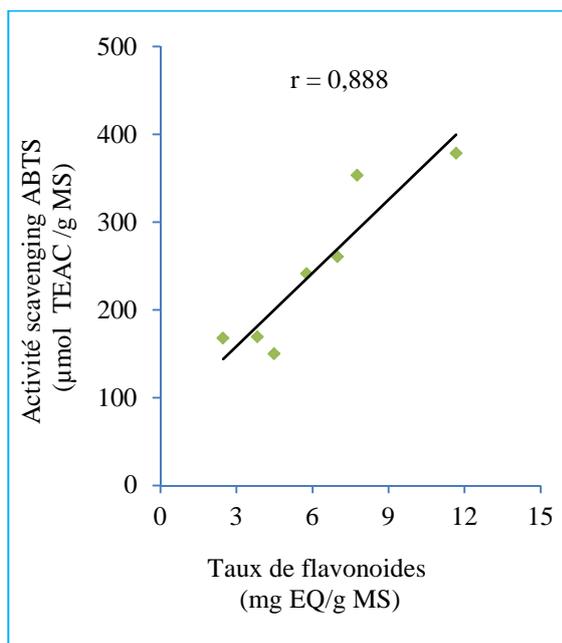
Même si les polyphénols sont les composés qui réalisent en majorité de l'activité antioxydante, il est important de signaler que l'activité antioxydante réalisée peut être attribuée ou influencée par des composés non phénoliques tels que les lipides, les sucres et la chlorophylle. L'étude menée par **Heim et al. (2002)** montre que les groupements hydroxyles des composés phénoliques et flavonoïdes jouent un rôle très important dans le pouvoir antioxydant. Alors que les travaux de **Naczk et Shahidi (2004)** montrent que les flavonoïdes aglycones sont plus actifs que les formes glycosylées. Par contre **Zheng et Wang (2001)** ont rapporté que l'activité antioxydante des composés phénoliques est essentiellement due aux nombres de groupements hydroxyles et leurs positions sur le cycle aromatique.



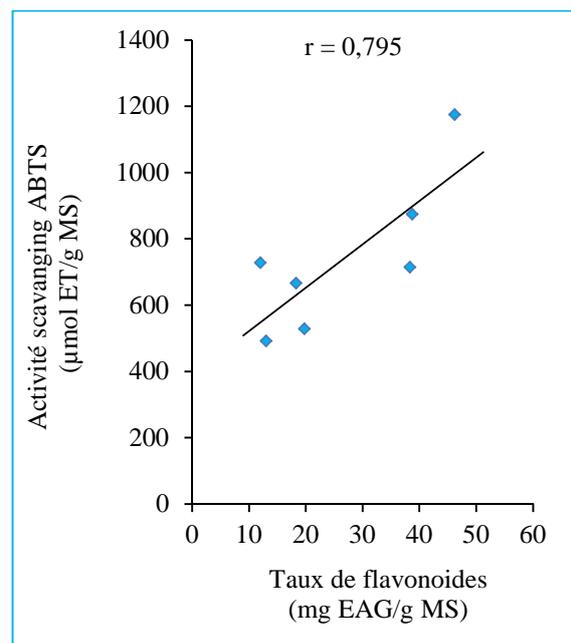
-a-



-b-



-c-

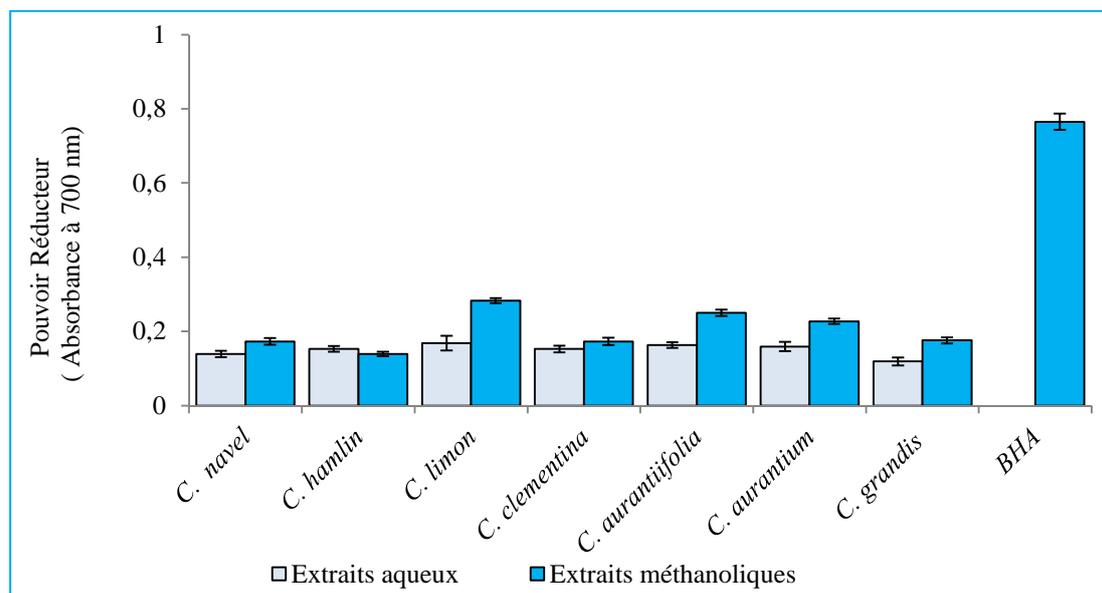


-d-

**Figure 33 :** Relation entre l'efficacité scavenging du radical ABTS et les taux en polyphénols totaux (a et b) et en flavonoïdes (c et d) des extraits méthanoliques (a et c) et des extraits aqueux (b et d) des feuilles de citrus.

### III.3.3. Test de la réduction du fer (FRAP)

En plus des méthodes précédemment décrites, l'activité antioxydante a été évaluée par le test FRAP basé sur la capacité des extraits à réduire les ions fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ions de fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). La réduction du fer ferrique s'accompagne d'un changement de couleur du jaune vers le bleu vert. L'intensité de la couleur dépend du potentiel réducteur des composés présents dans le milieu réactionnel (Zou *et al.*, 2004). Pour une même concentration d'extraits aqueux et méthanoliques (0,2 mg/ml), l'activité FRAP des extraits de citrus évaluée par la variation d'absorbance à 700 est nettement inférieure à celle du standard (figure 34).



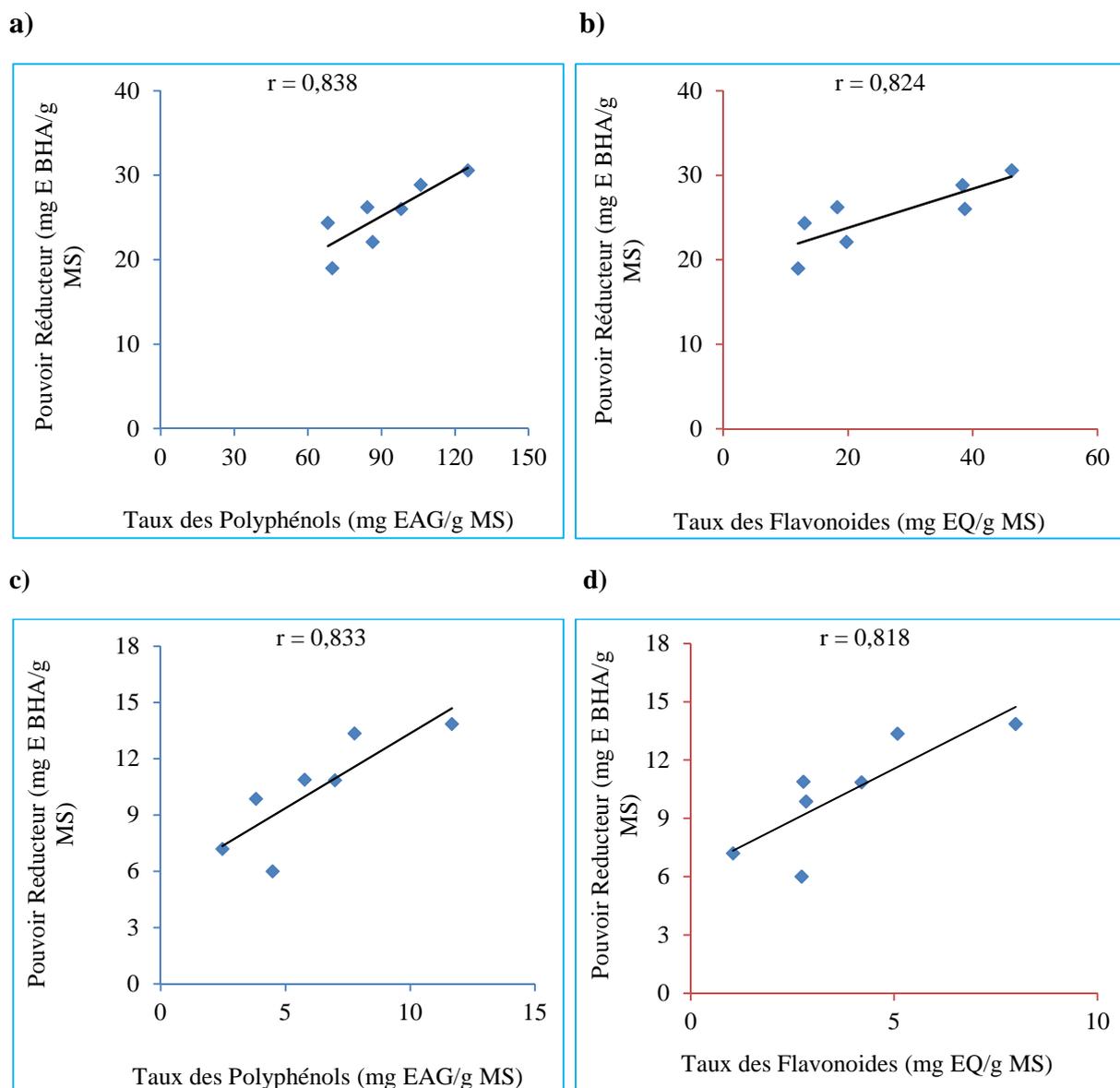
**Figure 34 :** Pouvoir réducteur des extraits méthanolique et aqueux des feuilles de citrus. Les extraits de citrus à 0,2 mg/ml, et du standard BHA à 0,1 mg/ml. Les barres verticales représentent les écarts types. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3).

Selon les résultats obtenus (Figure 30), la capacité réductrice des extraits aqueux de citrus sont classées par ordre décroissant comme suite : *C. limon* *C. aurantiifolia* *C. aurantium* *C. hamlin* *C. clementina* *C. navel* *C. grandis*. Alors que la capacité réductrice des extraits méthanoliques de citrus sont classées par ordre décroissant comme suite : *C. limon* *C. aurantiifolia* *C. aurantium* *C. clementina* *C. Thomson navel* *C. grandis* *C. hamlin*.

Nos résultats sont en accord avec des études antérieures, celles obtenus par **Lagha-Benamrouche et Madani (2013)** indiquent que les extraits méthanoliques des feuilles du *C. aurantium* sont doté d'un pouvoir réducteur plus élevée que celui des feuilles de quelques variétés d'orangers douce (Thomson navel, Washington, Portugaise,...). Nos résultats

confirment également, ce qui à été avancé par d'autres études (**Karimi *et al.*, 2012**) stipulant que le potentiel réducteur est due à la nature des antioxydants présents dans chaque extrait.

Comme pour les deux tests d'évaluation de l'activité antioxydante DPPH et ABTS, une corrélation positive entre le pouvoir réducteur (exprimé en mg équivalent BHA par g de matière sèche) et le taux de composés phénoliques a été obtenue (figure 35). D'après cette analyse, le pouvoir réducteur des extraits aqueux ou organiques est due à 83 % aux polyphénols, et principalement aux flavonoïdes ( $r=0,82$ ).



**Figure 35 :** Relation entre l'activité FRAP et les taux en polyphénols totaux (a et c) et en flavonoïdes (b et d) des extraits aqueux (a et b) et des extraits méthanoliques (c et d) des feuilles de citrus.

### III.4. Relation entre les différentes activités antioxydantes

La détermination de l'activité antioxydante nécessite de nombreux tests. Toutefois, il est nécessaire de réduire le temps d'expérimentation, afin de pouvoir mettre en place une méthode de sélection non biaisée, nous avons choisis de comparer les coefficients de corrélation précédemment identifié dans notre étude. Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux XV et XVI.

**Tableau XV :** Coefficients de corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, DPPH, ABTS et pouvoir réducteur des extraits méthanoliques.

Variables	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	DPPH	ABTS	Pouvoir réducteur
<b>Polyphénols totaux</b>	1				
<b>Flavonoïdes</b>	0,939	1			
<b>DPPH</b>	0,872	0,936	1		
<b>ABTS</b>	0,921	0,888	0,813	1	
<b>Pouvoir réducteur</b>	0,824	0,838	0,75	0,93	1

**Tableau XVI :** Coefficients de corrélation entre polyphénols, flavonoïdes, DPPH, ABTS et pouvoir réducteur des extraits aqueux.

Variables	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	DPPH	ABTS	Pouvoir réducteur
<b>Polyphénols totaux</b>	1				
<b>Flavonoïdes</b>	0,956	1			
<b>DPPH</b>	0,829	0,914	1		
<b>ABTS</b>	0,811	0,795	0,751	1	
<b>Pouvoir réducteur</b>	0,818	0,833	0,720	0,592	1

Ces résultats montrent que pour les extraits méthanoliques, il existe une bonne corrélation entre la présence de flavonoïdes, le pouvoir réducteur et l'activité antioxydante avec des coefficients de corrélations allant de 0,838 jusqu'à 0,936.

Ces résultats nous ont permis de conclure que pour les extraits méthanoliques, l'activité antioxydante des composés phénoliques est réalisée en grande partie par les flavonoïdes. Pour les extraits aqueux, malgré la présence des flavonoïdes, on constate que le pouvoir des polyphénols est semblable à ce qui a été obtenu en utilisant les extraits méthanoliques. Cela suggère que des composés phénoliques de type flavonoïdes sont présents de façon différentielle entre les deux extraits.

Une forte corrélation entre le test ABTS et DPPH ainsi que le test FRAP (0,813 et 0,93 ; respectivement) a été remarquée dans les extraits méthanoliques. Dans les extraits aqueux ces corrélations sont beaucoup moins importantes (0,751 et 0,592 ; respectivement).

**Hayes et al. (2011)** ont constatés les mêmes résultats de corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire et le pouvoir réducteur. D'après **Singh et Rajini (2004)** cette corrélation est due à l'existence des molécules bioactives dotés des propriétés réductrices et anti-radicalaires fortes. Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs montrant l'existence d'une bonne corrélation entre les polyphénols totaux et les activités antioxydantes des extraits de plantes (**Calabro et al., 2004 ; Floegel et al., 2011**) notamment les extraits d'espèces de citrus (**Jayaprakasha et al., 2008 ; Tawaha et al., 2007**).

### III.5. Activité anti-enzymatique

#### III.5.1. Activité anti-péroxydase

##### *i-Effets anti-péroxydase des extraits méthanoliques des feuilles de citrus*

Afin d'analyser les effets anti-péroxydase de nos extraits de citrus, nous avons précédé à l'évaluation de l'efficacité des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus sur l'activité de l'extrait péroxydasique de différentes sources de légumes-feuilles. Nous avons observé que le taux d'activité péroxydasique diffère selon la source enzymatique utilisée. Il est apparu ainsi que l'extrait enzymatique du chou et plus particulièrement le chou rouge présente le taux d'activité péroxydase le plus élevé. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Alikhani et al. (2009a)** et **Ponce et al. (2004)**. La différence en termes d'efficacité catalytique des POD de différents végétaux est attribuée en générale à l'affinité de ces enzymes au substrat, à la présence de plusieurs formes enzymatiques dans les mêmes végétaux et/ou aux variations des paramètres du milieu réactionnel.

D'après les résultats du tableau XVII, Les extraits méthanoliques des différentes espèces de citrus inhibent l'activité peroxydase. Le taux d'inhibition varie selon l'espèce de citrus et selon la source enzymatique. Ainsi, quelque soit la source enzymatique, pour une même concentration (1 mg/ml), les extraits de *C. limon*, *C. clementina*, *C. aurantium*, *C. hamlin* et *C. aurantiifolia* présentent des taux d'inhibition de 19,44 à 60,80 %. Toute fois, les activités inhibitrices de la peroxydase par les extraits de feuilles des citrus restent de loin inférieurs à celles obtenus avec des polyphénols standards (l'acide gallique et la quercétine) (tableaux XVII). Quant aux extraits méthanoliques de *C. navel* et *C. grandis*, ils n'ont pas d'effet sur l'activité peroxydase de feuille d'épinard. Le meilleur taux d'inhibition (60,80 %) a été enregistré pour l'extrait méthanolique de *C. aurantiifolia* sur l'activité de laitue.

**Tableau XVII :** Effets des extraits méthanoliques des feuilles de citrus sur l'activité des POD.

Extraits	Taux d'inhibition de l'activité peroxydase par 100µg/ml d'extraits aqueux de citrus ou de polyphénols (%)				
	Chou rouge (15µl/ml)	Chou vert (65µl/ml)	Cardon (150µl/ml)	Laitue (300µl/ml)	Epinard (300µl/ml)
<i>C. limon</i>	50,50	50,63	23,40	53,53	36,63
<i>C. clementina</i>	31,06	27,60	23,96	54,06	22,00
<i>C. aurantium</i>	20,50	28,85	27,09	47,61	19,44
<i>C. hamlin</i>	32,02	13,72	04,42	33,79	17,21
<i>C. aurantiifolia</i>	24,98	21,13	19,76	60,80	19,49
<i>C. navel</i>	29,56	03,78	17,18	29,93	02,28
<i>C. grandis</i>	14,32	10,10	18,52	17,04	00,82
<i>Acide gallique</i>	81,38	90,13	89,52	82,35	87,39
<i>Quercétine</i>	89,48	93,59	95,8	95,98	90,12

L'efficacité inhibitrice de la peroxydase a été évaluée par la détermination des IC50 «Concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer de 50% de l'activité enzymatique». Il apparaît d'après les résultats obtenus (tableau XVIII), que les espèces dont l'extrait méthanolique des feuilles présente la meilleure efficacité d'inhiber l'activité peroxydase sont *C. Limon* et *C. clementina*, avec des IC50 de 110,28-179,36 µg/ml et 141,67-155,10 µg/ml respectivement. L'efficacité anti-peroxydase des extraits de ces deux espèces de citrus reste

toute fois plus faible par rapport à celle de l'acide gallique et quercétine, dont les IC50 sont de 3,87 à 10,88 µg/ml respectivement.

**Tableau XVIII :** IC50 des extraits méthanoliques des feuilles de citrus sur l'activité des POD.

Extraits	IC50 (µg/ml)				
	Chou rouge (15µl/ml)	Chou vert (65µl/ml)	Cardon (150µl/ml)	Laitue (300µl/ml)	Epinard (300µl/ml)
<i>C. limon</i>	132,5	132,5	-	110,28	179,36
<i>C. clémentina</i>	151,41	141,67	-	151,52	155,1
<i>C. aurantium</i>	182,35	160,25	-	156,01	193,56
<i>C. hamlin</i>	163,96	242,87	-	251,5	275,23
<i>C. aurantiifolia</i>	178,28	188,29	-	113,42	200,22
<i>C. navel</i>	164,23	-	-	261,74	-
<i>C. grandis</i>	212,79	-	-	-	-
<i>A. gallique</i>	4,54	4,16	8,40	10,88	6,54
<i>Quercétine</i>	4,21	4,136	4,06	03,87	7,35

### ii-Effet anti-peroxydase des extraits aqueux des feuilles de citrus

D'après les résultats obtenus de l'étude d'inhibitions de la peroxydase, on observe que les extraits aqueux des feuilles de différentes espèces de citrus étudiées exercent des activités inhibitrices de l'activité des peroxydases extraites de la quasi-totalité des légumes-feuilles (tableau XIX). Pour une concentration d'extrait aqueux de citrus de 100 µg/ml, les taux d'inhibition observés varient selon l'espèce de citrus testés et la source végétale d'enzyme. À l'exception de l'extrait peroxydase de laitue où seul l'extrait aqueux *C. clementina* a une activité enzymatique inhibitrice (18,75 %), les activités peroxydases des autres légumes-feuilles sont inhibées par la quasi-totalité des extraits des citrus testés avec des taux variables. Ainsi, l'activité peroxydase du cardon est inhibée par les extraits aqueux des six espèces de citrus avec des taux d'inhibition variant de 16,75 % (*C. hamlin*) à 38,61 % (*C. clementina*). À signaler que le meilleur taux d'inhibition (53,45 %) est obtenu par l'extrait de *C. clementina* sur la peroxydase du chou rouge, alors que les taux les plus faibles sont obtenus par les extraits de *C. grandis* (2,65 %) et *C. aurantiifolia* (0,29 %) sur les peroxydases du chou vert et de l'épinard, respectivement. Toutes fois, ces taux d'inhibition sont largement inférieurs à

ceux obtenus par les antioxydants phénoliques, la quercétine et l'acide gallique qui sont supérieurs à 77 % (tableaux XIX).

**Tableau XIX :** Effets des extraits aqueux des feuilles de citrus sur l'activité des POD.

Extraits	Taux d'inhibition de l'activité peroxydase par 100µg/ml d'extraits aqueux de citrus ou de polyphenols (%)				
	Chou rouge (15µl/ml)	Chou vert (65µl/)	Cardon (150µl/ml)	Laitue (300µl/ml)	Epinard (300µl/ml)
<i>C. limon</i>	26,43	25,83	28,65	00	29,39
<i>C. clementina</i>	53,45	26,00	38,61	18,74	31,85
<i>C. aurantium</i>	04,57	04,72	31,05	00	12,01
<i>C. hamlin</i>	12,14	06,04	16,74	00	06,89
<i>C. aurantiifolia</i>	15,94	11,54	25,60	00	00,29
<i>C. navel</i>	08,00	05,06	25,47	00	20,02
<i>C. grandis</i>	19,86	02,65	27,57	00	22,17
<i>Acide gallique</i>	79,64	84,93	79,21	77,22	87,92
<i>Quercétine</i>	88,49	92,31	91,79	88,99	93,05

Des effets inhibiteurs de la peroxydase d'origine végétale ont été observés pour des extraits de plantes mais essentiellement par leurs huiles essentielles. Ainsi, **Ponce et al. (2004)** ont montré que les huiles essentielles de *C. limon* inhibent l'activité peroxydase de chou, de cardon, d'épinard et de laitue. Les études réalisées par **Mousavizadeh et al. (2011)**, **Alikhani et al. (2009a)** et **Ponce et al. (2004)** montrèrent une différence d'efficacité inhibitrice de l'activité de peroxydase de chou des extraits de plantes de genres différents de citrus.

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet des extraits aqueux ou méthanoliques des différentes espèces de citrus sur l'activité peroxydase de différent légumes-feuilles ont montré que l'efficacité inhibitrice des extraits méthanoliques est meilleure que celle des extraits aqueux. En effet, Les concentrations nécessaires à inhiber 50 % de l'activité des peroxydases avec les extraits aqueux, sont presque deux fois supérieures à celles utilisées par les extraits méthanoliques. Les potentiels d'inhibition différents de nos extraits peuvent être attribués à la

présence et à la variabilité en substances bioactives en termes de nature et de quantité. D'autre part, que ce soit pour les extraits méthanolique ou aqueux de citrus, l'efficacité d'inhibition dépend aussi de la source de l'extrait enzymatique utilisée. Cette variabilité d'action peut s'expliquer par l'existence de plusieurs formes d'enzymes (iso-enzymes) dans un même végétal et au niveau d'un même tissu, ainsi que par la différence de leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques. Le pH et la température des milieux réactionnels peuvent influencer également la spécificité des POD d'une manière non négligeable (**Lee et Klein, 1989 ; Shannon et al., 1996**).

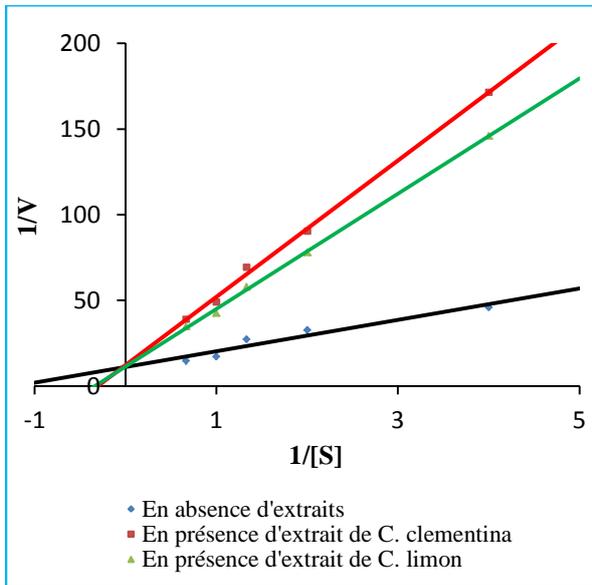
### *iii- Mode d'action des extraits de C. limon et C. clementina*

Les extraits des feuilles de *C. clementina* et *C. limon* étant les inhibiteurs de la POD les plus efficaces, nous avons cherché à établir leurs modes d'action par l'étude de leurs types d'inhibition. L'étude a été réalisée sur les peroxydases de chou vert et du chou rouge. Les résultats obtenus (**figure**) montrent que les extraits de *C. clementina* agissent comme inhibiteurs compétitifs sur la POD alors que les extraits de *C. limon* agissent comme inhibiteurs in-compétitifs ou compétitifs selon que l'extrait est méthanolique ou aqueux. Les extraits méthanoliques et aqueux de *C. clementina* qui sont des inhibiteurs compétitifs de la POD contiennent probablement des composés phénoliques qui sont des analogues structuraux du substrat de la peroxydase (le gaïacol). Ces composés se lient de manière réversible au site actif de l'enzyme et bloquent ainsi l'accès du substrat au site enzymatique.

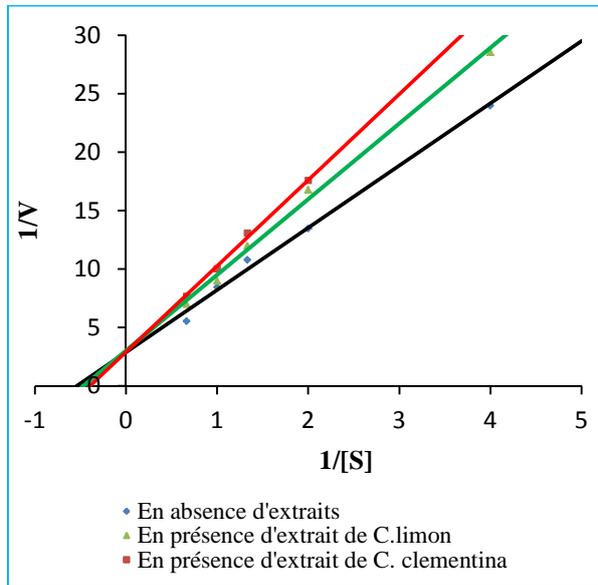
L'extrait méthanolique de *C. limon* montre une activité inhibitrice de type compétitif sur la peroxydase des deux choux. Cet effet est probablement dû à la présence dans ces extraits de composés qui peuvent entrer en compétition avec le substrat pour l'occupation du site actif de l'enzyme. Quant à l'extrait aqueux de *C. limon*, il présente une activité inhibitrice de type in-compétitif sur aussi bien la POD du chou vert que sur la POD du chou rouge. Les composés actifs de l'extrait aqueux qui sont responsables ne présentent donc pas d'analogie structurale avec le substrat et ne se lient qu'à l'enzyme préalablement complexée au substrat.

Les différents modes d'actions de ces extraits sont probablement dus à la différence dans la composition globale en composés phénoliques comme l'atteste les profils spectraux UV/Vis (figures 25 et 26) et les chromatogrammes HPLC (annexe IV).

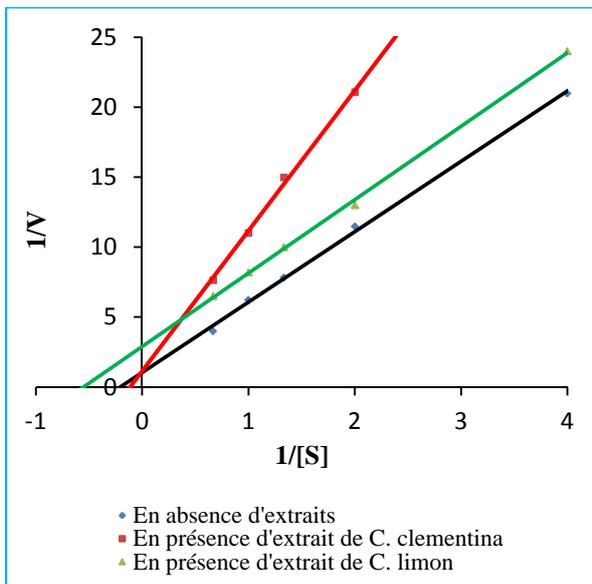
a)



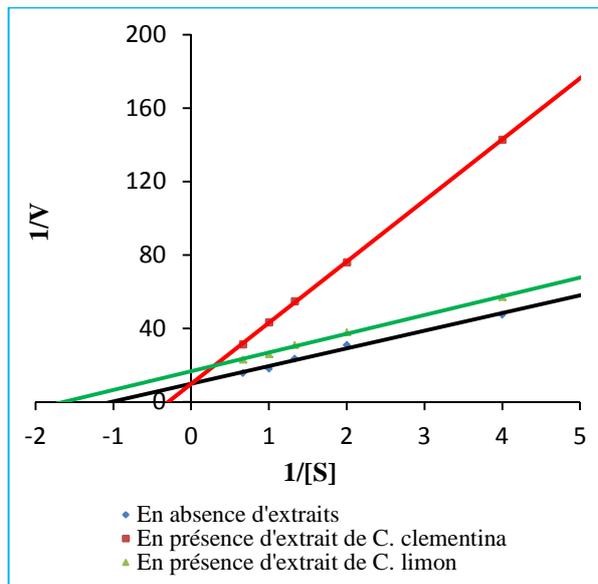
b)



c)



d)



**Figure 36 :** Représentation selon Lineweaver et Burk de type d'inhibition.

- Extraits méthanoliques avec peroxydases (a) de chou vert ; (b) de chou rouge ;
- Extrait aqueux avec peroxydase (c) de chou rouge ; (d) de chou vert.

### III.5.2 Activité anti-polyphénoloxydase

L'activité anti-PPO des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles de citrus a été testé pour les PPO de 5 légumes à feuillettes à savoir, le chou rouge, chou vert, cardon, laitue et l'épinard. Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques ne présentent aucun effet inhibiteur de l'activité PPO même à concentration élevée (1mg/ml) quelque soit la source de l'enzyme. Cependant, en présence des extraits aqueux ont observé une diminution de l'activité de ces enzymes, elle varie en fonction de la source d'enzymes et de l'espèce de citrus (tableau XX). Pour une concentration d'extrait de citrus de 500 µg/ml, les taux d'inhibition les plus importants sont largement plus faibles que ceux dû à l'acide ascorbique (73%-86,86 %) (tableau XX).

**Tableaux XX :** Effets des extraits aqueux des feuilles de citrus sur l'activité des PPO.

Extraits	Taux d'inhibition des PPO par les extraits aqueux de citrus (%)				
	Chou rouge (15µl/ml)	Chou vert (65µl/)	Cardon (150µl/ml)	Laitue (300µl/ml)	Epinard (300µl/ml)
<i>C. limon</i>	<b>21,73</b>	01,06	04,30	<b>12,66</b>	<b>21,67</b>
<i>C. clementina</i>	01,62	<b>10,29</b>	00	<b>11,90</b>	<b>13,67</b>
<i>C. aurantium</i>	<b>23,00</b>	05,43	00	<b>22,53</b>	04,94
<i>C. hamlin</i>	<b>11,54</b>	01,50	00	<b>19,66</b>	02,26
<i>C. aurantiifolia</i>	08,36	09,81	04,15	<b>15,46</b>	<b>21,49</b>
<i>C. navel</i>	<b>17,91</b>	03,67	01,83	<b>19,31</b>	<b>14,58</b>
<i>C. grandis</i>	<b>30,64</b>	08,05	02,22	<b>14,08</b>	00,19
<i>A. ascorbique</i>	80,27	86,86	85,26	73,30	77,23

D'après les résultats obtenus, les extraits aqueux des six espèces de citrus inhibent la PPO de laitue avec des taux de 11,9 % (*C. clementina*) à 22,66 % (*C. aurantium*). Alors, que pour la PPO de cardon et du chou vert, les extraits de citrus présentent peu ou pas d'activité inhibitrice (00 %-10,29 %). Pour les PPO de chou rouge et d'épinard, les taux d'inhibition pour la quasi-totalité des extraits de citrus varient de 10 % à 20 %. Avec le taux d'inhibition le plus élevé de l'extrait de *C. grandis* pour PPO de chou rouge (30,64 %).

Des études antérieures ont démontrées que les antioxydants naturels agissent comme des inhibiteurs des PPO de fruits et de légumes. Au contraire des résultats que nous avons obtenus pour les extraits de citrus, des travaux ont rapportés que les extraits d'autres plantes ont une meilleure efficacité inhibitrice de la PPO. L'étude réalisée par **Kim *et al.* (2005)** montre que les extraits d'oignon diminuent le taux du brunissement de la poire avec une efficacité allant jusqu'à 54,1 % en inhibant l'activité de la PPO. Ces résultats sont confortés par les travaux de **Lee *et al.* (2007)** qui ont montré que la PPO de taro est inhibée par les extraits d'oignon avec des taux de 54,8 % jusqu'à 68,5 %. D'autres études ont également rapporté des effets similaires lors de l'utilisation d'extraits naturels sur l'activité des PPO de plantes (**Espin *et al.*, 1999 ; Jang *et al.*, 2002**).

La différence de taux d'inhibition d'un extrait à un autre et d'une source enzymatique à une autre, peut s'expliquer par la présence de plusieurs formes d'enzyme (iso-enzymes) dans l'extrait enzymatique qui présentent des spécificités et des propriétés structurales et physico-chimiques variables (**Schmitz *et al.*, 2008**) et/ou par la nature des molécules actives des extraits inhibiteurs d'origine végétale.

## Conclusion

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité antioxydante et de l'activité anti-peroxydase et anti-polyphénoloxydase des extraits de feuilles de différentes espèces de citrus. Pour cela, nous avons opté pour une extraction par macération, en utilisant deux solvants, l'eau et le méthanol. Les résultats obtenus de l'extraction indiquent que l'eau est qualitativement et quantitativement un meilleur solvant d'extraction d'antioxydants que le méthanol. En effet, quelque soit l'espèce de citrus utilisée, l'extrait aqueux est plus riche en antioxydants de nature polyphénolique, principalement flavonoïdique, que l'extrait méthanolique. Une très bonne corrélation linéaire a été observée entre l'activité antioxydante évaluée par les tests DPPH, ABTS et FRAP et la teneur en composés phénoliques de l'extrait aqueux des feuilles d'agrumes analysées. Les teneurs en polyphénol totaux varient de  $02,477 \pm 0,34$  à  $11,668 \pm 1,46$  mg EAG/g de MS pour les extraits méthanoliques, tandis que les teneurs de ces composés dans les extraits aqueux sont plus importantes avec des concentrations allant de  $68,23 \pm 4,32$  à  $125,287 \pm 4,155$  mg EAG/g de MS. Et comme l'indique l'analyse statistique de corrélation, il semblerait que les composés phénoliques, aussi bien dans l'extrait aqueux que méthanolique, sont des flavonoïdes ( $r=0,956$  et  $r=0,939$  respectivement). L'évaluation de l'effet antioxydant de nos extraits méthanoliques et aqueux de feuilles par mesure de l'activité anti-radicalaire (test DPPH et test ABTS) a montré que les extraits aqueux ont des meilleures activités antioxydantes que les extraits méthanoliques quelque soit l'espèce de citrus. La meilleure activité anti-radicalaire a été observée pour les extraits aqueux de *C. limon* et *C. clementina* avec des EC50 pour piéger le radical DPPH de  $35,35 \mu\text{g/ml}$  et  $43,4 \mu\text{g/ml}$  respectivement et pour piéger le radical ABTS de  $32,65 \mu\text{g/ml}$  et  $37,60 \mu\text{g/ml}$  respectivement. Cependant, la quasi-totalité des différentes espèces de citrus présentent un pouvoir reducteur (test FRAP) de même ordre de grandeur que ce soit pour l'extrait aqueux que pour l'extrait méthanolique de leurs feuilles. Toutes fois, et bien que son activité reductrice soit largement inférieure à celle de la BHA, l'extrait méthanolique des feuilles de *C. limon*, présente le plus fort taux réducteur.

D'autre part, nous avons évalué l'effet anti-peroxydase et anti-polyphénoloxydase, enzymes impliquées dans le brunissement enzymatique, des extraits de feuilles des différentes espèces de citrus. Il a été démontré que la majorité des extraits méthanoliques ou aqueux des

citrus présentent un effet inhibiteur des peroxydases extraites de différents légumes à feuillettes. Les extraits de *C. clementina* (clémentinier) et de *C. limon* (citronnier) présentent la meilleure efficacité inhibitrice (IC50 allant de 110 à 180 µg/ml) avec néanmoins, une plus grande efficacité pour les extraits méthanoliques. Par contre, dans le cas de la PPO, seuls les extraits aqueux des citrus présentent un effet anti-PPO qui varie selon la source végétale enzymatique et l'espèce de citrus utilisée. Pour une concentration maximale d'extraits aqueux (500 µg/ml) et à l'exception de l'extrait de *C. grandis* dont le taux d'inhibition est de 30,6%, les taux d'inhibition des PPO ne dépassent pas 23%.

De cette étude, il semblerait que les feuilles de citrus, notamment celles de *C. limon* et *C. clementina*, constituent une bonne source de molécules bioactives à effet antioxydant. Il est donc intéressant de valoriser cette source végétale par l'application de ces métabolites dans les domaines pharmacologiques et cosmétiques pour traiter des pathologies liées au stress oxydative et pour retarder le vieillissement cellulaire par exemple. D'autre part, l'efficacité inhibitrice des activités peroxydase et polyphénoloxydase, notamment pour les extraits aqueux de leur feuilles fait que les citrus peuvent présenter une bonne source de biomolécules à valoriser en application agroalimentaire pour leurs effets anti-brunissement enzymatique principalement lors de la conservation et/ou lors des processus biotechnologiques de transformation des fruits et des légumes.

Il serait donc intéressant de procéder à une caractérisation qualitative, des extraits des feuilles de citrus principalement en métabolites de type secondaire comme les polyphénols, flavonoïdes et autres. Puis identifier et isoler les principes actifs responsables des effets antioxydant et anti-enzymatique.

## Références Bibliographiques

- **Abd Ghafar, M.F., Nagendra, M., Prasad, K., Weng, K.K., & Ismail, A. (2010).** Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *Af J Biotechnol*, 9 (3): 326-330.
- **Acosta, M., Arnao, M.B., Sanchez, B.J., Casas, J.L., Voique, B., Fernandez-Maculet, J.C., Castellano, J.M., Pech, J.C., Latche, A., & Balague, C. (1993).** Mechanistic aspects of ACC oxidation to ethylene. Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Proceedings of the International Symposium on Cellular and Molecular Aspects of Biosynthesis and Action of the Plant Hormone Ethylene, Agen, France, 1: 53-58.
- **Agocs, A., Nagy, V., Szabo, Z., Mark, L., Ohmacht, R., & Deli, J. (2007).** Comparative study on the carotenoids composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Sci Emerg Technol*. Sous presse.
- **Alikhani, M., Sharifani, M., Mousavizadeh, S.J., & Azizi, M. (2009a).** The antioxidative activity of some essential oils in reducing peroxidase activity and enzymatic browning in some vegetables. *J Agric Sci Nat Resour*, 16 (2): 203-207.
- **Allemana, I., Couvert-Mullot, H., Béranger, C., & Gisserot, O. (2010).** Prise en charge du cancer du sein en cas de récepteurs hormonaux négatifs :Therapeutic options for hormone receptor negative breast cancers. *Hosp Pharm*, 45 (1): 25-32.
- **Al-Senaidy, A.M., & Ismael, M.A. (2011).** Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi J Biol Sci*, 18: 293-298.
- **Altunkaya, A., & Gokmen, V. (2008).** Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem*, 107: 1173-1179.
- **Altunkaya, A., & Gokmen, V. (2011).** Purification and characterization of polyphenol oxidase, peroxidase and lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (*Lettuce sativa*). *Food Technol Biotechnol*, 49 (2): 249-256.
- **Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. (2004).** Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 84: 551-562.
- **Anderson, D.W., & Nicholson, R.L. (1996).** Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, 88: 996-1002.
- **Aniszewnicki, T., Lieberei, R., & Gulewicz, K. (2008).** Research on catecholases, laccases and cresolases in plants.Recent progress and future needs. *Acta Biol Cracov Sr Botan*, 50 (1): 7-18.

- **Anonyme. (2012).** : Document fourni par la direction des services agricoles de Béjaïa
- **Anonyme:** <http://www.aps.dz/Agrumes-la-production-nationale-s.html>.
- **Arias, A.B., & Laca-Ramon, L. (2005).** Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in Mediterranean region. *J Ethnopharmacol*, 97: 89-95.
- **Arima, H., Ashida, H., & Danno, G. (2002).** Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem*; 66: 1009-1014.
- **Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994).** Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Bl J Pharm*, 49: 462-468.
- **Asada, K. (1999).** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 601-639.
- **Ashie, I.N.A., Simpson, B.K., & Smith, J.P. (1996).** Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 36: 1-30.
- **Asmus, K.D., & Bonifacic, M. (2000).** Free radic chem. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O. Editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier, pp: 3-53.
- **Astarita, L.V., Floh, E.I.S., & Handro, W. (2003).** Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidase associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine). *Plant Growth Regul*, 39: 113-118.
- **Aydemir, T. (2004).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara sclymus L.*). *Heads Food Chem*, 87(1): 59-67.
- **Azevedo, A.M., Martins, V.C., Prazeres, D.M.F., Vojinovic', V., Cabral, J.M.S., & Fonseca, L.P. (2003).** Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol Rev*, 9: 199-236.
- **Bache, M., Luciani, M. & Mazzola, E. (2002).** Les agrumes. Ingersheim-comar : SAEP, 69.
- **Bachés, B., & Bachés, M. (2011).** Agrumes. comment les choisir et les cultiver facilement. édition Eugen Ulmer, pp: 53-106.
- **Balon, T.W., & Nadler, J.L. (1994).** Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol*, 77: 2519-21.
- **Barber, K.R., Rodriguez Maranon, M.J., Shaw, G.S., & Van Huystee, A.B. (1995).** Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by 1 H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 232: 825-833.
- **Barrett, H.C., & Rhodes, A.M. (1976).** A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *System Bot*, 1:105-136.
- **Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Toxicology*, 9: 5-21.

- **Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., & Kulesza, P. (2008).** Spring cabbage peroxidase – Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry*, 69: 627-636.
- **Bellani, L.M., Guarnieri, M., & Scialabba, A. (2002).** Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol Plant*, 115: 330.
- **Benavente-García, O., Castillo J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Río, J.A., & Agric, J. (1997).** *Food Chem*, 45: 4505-4515.
- **Bossokpi, I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, pp: 133.
- **Boudet, A.M. (2000).** Lignins and lignifications: selected issues. *Plant Physiol Biochem*, 38: 81-96.
- **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Bri Nature Technol, 9: 14-19.
- **Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R Biol*, 331: 48-55.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*, 28: 25-30.
- **Bruneton, J. (1999).** Phytochimie et plantes médicinales, Pharmacognosie, tome III, 3e édition, pp: 266-29.
- **Calabrese, F. (1998).** Citrus. Origin and history. Taylor & Francis, 1: 1-15.
- **Calabro, M.L., Galtieri, V., Cutroneo, P., Tommasini, S., Ficarra, P., & Ficarra, R. (2004).** Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *J Pharm Biomed Anal*, 35: 349-363.
- **Catalano, L., Franco, I., De Nobili, M., & Eita, L. (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteau and HPLC methods. *Agrochimica*, 43: 193-205.
- **Chahidi, B., El-Otmani M., Jacquemond, C., Tijane, M., El-Mousadik, A., Srairi, I. & Luro, F. (2008).** Utilisation de caractères morphologiques, physiologiques et de marqueurs moléculaires pour l'évaluation de la diversité génétique de trois cultivars de clémentinier. *C R Biol*, 331: 1-12.
- **Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangeri, A.R., & Engeseth, N.J. (2000).** Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *J Agric Food Chem*, 48 (10): 4997-5000.

- **Cheriot, S.C., Billaud, C., & Nicolas, J. (2006).** Use of experimental design methodology to prepare Maillard reaction products from glucose and cysteine inhibitors of polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena*). *J Agric Food Chem*, 54: 5120-5126.
- **Chisari, M., Riccardo, N., Barbagallo, K., & Spagna, G. (1998).** Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase, and Influence on Browning of Cold Stored Strawberry Fruit. *Food Chem*, 30: 252-253.
- **Colombo, A. (2004).** La culture des Agrume. Paris : Edition de Vecchi, pp: 142.
- **Corban, G.J., Hadjikakou, S.K., Tsipis, A.C., Kubicki, M., Bakas, T., & Hadjiliadis, N. (2011).** Inhibition of peroxidase catalyzed iodination by thioamides: Experimental and theoretical study of the antithyroid activity of thioamides. *New J Chem*, 35: 213-224.
- **Cronquist, A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants.
- **Cullen, D. (1997).** Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J Biotechnol*, 53: 273- 289.
- **De Gara, L. (2004).** Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochem Rev*, 3: 195-205.
- **De Pooter, H.L., & Schamp, N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: *Progress in essential oil research*. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin, pp: 139-150.
- **De Reynal, B., & Multon, J.L. (2009).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Ed TEC&DOC. Lavoisier, pp: 690.
- **Del Rio, J.A., Fuster, M.D., Gomez, P., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., & Ortuno, A. (2004).** *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chem*, 84: 457-461.
- **Delannoy, É., Marmey, P., Penel, C., & Nicole, M. (2004).** Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Botanica Gallica*, 151(4) : 353-380.
- **Delattre, J., Beaudeau, J.L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005a).** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques, pp:1- 23.
- **Demeke, T., Chang, H.G., & Morris, C.F. (2001).** Effect of germination, seed abrasion and seed size on polyphenol oxidase assay activity in wheat. *Plant Breed*, 120: 369-373.
- **Di Matteo, V., & Esposito, E. (2003).** Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets Neurol Disord*, 2: 95-107.
- **Diankov, S., Karsheva, M., & Hinkov, I. (2011).** Extraction of natural antioxidant from lemon peels. Kinetics and antioxidant capacity. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46 (3): 315-319.

- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97: 654-660.
- **Dogan, M., Arslan, O., & Dogan, S. (2002).** Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenoloxidase from different aubergine cultivars. *Int J Food Sci Technol*, 37: 415-423.
- **Do ru, Y.Z., & Erat, M. (2012).** Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae). *Food Res Int*, 49: 411-415.
- **Dransfield, G., Guest, P.J., Lyth, P.L., McGarvey, D.J., & Truscott, T.G. (2000).** Photoactivity tests of TiO<sub>2</sub>-based inorganic sunscreens: Part 1: Non-aqueous dispersions. *J Photochem Photobiol*, 59: 1-3 ; 147-151.
- **Ejaz, S., Ejaz, A., Matsuda, K., & Chae, W.L. (2006).** Limonoids as cancer chemopreventive agents. *J Sci Food Agric*, 86: 339-345.
- **Eskin, N.A.M. (1990).** Biochemistry of food spoilage: Enzymatic browning. In *Biochemistry of Foods*, (N.A.M. Eskin, ed.). Academic Press, New York, pp: 401-432
- **Espin, J.C., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Canovas, F. (1998).** Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *J Agric Food Chem*, 46: 2968-2975.
- **Espin, J.C., Jolivet, S., Overeem, A., & Wichers, H.J. (1999).** Agaritine from *Agaricus bisporus* is capable of preventing melanin formation. *Phytochemistry*, 50: 555-556.
- **Faguy, D.M., & Doolittle, W.F. (2000).** Horizontal transfer of catalase-peroxidase genes between archaea and pathogenic bacteria. *Trends Gen*, 16: 196-197.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourouai, N., Trabelsi, N., Boulaaba M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *C R Biol*, 331: 372-379.
- **FAO. (2010).** Annual statistique: Citrus, [www.fao.org](http://www.fao.org)
- **Fattahi, J., Fotouhi, R., Bakhshi, D., & Aghajanzadeh, S. (2009).** Fruit quality, anthocyanin, and cyanidin 3-glucoside concentrations of several blood orange varieties grown in different areas of Iran. *Hort Environ Biotechnol*; 50: 1-5.
- **Favier, A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. In *Annales de biologie clinique*, 55 (1): 9-16.
- **Fellers, P.J. (1985).** Citrus: sensory quality as related to rootstock, cultivar, maturity and season. In *Evaluation of quality of fruits and vegetables*. Pattee, HE, Ed. AVI Publishing, Co, pp: 83-128.
- **Fernandez, E., Sanchez-Amat, A., & Solano, F. (1999).** Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell Res*, 12: 331-339.

- **Fink, R.C., & Scandalios, J.G. (2002).** Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys*, 399: 19-36.
- **Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S.I., & Chun, O.K. (2011).** Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Comp Anal*, 24: 1043-1048.
- **Flurkey, W.H., & Inlow, J.K. (2008).** Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J Inorg Biochem*, 102: 2160-2170.
- **Fraignier, M., Marques L., Fleurie, T.A., & Macheix, J. (1995).** Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. *J Agric Food Chem*, 43: 2375-2380.
- **Fuster, M.D. (1997).** Citrus flavonoids. Distribution, modulation by phytochemicals and their possible physiological function. PhD. University of Murcia. Spain.
- **Gardner, P.T., Tamsin, A.C., McPhail, D.B., & Duthie, G.G. (2000).** The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem*, 68: 471-474.
- **Gaspar, T.H., Penel, C.L., Thorpe T., & Grappin, H. (1982).** Peroxidases, A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants, University de Genève Press, Genève, pp: 10-90.
- **Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., & Baraniak, B. (2007).** Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea var. Botrytis italica*) florets. *Food Chem*, 105: 1047-1053.
- **Gawlik-Dziki, U., Złotek, U., & Swieca, M. (2008).** Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata L.*). *Food Chem*, 107: 129-135.
- **Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, J.M. (2005).** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*, 53: 1370-1373.
- **Gérard-Monnier, D., & Chaudière, J. (1996).** Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Path Biol*, 44: 77-85.
- **Gerdemann, C., Eicken, C., & Krebs, B. (2002).** The crystal structure of catechol oxidase: new insights into the function of type-3 copper proteins. *Acc Chem Res*, 35: 183-191.
- **Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., & Ferreres, F. (2002).** Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *J Agric Food Chem*, 50 (18): 5107-5114.
- **Glenn, J.K., Akileswaran, L., & Gold, M.H. (1986).** Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 251: 688-696.

- **Glizczynska-Swiglo, A. (2006).** Antioxidant activity of water-soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chem*, 96 (9): 131.
- **Gmitter, F.G., Chunxian Chen Jr., Nageswara Rao M., & Soneji J.R. (2007).** Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Fruits and Nuts. C. Kole (Ed.), 4 (14): 265-275.
- **González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010).** Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J Pharm Biomed Anal*, 51(2): 327-345.
- **Goodner, K.L., Rousef, R.L., & Hofsommer, H.J. (2001).** Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J Agric Food Chem*, 49: 1146-1150
- **Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*, 11: 115-20.
- **Greenshields, R.N. (1973).** Caramel - Part 2. Manufacture, Composition and Properties. *Process Biochem*, 8: 17-20
- **Hadrich, B., Dahak, K., Abdenouri, N., & Kechaou, N. (2008).** Etude de séchage des feuilles de bigaradier. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger*, pp: 145-149.
- **Haineault, S. (2011).** Les vertus thérapeutiques des agrumes, 3ème édition Quebecor, pp: 152.
- **Harborne, J.B. (1993).** The flavonoids. *Advances in Research since 1986*. Chapman and Hall, London, pp: 121-129.
- **Haton, C. (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp: 43.
- **Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., & Xia, W. (2009).** Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from *Citrus mandarin* peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Sep Sci Technol*, 70: 63-70.
- **Hayes, J.E., Allena, P., Bruntona, N., O'Grady, M.N., Kerry, J.P. (2011).** Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem*, 126: 948-955.
- **Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship; *J Nutr Biochem*, 13: 572-584.
- **Heimdal, H., Larsen, M.L., & Poll, L. (1994).** Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lectuca sativa*). *J Agric Food Chem*, 42: 1428-1433.
- **Heller, W., & Forkmann, G. (1993).** The flavonoids. *Advances in research since 1986*. In Harborne JB. *Secondary Plant Products*. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, pp: 399-425.

- **Hemeda, H.M., & Klein, B.P. (1991).** Inactivation and regeneration of peroxidase activity in vegetable extracts treated with antioxidants. *J Food Sc*, 56: 68-71.
- **Henriksen, A., Smith, A.T., & Gajhede, M. (1999).** The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidase oxidizes small phenolic substrates. *J Biol Chem*, 274 (49): 35005-35011.
- **Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Tacker, J.R., & Kües, U. (2005).** Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J*, 273-2308-2326.
- **Hopkins, W.G. (2003).** *Physiologie végétale*. Edition Debock et lancier, pp: 276.
- **Hwang, S.L., Shih, P.H., & Yen, G.C. (2012).** Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem*, 60: 877-885.
- **Jabri-Karoui, I., & Marzouk, B. (2013).** Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) Peel and juice and determination of their antioxidant activities. *Bio Med Res Int*, pp: 1-12.
- **Jang, M.S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., & Ohshima, T. (2002).** Inhibitory effects of 'Enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *LWT*, 35: 697-702.
- **Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B., & Patil, B.S. (2008).** Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT*, 41: 376-384.
- **Jialal, I., Fuller, C., & Huet, B.A. (1995).** The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL oxidation: a dose-response study. *Arterioscler Throm Vas Biol*, 2: 190-198.
- **Johansson, A., Rasmussen, S.K., Harthill, J.E., & Welinder, K.G. (1992).** DNA, amino acid and carbohydrate sequence of barley seed-specific peroxidase BP 1. *Plant Mol Bio*, 18: 1151-1161.
- **Jukanti, A.K. (2005).** Molecular and biochemical characterization of wheat (*Triticum aestivum* L.). Ph.D dissertation, Montana State University, Bozeman, Montana.
- **Kammoun, B.A., Boudhrioua, M.N., & Kechaou, N. (2012).** Moisture sorption isotherms Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Food Chem*, 132: 1728-1735.
- **Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H.Z.E. (2010).** Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, 15: 6244-6256.
- **Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian A., & Jaafar, H.Z.E. (2012).** Phenolic compounds, characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules*, 17: 1203-1218.

- **Kawano, T. (2003a).** Possible use of indole-3-acetic acid and its antagonist tryptophan betaine in controlled killing of horseradish peroxidase-labeled human cells. *Med Hypotheses*, 60: 664-666.
- **Kerboua, M. (2002).** L'agrumiculture en Algérie. In: D'Onghia A.M. (ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N. (ed.). Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Bari: CHIEAM, pp: 21-26.
- **Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S. Dangles, O., & Chemat, F. (2010).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem*, 119: 851-858.
- **Kim, M.J., Kim, C.Y., & Park, I. (2005).** Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chem*, 89(2): 181-184.
- **Kimball, D.A. (1999).** Citrus processing, a complete guide, second edition. Kimball D.A., Ed. Gaithersburg : An Aspen publication.
- **Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., & Krebs, B. (1998).** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature struct biol*, 5 (12):1084-1090.
- **Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., & Gliszczynskaswiglo, A. (2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Comp Anal*, 20: 313-322.
- **Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidatio of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30: 620-650.
- **Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, K.N., Ismail, A., Tan, C.P., & Rajab, N.F. (2010).** Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15: 959-987.
- **Kroh, L. W. (1994).** Caramelisation in food and beverages. *Food Chem*, 51: 373-379.
- **Krueger, R.R. & Roose, M.L. (2003).** Use of molecular markers in management of citrus germplasm resources. *J Am Soc Hortic Sci*, 128: 827-837.
- **Kubo, I., Kinst-Hori, I., Kubo, Y., Yamagiwa, Y., Kamikawa, T., & Haraguchi, H. (2000).** Molecular design of antibrowning agents. *J Agric Food Chem*, 48: 1393-1399.
- **Kuwabara, T., & Katoh, Y. (1999).** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol*, 40: 1029-1035.
- **Ladanyia, M., & M. Ladaniya. (2010).** Citrus fruit: biology, technology and evaluation. Academic press.
- **Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013).** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind Crops Prod*, 50: 723-730.
- **Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., & Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 14 (5): 278-292.

- **Lecerf, J.M., Luc, G., & Fruchart, J.C. (1994).** Vitamine E, antioxydants et athérosclérose. *Rev Méd Int*, 15: 641-649.
- **Ledl, F. (1987).** Analytik flüchtiger zuckerabbauprodukte. *Lebensmittelchem Gerichrtl Chem*, 41: 83-87.
- **Lee, C.Y., Smith, M.L., & Pennesi, A.P. (1983).** Polyphenoloxidase from *Dechaunac grapes*. *J Sci Food Agric*, 3: 987-991.
- **Lee, H. C., & Klein, B.P. (1989).** Evaluation of combined effects of heat treatment and antioxidant on peroxidase activity of crude extract of green peas. *Food Chem*, 32: 151-158.
- **Lee, H.S. (2002).** Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange (*Citrus sinensis*). *J Agric Food Chem*, 50: 1243-1246.
- **Lee, M.K., & Park, I. (2005).** Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction products. *Food Chem*, 91: 57-61.
- **Lee, M.Y., Lee, M.K., & Park, I. (2007).** Inhibitory effect of onion extract on polyphenol oxidase and enzymatic browning of taro (*Colocasia antiquorum* var. *esculenta*). *Food Chem*, 105: 528-532.
- **Lehninger, A.L. (1977).** Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. *Biochimie*, 2ème édition. Flammarion, pp: 191-192; 207-208.
- **Lerch, K. (1995).** Tyrosinase: Molecular and Active Site Structure. In *Enzymatic Browning and Its Prevention*. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, Am Chem Soc, pp: 64-80.
- **Lévesque, F., & Seeberger, P.H. (2012).** Continuous-Flow Synthesis of the Anti-Malaria Drug Artemisinin. *Angewandte Chem Int*, 5 (7): 1706-1709.
- **Lien, E., Sellati, T.J., Yoshimura, A., Flo, T.H., Rawadi, G., Finberg, R.W., Carroll, J.D., Espevik, T., Ingalls, R.R., & Radolf, J.D. (1999).** Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem*, 274: 33419-33425.
- **López-Nicolás, J.M., Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., & García-Carmona, F. (2007).** Kinetic model of apple juice enzymatic browning in the presence of cyclodextrins: The use of maltosylb-cyclodextrin as secondary antioxidant. *Food Chem*, 101: 1164-1171.
- **Lopez-Serrano, M., & Ros Barselon, A. (2002).** Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxydation. Their possible implication in straxberry (*Fragaria X ananassa*) browning reaction. *J Agric Food Chem*, 50: 1218-1224.
- **Loussert, R. (1989).** Les agrumes. 2-Production. *Techniques agricoles méditerranéennes*. Paris.
- **Macheix, J.J., Fleurie A., & Sarni-Manchado, P. (2005).** Composés phénoliques dans la plante: structure, biosynthèse, répartition et rôles, in, *Les Polyphénols en Agroalimentaire*. Tec and Doc Edition. Paris. pp: 133-141.

- **Macheix, J.J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990).** Phenolic compounds in fruit processing. In fruit phenolics, (J. Macheix, A. Fleuriet and J. Billot, eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp : 239-312.
- **Machiels, D., & Istasse, L. (2002).** La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments. *Ann Méd Vêt*, 146: 347-352.
- **Makkar, H.P. S., Singh, B., & Dawra, R.K. (1988).** Effect of tannins rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovin rumen. *Br J Nutr*, 60: 287-296.
- **Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2008).** The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.)O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chem*, 107: 1000-1007.
- **Manner, H.I., Buker, R. S., Smith, V.E., Ward, D., & Elevitch, C.R. (2006).** Citrus and Fortunella. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, pp: 7-29.
- **Manthey, J.A., Grohmann, K., Berhow, M.A., & Tisserat, B. (2000).** Changes in citrus leaf flavonoid concentrations resulting from blight-induced zinc-deficiency. *Plant Physiol Biochem*, 38 (4): 333-343.
- **Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., & Dessi, A. (2004).** Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*. *Phyto Res*, 18: 789-792.
- **Marques, L., Fleureit, A., & Macheix, J. (1995).** Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol Biochem*, 33: 193-200.
- **Marshall, M.R., Kim J., & Wei, C.I. (2006).** Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods. Available in <http://www.fao.org>.
- **Martinez, M.V., & Whitaker, J.R. (1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci Technol*, 6: 195-200.
- **Marusak, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., & Inlow, J.K. (2006).** Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J Inor Biochem*, 100: 108-123.
- **Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., & Andoh, T. (1999).** Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *J Agric Food Chem*, 47: 1749-1754.
- **Mathé, C., Barre, A., Jourda, C., & Dunand, C. (2010).** Evolution and expression of class III peroxidases. *Rev Arch Biochem Biophys*, 500: 58-65.
- **Mayer, A.M. (2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places?. *Rev Phytol*, 67: 2318-2331.
- **Mazzafera, P., & Robinson, S.P. (2000).** Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytologia*, 55: 285-296

- **McEvily, A.J., Iyengar R., & Otwell W.S. (1992).** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32: 253-273.
- **Menichini, F., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Conforti, F., De Luca, D., Statti, G.A., Cindio, B., Menichini, F., & Tundis, R. (2011).** Phytochemical profile, antioxidant, antiinflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food Chem Toxicol*, 49: 1549-1555.
- **Mohamed, S.A., Abulnaja, K.O., Ads, A., Khan, J.A., & Kumosani, T.A. (2011).** Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. *Food Chem*, 128: 725-730.
- **Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. P., & Canaud, B. (2002).** Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23(5): 201-208.
- **Mousavizadeh, S.J., Sedaghatoor, S., & Khorami, H. (2011).** Essential oils as reducing agents of cabbage peroxidase. *Sci Hort*, 128: 388-392.
- **Murata, M., Tsurutani, M., Hagiwara, S., & Homma, S. (1997).** Subcellular localotion of Polyphenol Oxydase in apples. *Biosci Biotech Biochem*, 61(9): 1495-1499.
- **Muthiah, P., Umamaheswari, M., & Asokkumar, K. (2012).** *In vitro* antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of citrus. *Int J Phytol*, 2: 13-20.
- **Naczk, M., & Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr*, 1054: 95-111.
- **Nicolas, J., Richard-Forget, F., Goupy, P.M., AMIOT, M.J., & Aubert, S.Y. (1994).** Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 34: 109-157.
- **Nicolosi, E., Deng Z.N., Gentile, A., La Malfa, L., Continella, G., & Tribulato, M. (2000).** Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 100: 1155-1166.
- **Nie, G., Reading, N.S., & Aust, S.D. (2003).** Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys*, 365: 328-344.
- **Nitta, K., Kataoka, K., & Sakurai, T. (2002).** Primary structure of a Japanese locquar tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. *J Inorg Biochem*, 91:125-131.
- **Northtrop-Clewes, C.A., & Thurnham, D.I. (2007).** Monotoring micronutrients in cigarette smokers. *ACTA Clin Chim*, 377 : 14-38.
- **O'Brien, P.J. (2000).** Peroxidases. *Chem Biol Interac*, 129: 113-139.
- **Ortero, R., Nu-nez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jimenez, S.L., Osorio, RG., Saldarriaga, M., Diaz, A. (2000).** Morsures de serpent et ethnobotanique dans la région nord-ouest de la Colombie. Partie III. Neutralisation de l'effet hémorragique de *Bothrops atrox* venin. *J. Ethn*, 73: 233-341.

- **Ortiz, J.M. (2002).** Citrus Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. Taylor & Francis, 2: 16-35.
- **Ortuño, A., Bavidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., & García-Lidón, A. (2006).** Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defense mechanism against Penicillium digitatum. Food Chem, 98: 351-358.
- **Oskoueian, E., Abdullah, N., Zuhainis, S.W., Omar, A.R., Ahmad, S., Kuan, W.B., Zolkifli, N.A., Hendra, R., & Ho, Y.W. (2011).** Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from Jatropha curcas Linn. J Med Plant Res, 5: 49-57.
- **Oufedjikh, H., Lacroix, M., Mahrouz, M., & Amiot, M.J. (2000).** Effect of g-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of *Citrus clementina* Hort. Ex. Tanaka. J Agric Food Chem, 48: 559-565.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nut, 44: 307-315.
- **Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., & Dunand, C. (2007).** PeroxiBase: The peroxidase database. Phytochemistry, 68: 1605-1611.
- **Pelmont, J. (1993).** Enzymes. Alger : Office des publications universitaires, pp: 167-240.
- **Pérez, Y.Y., Jimenez-Ferrer, E, Alonso, D., Botello-Amaro, C.A. & Zamilpa, A. (2010).** *Citrus limetta* leaves extract antagonizes the hypertensive effect of angiotensin II. J Ethn, 128: 611-614.
- **Pietta, P., Gardana, C., & Pietta, A. (2003).** Flavonoids in herbs. In; Flavonoids in health and disease, Rice-Evans, C., Packer, L., Eds, Marcel Dekker, New York, pp: 43-69.
- **Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002).** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. J Agric Food Chem, 277: 37663-37669.
- **Polese, J.M. (2008).** La culture des agrumes In Artemis (Ed), pp: 93.
- **Ponce, A.G., Del Valle C.E., & Roura S.I. (2004).** Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. LWT Food Sci Tech, 37: 199-204.
- **Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2005).** Transparent TEST10 encodes a laccase-like involved in oxidative polymerisation of flavonoids in Arabidopsis seed coat. Plant Cell, 17: 2966-2980.
- **Pourcel, L., Routaboul, J-C., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007).** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. Trends Plant Sci, 12: 29-36.
- **Puppo, A., & Halliwell, B. (1988).** formation for hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological fenton reagent ?. J Biochemistry, 249: 185-90.

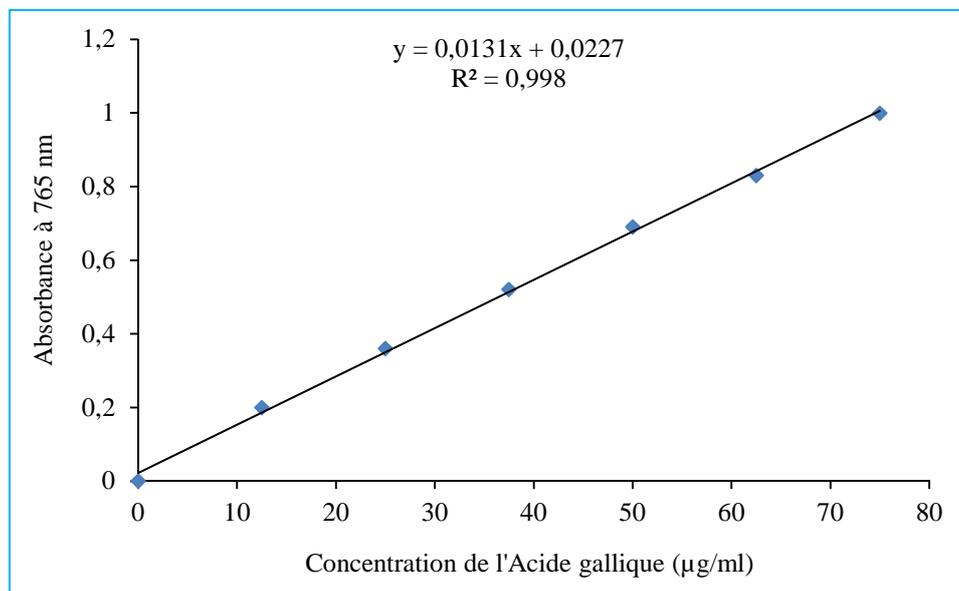
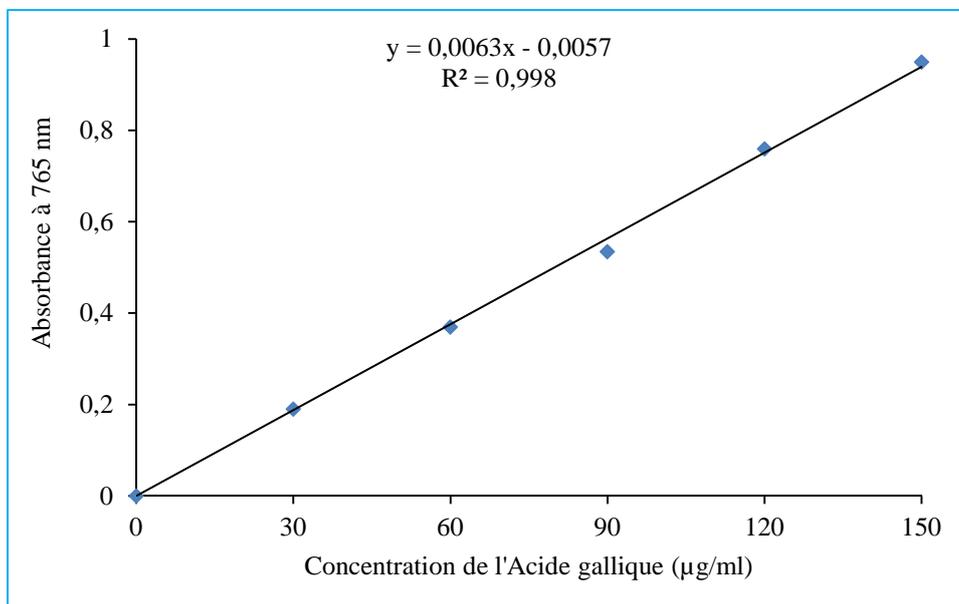
- **Qacif, N., Bendiab, K., & Baaziz, M. (2006).** Aspects qualitatif et quantitatif des peroxydases du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) étudiés chez des pieds mâles et femelles, pp : 179-181.
- **Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, L., Valente-Mesquita, V.L. (2008).** Polyphenol Oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev Int*, 24 (4): 361-375.
- **Ramu, S.K., Peng, H.M., & Cook, D.R. (2002).** Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *ripl* in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*, 15: 522-528.
- **Rapeanu, G., Loey, V.A., Smout, C., & Hendrickx, M. (2006).** Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*). *J Agric Food Chem*, 94: 253-261.
- **Ravindra, N., & Van-Huystee, R. (1984).** Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol*, 75: 956-958.
- **Raymond, J., Rakariyatham, N., & Azanza, J.L. (1993).** Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, 34: 927-931.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26: 1231-1237.
- **Reinhammar, B., & Malmstrom, B.G. (1981).** "Blue" copper-containing oxidases. In *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons, pp: 109-149.
- **Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil, M.G. & Esquivel, M.M. (2001).** *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *J Supercritical Fluids*, 21: 51-60.
- **Ribereau-Gayon, P. (1968).** Propriétés chimiques des phénols. In " Les composés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, pp: 29-57.
- **Richard, H., Giampaoli, P., Toulemonde, B., & Duquenoy, A. (2010).** Flaveurs et procédés de cuisson. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA).
- **Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999).** *Food Chem*, 66: 401-436.
- **Rocca Serra, D. & Ollitrault, P. (1992).** Les ressources génétiques chez les agrumes. Station de Recherches agronomiques INRA-IRFA 20230, San Guriano, 3: 1-10.
- **Ruiz-Duenas, F.J., & Camarero, S. (2001).** A new versatile peroxidase from *Pleurotus* *Biochem Soc Trans*, 29: 116-122.
- **Ryan, L. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Int J Sci*.
- **Saraiva, J.A., Nunes, C.S., & Coimbra, M.A. (2007).** Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of pectin binding peroxidase. *Food Chem*, 101: 1571-1579.

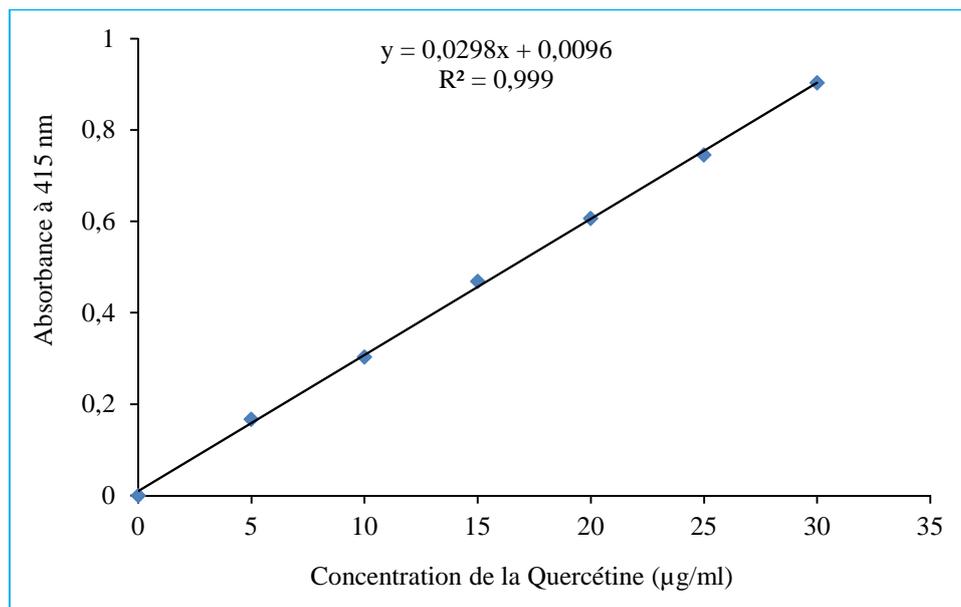
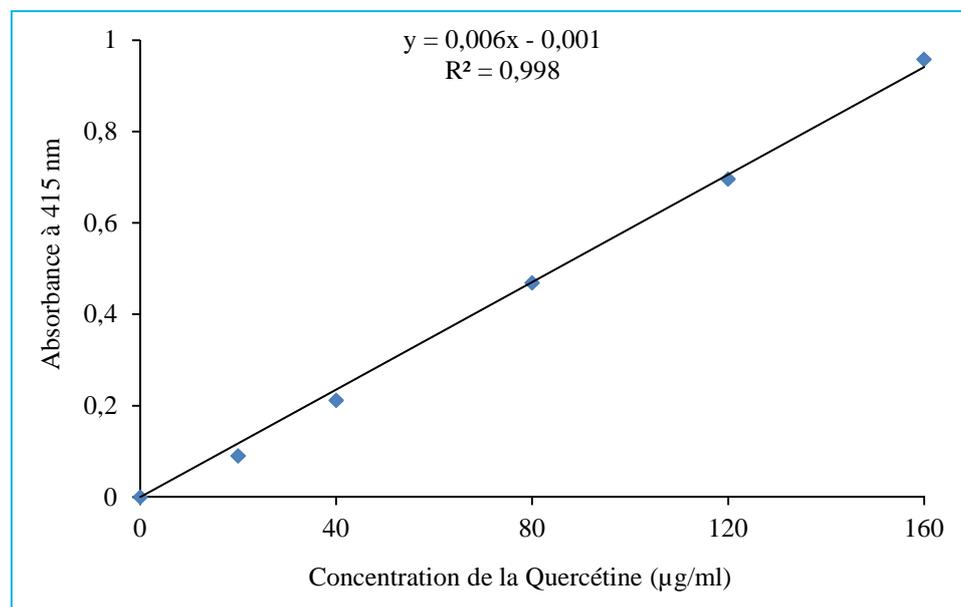
- **Sasaki, T., Matsumoto, T., & al. (2002).** The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature*, 420: 312-316.
- **Saunt, J. (1990).** Citrus varieties of the world: an illustrated guide. Saunt J., Ed. Sinclair International.
- **Scandalios, J.G. (2005).** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38: 995-1014.
- **Schuller, D.J., Ban, N., Van Huystee, R.B., McPherson, A., & Poulos, T.L. (1996).** The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4: 311-321.
- **Schutzendubel, A., Nikolova, P., Rudolf, C., & Polle, A. (2002).** Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress in *Populus xcanescens* roots. *Plant Physiol Biochem*, 40: 577-584.
- **Selinheimo, E., NiEidhin, D., et al (2007).** Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J Biotechnol*, 130 (4): 471-480.
- **Seo, B., Yun, J., Lee, S., Kim, M., Hwang, K., Kim, J., Minutes, K.R., Kim, Y., & Moon, D., (1999).** Barbarin as a new tyrosinase inhibitor from *Barbarea orthocerus*. *Planta Med*, 65: 683-686.
- **Shannon, I.M., Kay, E., & Lew, J.Y. (1996).** Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. Isolation and physical properties. *J Biol Chem*, 241: 2166-2172.
- **Sharma, R.R., Goswami, A.M., Singh, C.N., Chhonkar, O.P., & Singh, G. (2001).** Catecholase and cresolase activities and phenolic content in mango (*Mangifera indica* L.) at panicle initiation. *Sci Hort*, 87: 147-151.
- **Shklar, G., & Schwartz, J. (1988).** Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with vitamin E, bêta-carotene, canthaxanthine and algae extract. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 24: 839-50.
- **Shmitz, GE., Sullivan, M.L., & Hatfield, R.D. (2008).** Three polyphenol oxidases from red clover (*Trifolium pratense*) differ in enzymatic activities and activation properties. *J Agric Food Chem*, 56: 272-280.
- **Singh, N., & Rajini, P.S. (2004).** Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem*, 85: 611-616.
- **Singleton, V., & Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticulture*, 16: 144-158.
- **Smirnoff, N. (2000).** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Cur Op Plant Biol*, 3: 229-235.
- **Souci, S.W., Fachmann, W., & Kraut, H. (1995).** Fruit. In: «Food Composition». 5<sup>ème</sup> Edition CRC Press, London, pp: 801-980.
- **Stahl, W., & Sies, H. (2003).** Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*, 24: 345-351.

- **Steinberg, D. (1991).** Antioxidant and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*, 84: 1420-1425.
- **Takeda, A., Loveman, E., Clegg, A., Kirby, J., Picot, J., Payne, E., & Green, C. (2006).** A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psy*, 21(1): 17-28.
- **Takio, K., Titani, K., Ericsson, L.H., & Yonetani, T. (1980).** Primary structure of yeast cytochrome c peroxidase. II. The complete amino acid sequence. *Arch Biochem Biophys*, 203: 615-629.
- **Talanoa, M.A., Agostini, A., Medinaa, M L., Reinosob, H., Tordableb, M .D .C., Horacio, A., Tigiera, y., & Milrad, S. (2006).** Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: The relationship with the release of a basic peroxidase. *J Plant phys*, 163: 740-749.
- **Tan, B.K., & Harris, N.D. (1995).** Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase. *Food Chem*, 53: 267-273.
- **Tanaka, T. (1961).** Contribution to the knowledge of Citrus classification. *Rep Citrol*, pp: 107-114.
- **Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*, 104: 1372-1378.
- **Taylor, S. L., Higley, N. A., & Bush, R. K. (1986).** Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity and hypersensitivity. *Ad Food Res*, 30: 1-76.
- **Thipyapong, P., Stout, MJ., & Attajarusit, J. (2007).** Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. *Molecules*, 12: 1569-1595.
- **Thurston, C.F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26.
- **Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2002).** Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Laboratory of Plant Biochemistry and Physiology, University of Geneva. Gene*, 288: 129-138.
- **Toivonen, P.M., & Brummell, D.A. (2008).** Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol Technol*, 48: 1-14.
- **Tranchida, P.Q., Bonaccorsi, I., Dugo, P., Mondello, L., & Dugo, G., (2012).** Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. *Rev Flavour Fragr J*, 27: 98-123.
- **Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chem*, 104: 466-479.

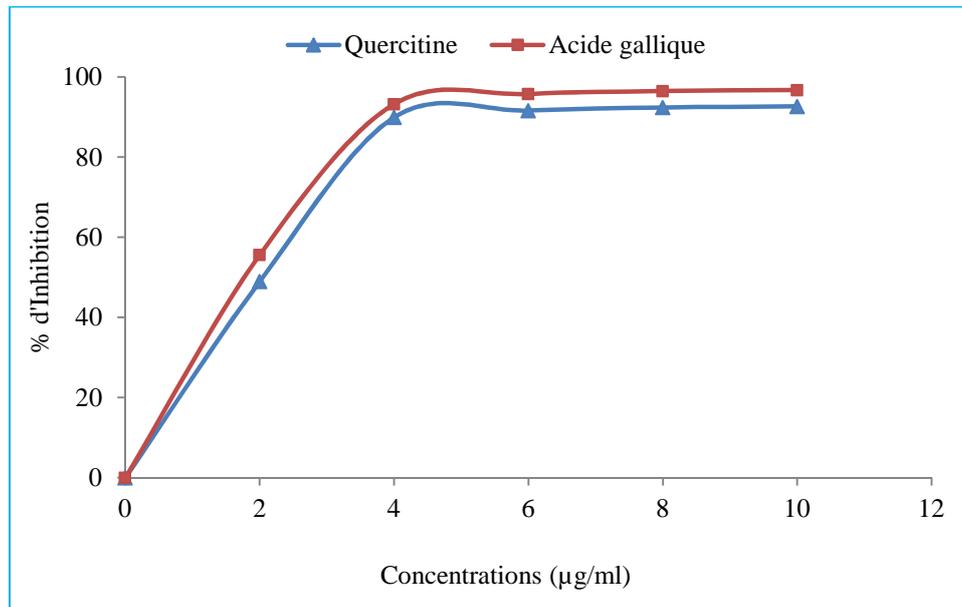
- **Ünal, M.U. (2007).** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chem*, 100 (3): 909-913.
- **Valentine, M.C., Vilaplana, R., Torre,s R., Usall, J., & Larrigaudi, C. (2005).** Rôles spécifiques du brunissement et de la lignification enzymatique dans la résistance de maladie de pomme. *Postharvest Biol Technol*, 36: 227-234.
- **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Int*, 160 (1): 1-40.
- **Valli, K., Wariishi, H., & Gold, M.H. (1990).** Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry*, 29: 8535-8539.
- **Vámos-Vigyázó, L. (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 15(1): 49-127.
- **Van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H., & Bast, A. (1999).** Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*, 66: 511-517.
- **Varela, E., Martinez, A.T., & Martinez, M.J. (2000).** Southern blot screening for lignin peroxidase and arylalcohol oxidase genes in 30 fungal species. *J Biotechnol*, 83: 245-251.
- **Veitch, N.C. (2004).** Molecules of interest. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65: 249-259.
- **Venturini, N. (2012).** Contribution chimique a la définition de la qualité : exemple de myrte (*Myrtus communis L.*) et de cédrat (*Citrus medica L.*) de corse. Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli.
- **Virbel-Alonso, C. (2011).** Citron et autres agrumes : Un concentré d'astuces pour votre maison, votre santé, votre beauté. Editions Eyrolles.
- **Waliszewski, K.N., Márquez, O., & Pardo, V.T. (2009).** Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chem*, 117: 196-203.
- **Walker, J.R.L. (1976).** The control of enzymic browning in fruit juices by cinnamic acids. *J Food Technol*, 11: 341-345.
- **Wang, Y.C., Chuang, Y.C., & Ku, Y.H. (2007).** Quantitation of bioactive compounds in citrus fruit cultivated in Taiwan. *Food Chem*, 102: 1163-1171.
- **Weisburger, J.H. (2002).** Lycopene and tomato products in health promotion. *Exp Biol Med*, 227: 924-927.
- **Welinder, K.G. (1992).** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases *Curr Opin. Struct Biol*, 2: 388-393.

- **Welinder, K.G., Justesen, A.F., Kjaersgard, I. V.H., Jensen, R.B., Rasmussen, S.K., Jespersen, H.M., & Duroux, L. (2002).** Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem*, 269: 6063-6081.
- **Whitaker, J., & Lee, C.Y. (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, Am Chem Soc, pp: 2-7.
- **Whitaker, J.R. (1985).** Mechanisms of oxidoreductases. In *Chemical changes in Food during Processing*. ed. T. Rechardson and J.W. Finley, pp: 123-130.
- **Winston, J.C. (1999).** Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr*, 70: 491-499.
- **Wright, H., & Nicell, A. (1999).** Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technol*, 70: 69-79.
- **Wu, T.S., Huang S.C., & Wu, P.L. (1996).** Buntanbismine, a bisacridone alkaloid from *Citrus grandis buntan*. *Phytochemistry*, 42: 221-223.
- **Wuyts, N., Waele, D.D., & Swennen, R. (2006).** Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata grande naine*) roots. *Plant Phy Biochem*, 44: 308-314.
- **Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y., & Chen, J. (2008).** Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis Hort. ex Tanaka*) and Huyou (*Citrus paradisi Macf. Changshanhuyou*) during maturity. *J Food Comp Anal*, 21(5): 382-389.
- **Yepez, B., Espinosa, M., López, S., & Bolaños, G. (2002).** Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equilibria*, pp. 879-884.
- **Yoshida, H., Kajimoto, G., & Emura, S. (1993).** Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *J Am Oil Chem Soc*, 70 (10): 989-995.
- **Zamocky, M., Janecek, S., & Koller, F. (2000).** Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene*, 256: 169-182.
- **Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., & Eskin, N.A.M. (1991).** Polyphenoloxidase. Dans D.S. Robinson et N. heure du matin Eskin (Eds.), *enzymes oxydantes en nourritures*, pp: 217-273.
- **Zhang, J., Kjonass, R., & Flurkey, W.H. (1999).** Does N-hydroxyglycine inhibit plant and fungal laccases? *Phytochemistry*, 52: 775-783.
- **Zheng, W., & Wang, S.Y. (2001).** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*, 49(11): 5165-5170.
- **Zhou, P., Smith, N.L., & Lee, C.Y. (1993).** Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem*, 41: 532-536.
- **Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2004).** Antioxidant activity of a flavonoid rich extract of *Hypericum perforatum L. In vitro*. *J Agric Food Chem*, 52: 5032-5039.

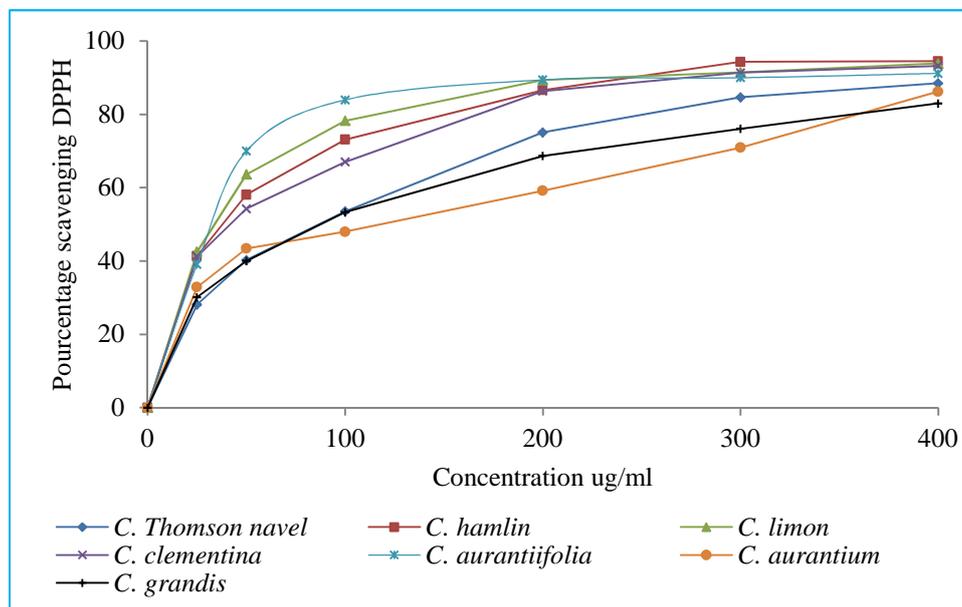
**Annexe I :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.**Annexe I.1 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols des extraits méthanoliques.**Annexe I.2 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols des extraits aqueux.

**Annexe II :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.**Annexe II.1 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes des extrais méthanolique.**Annexe II.2 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes des extrais aqueux.

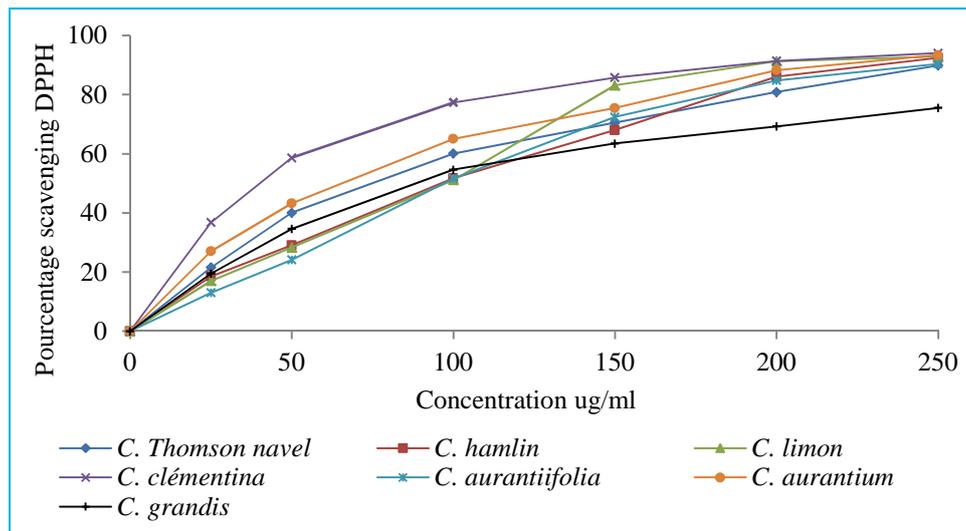
### Annexe III : Courbes d'étalonnages des activités antioxydantes.



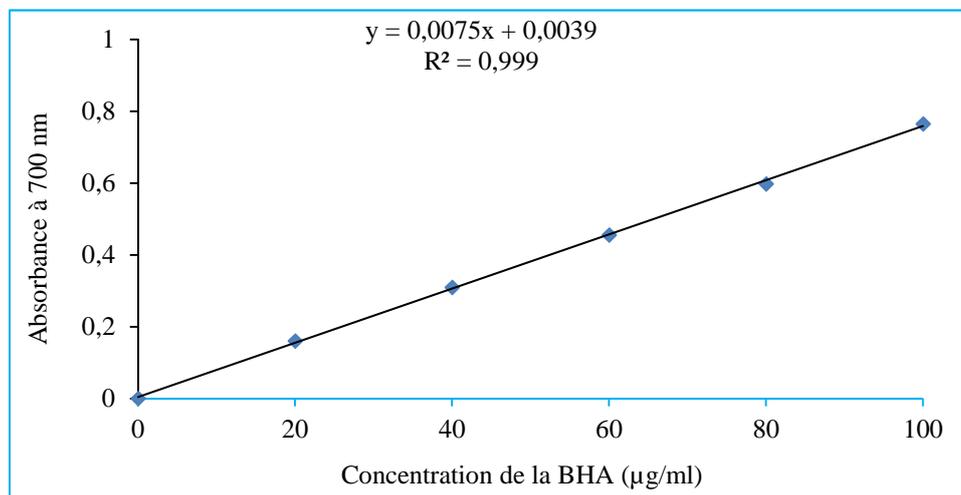
#### Annexe III.1 : Courbe d'activité scavenging du radical DPPH des standards (Quercétine et l'Acide Gallique).



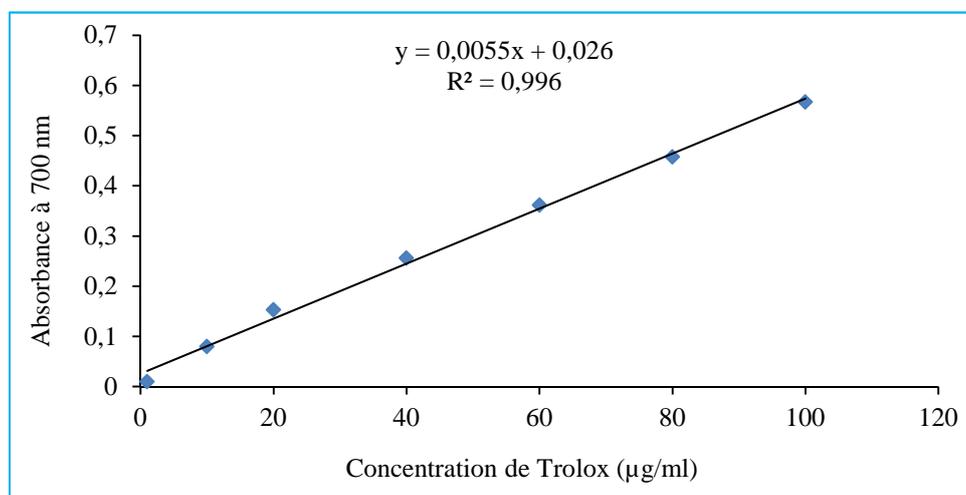
#### Annexe III.2 : Courbes d'activités scavenging du radical DPPH des extraits aqueux.



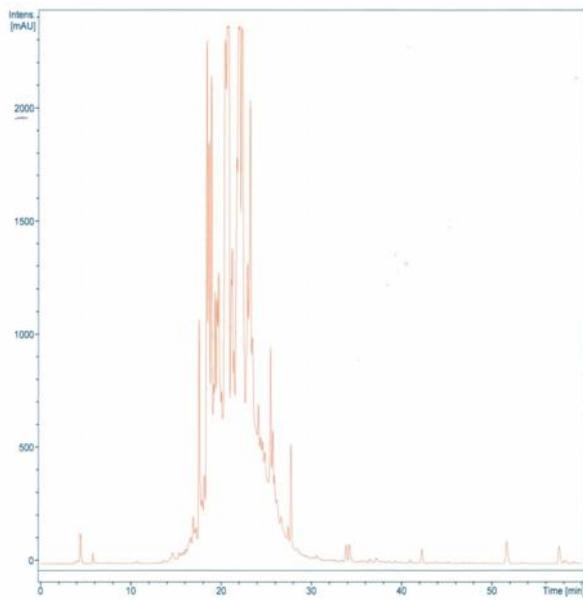
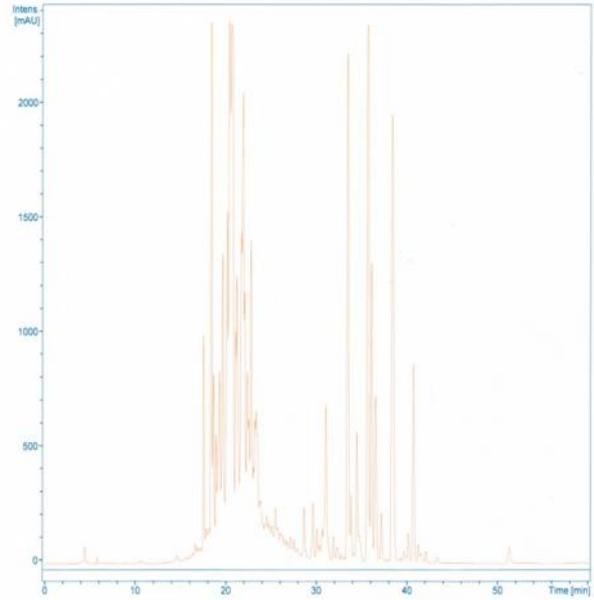
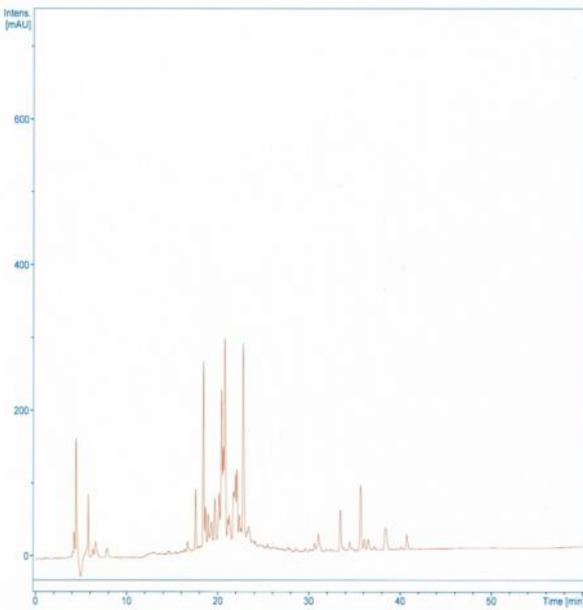
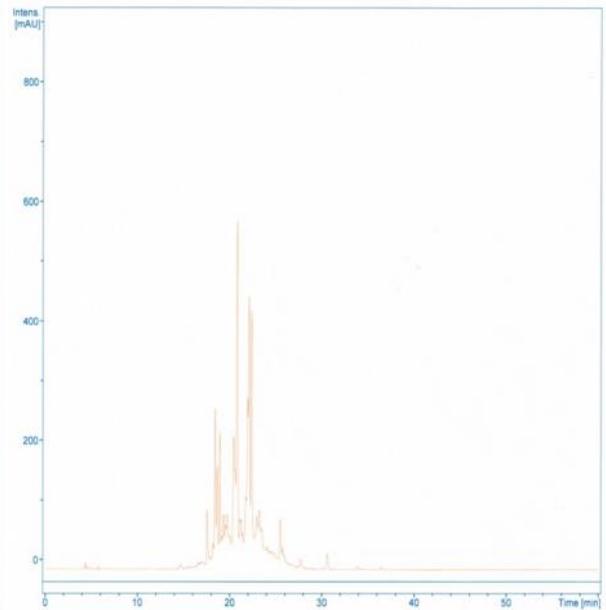
**Annexe III.3 :** Courbes d'activités scavenging du radical DPPH des extraits méthanoliques.



**Annexe III.4 :** Courbe d'étalonnage de la BHA pour le pouvoir réducteur.



**Annexe III.5 :** Courbe d'étalonnage de Trolox.

**(a)****(b)****(c)****(d)**

**Annexe IV** : Chromatogrammes HPLC des extraits méthanoliques **(a)** *C. clementina* ; **(b)** *C. limon* et des extraits aqueux **(c)** *C. clementina* ; **(d)** *C. limon*.

➤ **Conditions expérimentale pour HPLC :**

- Colonne C18 phase inverse ;

-Volume injecté : 20 µl de chaque extrait ;

◆ Le débit : 0,6 ml/min ;

◆ Les solvants d'éluion : le solvant A constitué d'eau distillée et le solvant B constitué de 5% d'acétonitrile et 1% d'acide trifluoroacétique.

◆ Le gradient d'éluion utilisé est :

- 0-40 min : 5% A+ 95% B ;
- 40-55 min : 80% A+ 20% B ;
- 55-65 min : 100% A+ 0% B ;
- 65-75 min : 5% A + 95% B.

◆ La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 260nm.

## Résumé.....

Durant ces dernières décennies, un intérêt majeur est accordé aux plantes médicinales en vu de leurs propriétés thérapeutiques démontrées, dans le but d'obtenir des alternatives pour l'antibiothérapie. Dans cette étude, des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles d'espèces de *Citrus* (*C. clementina*, *C. limon*, *C. hamlin*, *C. navel*, *C. aurantiifolia*, *C. aurantium* et *C. grandis*) ont été analysés pour leurs multiples propriétés pharmacologiques et leur richesse en substances bioactives. Tout d'abord, une étude quantitative a été réalisée par le dosage spectral des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) des extraits de feuilles des différentes espèces de *Citrus*. Par la suite, l'activité antioxydante (effet scavenger du radical DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur) ainsi que l'activité anti-péroxydase et anti-polyphénoloxydase de ces extraits ont été évaluées. De point de vu quantitatif, les extraits aqueux et méthanoliques de *C. clementina* sont les plus riches en polyphénols accompagnés par des teneurs très élevées en flavonoïdes. Les résultats obtenus de l'activité antioxydante indiquent que le pouvoir antioxydant le plus élevé est manifesté par les extraits de *C. clementina* suivi par ceux de *C. limon*. De plus, ces résultats sont indépendants de la méthode utilisée pour la mesure de l'activité antioxydante. Cependant, cette dernière est plus importante dans les extraits aqueux que dans les extraits méthanoliques. Enfin, l'évaluation de l'activité anti-péroxydase indique que les feuilles des différentes espèces étudiées sont habiles à inhiber les peroxydases. Cependant, cette inhibition varie selon l'espèce et la source de ces enzymes. Par contre, les extraits aqueux de ces espèces exercent une faible inhibition sur les polyphénoloxydases, alors qu'aucun effet n'est enregistré avec les extraits méthanoliques.

**Mots clés : Citrus, stress oxydatif, polyphénols, activité antioxydante, peroxydase, polyphénoloxydase.**

## Abstract.....

In recent decades, a major interest is focused on medicinal plants thanks to their demonstrated therapeutic properties, in order to obtain alternatives to antibiotics. In this study, methanolic and aqueous extracts of *Citrus* leaves of different species (*C. clementina*, *C. limon*, *C. hamlin*, *C. navel*, *C. aurantiifolia*, *C. aurantium* and *C. grandis*) were analyzed for their multiple pharmacological properties and for their content in bioactive substances. First, a quantitative study was conducted by the spectral determination of phenolic compounds (flavonoids and total polyphenols) of leaf extracts of different *Citrus* species. Thereafter, the antioxidant activity (DPPH, ABTS radical scavenger effect, ferric reducing antioxidant power), and both anti-peroxidase, anti-polyphenol oxidase activities of these samples were evaluated. Quantitatively, the aqueous and methanolic extracts of *C. clementina* presented the highest ratio of polyphenols accompanied by high level of flavonoids. The results of antioxidant activity showed a highest antioxidant effect with *C. clementina* extracts followed by those of *C. limon*. Furthermore, these results are independent of the method used to quantify the antioxidant activity. However, this activity is most important in the aqueous extracts than in methanolic ones. Finally, the assessment of anti-peroxidase activity indicates that the leaves extracts of different studied species are able to inhibit peroxidase. Whereas, this inhibition varies following the species and the source of these enzymes. Ended, the aqueous extracts of different species showed a low inhibition of polyphenol oxidase while, no effect on these enzymes is obtained with methanolic extracts.

**Key words: Citrus, oxidative stress, polyphenols, antioxidant activity, peroxidase, polyphenol oxidase.**

في الأونة الأخيرة ارتفع الاهتمام بالنباتات الطبيعية نظرا للخصائص الصحية التي تتمتع بها. هذه الدراسة بتقييم المستخلصات الميثانولية و المائية *C. clementina*, *C. limon*, *C. aurantium*, *C. hamlin*, *C. grandis*, *C. aurantiifolia navel* لغناها بالمركبات النشطة. تطرقنا من خلال دراستنا هذه التقدير الكمي للمركبات الفينولية المستخلصات المائية و الميثانولية لأوراق هذه من الحمضيات من جهة و كذا تقييم مدى نشاطها المضاد (قوة تثبيت الجذر الحديد) و مدى قوة تثبيت الإنزيمين "بيروكسيداز و بوليفينول اكسيداز" من جهة "DPPH" "ABTS" من الناحية الكمية *C. clementina* من حيث المركبات الفينولية المائية و الميثانولية. هذا النوع يحوي على اكبر كمية من الف فونويد مقارنة *C. limon* *C. clementina* نشاطها من حيث المركبات الفينولية المائية و الميثانولية. أظهرت الدراسات أيضا قدرة الحمضيات على كبح نشاط البيروكسيداز و الذي يختلف من نوع إنزيم بينما قدرة هذه المستخلصات على كبح البوليفينول كسيداز هي ضعيفة عند المستخلصات المائية و منعدمة عند المستخلصات الميثانولية.

: الحمضيات, عديد الفينول, الفعالية , البيروكسيداز, بوليفينول أكسيداز.