

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 des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité: Qualité des produits et sécurité alimentaire.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

***Optimisation des conditions d'extraction des
antioxydants à partir du sous-produit industriel de
fabrication des jus d'orange***

Présenté par :
BELMEHDI Tassadit

Soutenu le : 23 juin 2018

Devant le jury composé de :

Mm. CHOUGUI Nadia	(MCA)	Examinatrice
M. BOUDRIES Hafid	(MCA)	Encadreur
Mm. GUEMGHAR Hayat	(MCA)	Présidente

Année universitaire : 2017/ 2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux êtres qui me sont les plus chers au monde, mon père et ma mère à qui je dois le mérite d'être arrivée là, qu'ils trouvent ici les expressions de ma profonde gratitude et mon affection ;

A mes très chers frères : Ouamar, Mihmih, Idir et leurs familles

A mes très chères sœurs Samia, Malika, Rachida, Ferroudja et Miassa.

A mes nièces :

Imane et Nouréléne

A mes neveux :

Marko, Aziz, Alilou, Nadir, Tahar, Rayane et Syfaxe

*A mes amies : Chafia, Sara, Saida, koko, Sylia, Dalila Amanda et Hana,
Yamina, Biba*

Et mon très cher ami Abdelhak

Qui m'ont accueilli à bras ouverts, avec qui

J'ai passé une année agréable.

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

A toute la promotion Qualité des produits et sécurité alimentaire 2017/2018.

Tassadit

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie Allah, le tout puissant qui ma donner le courage, la volonté et la santé pour achever ce travail ;

C'est avec un grand respect que je transmets mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier monsieur BOUDRIES Hafid d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et de ses conseils. Je le remercie également pour sa gentillesse et sa disponibilité qui ont été un élément primordiale pour la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à monsieur BACHIR-BEY Moustafa de m'avoir consacré son temps précieux. Je vous remercie de votre disponibilité qui a été un élément indispensable pour la réalisation de ce travail.

Je remercie les membres de jury :

-Mme CHOUGUI Nadia, maitre de conférences(A) à l'université de Bejaia d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

-Mme GUEMGHAR Hayat, maitre de conférences(A) à l'université de Bejaia d'avoir accepté de présider les jurys, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Liste des abréviations

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
DCPIP	2,6-Dichlorophenolindophenol
DPPH	2,2-diphényle-1-picryl hydrazyl
EAG	Equivalent d'acide gallique
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
ISO	International Organization for Standardization
MS	Matière sèche
MSR	Méthodologie surface de réponse
ONAGRI	Observatoire national de l'agriculture
P	Probabilité
R²	Coefficient de détermination
UE	Union européenne
USDA	United States Department of Agriculture

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre	Page
I	Taxonomie de l'orange.	2
II	Les principaux pays producteurs de l'orange dans la région méditerranéenne.	5
III	Composition chimique globale des écorces d'orange.	8
IV	La composition en fibres des écorces d'agrumes.	9
V	Composition en minéraux des écorces d'orange.	10
VI	Teneurs en caroténoïdes des écorces des différentes variétés d'orange.	11
VII	Les différentes combinaisons effectuées pour l'optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante.	21
VIII	Les paramètres chimiques analysés des écorces d'orange.	22
IX	Paramètres et valeurs optimales pour l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange par la méthode séquentielle.	31
X	Matrice du modèle de Box-Behnken (valeurs codées et réelles des niveaux des trois variables), et les valeurs expérimentales et prédites des trois niveaux des trois facteurs du plan d'expérience pour les écorces d'orange.	33

XI	le coefficient de détermination R ² et R ² ajusté des composés phénoliques et de l'activité antioxydante.	34
XII	Analyse de variance de modèle et de défaut d'ajustement pour les composés phénoliques.	35
XIII	Analyse de variance de modèle et de défaut d'ajustement pour l'activité antioxydante.	35
XIV	Paramètres des modèles de surfaces de réponses des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange.	36
XV	conditions et valeurs optimales pour l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange par la méthode des surfaces de réponses.	42

Liste des figures

N° de figure	Titre	Page
01	Schéma détaillant la structure anatomique de l'orange	3
02	Les principaux pays producteurs d'orange	4
03	Evolution de la production mondiale par variété d'agrumes.	5
04	Diagramme de la transformation d'orange en pulpe	6
05	La structure chimique du limonène	9
06	Structure chimique de quelques caroténoïdes de l'écorce d'orange : β -carotène, lutéine et la lycopène.	11
07	Structure de l'acide ascorbique	12
08	Structure de base du phénol	12
09	Structure de base des flavonoïdes	13
10	Structure du principal flavanone de l'écorce d'orange : l'hespéridine	13
11	Structure chimique de l'acide p-coumarique.	14
12	Photographie de l'échantillon dans l'étuve.	15
13	Photographie des résultats du test humidité	16
14	Représentation graphique des résultats de la teneur en cendres et le taux d'humidité des écorces d'orange.	22
15	Effet du type du solvant sur l'efficacité d'extraction des composés	25

	phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.	
16	Effet de la concentration du méthanol sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.	27
17	Effet du temps sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.	28
18	Effet de la température sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.	30
19	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites	34
20	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant et du temps sur l'extraction de composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange	39
21	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant et de la température d'extraction sur l'extraction de composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.	40
22	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la température d'extraction et du temps sur l'extraction de composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.	41
23	Courbe d'étalonnage des sucres	
24	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	
25	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	
26	Courbe d'étalonnage des caroténoïdes	
27	Courbe d'étalonnage des composés phénoliques	
28	Courbe anti-radical DPPH*	

Table des matières

Dédicaces.....	
Remerciements.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Introduction.....	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	
I-L'Orange.....	2
I-1- Données botaniques.....	2
I-2- Systématique et description morphologique/physiologique.....	2
I-2-1-L'Ecorce ou péricarpe.....	3
I-2-2-Endocarpe ou pulpe.....	4
I-3- La production mondiale d'orange.....	4
I-4- Production Algérienne.....	5
II-La transformation industrielle des oranges.....	6
II-1-Procédé de transformation d'orange en pulpe dans l'unité El-Kseur de CEVITAL.....	6
II-2- Déchets de la transformation industrielle	7
II-2-1-L'écorce de l'orange.....	7
A- Composition chimique globale.....	7
a-Eau.....	8
b- Glucides.....	8
c- Huiles essentielles.....	8
d- Fibres	9
e-Minéraux.....	9
III-La composition antioxydante des écorces d'orange.....	10
III-1-Définition des antioxydants.....	10
III-2- Antioxydants de l'écorce.....	10
III-2-1-Caroténoïdes.....	10
III-2-2- Vitamines (vitamine C).....	11
III-2-3-Composés phénoliques	12
III-2-3-1- Les principaux composés phénoliques de l'écorce d'orange.....	12

a-Les flavonoïdes.....	12
b-Les acides phénoliques.....	14
IV- Intérêt et utilisation de l'écorce de l'orange.....	14

Matériel et méthodes

I-Matériels végétal.....	15
II- Préparation des échantillons.....	15
II-1-Séchage.....	15
II-2-Broyage et tamisage.....	15
III-Analyses physico-chimiques.....	16
III-1-Taux d'humidité.....	16
III-2-Taux de cendres.....	16
III-3-Dosage des glucides.....	17
IV-Dosage des composés bioactifs d'écorce d'orange.....	17
IV-1-Dosage des flavonoïdes.....	17
IV-2-Dosage de la vitamine C.....	18
IV-3-Dosage des caroténoïdes.....	18
V- Optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante.....	19
V-1-Méthode séquentielle.....	19
a-Préparation des extraits.....	19
b-Dosage des composés phénoliques.....	19
c-Mesure de l'activité antioxydante des écorces.....	20
V-2-- méthode des surfaces de réponses.....	20

Résultats et discussion

I-Paramètres physico-chimique analysés des écorces d'orange.....	22
II-Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante.....	23
II-1-Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante par la méthode séquentielle.....	24
II-1-1-Effet du type de solvant.....	24
II-1-2- Effet de la concentration du méthanol.....	26
II-1-3- Effet de temps d'extraction.....	27

II-1-4- Effet de la température d'extraction.....	29
II-2- Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante par la méthodologie de surfaces des réponses.....	32
II-2-1-Construction du plan d'expérience.....	32
II-2-2- Modèle globale et manque d'ajustement.....	35
II-2-3- Effets des facteurs.....	35
II-2-4- Représentation spatiale et analyse des modèles de surfaces des réponses.....	38
II-2-5- Détermination des conditions optimales.....	42

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Résumé



Introduction

Les agrumes sont le principal genre dans la famille des Rutaceae (Turner, 2013). L'agrumiculture constitue le plus grand secteur de production de fruits dans le monde, avec plus de 90 millions de tonnes pour la campagne 2016/2017 (USDA, 2017) où l'Algérie occupe la 4^{ème} position dans la région méditerranéenne (FAO, 2016). Cette production se décline essentiellement en 4 catégories : citron, mandarine, pamplemousse et l'orange avec une part de 54% de la production mondiale (USDA, 2017). Les oranges sont les plus consommés en raison de leurs bonnes saveurs, leurs valeurs nutritives et leurs richesses en molécules bioactives (Wang *et al.*, 2007). Ils sont consommés comme dessert (fruit frais), confiture ou jus.

La transformation industrielle des oranges en jus génère des déchets représentés essentiellement par les écorces qui font 50 à 60% du poids total du fruit (Abou-arab *et al.*, 2016). Ces écorces sont l'association du flavédo qui est la surface périphérique du fruit coloré par des pigments et de l'albédo qui est la couche intérieure blanchâtre (Ramful *et al.*, 2010).

Les écorces d'orange forment une matrice importante vue sa richesse en composés tels que les caroténoïdes, l'acide ascorbique, et les composés phénoliques caractérisés par leurs activités antioxydantes, thérapeutiques, etc. et ayant des applications très variés dans différents domaines : alimentaire, cosmétique, nutraceutique, etc. Ces écorces représentent un gisement riche en ingrédients nutritionnels. Toute fois, la voie de valorisation industrielle la plus répandue demeure l'extraction des huiles essentielles (Singh *et al.*, 2014), l'utilisation directe des écorces dans la production des confiseries (bonbons, confitures,...) (Bocco *et al.*, 1998). En Algérie les co-produits d'orange sont principalement utilisés en tant qu'aliment de bétails ou fertilisants pour les sols. Cette valorisation devient un enjeu d'un point de vue environnemental et économique, elle permet non seulement de minimiser la pollution, mais aussi de proposer de nouvelles opportunités permettant le développement économique.

Le but de cette étude est de doser les teneurs en composés bioactifs tels que les caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques totaux et les flavonoïdes. Et pour évaluer l'influence des différents paramètres expérimentaux (solvant, temps, température) sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante, on a procédé à une optimisation afin de déterminer les conditions optimales d'extraction de ces derniers afin d'obtenir le meilleur rendement en composés phénoliques et la meilleure activité antioxydante



Partie théorique :



Chapitre I:
Synthèse bibliographique

I-L'Orange :

I-1- Données botaniques

L'orange, dont le nom scientifique est *Citrus sinensis*, fait parti du genre Citrus qui est constitué de plus de 1300 espèces (Ould yerou *et al.*, 2017). L'orange constitue un véritable gisement de nutriments essentiels (M'hiri, 2015), qui contribue à l'équilibre nutritionnel de tous à cause de leur richesse en substances et principes actifs indispensables au bon fonctionnement du métabolisme humain.

Toutes les espèces appartenant à ce genre sont provenu des régions tropicales et subtropicales du sud-est d'Asie. (FAO, 2015).

I-2- Systématique et description morphologique/physiologique

La systématique de l'orange '*citrus sinensis*' est présentée dans le **tableau N°I** suivant :

Tableau N° I: Taxonomie de l'orange (*citrus sinensis*) (Nacolosi, 2007)

Règne	<i>Végétal</i>
Ordre	<i>Géraniales</i>
Sous-ordre	<i>Géraniineae</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Sous-classe	<i>Archichalmydeae</i>
Division	<i>Embryophyta</i>
Sous-division	<i>Angiosperme</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Sous-famille	<i>Aurantiodeae</i>
Tribu	<i>Citreae</i>
Sous-tribu	<i>Citrinae</i>
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus sinencis</i>

L'orange, le fruit principal du genre citrus, qui présente différentes colorations, formes, composition du jus et périodes de maturité, a la structure anatomique suivante : (**Figure N° 1**).

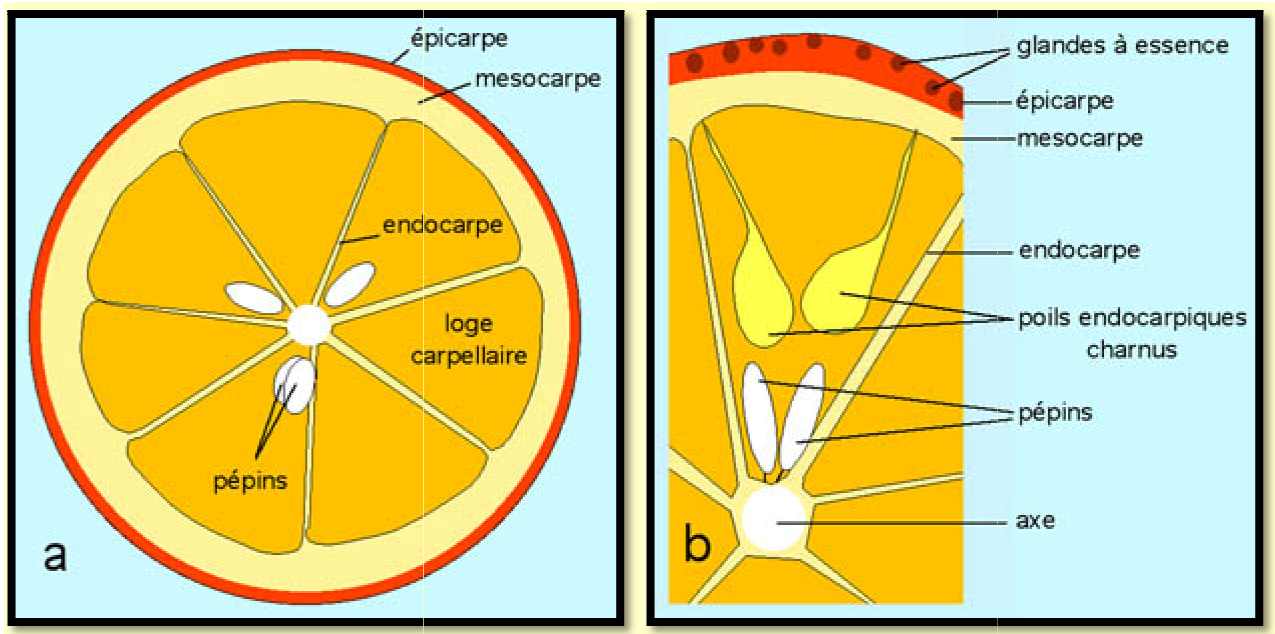


Figure N°1 : Schéma détaillant la structure anatomique de l'orange (www.snv.jussieu.fr).

Les agrumes et en particulier les oranges, sont des fruits charnus de type bai avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées (**M'hiri, 2015**) qui sont: L'épicarpe appelé flavédo, le mésocarpe appelé albédo qui constitue l'écorce ou le péricarpe, et en dernier l'endocarpe (pulpe).

I-2-1-L'Ecorce ou péricarpe

L'écorce de l'orange est constituée de deux tissus différents qui sont : l'épicarpe et le mésocarpe,

➤ **Flavédo ou épicarpe**

L'épicarpe est la surface périphérique du fruit, représente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences (glande Schizolysigènes) réparties d'une façon irrégulière qui confère l'odeur particulière des orange, rappelant le mot « flaveur ». (**M'hiri, 2015**). Le flavédo peut être de coloration verte ou orange en fonction de sa composition en pigments flavonoïdes et caroténoïdes (**Dugrand-judek, 2015**).

➤ Albédo ou mésocarpe

Le mésocarpe est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe du coté externe, et aux membranes des segments sur le coté interne (M'hiri, 2015).

I-2-2-Endocarpe ou pulpe

C'est la partie comestible du fruit, constituée d'environ 8 à 16 segment entourée par une fine membrane (dite Septa) (Dugrand-judek, 2015). Qui tapisse les nombreuses loges capillaires (carpelles) contenant des poils à jus et des pépins.

I-3- La production mondiale d'orange

Selon les données de l'USD A (Département américains de l'agriculture), la production mondiale d'orange (*Citrus sinensis*) représente 54% de la production globale des agrumes pour l'année 2016/2017. Le Brésil est le premier producteur dans le monde avec plus de 19 million de tonnes (ONGARI, 2017) (Figure N° 2), la chine et l'union européenne se classent en deuxième position avec 12% de la production globale soit 6 million de tonnes. Avec 9% (soit 8,10 million d tonnes) de la production mondiale d'orange, Les Etats-Unis et le Mexique occupent le 4^{em} rang.

Les pays méditerranéens ont une production de 20 million de tonnes, essentiellement destinées à la consommation locale, dont les principaux producteurs sont : l'Espagne avec 10 MT, l'Italie avec 12,5 million de tonnes, la Turquie avec 4 million de tonnes, et l'Egypte qui représente 6% (soit 5.4 million de tonnes) de la production mondiale, (ONGARI, 2017).

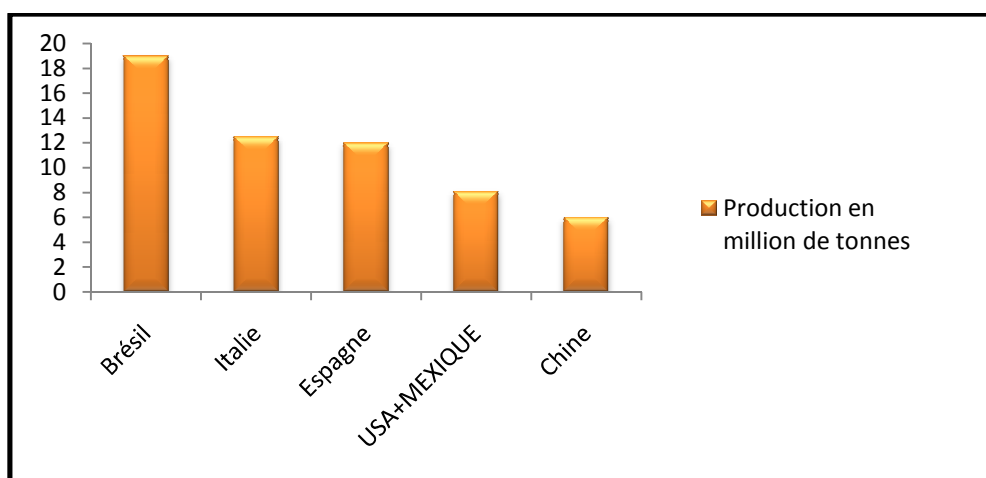


Figure N° 2 : Les principaux pays producteurs d'orange dans le monde (USDA, 2017)

La production de l'orange pour l'année 2017/2018 devrait chuter de 4 MT par rapport à celle de l'année précédente (USDA, 2018), et cela peut être dû aux conditions météorologiques défavorables entraînant des récoltes plus faibles.

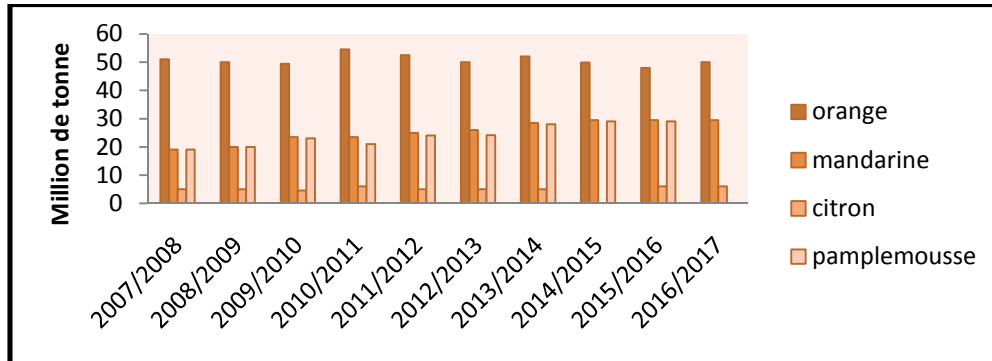


Figure N° 3 : Evolution de la production mondiale par variété d'agrumes par million de tonnes (ONAGRI, 2018).

I-4- Production Algérienne

L'Algérie est reconnue pour la qualité supérieure de ses agrumes ainsi que pour son savoir faire tant dans la sélection des espèces que dans la production de fruits, de jus et des huiles essentielles d'agrumes (Ferhat *et al.*, 2016).

La production Algérienne d'agrumes pour l'année 2016 est estimée de 13724000 tonnes, avec une 1025.5 milles tonnes d'orange. Elle occupe la 2^{ème} place dans la région nord africaine et la 4^{ème} dans la région méditerranéenne selon des études préliminaires pour l'année 2016. (FAO, 2016) (Tableau N°II).

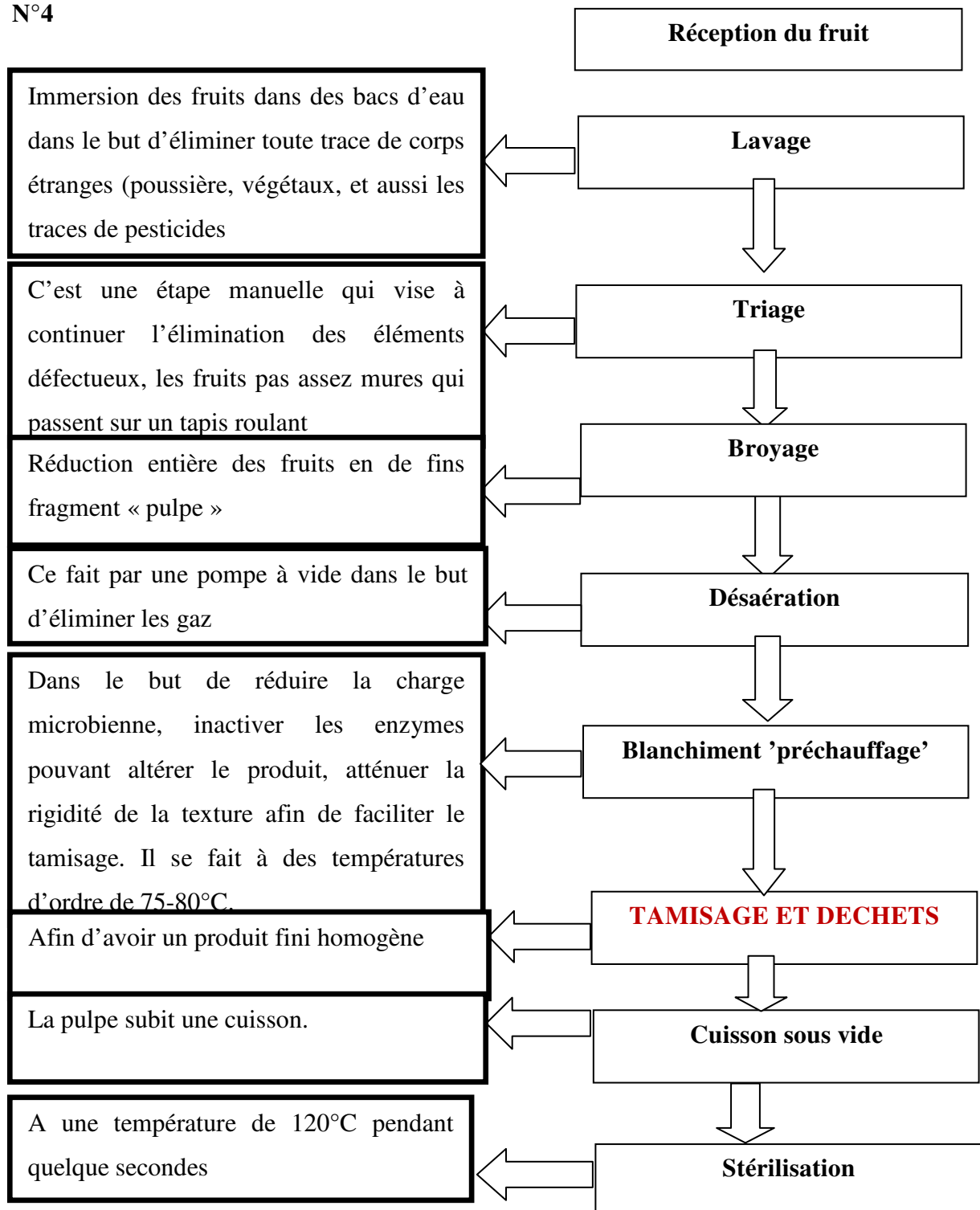
Tableau N°II : Les principaux pays producteurs d'orange dans la région méditerranéenne. (FAO, 2016).

Pays	Production en milles de tonnes (MT)
Espagne	3641.4
Egypte	3610.4
Italie	1854.9
Algérie	1025.5
Maroc	925.0
Grèce	808.1
Tunisie	127.9
Chypre	33.2

II-La transformation industrielle des oranges

II-1-Procédé de transformation d'orange en pulpe dans l'unité El Kseur de CEVITAL

Avant que le produit final soit mis sur le marché, la matière première doit subir des transformations tout en suivant les étapes représentées dans le diagramme suivant (**Figure N°4**)



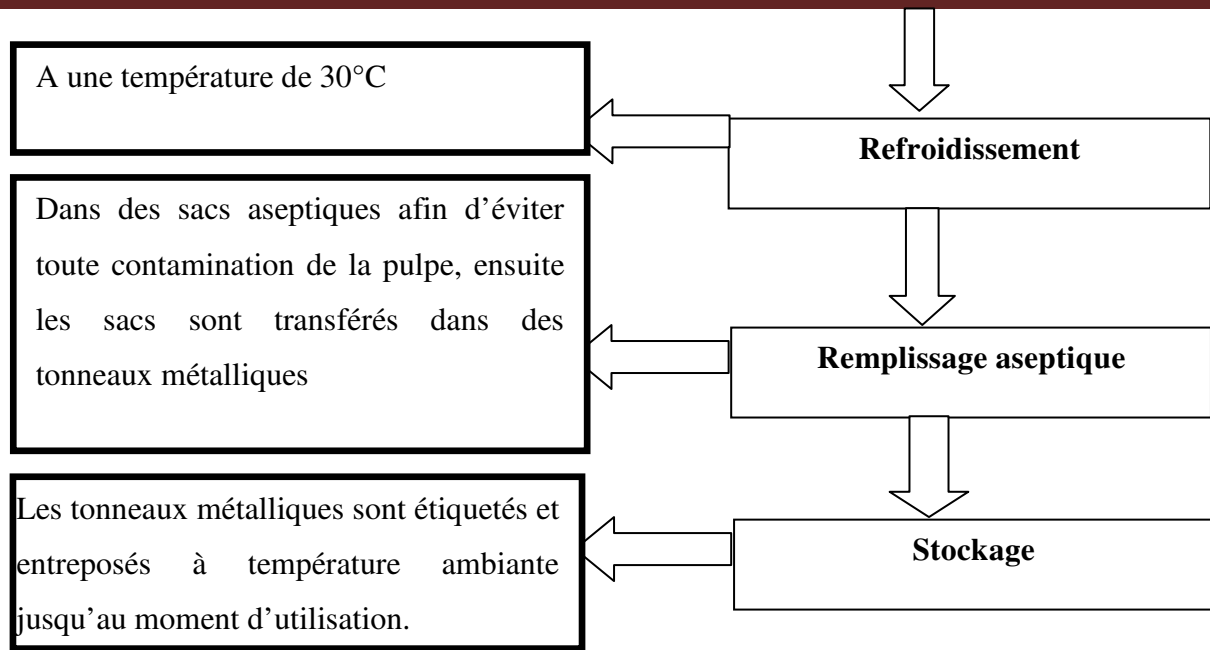


Figure N°4 : Diagramme de transformation d'orange en jus pulpeux.

II-2- Déchets de la transformation industrielle

La consommation et l'industrie de transformation des agrumes en général et des oranges en particulier génèrent de gigantesques masses de sous-produits tels que les écorces, les pulpes et les pépins. ces derniers peuvent atteindre 50 à 60% du poids total du fruit (Valesco *et al.*, 2017). Au cours de cette transformation, les écorces sont les sous-produits primaires non traitées, elles deviennent une source de pollution environnementale.

Les écorces, qui représentent la plus grande partie des déchets de transformation d'orange sont utilisées comme mélasse pour l'alimentation des animaux, production de fibres et de carburant (Lagha-Ben-Hammouche *et al.*, 2017), même pour les déchets de la transformation de l'orange chez CEVITAL unité Elkseur, ils sont destinées essentiellement à l'alimentation de bétail et à la fertilisation des sols.

II-2-1-L'écorce de l'orange

A- Composition chimique globale

Les composés phénoliques sont représentés essentiellement par les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les flavonoïdes des écorces sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale et antibactérienne (M'hiri, 2015).

La composition globale est représentée dans la figure ci-dessous (Tableau N°3).

Tableau N° III: Composition chimique globale des écorces d'orange (g/100g MS) (**M'hiri, 2015**)

Composition chimique	Concentration
Eau	60- 75 %
Lipides	1.66g/100g MS
Protéines	1.79g/100g MS
Glucides	15.01g/100g MS
Minéraux	3.45g/100gMS
Fibres	41.64g/100gMS
Caroténoïdes	0.04g/100gMS
Phénols totaux	19.62g/100gMS
Vitamine C	1.15g/100g MS
Huiles essentielles	0.6g/100g MS

a-Eau

Les écorces d'agrumes présentent des teneurs élevées en eau (soit 60% à70% en base humide), de ce fait c'est un coproduit hautement périssable (**M'hiri, 2015**).

b- Glucides

Les sucres solubles comme le glucose, fructose et le sucrose, et les sucres insolubles tels que la cellulose, l'hémicellulose et les pectines sont présents dans les écorces de l'orange (**El-kantar et al., 2018**).

Les sucres insolubles cités précédemment se trouvent essentiellement dans les parois cellulaires de l'écorce d'orange, et jouent un rôle important pour la santé humaine (**Elleuch et al., 2011**).

c- Huiles essentielles

Les huiles essentielles connues sous le nom d'essence ou parfum sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau et plus au moins solubles dans l'éther et l'alcool (**Bousbia, 2011**), ils sont localisés dans les glandes situées dans le flavédo. Le limonène est le composé majoritaire dans les différentes variétés des écorces d'agrumes

(92,6% pour la mandarine, 95,4% pour le pamplemousse et 94,88- 97,3% pour les oranges) (Hosni *et al.*, 2010).

L'extraction des huiles essentielles se fait par plusieurs techniques tels que l'extraction par la distillation à la vapeur, l'hydro-distillation ou par une simple pression (Ferhat *et al.*, 2016).

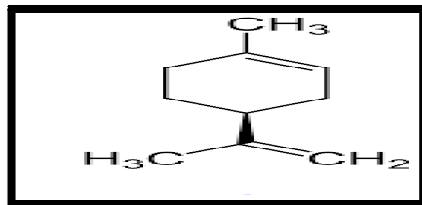


Figure N°5 : Structure chimique du limonène (www.fr.wikipedia.org).

d- Fibres :

L'écorce d'orange est un élément riche en fibres alimentaires (Fernandez-lopez *et al.*, 2009). Elle contient des fibres non solubles telles que la cellulose et l'hémicellulose avec des teneurs plus importantes par rapport aux autres variétés. La teneur en fibre hydrosolubles (pectine) varie selon les variétés d'agrumes, par ailleurs les écorces d'orange présentent des teneurs faibles par rapport aux autres variétés tel que la mandarine et le citron (M'hiri, 2015). Le tableau N° IV représente la composition en fibres des écorces d'agrumes

Tableau N° IV : La composition en fibres des écorces d'agrumes.(Marin *et al.*, 2007)

Classe des fibres	% bs			
	Pectine	Lignine	Cellulose	Hémicellulose
Orange	0,22-23,02	7,52	37,08	11,04
Mandarine	2,58-3,73	13,54	30,53	11,04
Citron	6,52-13,00	7,56	23,06	8,09

e-Minéraux

Les écorces de *citrus sinensis* sont riches en minéraux (Tableau N°V) essentiellement le magnésium (Mg), potassium (k) et le calcium (Ca) ainsi que le sodium (Na) comme éléments majeurs, et le fer (Fe), zinc (Zn) et le cuivre (Cu) comme éléments mineurs (M'hiri, 2015).

Tableau N°V: Composition en minéraux des écorces d'orange (**Kammoun et al., 2011**)

Type d'agrume	Orange (g/100g MS)
Potassium (K)	220.40
Sodium (Na)	312.89
Calcium (Ca)	1201.4
Magnésium (Mg)	156.77
Zinc (Zn)	1.86
Cuivre (Cu)	1.13
Fer (Fe)	1.58

III-La composition antioxydante des écorces d'orange

III-1-Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de ralentir ou de prévenir l'oxydation d'autres molécules et peuvent protéger les cellules des dommages causés par les molécules instables connues sous le nom de radicaux libres.

Les réactions d'oxydation peuvent produire des radicaux libres qui déclenchent des réactions en chaîne qui causent des dommages pour la cellule. Les antioxydants terminent ces réactions en éliminant les intermédiaires de radicaux libres et inhibent d'autres réactions d'oxydations.

Par conséquent les antioxydants sont souvent des agents réducteurs tels que 'acide ascorbique, les polyphénols, etc. (**Assefa, 2016**).

III-2- Antioxydants de l'écorce

Il existe plusieurs antioxydants au niveau de l'écorce d'orange :

III-2-1-Caroténoïdes

La couleur des écorces et de la pulpe des oranges mures est due aux pigments dit caroténoïdes, qui sont des pigments synthétisés par les plantes dans le but de les protéger avec leurs propriété antioxydante (**Boubkri, 2014**), et leurs abondances fait une source importante des nutriments alimentaires (**Sharma et al., 2017**).

Les caroténoïdes sont classés généralement en deux principales classes qui sont les caroténoïdes hydrocarbonés connus sous le nom de carotènes (exemple : la β -carotène et le lycopène), et les caroténoïdes oxygénés connus sous le nom de xanthophylles (exemple de :

lutéine, violaxanthine). La structure chimique des caroténoïdes est présentée dans la **Figure N° 6**.

Plus de 115 caroténoïdes ont été découverts chez les agrumes principalement au niveau de l'écorce qu'au niveau de la pulpe contribuant à divers couleurs allant de jaune au rouge. (Sharma *et al.*, 2017) (Tableau N°VI).

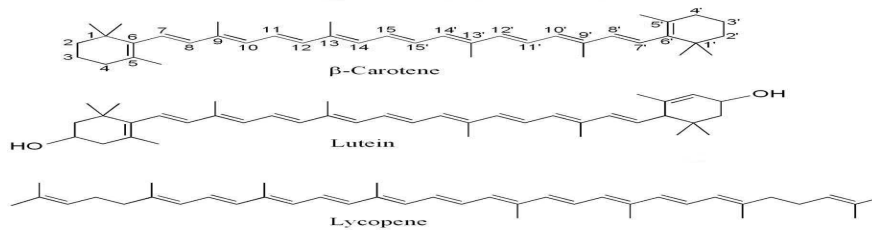


Figure N°6 : La structure chimique de quelques caroténoïdes de l'écorce de l'orange : β -carotène, la lutéine et la lycopène (Borneo R. and Edel Leon A., 2011).

Tableau N°VI: Teneurs en caroténoïdes des écorces des différentes variétés d'orange ($\mu\text{g/g MS}$) (Wang *et al.*, 2008)

Variété	Lutéine	Zéaxanthine	Béta-crypto xanthine	Béta-carotène
Mandarine	7.75	6.46	30.50	69.20
Orange	29.0	27.70	0.76	50.30
Pamplemousse	0.80	0.51	0.40	0.96

III-2-2- Vitamines (vitamine C)

Les vitamines de l'écorce d'orange sont représentées essentiellement par la vitamine C (Chidan kumar *et al.*, 2011).

La vitamine C ou également l'acide ascorbique (**figure N°7**) est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur et à l'oxygène, la vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase. Elle est un antioxydant puissant capable de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO). (Boubkri, 2014).

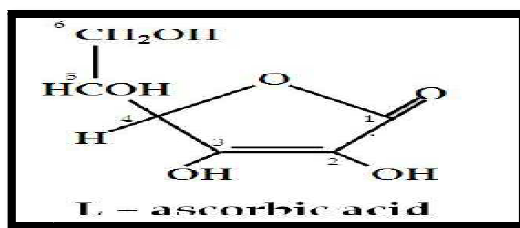


Figure N°7: Structure de l'acide ascorbique (Morales-González *et al.*, 2014).

III-2-3-Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont la classe principale des métabolites secondaires chez les végétaux, Ils sont classés en acides phénoliques et en polyphénols qui sont à leur tours classés en flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Otavio *et al.*, 2017).

Ces composés sont principalement synthétisés à partir de l'acide aminé phénylalanine qui est converti en acide cinnamique, ils jouent un rôle dans la régulation de la croissance des plantes (attraction des pollinisateurs), participent aux réponses de défense pendant l'infection, l'exposition excessive au soleil, jouent un rôle dans la pigmentation... (Kubart, 2016).

Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique et d'un ou de plusieurs groupements phénoliques dans leur structures (Figure N°8), ils se différencient par le nombre et la position des groupes hydroxyles et la présence de différents substituants tels que les acides organiques et les groupements alkyles (M'hiri, 2015). Les composés phénoliques ont plus de 8000 structures identifiées (Laaboudi, 2012).

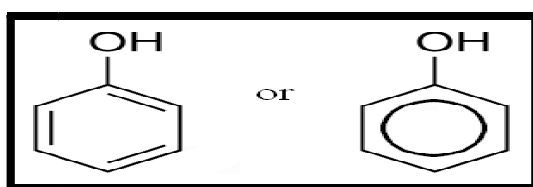


Figure N°8 : Structure de base du phénol (www.en.wikipedia.org).

III-2-3-1- Les principaux composés phénoliques de l'écorce d'orange

On retrouve principalement deux classes de composés phénoliques dans les écorces d'orange : les flavonoïdes et les acides phénoliques (Kamran khan, 2010).

a-Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavédo, désignant la couche externe des écorces

d'orange, ou plutôt ce terme a été prêté du mot latin flavus qui désigne jaune (**Laaboudi, 2012**).

Ce sont des composés de faibles poids moléculaires, possédant un squelette carboné de 15 atomes de carbones (C6-C3-C6), **figure N° 9** (**Kamran khan, 2010**), formant deux noyaux aromatiques A et B qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle C, qui portant de divers fonctions qui définit l'appartenance du flavonoïde à un groupe déterminé selon le degré d'hydroxylation et de glycosilation (flavanone, flavone et les flavonols).

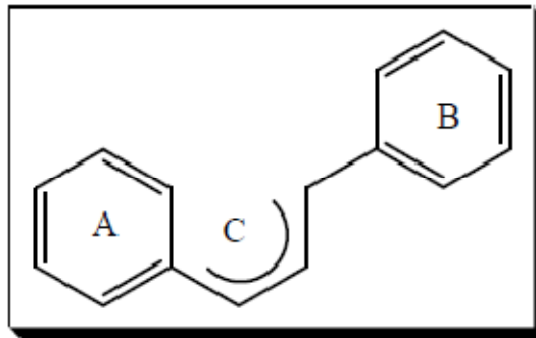


Figure N°9: Structure de base des flavonoïdes (**LAABOUDI, 2012**).

▪ Flavanones

Les flavanones sont largement distribués chez les agrumes (**Kamran khan, 2010**). Leurs fortes concentrations se trouvent au niveau des écorces d'orange (**Laaboudi, 2012**).

Les flavanones les plus abondants dans les écorces d'agrumes sont la naringine et l'hésperidine, la naringine confère un goût amer caractéristique des oranges amères, et représente le flavonoïde le plus abondant dans les écorces de pamplemousse. (**M'hiri, 2015**). Tandis que pour les écorces de la mandarine l'hésperidine représente le taux le plus élevée. (**Figure N° 10**).

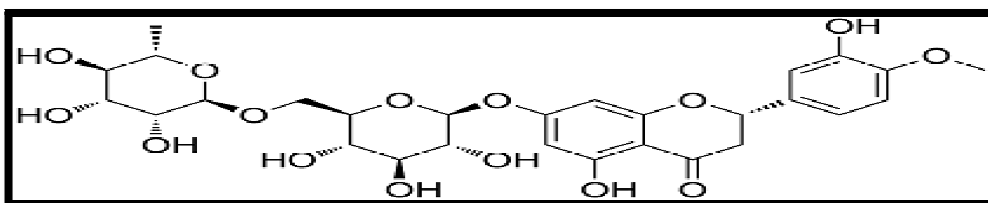


Figure N° 10: Structure du principal flavanone de l'écorce d'orange : l'hésperidine

(www.fr.wikipedia.org).

b-Les acides phénoliques

Dans les écorces d'orange, les acides phénoliques sont principalement représentés par l'acide hydroxycinnamique qui dérive de l'acide cinnamique, ils ont une structure de base de type C₆-C₃. L'acide phénolique le plus abondant dans les écorces d'orange est l'acide p-coumarique avec une teneur de 229,1µg/g MS (Wang *et al.*, 2008) (Figure N°11)

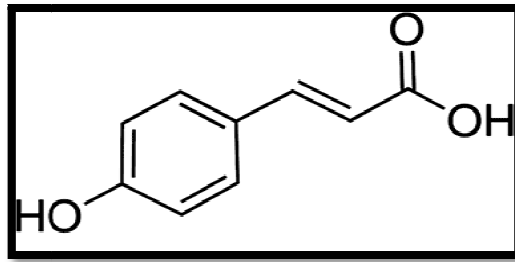


Figure N° 11: Structure chimique de l'acide p-coumarique. (www.fr.wikipedia.org).

IV- Intérêt et utilisation de l'écorce de l'orange

De nombreuses études de recherche ont été consacrées à la conversion de l'écorce d'orange en d'autres produits appréciables (éthanol, acide succinique et enzymes) (Bicu et Mustata, 2011) et cela par des processus hydrolytiques et fermentaires. D'autres recherches ont aussi poursuivi ces études par l'extraction de quelques composés comme les sucres, les caroténoïdes, flavonoïdes et fibres qui ont une place importante dans l'industrie alimentaire.

A travers son activité de biodégradation microbienne, l'écorce d'orange est également utilisée comme milieu de culture pour la production d'enzymes telle que les pectinases cellulase en présence des micro-organismes tels que des espèces du genre *Bacillus* (Ismail, 1996).



Partie pratique



Chapitre I:
Matériel et méthodes

I-Matériel végétal

Les échantillons utilisés dans cette étude sont récupérés auprès de l'unité El-Kseur CEVITAL, Ils sont issus de la chaîne de production de la pulpe utilisés pour la fabrication de jus « Tchina ».

Après la récupération d'une quantité d'environ 5 kg dans un sachet en plastique au près de l'unité le 13/03/2018, et à l'arrivé au laboratoire, une partie de l'échantillon est mise dans le réfrigérateur afin d'effectuer le dosage de la vitamine C, et la détermination du taux d'humidité. Et l'autre partie est séchée à l'étuve pour servir au dosage des flavonoïdes, polyphénols, caroténoïdes, et les glucides.

II- Préparation des échantillons

II-1-Séchage

Le séchage est un phénomène où la température joue un rôle primordial dans la déshydratation de l'aliment. L'étuve est un moyen efficace pour le séchage des échantillons, plus rapide que le séchage traditionnel au soleil.

La pate des écorces est séchée à une température de 40°C pendant 24h afin d'avoir une masse sèche qui subira par la suite un broyage.



Figure N°12: Photographie de l'échantillon dans l'étuve.

II-2-Broyage et tamisage

La pate d'écorce après avoir été séchée, subira un broyage à l'aide d'un broyeur éclectique, suivi d'un tamisage pour avoir une poudre homogénéisée, qui par la suite sera conservée dans des flacons opaques, fermés et mis à l'abri de la lumière jusqu'au moment d'utilisation.

III-Analyses physico-chimiques

III-1-Taux d'humidité

La teneur en eau des écorces de l'orange a été déterminée selon la norme internationale 5534 (ISO, 2004), elle est mesurée par la dessiccation de 4g d'échantillon mis dans des creusets en porcelaine dans une étuve ventilée à une température de 105°C jusqu'à un poids constant (24h).

Le taux d'humidité est exprimé par rapport à la base humide (%) suivant l'équation ci-dessous :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [m_i - m_s / m_i] * 100$$

Où : m_i est la masse initiale de l'échantillon avant dessiccation,

: m_s est la masse sèche de l'échantillon après dessiccation.



Figure N° 13 : Photographie des résultats du test humidité

III-2-Taux de cendres

La teneur en cendres des écorces d'orange a été déterminée selon la méthode officielle AOAC 972.15 (AOAC, 2006). Cette méthode consiste à calciner l'échantillon à 500°C dans un four à moufle jusqu'à obtention d'une cendre blanchâtre. La masse sèche obtenu à partir du test de l'humidité, mis dans des creusets en porcelaine sont placés pendant 05 heures dans un four à moufle à 500°C. A la sortie du four, les creusets sont refroidis dans un dessiccateur avant d'être pesés.

Le pourcentage en cendres est déterminé selon l'équation suivante :

$$\text{Teneur en cendre (\%)} = [\text{masse en cendre} / \text{masse initiale de l'échantillon}] * 100$$

NB : La masse initiale de l'échantillon est exprimée par rapport à la matière sèche.

III-3-Dosage des glucides

Les glucides sont extraits en utilisant de l'éthanol 80%, suivant la procédure de **Kader et al. (1993)**. Une aliquote de 0,5 g de la poudre mélangée avec 15ml de l'éthanol 80%, suivi d'une incubation au bain marie à 95 °C pendant 15min. Le surnageant est récupéré par centrifugation 5000rpm /10min.

La détermination de la teneur en sucres dans les échantillons des écorces d'orange est faite par la méthode de **Dubois et al. (1956)**, en présence de l'acide sulfurique et à chaud, les glucides sont déshydratés en dérivés de furfural qui se combinent facilement avec le phénol et donnent une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural).

Un volume de 0.5ml de surnageant est mélangé avec 0.3ml de phénol (5%) et 1.5ml d'acide sulfurique concentré. Après incubation à 105°C pendant 5min, l'absorbance est mesuré à 490nm. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent de glucose par 100g de matière sèche, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose (**Annexe I, Figure N°22**).

IV-Dosage des composés bioactifs d'écorce d'orange

IV-1-Dosage des flavonoïdes

Principe

Le principe de dosage des flavonoïdes est basé sur la formation de complexes suite à la chélation des métaux Al^{3+} , utilisé sous forme de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), par les groupements OH (**Ribereau-gayon, 1968**).

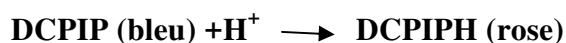
Un extrait est préparé par macération de 0.5g de poudre dans 30ml d'éthanol, suivie par une agitation pendant 30min, et par une filtration.

Un volume de 01 ml de l'extrait est ajouté à 01 ml de la solution éthanoliques d' $AlCl_3$ (2%) suivi par une agitation, incubation à température ambiante pendant 15min à l'obscurité (**Khenouf et al., 2010**). L'absorbance est lue à 430nm. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par 100g de matière sèche en se référant à une courbe d'étalonnage faite avec la quercétine (**Annexe I, Figure N°23**).

IV-2-Dosage de la vitamine C

Principe

Le dosage est basé sur la réaction d'oxydation de la vitamine C par une solution de DCPIP en milieu acide, le produit de réduction de ce dernier est de couleur rose. Si la vitamine C est présente, la coloration bleue du DCPIP qui devient rose dans les conditions acides, vas donner un composé incolore en oxydant l'acide ascorbique selon les réactions suivantes (**Hughes, 1983**)



Le dosage de la vitamine C est réalisé par le 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP).

La vitamine C est extraite à partir de 0.5 g de l'échantillon par 20ml de l'acide oxalique (1%), avec une agitation pendant 30min à l'obscurité. Après centrifugation 5000rpm/10 min, un volume de 300µl de surnageant est mélangé avec 2.7ml de DCPIP. L'absorbance est lue à 515nm après 15secondes (**Klein et Perry, 1982**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique /100g de MF en se référant à une courbe d'étalonnage faite par l'acide ascorbique. (**Annexe I, Figure N°24**).

IV-3-Dosage des caroténoïdes

La structure chimique des caroténoïdes présente un système conjugué de doubles liaisons alternées avec des liaisons simples formant la partie centrale de la molécule qui constitue le chromophore responsable de l'absorption de la lumière (**Zaghdoudi, 2015**).

L'extraction est réalisée selon la méthode de **Soto-zamora et al. (2005)** : une masse de 0.5 g de l'échantillon est écrasée avec un pilon dans 10ml de mélange de solvant d'extraction (éther de pétrole/acétone/éthanol, 5,5/2, 5/2), le mélange est récupéré dans une ampoule à décanter, après décantation et séparation des deux phases, on récupère la phase supérieure. L'opération est répétée jusqu'à épuisement totale de la couleur jaune. La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de la phase récupérée à 450nm et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de beta-carotène par 100g de la matière sèche, en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe I, Figure N°25**).

V- Optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante est faite par la méthode séquentielle (étape par étape) et aussi par la méthodologie surfaces de réponses (plan d'expérience).

V-1-Méthode séquentielle

a-Préparation des extraits

L'extraction des composés phénoliques se fait par macération (extraction solide/ liquide) à température ambiante. Une quantité de 0.5g de la poudre est mise dans un érlenmeyer où 30ml du solvant d'extraction sont ajoutés, le mélange est mis sous agitation pendant 30min, par la suite il subit une filtration.

L'optimisation d'extraction des polyphénols et l'activité antioxydante par la méthode séquentielle est faite sur un seul échantillon tout en optimisant quatre paramètres : Type de solvants (méthanol pur, éthanol pur, acétone pur et eau), concentration des solvants (0%, 25%, 50%, 75% et 100%), temps d'extraction (0min, 15min, 30min, 45min et 60min), température d'extraction (température ambiante, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C).

b-Dosage des composés phénoliques

Principe :

Le dosage des composés phénoliques est basé sur la réaction d'oxydoréduction. Le réactif de Folin-Ciocalteu, acide de couleur jaune, est constitué de polyhétérocycles qui est un mélange d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange de d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présent dans le milieu réactionnel (**Lapornik et al., 2005**).

La teneur total en composés phénoliques a été déterminé suivant la méthode modifiée de **Singh et al. (2014)** qui se base sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu. 200µl de l'extrait dilué avec 450µl d'eau distillée, mélangé avec 750µl de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10) et 300µl de carbonate de sodium à 7%, puis le mélange est incubé pendant 1heure à

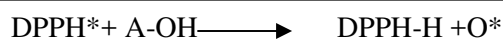
l'obscurité et les absorbances sont lues à 720nm. Les résultats sont déterminés en se référant à une courbe d'étalonnage faite avec de l'acide gallique et ils sont exprimés par mg équivalent d'acide gallique par 100g de matière sèche (**Annexe I, Figure N° 26**).

c-Mesure de l'activité antioxydante des écorces

Activité anti-radical DPPH

Principe

L'activité anti radicalaire des extraits est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical diphényle picryl-hydrazyl (DPPH*), suite à un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouve dans le milieu réactionnel. La réaction de réduction du DPPH provoque la diminution de l'intensité de la couleur violette qui est mesurée par un Spectrophotomètre à 517 nm, dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme est être récapitulé dans la réaction suivante (**Popovici et al ., 2009**):



A-OH : donneur de proton.

L'activité de piégeage du radical DPPH* est déterminée selon une version modifiée de la méthode de **Singh et al. (2014)**, une solution de DPPH est préparée avec du méthanol à une concentration de 0,02g/l. 50µl d'extrait dilué avec 50µl de méthanol est ajouté à 900µl de la solution de DPPH et pour le témoin est fait en parallèle, en mélangeant 100µl de méthanol avec 900µl de la solution de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pour une durée de 30 min et à température ambiante, la lecture des absorbances est faite à une longueur d'onde de 517nm. Les résultats sont exprimés en mg EAG/100g en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide gallique (**Annexe I, Figure N° 27**).

V-2-- Méthode des surfaces de réponses

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante est réalisée par la méthode des surfaces de réponse en utilisant le logiciel JMP et le plan Box-Behnken sur notre échantillon (poudre d'écorce d'orange), trois paramètres ayant une influence significative ont été sélectionnés qui sont : la concentration du solvant, le temps et la température d'extraction, et pour chaque paramètre, trois niveau sont fixés : niveau bas (-1), niveau élevé (+1) et un niveau intermédiaire (0).

Les composés phénoliques sont extraits à partir de 0.5g de la poudre auquel sont ajoutés 30ml du solvant à différentes concentrations (40%, 60% et 100%) à différents temps (5min, 30min et 55min) et à différentes températures (20°C, 35°C et à 50°C) (**Tableau N°VII**)

Tableau N°VII: Les différentes combinaisons effectuées pour l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et activité antioxydante

Essai	Concentration de solvant	Temps d'extraction	Température d'extraction
1	70(0)	60(+1)	50(+1)
2	70(0)	10(-1)	50(+1)
3	40(-1)	35(0)	50(+1)
4	100(+1)	35(0)	20(-1)
5	70(0)	35(0)	35(0)
6	100(+1)	60(+1)	35(0)
7	70(0)	10(-1)	20(-1)
8	70(0)	60(+1)	20(-1)
9	100(+1)	10(-1)	35(0)
10	100(+1)	35(0)	50(+1)
11	40(-1)	10(-1)	35(0)
12	70(0)	35(0)	35(0)
13	70(0)	35(0)	35(0)
14	40(-1)	35(0)	20(-1)
15	40 (-1)	60(+1)	35(0)



Chapitre II :
Résultats et discussion

I-Paramètres chimiques analysés des écorces d'orange

Les résultats obtenus pour les paramètres chimiques analysés des écorces d'orange (humidité, cendres, glucides, flavonoïdes, vitamine C et les caroténoïdes) sont illustrés dans le tableau N° VIII.

Tableau N° VIII: Les paramètres chimique analysés des écorces d'orange.

Paramètres	Teneurs
Humidité	79,41%
Cendres	3,92%
Glucides	16,51±0,08 g équivalent de glucose /100g MS
Vitamine C	128,65±2,57mg équivalent d'acide ascorbique/100g MS
Flavonoïdes	56,77±0,47mg équivalent de quercitine/100g MS
Caroténoïdes	10,79±0,06mg équivalent de β -Carotène /100g MS

A la lumière des résultats, on constate que les écorces d'orange sont riches en eau (79.41%) et en minéraux (3.92 % en matière sèche),

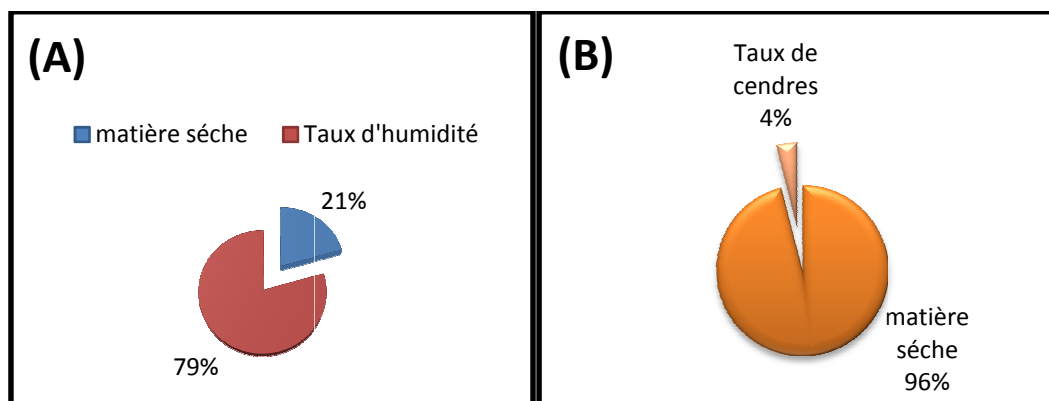


Figure N° 14 : Représentation graphique des résultats du taux d'humidité obtenu (A) et de la teneur en cendres (B) des écorces d'orange.

Ces résultats coïncident avec ceux rapportés par **Abdelghfar *et al.* (2016)** pour les écorces d'orange en utilisant différentes méthodes de séchage (séchage par micro-ondes et à l'air avec des teneurs 3,51% et 3,33% respectivement).

ABOU-ARAB *et al.* (2015), ont montrés que les teneurs en cendres des écorces d'orange de valencia sont de 4.22%, cette différence peut être liée à l'espèce végétale ou à l'origine géographique.

Les écorces d'orange sont aussi riches en flavonoïdes (56.77mg équivalent quercétine/100g MS), en caroténoïdes (10,79mg équivalent en β -carotène/100g MS), en acide ascorbique (128,65mg équivalent d'acide ascorbique/100g MS) et en glucides avec une teneur de 16,51 \pm 0,08g équivalent de glucose/100g MS.

GADE *et al.*, (2018), ont trouvé que les pelures d'orange sont riches en glucides avec un rendement de 52,90% en matière sèche. La différence des résultats peut être liée au séchage ou à la période de récolte ainsi que aux facteurs climatiques.

Rudge de Moraes Barros *et al.*, (2012), montrent que les écorces des mandarines ont une teneur de 47,6mg équivalent acide ascorbique /100g MF (matière fraîche) en acide ascorbique. Tandis que **Fidrianny *et al.*, (2014)** ont indiqué que les teneurs en flavonoïdes et en caroténoïdes atteignent une valeur de 9,94g équivalent de quercétine/100gMS et 2,33 g équivalent de β -carotène/100gMS, respectivement.

Ces différences peuvent être expliquées par la variation des conditions climatiques, type de variété (exemple de la β -carotène qui se trouve en grande quantité dans les écorces de la mandarine que dans les écorces d'orange).la variation des conditions d'extraction peut aussi affecte les taux d'extraction des caroténoïdes, flavonoïdes, etc.

II-Optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante

L'extractibilité des composés phénoliques est exigeante, elle dépend de plusieurs facteurs tels que le type du solvant, la nature de la matrice végétale à extraire, la structure chimique des composés phénoliques, le temps d'extraction ainsi que la température qui peuvent influencer d'une manière significative l'extraction (**Buvi-Koji *et al.*, 2011 ; Dent *et al.*, 2013**).

L'amélioration de l'extraction des polyphénols peut se faire par une optimisation d'extraction, cette dernière est réalisée soit par une méthode séquentielle (étape par étape) ou par une méthode statistique (plan d'expérience).

II-1-Optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante par la méthode séquentielle

II-1-1-Effet du type de solvant

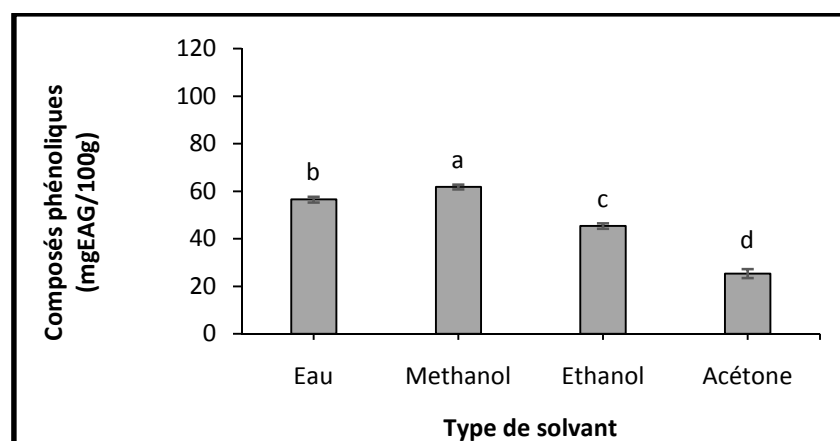
L'extraction par solvant est un facteur primordial qui affecte l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante. L'activité antioxydante dépend du solvant, en raison du potentiel antioxydant différent des composés de polarités différentes (Asséfa, 2016).

La figure N°15 A et B, qui représente l'effet obtenu des différents solvants sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante, montre clairement que le type du solvant a une influence significative soit sur le taux d'extraction des composés phénoliques, soit sur l'activité antioxydante.

La figure N°15-A, indique que le méthanol est le solvant ayant l'influence la plus significative sur l'extraction des composés phénoliques avec une concentration de $61,74 \pm 0,98 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$, suivi par l'eau ($51,46 \pm 1,21 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$), l'éthanol ($45,37 \pm 1,12 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$) et l'acétone en dernier ($25,33 \pm 1,87 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$).

La figure N°15-B, révèle des données sur l'influence du solvant sur l'activité antioxydante, on constate que les différents extraits présentent de fortes capacités à piéger le radical DPPH*, par ailleurs l'extrait méthanolique offre l'activité antioxydante la plus importante avec $85,58 \pm 0,7 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$, suivi par l'éthanol ($62,87 \pm 0,6 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$) et l'eau ($63,49 \pm 0,56 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$), sans différences significatives et enfin l'acétone ($52,71 \pm 0,83 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$)

(A)



(B)

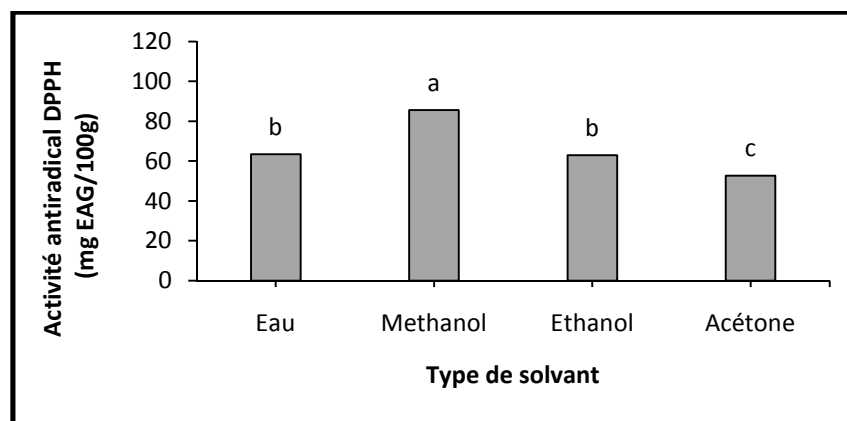


Figure N°15 : Effet du type de solvant sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

Les barres verticales représentent les écart-types. Les résultats d'écorces qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0,05$) avec $d < c < b < a$.

Tajnuba et al. (2016) qui ont étudié l'extraction des composés bioactifs à partir de quelques fruits et légumes, ont montré que le méthanol est le solvant le plus approprié pour un meilleur rendement en composés phénoliques et en flavonoïdes à partir des écorces de grenadine, suivi par l'eau, éthanol et l'acétone. **EL -Bassyouni et al. (2015)** indique que l'extrait méthanolique d'écorces d'orange présente le rendement le plus élevé en composés phénoliques (1,70mgEAG/g MS) comparé à l'éthanol (1,03mgEAG/g MS) et à l'acétone (0,94mgEAG/g MS) qui présente le taux le plus faible.

Les différences des teneurs entre les différents solvants sont dues à la différence de solubilité du soluté (composés phénoliques) dans les solvants de différentes polarités.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'**Ibrahium et Hegazy (2012)**, qui ont montrés que l'extrait méthanolique des écorces d'orange a une forte capacité antioxydante. Les solvants organiques à forte polarité sont plus efficaces dans la récupération quantitative que les solvants à faibles polarité (**Asséfa, 2016**).

Les résultats montrent bien que la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange obtenue par le méthanol est plus élevée par rapport aux autres solvants, de ce fait le méthanol a été retenu pour la suite de cette étude.

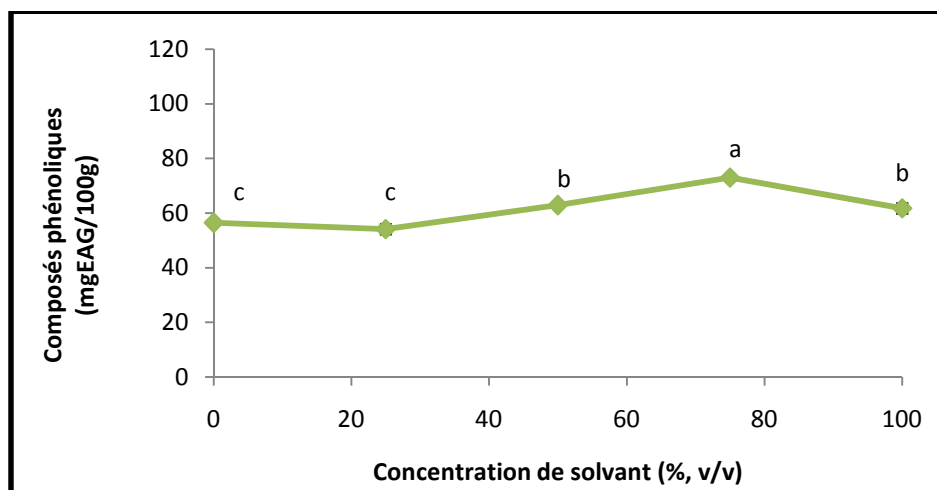
II-1-2- Effet de la concentration du méthanol

Après avoir déterminé le type du solvant approprié pour l'extraction des composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante qui est le méthanol, différentes combinaisons méthanol/eau sont utilisées pour étudier l'effet de la concentration du solvant (0; 25; 50; 75; 100%).

Les résultats obtenus indiquent l'effet des différentes concentrations sur l'extraction des composés phénoliques. La **figure N° 16-A** montre qu'une concentration de 0 et 25% l'efficacité d'extraction est relativement faible puis elle augmente pour atteindre le maximum à une concentration de 75%, et au delà de ce pourcentage, le rendement en composés phénoliques diminue. De même pour l'activité antioxydante (**figure N°16-B**), qui montre qu'à une concentration de 0% le taux d'extraction est relativement faible, puis il commence à augmenter à partir de 25% jusqu'à un pic à 75%, puis il diminue à une concentration de 100% (état pur de solvant).

Selon les résultats, le méthanol 75% est la concentration optimale qui donne la meilleure extraction des composés phénoliques ($73,00 \pm 1,02 \text{mgEAG}/100\text{gMS}$) et l'activité antioxydante ($97,62 \pm 2 \text{mgEAG}/100\text{gMS}$).

(A)



(B)

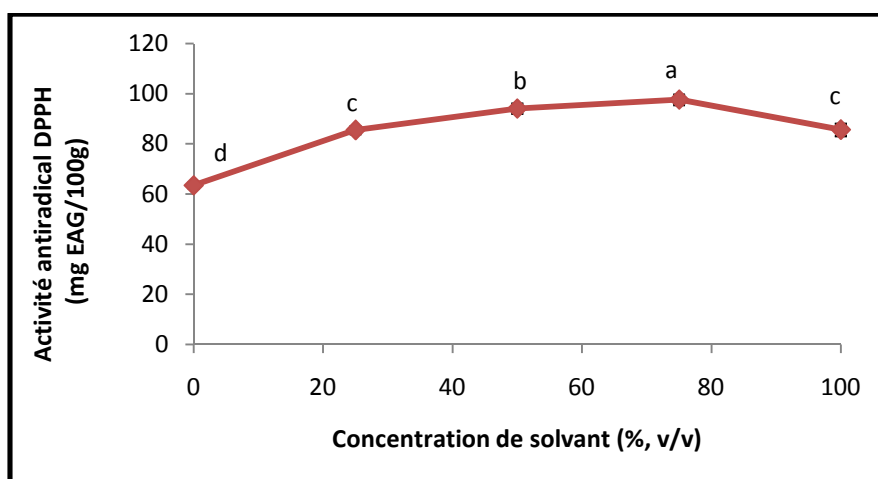


Figure N°16 : Effet de la concentration du méthanol sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents. ($P < 0,05$) avec $c < b < a$.

Qasim et al. (2016), montrent que parmi les solvants de différentes polarités (méthanol 80%, éthanol 80%, acétone et chloroforme), le méthanol 80% apparaît le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques depuis les halophytes médicinales, suivi par l'éthanol 80%, par contre l'acétone a la plus faible efficacité d'extraction. De même pour l'activité de piégeage du radical DPPH*, le méthanol 80% révèle une forte capacité antioxydante comparé aux autres extraits.

Parvathi nandan et al. (2015), montrent que l'extraction des flavonoïdes du cédratier en utilisant différentes concentration du méthanol/eau (20, 40, 60, 80, 100%) est au maximum avec le méthanol à 80%.

II-1-3- Effet de temps d'extraction

Le temps est un paramètre important qui affecte le taux d'extraction des antioxydants.

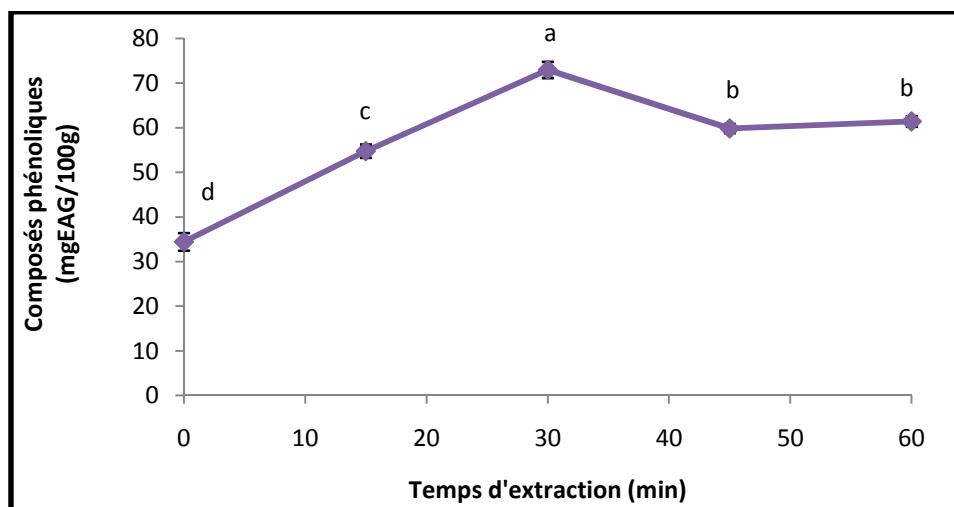
Comme l'indique la **figure N° 17 (A et B)**, le temps d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante à un impact hautement significatif sur le rendement d'extraction.

La figure N°17-A, révèle qu'à un temps de 0 min, le taux d'extraction est relativement faible, il commence à augmenter pour atteindre le maximum d'extraction à 30min (73,00

$\pm 1,80\text{mgEAG}/100\text{gMS}$), au delà de ce temps, la teneur en composés phénoliques diminue (à $t= 45\text{min}$) et se stabilise ($t=60\text{min}$) avec une concentration de $59,85\pm 1,5\text{mgEAG}/100\text{gMS}$ et $61,44\pm 1,17\text{ mgEAG}/100\text{gMS}$, respectivement.

En ce qui concerne l'activité antioxydante (**Figure N°17-B**), à $t= 0\text{ min}$, la capacité de piégeage du radical DPPH* est relativement faible, elle augmente au cours du temps afin d'avoir une teneur maximale à 30min ($97,62\pm 2,14\text{mgEAG}/100\text{gMS}$) puis elle se stabilise à $t= 45\text{min}$ ($96,54\pm 0,98\text{mgEAG}/100\text{gMS}$) et $t= 60\text{min}$ ($95,36\pm 1,45\text{mgEAG}/100\text{gMS}$).

(A)



(B)

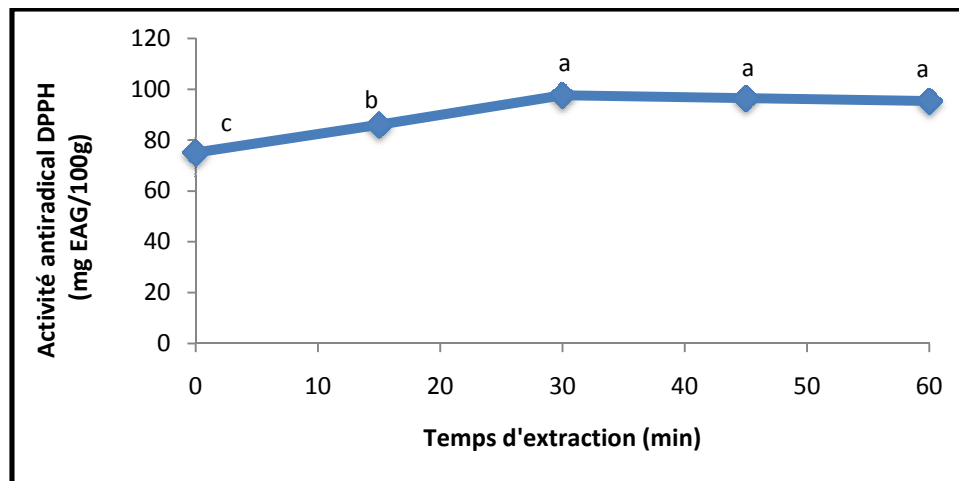


Figure N°17 : Effet du temps sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents. ($P < 0.05$) avec $c < b < a$.

D'après les résultats, un temps de 30 min est considéré comme optimum pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques. Ces derniers sont en accord avec les résultats de **Tajnuba et al.(2016)**, qui indiquent que l'extraction des composés phénoliques à un temps de 30min semble le plus efficace pour augmenter les taux d'extraction.

Et la diminution des teneurs en composés phénoliques au delà de ce temps peut être expliquée par la dégradation des composés phénoliques solubilisés ou à une éventuelle condensation des composés bioactifs au cours de l'extraction prolongée. De même pour l'activité antioxydante qui augmente à 30 min puis se stabilise et cette stabilité peut être expliquée par l'équilibre qui se forme entre le soluté (composés phénoliques) et le solvant d'extraction (**Chew et al., 2011**).

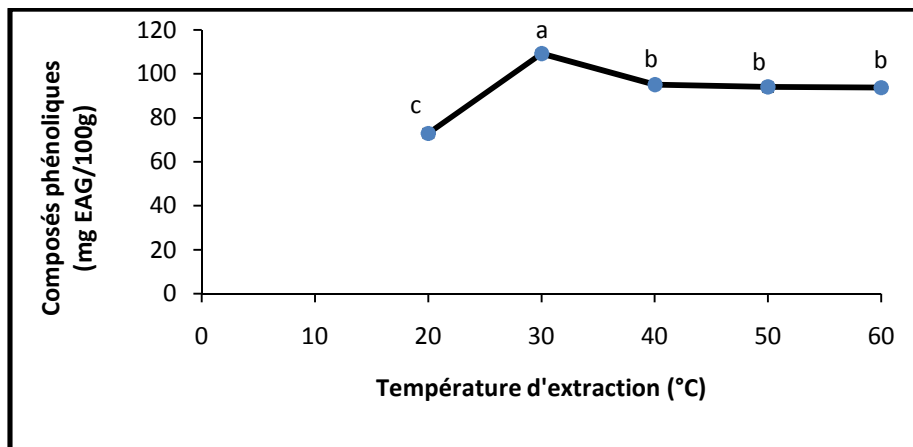
II-1-4- Effet de la température d'extraction

Comme le montre **la figure N°18**, l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante est significativement affectée par la température (20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 °C) en utilisant le méthanol 75% comme solvant d'extraction.

Le taux d'extraction des composés phénoliques (**figure N°18-A**) à température ambiante est relativement faible, il atteint le maximum à une température de 30°C ($109,20 \pm 1,56 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$) puis il diminue à 40°C ($95,01 \pm 1,20 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$) et se stabilise à une température de 50°C et de 60°C avec $94,00 \pm 1,98 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$ et $93,79 \pm 1,23 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$, respectivement.

La figure N°18-B montre l'effet de la température sur l'activité antioxydante, il est bien claire qu'à température ambiante (20°C), l'activité anti-radicalaire est relativement faible ($97,62 \pm 2,14 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$), cependant à 30°C l'activité antioxydante est au maximum ($108,91 \pm 2,14 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$), au-delà de cette dernière, il est remarquable qu'il y'a une diminution à un taux de $85,80 \pm 0,98 \text{ mgEAG}/100 \text{ gMS}$ (40°C) puis une stabilisation à cette valeur pour 50 et 60°C ($87,25 \pm 1,87 \text{ mg EAG}/100 \text{ gMS}$ et $85,11 \pm 2,05 \text{ mg EAG}/100 \text{ g MS}$), respectivement.

(A)



(B)

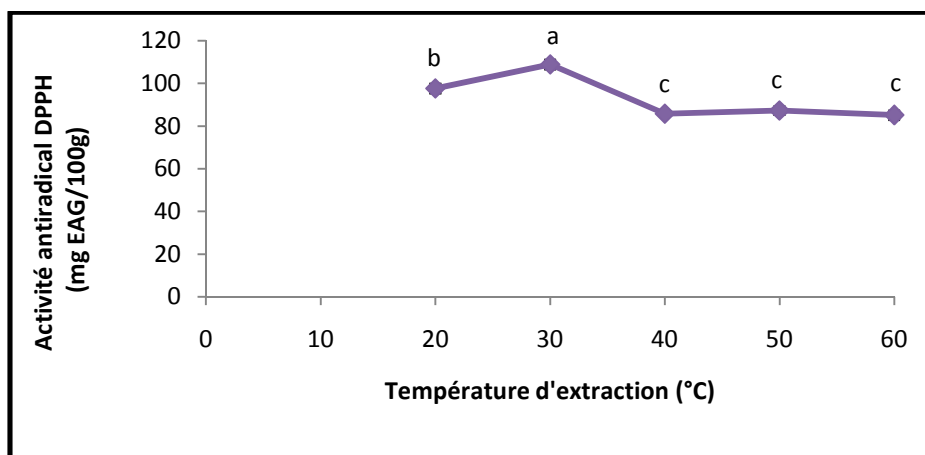


Figure N°18 : Effet de la température sur l'efficacité d'extraction des composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents. ($P < 0.05$) avec $c < b < a$.

Ces résultats révèlent que la température optimale afin de maximiser le rendement des composés phénoliques et l'activité antioxydante est de 30°C.

Chan et al. (2009) indiquent que l'extraction des composés phénoliques du zeste de citron à une température de 40°C a donné les rendements les plus élevés, puis se stabilise à des températures comprise entre 40 et 50°C.

Parvathi nandan et al. (2015) indiquent l'effet de la température sur la teneur des flavonoïdes des écorces de cédratier (*Citrus medica L.*) en utilisant le méthanol 80%, ils montrent que le rendement élevé des flavonoïdes est obtenu à une température de 50°C.

Les résultats obtenus sont semblables à ceux de **Tajnuba et al. (2016)**, qui montrent qu'une extraction des composés phénoliques à partir des écorces de grenadine augmente à des température entre 20 et 40°C voir 30°C.

La diminution des teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante observée dans **figure N° 18** peut être expliquée par la présence des substances thermosensibles, à la dégradation des antioxydants ou à la décomposition des composés extrait au départ.

D'après tout ces résultats, il est facile de comprendre que la température joue un double rôle, d'une part une augmentation de cette dernière permet l'amélioration des rendements d'extraction en composés phénoliques et l'activité antioxydante en augmentant la solubilité et le coefficient de diffusion des composés (**Dent et al., 2013**), d'autre part toute élévation de température provoque la diminution de taux d'extraction en raison de la déstabilisation et la dégradation des composés phénoliques par hydrolyse, réactions d'oxydoréduction ou par polymérisation (**Medina-torres et al., 2017**).

Le tableau N° IX illustre les conditions et les valeurs optimales pour l'optimisation d'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante.

Tableau N°IX: Paramètres et valeurs optimales pour l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange par la méthode séquentielle.

Paramètres optimaux d'extraction	Valeur de la teneur optimale	
	Composés phénoliques mgEAG/100g MS	Activité antioxydante mgEAG/100Gms
Solvant : méthanol Concentration du solvant : 75% Temps d'extraction : 30min Température d'extraction : 30°C	73,00±1,8	97,62±2,14

II-2- Optimisation d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante par la méthodologie de surfaces des réponses

Après l'étude de l'influence des 4 paramètres sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange, trois paramètres s'avéraient intéressants car ils ont une influence significative sur l'extraction des antioxydants.

Dans cette partie, l'optimisation de l'extraction des antioxydants est étudiée en utilisant la méthodologie de surfaces des réponses (MSR), cette dernière permet d'étudier l'influence de chacun des trois paramètres et d'analyser l'interaction entre eux.

La technique de surfaces de réponses est l'une des méthodes les plus populaires dans l'optimisation, elle permet d'explorer les relations entre les variables avec les plans d'expériences, on obtient le maximum d'information avec le minimum d'expériences.

La construction des surfaces de réponses s'effectue suite à l'ajustement du modèle en utilisant des fonctions mathématiques (**Goupy, 2006**).

La méthode de MSR nécessite trois étapes qui sont :

- Réalisation du plan expérimental,
- La modélisation de la réponse,
- Les représentations graphiques.

Les plans utilisés dans le cadre d'une étude de MSR sont des plans quadratiques, tel que les plans Box-Behnken. Ce dernier est utilisé pour l'optimisation d'extraction des antioxydants à partir d'écorces d'orange.

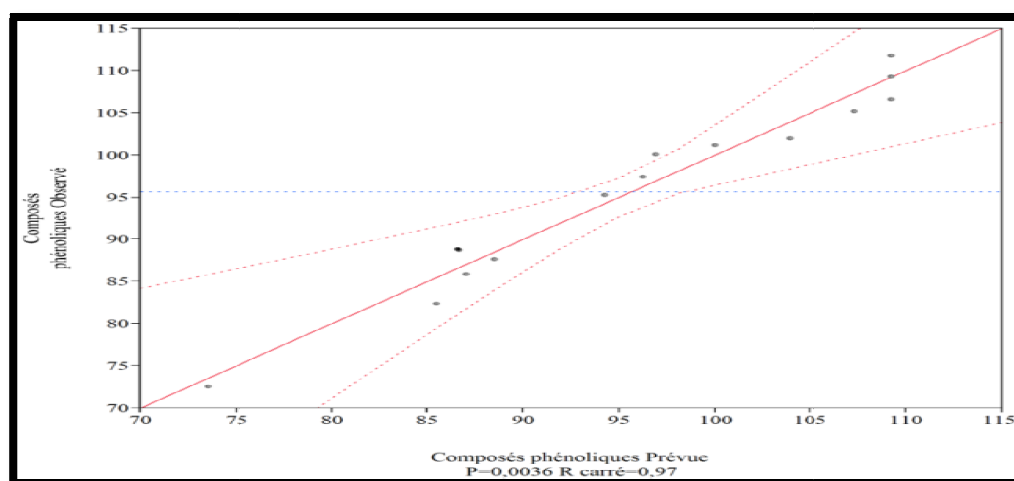
II-2-1-Construction du plan d'expérience

Les niveaux des facteurs, les valeurs mesurées et prédites des teneurs en composés phénoliques et des activités antioxydantes sont présentés dans le **tableau N°IX**. Les résultats indiquent que la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante varient de 72.49 à 111.82 mgEAG/100gMS et 75.74- 99.27 mgEAG/100gMS, respectivement. Il ressort des résultats que les valeurs expérimentales et prédites sont fortement rapprochées. Le graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites (**figure N°21**) montre que les valeurs des modèles concordent avec les réponses mesurées, toutes les valeurs des composés phénoliques et de l'activité antioxydante font partie de l'intervalle de confiance.

Tableau N°X: Matrice du modèle de Box-Behnken (valeurs codées et réelles des niveaux des trois variables), et les valeurs expérimentales et prédites des trois niveaux des trois facteurs du plan d'expérience pour les écorces d'orange.

Essai	Concentration de solvant	Temps d'extraction	Température d'extraction	Composés phénoliques		Activité antioxydante	
				Mesurées	Prédites	Mesurées	Prédites
1	70(0)	60(+1)	50(+1)	97,40	96,26	93,55	93,55
2	70(0)	10(-1)	50(+1)	87,58	88,53	85,76	85,47
3	40(-1)	35(0)	50(+1)	88,69	86,68	75,74	76,76
4	100(+1)	35(0)	20(-1)	101,91	103,92	90,42	89,40
5	70(0)	35(0)	35(0)	106,56	109,21	93,48	96,64
6	100(+1)	60(+1)	35(0)	101,09	100,04	94,25	94,98
7	70(0)	10(-1)	20(-1)	85,87	87,01	87,86	87,86
8	70(0)	60(+1)	20(-1)	95,25	94,30	94,25	94,54
9	100(+1)	10(-1)	35(0)	100,09	96,95	91,35	92,37
10	100(+1)	35(0)	50(+1)	105,12	107,31	91,35	90,62
11	40(-1)	10(-1)	35(0)	72,49	73,54	77,37	76,64
12	70(0)	35(0)	35(0)	109,25	109,21	97,18	96,64
13	70(0)	35(0)	35(0)	111,82	109,21	99,27	96,64
15	40 (-1)	60(+1)	35(0)	82,33	85,47	89,82	88,80

(A)



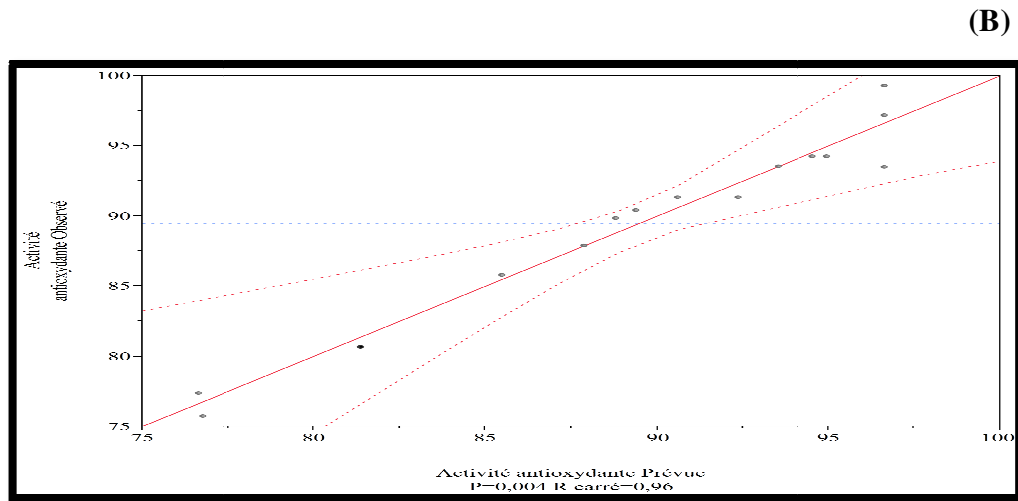


Figure N° 19 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites en composés phénoliques (A), et activité antioxydante (B).

L'analyse de la variance permet de calculer un paramètre statistique très utile qui est le coefficient de détermination R^2 , ce dernier nous renseigne sur la qualité du modèle utilisé. Si cette grandeur se rapproche de 1, donc le modèle exprime une forte puissance d'explication, et s'il se rapproche de 0 il présente une faible puissance d'explication (**Bachir-bey, 2015**).

Le $R^2 = 0.97$ et 0.96 pour les composés phénoliques et l'activité antioxydante respectivement affirme que les deux modèles de réponse sont hautement significatifs.

Tableau N° XI: Le coefficient de détermination R^2 et R^2 ajusté des composés phénoliques et de l'activité antioxydante

Composés phénoliques	
R^2	0,966
R^2 ajusté	0,906
Activité antioxydante	
R^2	0,965
R^2 ajusté	0,901

Le R^2 ajusté est une valeur corrigée de R^2 après l'élimination des termes du modèle non significatifs. S'il y avait beaucoup de termes non significatifs qui ont été inclus dans le modèle, le R^2 ajusté serait plus petit que le R^2 (**Chan et al., 2009**). Le **tableau N° 10** montre que le R^2 ajusté est proche de la valeur de R^2 ce qui affirme la significativité des modèles, et que les valeurs expérimentales sont fortement expliquées par les valeurs prédites.

II-2-2- Modèle globale et manque d'ajustement

L'analyse indique que les carrés des moyennes des modèles sont supérieurs à ceux des résidus. Par ailleurs la probabilité correspond à une valeur de 0,004. D'après ces résultats, nous pouvons dire que les deux modèles ont une forte significativité vis-à-vis de la réponse expérimentale des composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Les tableaux N°XII Et XIII indiquent des défauts d'ajustement de probabilités de 0,336 pour les composés phénoliques et de 0.858 pour l'activité antioxydante, ce qui indique que les défauts d'ajustement ne sont pas significatifs ($Prob < 0,05$).

A partir de ces résultats, les deux modèles quadratiques des composés phénoliques et l'activité antioxydante ont une forte puissance d'explication des résultats expérimentaux.

Tableau N°XII: Analyse de variance de modèle et de défaut d'ajustement pour les composés phénoliques

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F	Prob. > F
<i>Modèle</i>	9	1659,317	184,369	15,928	0,004*
Résidus	5	57,877	11,575		
Total	14	1717,194			
<i>Défaut d'ajustement</i>	3	44,041	14,680	2,122	0,336
Erreur pure	2	13,836	6,918		
Erreur totale	5	57,877			

Tableau N° XIII: Analyse de variance de modèle et de défaut d'ajustement pour l'activité antioxydante.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F	Prob. > F
<i>Modèle</i>	9	647,781	71,976	15,223	0,004*
Résidus	5	23,641	4,728		
Total	14	671,422			
<i>Défaut d'ajustement</i>	3	6,447	2,149	0,250	0,858
Erreur pure	2	17,194	8,597		
Erreur totale	5	23,641			

II-2-3- Effets des facteurs

Les effets des trois facteurs étudiés (concentration du solvant, temps et température

d'extraction) ainsi que leurs interactions sur les réponses d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante sont exprimés dans le **tableau N°XIII**.

La valeur de la probabilité des paramètres indique son influence, autrement dit la significativité du paramètre augmente avec la diminution de la probabilité, elle est dite significative si elle est inférieure à $\text{prob} < 0,05$.

Tableau N°XIV : Paramètres des modèles de surfaces de réponses des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Composés phénoliques				
Constante	111,239	1,907	58,330	<0,0001*
Concentration de solvant(40,100)	3,860	1,149	3,360	0,020*
Temps d'extraction(10,60)	-1,759	1,459	-1,210	0,282
Température d'extraction(20,50)	1,101	1,320	0,830	0,442
Concentration de solvant*Temps d'extraction	-1,658	1,276	-1,300	0,251
Concentration de solvant*Température d'extraction	0,617	1,276	0,480	0,649
Temps d'extraction*Température d'extraction	0,110	1,701	0,060	0,951
Concentration de solvant*Concentration de solvant	-4,391	0,996	-4,410	0,007*
Temps d'extraction*Temps d'extraction	-12,404	1,771	-7,010	0,001*
Température d'extraction*Température d'extraction	-5,281	1,771	-2,980	0,031*
Activité antioxydante				
Constante	98,133	1,219	80,510	<0,0001*
Concentration de solvant(40,100)	1,074	0,734	1,460	0,203
Temps d'extraction(10,60)	2,569	0,933	2,750	0,040*
Température d'extraction(20,50)	-0,411	0,844	-0,490	0,647
Concentration de solvant*Temps d'extraction	-1,791	0,815	-2,200	0,080
Concentration de solvant*Température d'extraction	1,091	0,815	1,340	0,238
Temps d'extraction*Température d'extraction	0,350	1,087	0,320	0,761
Concentration de solvant*Concentration de solvant	-4,012	0,637	-6,300	0,002*
Temps d'extraction*Temps d'extraction	-1,313	1,132	-1,160	0,298
Température d'extraction*Température d'extraction	-4,975	1,132	-4,400	0,007*

Les effets de paramètres sur l'extraction des composés phénolique sont classés selon l'ordre suivant : Temps²>concentration²>concentration >température². Les autres paramètres n'ont pas une influence significative sur l'extraction des composés phénoliques.

Pour l'activité antioxydante, le classement ne suit pas le même ordre : concentration²>température²>temps, et les autres paramètres n'ont pas d'effet significatif.

Les modèles mathématiques des surfaces de réponses des teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante se présentent sous forme de polynômes de second ordre. Ces modèles incluent les effets linéaires, d'interactions et quadratiques des différents facteurs.

Les modèles de surfaces de réponses quadratiques, en considérant les paramètres d'influence significative sont comme suit :

Pour les composés phénoliques :

$$Y_1=111.239 + 3.86 x_1 - 4.391 x_1^2 - 12.404 x_2^2 - 5.281 x_3^2.$$

Pour l'activité antioxydante :

$$Y_2= 98.133 + 2.569x_2 - 4.012 x_1^2 - 4.975 x_3^2.$$

X₁ : la concentration du solvant

X₂ : le temps d'extraction

X₃ : la température d'extraction

Il est bien connu que les conditions d'extraction et les caractéristiques de l'échantillon peuvent affectés la fiabilité et l'efficacité de l'extraction d'une manière significative. L'extraction des composés phénoliques est une étape très importante qui exige certaines conditions permettant la maximisation de l'extraction avec le minimum de dégradation et de détérioration (**Garcia-salas *et al.*, 2010**).

Le tableau N°XIV montre la significativité des différents paramètres de modèle de surfaces de réponses, les valeurs de P sont utilisées comme outils pour vérifier la signification de chaque paramètre.

Il pourrait être observé du tableau que l'effet linéaire des trois paramètres : concentration du solvant(x₁), le temps d'extraction (x₂) et la température d'extraction (x₃) n'ont pas tous un effet significatif sur l'extraction des composés phénoliques et sur l'activité antioxydante. Le paramètre le plus significatif pour les composés phénoliques est la concentration, tandis que pour l'activité antioxydante est le temps. De plus la teneur totale en composé phénoliques est influencée par l'effet quadratique des trois paramètres, par contre l'activité antioxydante n'est

affectée que par l'effet quadratique de la concentration du solvant (x_1) et la température d'extraction.

Les interactions entre les différents paramètres n'ont aucune influence significative sur la teneur en composés phénoliques ou sur l'activité antioxydante.

Chan et al., (2009) ont montré que les effets linéaires et quadratiques des trois paramètres (concentration du solvant, temps et température) sont significatifs sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante, ils ont signalé que parmi les trois paramètres étudiés, seule la concentration du solvant qui avait un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques des écorces de *Citrus hystrix*.

II-2-4- Représentation spatiale et analyse des modèles de surfaces de réponses

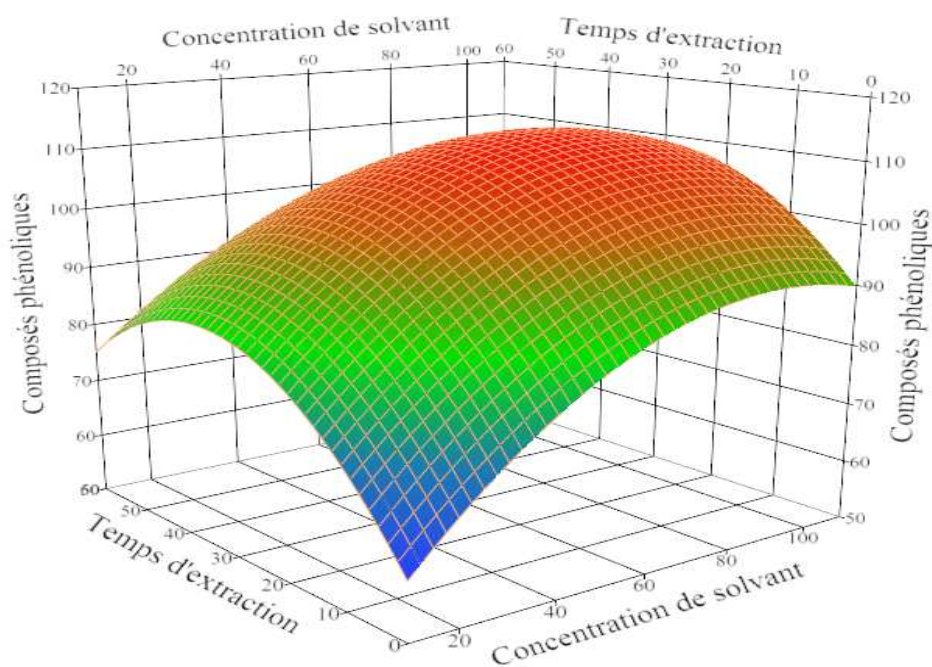
Des représentations graphiques sont faites pour mieux illustrer les effets des différents facteurs. Dans chaque graphe, deux paramètres varient dans le domaine expérimental et le troisième est fixé à son niveau central (niveau 0).

La figure N° 20, illustre la représentation en trois dimensions des effets de la concentration du solvant et du temps sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange. La concentration montre une forte influence sur la teneur en composés phénoliques d'une manière quadratique et linéaire, ce qui explique que la polarité du solvant est un facteur fondamental dans l'extraction des composés phénoliques (**Bettaieb et al., 2016**) tandis que pour l'activité antioxydante, elle présente seulement un effet quadratique. Pour le temps, l'effet quadratique est significatif tandis que l'effet linéaire n'est pas significatif, indiquant que l'extraction des antioxydants augmente et atteint un pic à 36.42 min puis elle diminue en raison de la dégradation des composés phénoliques suite au contact prolongé avec le solvant.

La figure N° 21 et 22 présente respectivement les présentations spatiales en trois dimensions des effets de la concentration du solvant et de la température ainsi que les effets de la température et le temps d'extraction. D'après ces deux figures, l'effet quadratique de la température sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante est bien illustré. Donc le taux d'extraction des antioxydants augmente avec l'augmentation de la température avec un maximum d'extraction à une température de 35,15°C, au-delà de cette température, la teneur

en composés phénoliques diminue, et cela pourrait s'expliquer par la présence des substances thermolabiles dans les extraits (Bachir-bey, 2015).

(A)



(B)

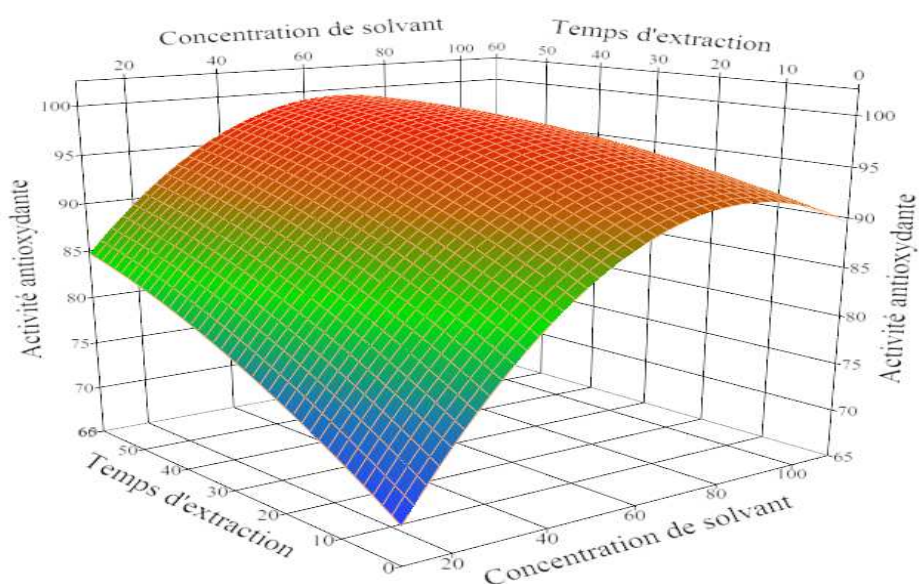
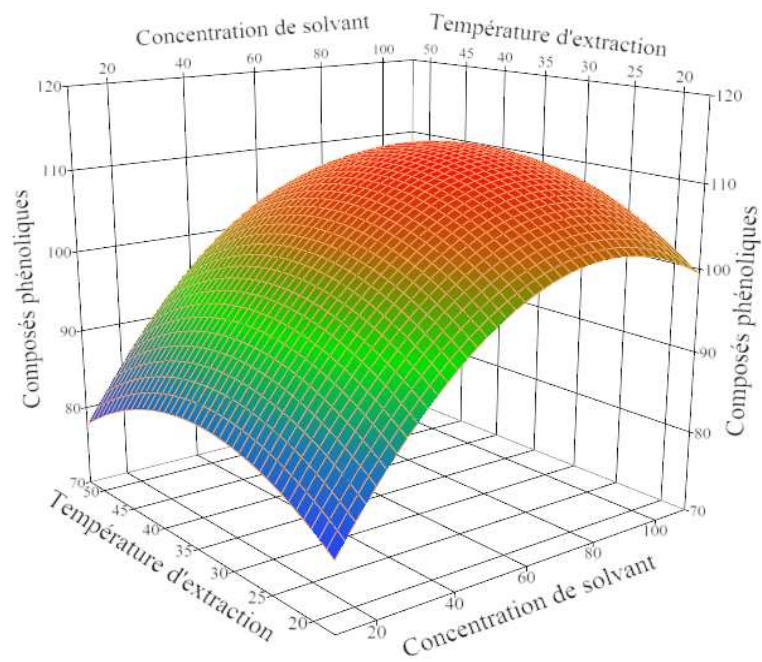


Figure N°20: Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant d'extraction et du temps sur l'extraction de composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

(A)



(B)

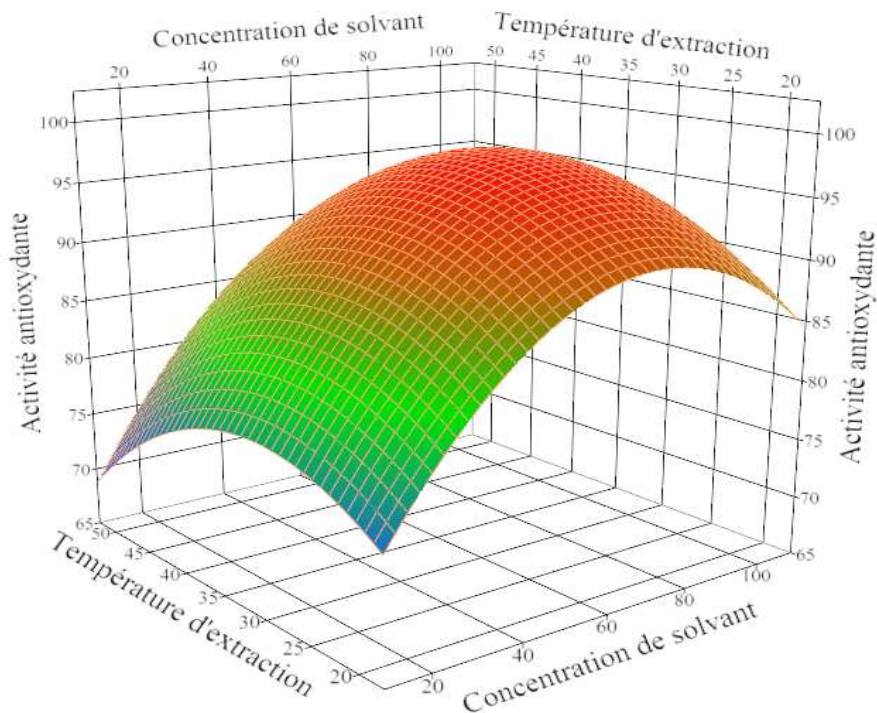
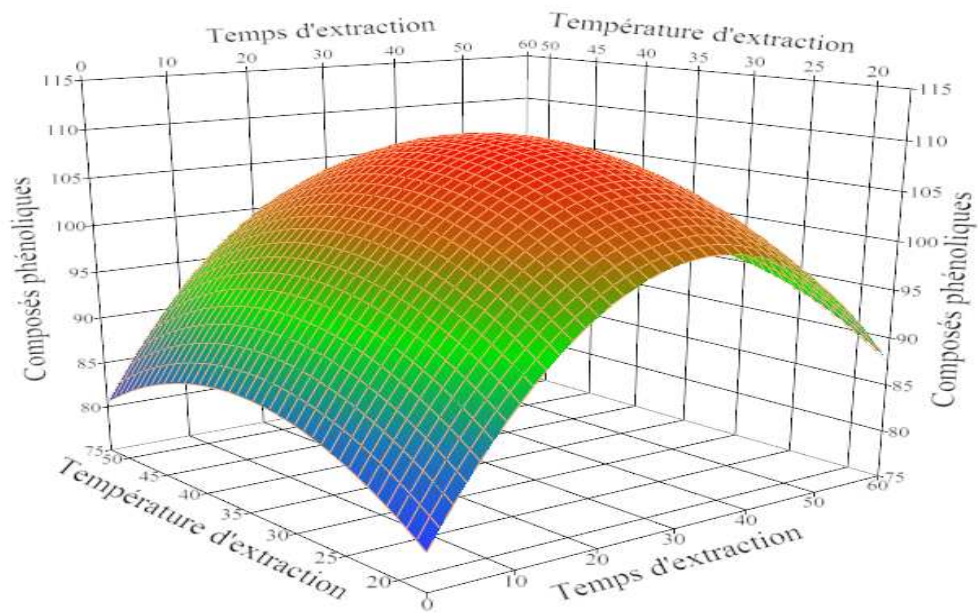


Figure N°21 : Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant d'extraction et de la température d'extraction sur l'extraction de composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

(A)



(B)

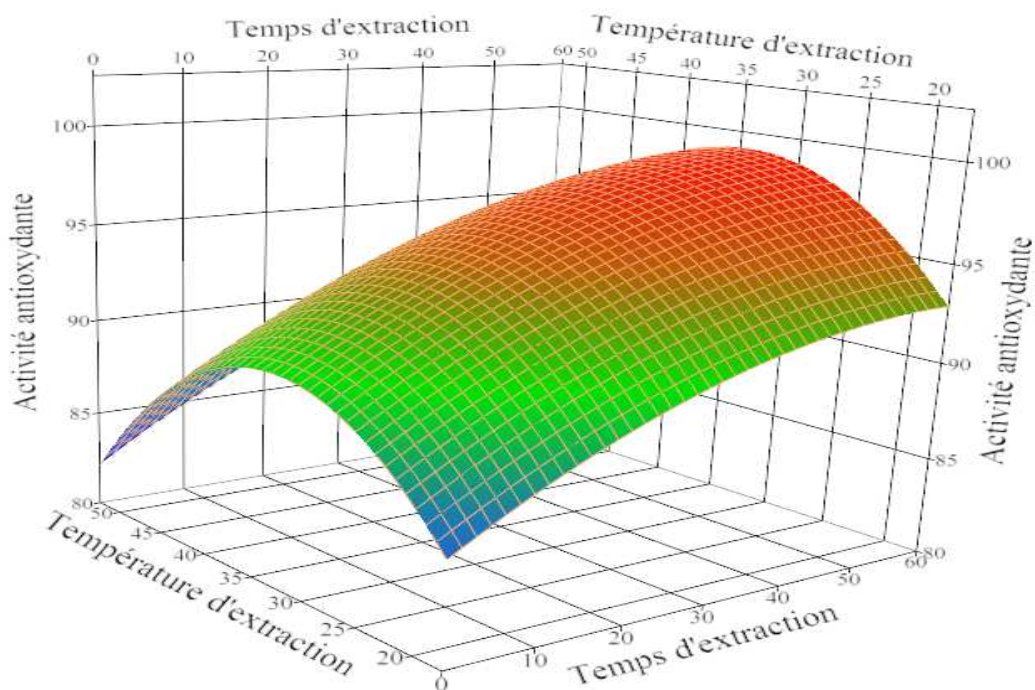


Figure N°22 : Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la température d'extraction et du temps sur l'extraction de composés phénoliques (A) et l'activité antioxydante (B) des écorces d'orange.

II-2-5- Détermination des conditions optimales

Les conditions requises pour maximiser l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante sont déterminés à l'aide du logiciel JMP. Les niveaux des trois facteurs étudiés concentration du solvant, temps et température d'extraction sont le méthanol 76.93%, 36.42 min et 35.15°C respectivement. Des conditions qui permettent de donner des prédictions de 111.75 mgEAG/100gMS pour les composés phénoliques et de 98.28mgEAG/100gMS pour l'activité antioxydante (**tableau N° XIV**).

Tableau N°XV: Conditions et valeurs optimales pour l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces d'orange par la méthode des surfaces de réponses.

Paramètre optimisé	Valeur optimale
Concentration de solvant	76,93%
Temps d'extraction	36,42min
Température d'extraction	35,15°C
Composés phénoliques	111,75mgEAG/100gMS
Activité antioxydante	98,28mgEAG/100Gms



Conclusion

Conclusion

La présente étude s'intéresse à la détermination des teneurs en composés bioactifs des écorces d'orange d'une part, et à l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques et l'évaluation de leurs activité antioxydante (anti-radicalaire DPPH*) d'autre part.

Les résultats du dosage quantitatif révèlent que le co-produit majoritaire de la fabrication industrielle de jus d'orange présente des teneurs importantes en eau, en sucres et en cendres, ainsi que des teneurs élevées en antioxydants (flavonoïdes, caroténoïdes et acide ascorbique).

L'optimisation par la méthode séquentielle des paramètres d'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante indique l'effet significatif de type du solvant, de sa concentration, la température ainsi que le temps d'extraction. Les paramètres qui semblent appropriés sont 75% du méthanol à 30°C et pendant 30min d'extraction, ces derniers permettent d'avoir des concentrations de ($73 \pm 1.80\text{mg EAG}/100\text{gMS}$) et ($97,62 \pm 2,14\text{mgEAG}/100\text{gMS}$) pour les composés phénoliques et l'activité antioxydante, respectivement. Tandis que pour la méthodologie de surfaces de réponses, les modèles des teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante montrent les effets linéaires et quadratiques statistiquement significatifs pour les différents facteurs étudiés (concentration du solvant, temps et température d'extraction), les résultats obtenus sont proches pour la concentration du solvant, et notablement différents pour le temps et la température qui ont permis d'avoir des valeurs proches pour l'activité antioxydante et des teneurs sensiblement différentes en composés phénoliques.

Dans le but de compléter et d'approfondir cette étude, il serait vraiment intéressant d'opter à :

- La caractérisation des polyphénols des écorces et l'étude du profil antioxydant d'autres espèces du genre citrus.
- La réalisation d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant in vivo et pour s'assurer de la non toxicité de ces écorces, pour qu'ils soient utilisés dans le cadre de lutte contre le stress oxydatif.
- L'évaluation d'autres activités biologiques telles que de l'activité antimicrobienne des écorces d'orange.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

El-ghfar, M. A. A., Ibrahim, H. M., Hassan, I. M., Fattah, A. A., and Mahmoud, M. H. (2016). Peels of lemon and orange as value-added ingredients: Chemical and antioxidant properties. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(12), 777-794.

ABOU-ARAB, A A., MAHMOUD, M H., and ABU-SALEM, F M(2015). Effect of some different drying methods on the chemical analysis of citrus by-products. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*. 6(6), 105-116.

Assefa A.T., 2016. Extraction and characterization of antioxidant from orange peels.

AOAC, 2006. Official Methods of Analysis, 18th ed. association of Official Analytical Chemists. washington, dc.

B

Bachir-bey M., 2015. Etude de l'effet du séchage sur les caractéristiques physico-chimiques, les propriétés antioxydantes et les profils phénoliques de variété de figes (*Ficus carica.L*).

Bettaieb R., Sriti J., Besbess B., Mkaddmini H.K., Hamrouni S.I., Marzouk B. and Ksouri R., 2016. Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare Mill*). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 27(4), 1478-1487.

Bicu, I., and Mustata, F. (2011). Cellulose extraction from orange peel using sulphite digestion reagents. *Bioresource technology*, 102(21), 10013-10019.

Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2123-2129.

Boubkri C., 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques.

Borneo, R., and León, A. E. (2012). Whole grain cereals: functional components and health benefits. *Food & function*, 3(2), 110-119.

Bousbia N., 2011. Extraction des antioxydants à partir des produits naturels et de co-produits agricoles

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., and Velić, D. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 195-199.

C

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Aida, W. W., and Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16(2), 203-213.

Chew K.K.,S.Y., Thoo Y.Y., Khoo M.Z., WAN A., W.M. and C.W., 2011.Effect of ethanol concentration, extraction time, extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centilla asiatica* extract. *International Food Research Journal*, 18:571-578.

Chidan kumar C.S., Mythily R. and Chandraju S., 2011. Extraction of Carbohydrate from Sweet Orange Peels (*Citrus sinensis* L.) and their Identification via LC /MS & Thin Layer Chromatographic Analysis. *Biosciences, Biotechnology, Research. Asia*, 8(2), 709-715.

D

Dent, M., Dragovic-Uzelac, V., Penic, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., and Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology*, 51(1), 84.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Dugrand- Judek A., 2015. Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre *Citrus*

E

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., and Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food chemistry*, 124(2), 411-421.

El-Beltagi, H. S., and Mohamed, H. I. (2013). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 44-57.

El-bassyouni G.M. and Emam, O.A., 2015. Effect of natural antioxidants of orange peel on sunflower oil during storage. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 6: 205 - 213.

El-kantar S., Boussetta N., Rajha H.N., Maroun R.G., Louka N. and Eugène Vorobiev, 2018. High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphénols and fermentable sugars from orange peels. *Food research international*.

F

FAO stat 2016. Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016. (www.fao.org/faostat).

Ferhat M.A, Boukhatem M.N., Hazzit M. and Chemat F., 2016. Rapid extraction of volatile compounds from *citrus* fruits using a microwave dry distillation. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8, 753-78.

Fernandez-lopez J., Sendra-Nadal J.E., Navarro C., Sayas E., Viuda-Martos M. and Prez Alvarez J.A., 2009. Storage stability of a high dietary fibre powder from orange by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 748–756.

Fidrianny I., Harnovi M. and Insanu M., 2014. Evaluation of antioxydant activities from various extracts of sweet orange peels using DPPH, FRAP assays, and correlation with

phenolics, flavonoid, and carotenoid content. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7, 186-190.

G

Gade J. and Gotmare S., 2018. Orange Peel: A Potential Source of Phytochemical Compounds. *International Journal of ChemTech Research*, 11(02), 240-243.

Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A., 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.

Goupy Jaque, 2006, Les plans d'expériences. *Revue Modulad*, 34, 74-116.

H

Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., and Sebei, H. (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.

Hughes D.E., 1983. Trimetric determination of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenol indophenols in commercial liquid diets. *Journal of pharmaceutical sciences*, 72,126-129

I

Ibrahium M.I. and Hegazy A.E, 2012. Antioxidant Activities of Orange Peel Extracts. *World Applied Sciences Journal*, 18(5), 684-688.

Ismail, A. M. S. (1996). Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. *Process Biochemistry*, 31(7), 645-650.

ISO 5534, 2004. Détermination de la teneur totale en matière sèche (Méthode de référence).

K

Kader, F., Rovel, B., and Metche, M. (1993). Role of invertase in sugar content in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *LWT-Food Science and Technology*, 26(6), 593-595.

Kammoun B., A., Ghanem N., Mihoubi D., Kechaou, N. and Boudhrioua Mihoubi, N., 2011. Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil

Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. *Journal of Food Engineering*, 7(5).

Kamran Khan, M., 2010. Polyphénols d'Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec le sérum albumine.

Klein, B.P., and PERRY A.K., 1982. Ascorbic Acid and Vitamin A Activity in Selected Vegetables from Different Geographical Areas of the United States. *Journal of food science*, 47(3), 941-945.

Kubart, K., 2016. The role of phenolics compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences*, 80, 97-108.

L

Laaboudi W., 2012, extraction des composés phénoliques à partir des zestes d'agrumes et l'étude de leurs activité anti radicalaire.

Lagha-Benamrouche S., Addar L., Boudershem H., Tani S. and Madani k., 2017. Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology Journal. Volume: B, Agronomic & Biological Sciences*, 18, 28-35.

Lapornik B. prosek M. And Wondra A.G., 2005. Comparaison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, volume: 71(2), 214-222.

M

Marin, F.A., Soler-Rivas, C., Benavente-Garcio., Castillo, J. and Perez-Alvarez, J.E., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*. 100, 736-741.

Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., and Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.

M'HIRI N., 2015. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone

Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., and Lima, G. P. P. (2017). Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In *Phenolic Compounds-Biological Activity*. InTech.

Morales-González J.A., Barajas-Esparza L., Valadez-Vega C., Madrigal-Santillán E., Esquivel-Soto J., Esquivel-Chirino C., Téllez-López A.M., López-Orozco M. and Zúñiga-Pérez C., 2014. The Protective Effect of Antioxidants in Alcohol Liver Damage. In Liver regeneration. InTech.

N

Nicolosi E. 2007. Origin and taxonomy. In "citrus : citrus genetics, breeding and biotechnology". Ed. UK. London. 19-44.

O

ONAGRI 2018/ Note de veille Agrumicole Un regard sur le marché mondial et Tunisien des Agrumes.

Ould Yerou K, Ibri K., Bouhadi D., Hariri A., Meddah B., and Tir Touil A., 2017. The use of orange (*Citrus sinensis*) peel as antimicrobial and anti-oxydant agents. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(3), 1351-1357.

P

Parvathi nandan M. and Vangalapati M., 2015. Phytochemical Analysis and Effect of Various Parameters on the Extraction Yield of Flavonoids from the *Citrus medica L* Peel Extract. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology* , 2(9).

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

Q

Qasim M., Irfan A., Munawwer R., Gul B. and Ajmal khan M., 2016. Effect of extraction solvents on polyphénols and antioxydant activity of medicinal halophytes. *Pakistan Journal of Botany*, 48(2), 621-7.

R

Ramful D., Bahorun T., Bourdonc E., Tarnusc E. and Aruomad O.I., 2010.. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1),75–87

Ribereau-Gayon P (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254.

Rudge de Moraes Barros H., Aparecida Pinto de Castro Ferreira T. and Genovese M.I., 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892–1898.

S

Singh S. and Genitha I., 2014. Extraction of Antioxidants from Fruit Peels and its Utilization in Paneer. *Journal of Food Processing and Technology*, 5(7).

Sharma K., Mahato N., Cho M.H., and Lee Y.R., 2017. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. *Nutrition*, 34,29-46.

Soto -Zamora G., Yahia E.M., Brecht J.K. and Gardia A. 2005. Effect of post harvest hot air treatment in low O₂ atmosphere on the quality and antioxidant level in tomato fruit LW T, 38,183-202.

T

Turner T. and Burri B.J., 2013, Potential Nutritional Benefits of Current Citrus Consumption. *Agriculture*,3(1),170-187.

Tajnuba S., Neaj A., Abul H., Hosain M. , Shakti Chandra M., Haque1 R., Almas M., and Siddik A.B., 2016. Extraction of Bioactive Compound from Some Fruits and Vegetables (Pomegranate Peel, Carrot and Tomato) *American Journal of Food and Nutrition*, 4(1), 8-19.

V

Velasco D., Senit J.J., Torre I., Santos M. T., Yustos P., Santos V. and Miguel Ladero, 2017, Optimization of the Enzymatic Saccharification Process of Milled Orange Wastes. Fermentation, 3(3), 37.

W

Wang Y-C., Chuang Y-C and Ku Y-H, 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. Food Chemistry, 102(4),1163–1171.

Wang, Y.C., Chuang, Y.C., and Hsu, H.W., 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. Food Chemistry, 106(1), 277-284.

Z

Zaghdoudi K., 2015, Optimisation de l'extraction des caroténoïdes à partir dupersimmon (*Diospyros kaki L.*), de l'abricot (*Prunus armeniaca L.*) et de la pêche (*Prunus persica L.*). Etude photo-physique en vue d'une application en thérapie photo dynamique (PDT).

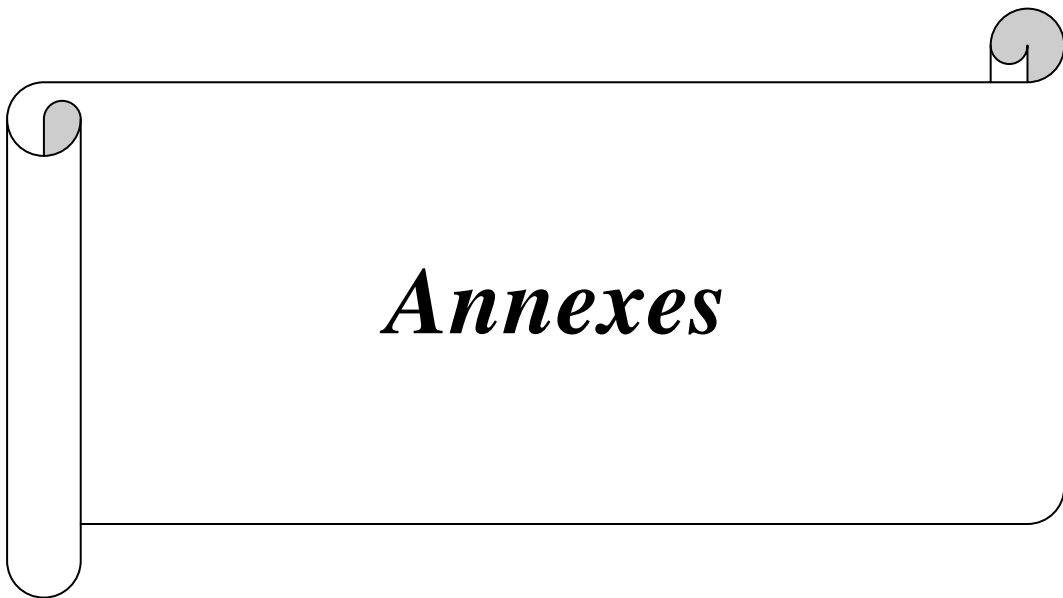
Sites internet

www.snv.jussieu.fr

www.en-wikipedia.org

www.fr.wikipedia.org

www.usda.gov



Annexes

Annexe

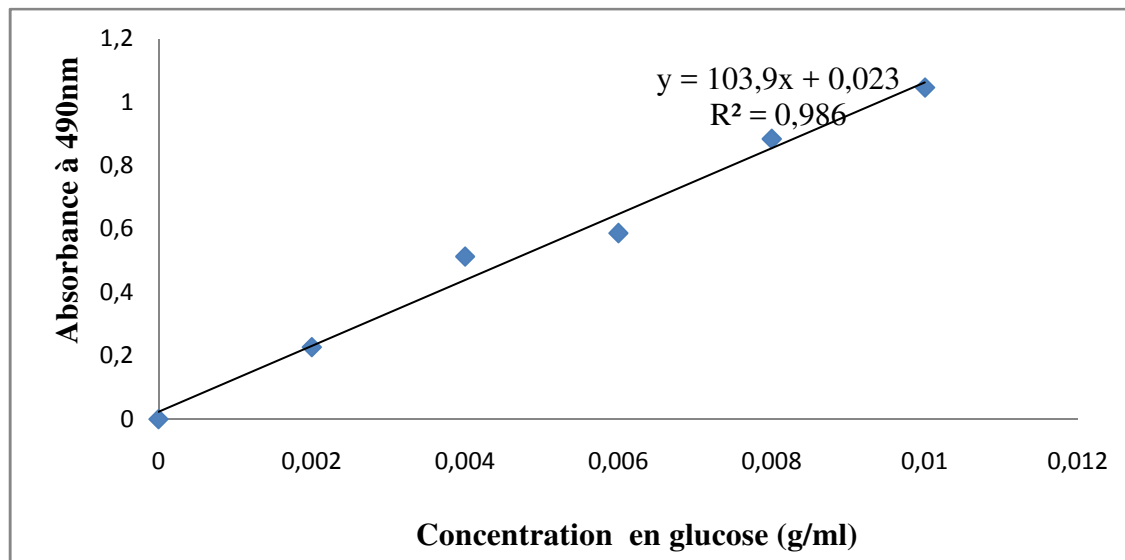


Figure N° 23 : Courbe d'étalonnage des sucres.

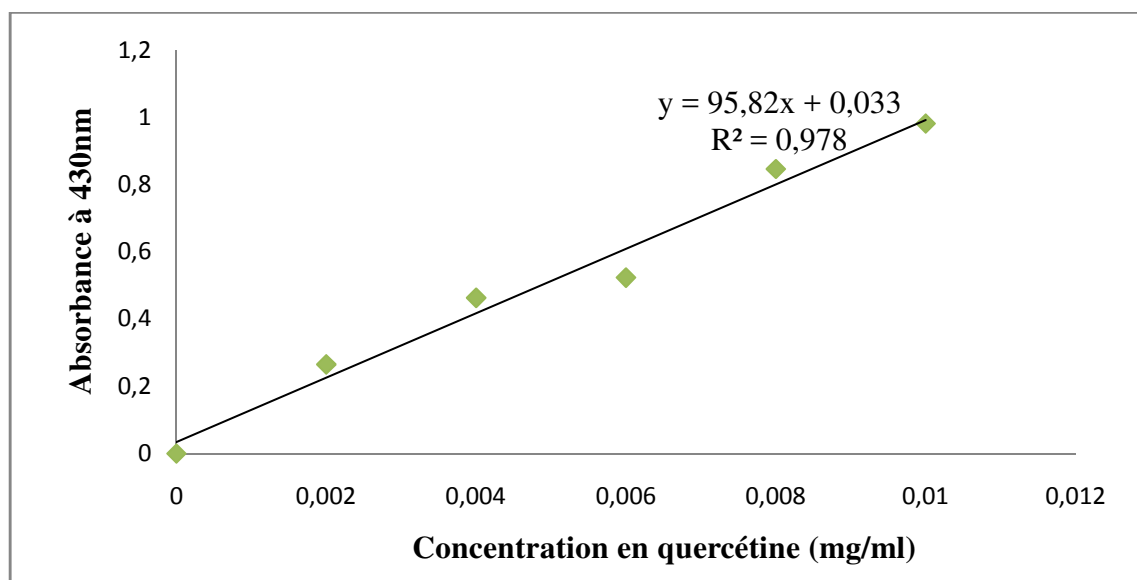


Figure N° 24 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

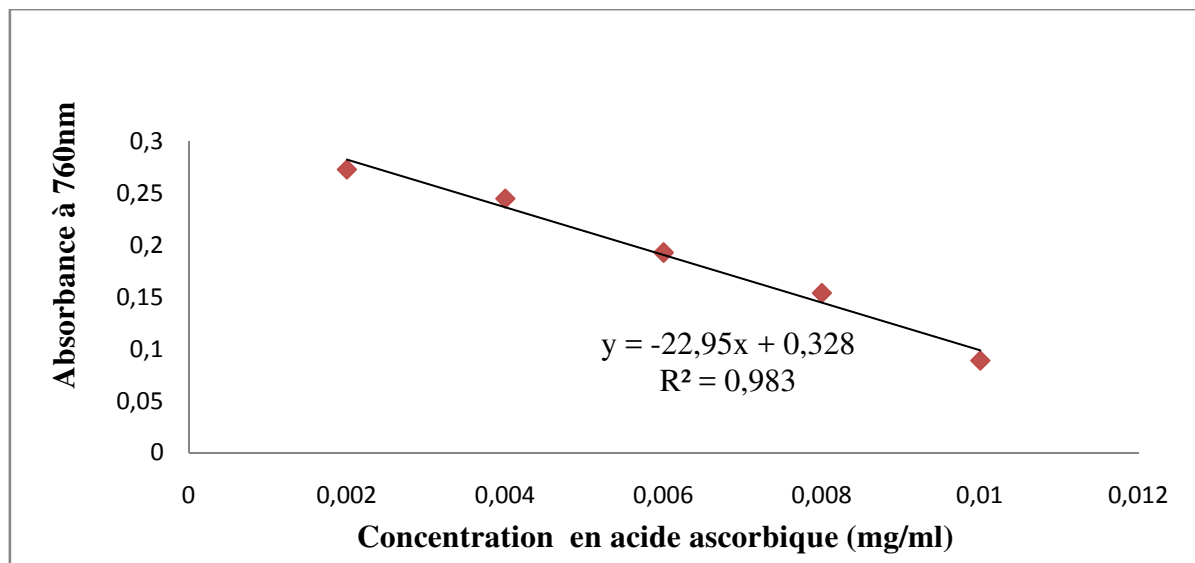


Figure N° 25 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.

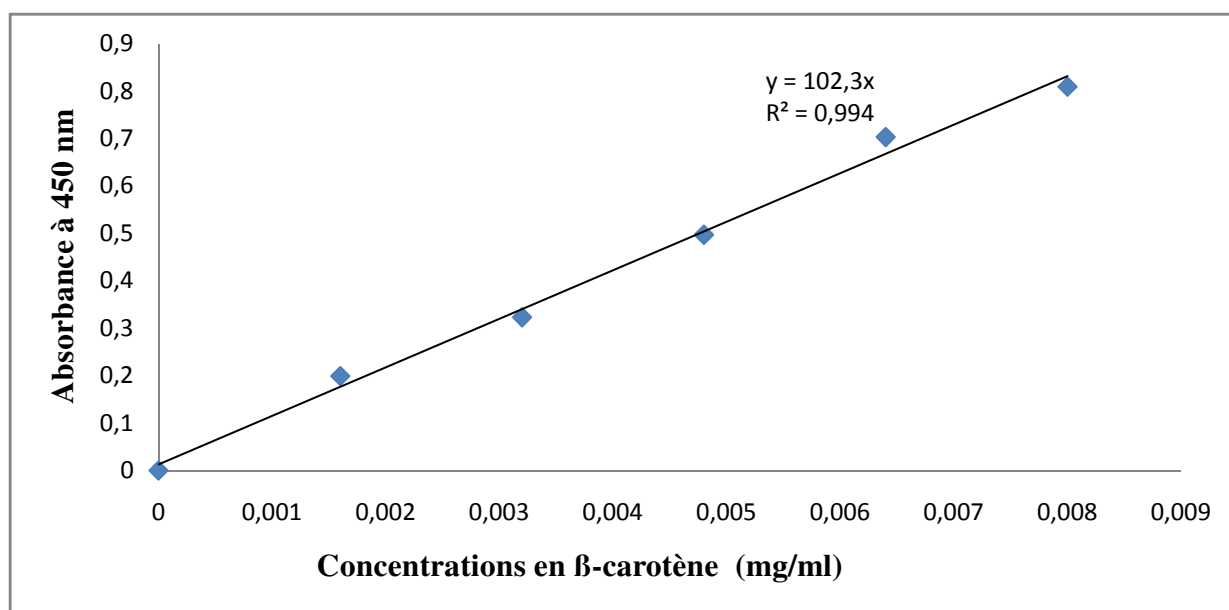


Figure N° 26 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes.

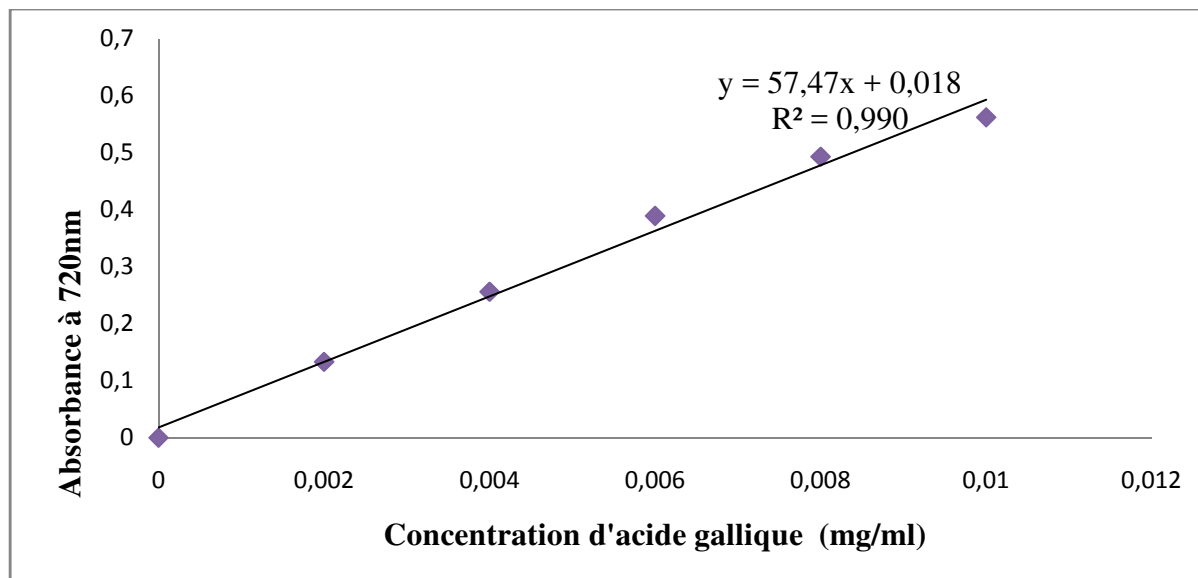


Figure N° 27 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques.

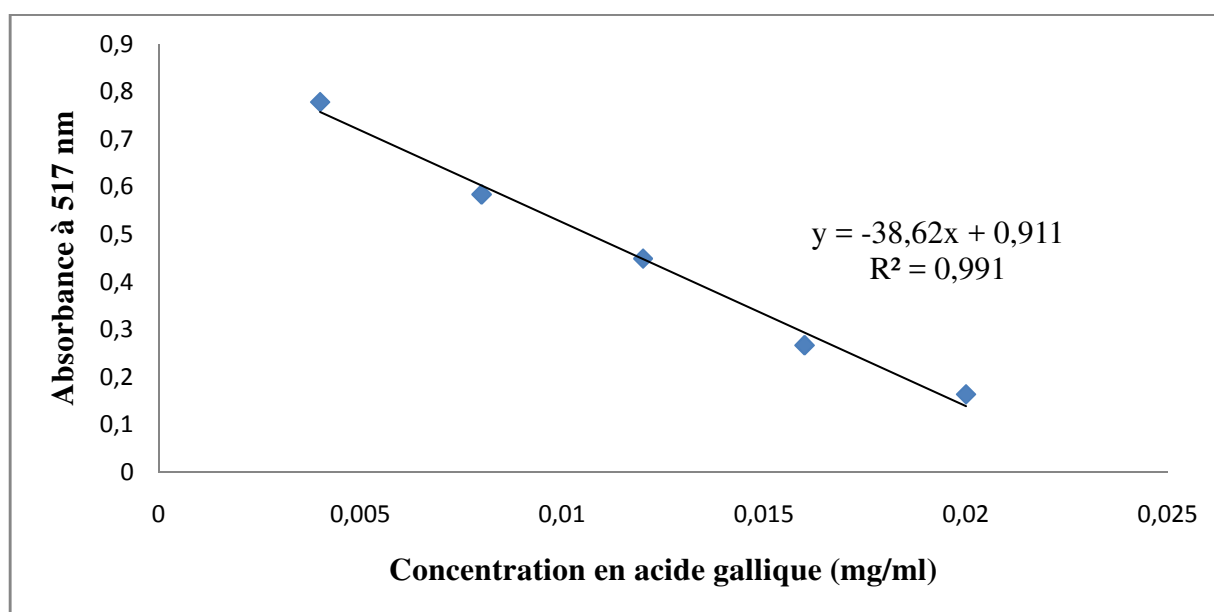


Figure N° 28 : Courbe anti-radical DPPH.

Résumé

Les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante (piégeage du radical DPPH*) des écorces d'orange (*Citrus sinensis*) sont optimisées par la méthode séquentielle et aussi par la méthodologie des surfaces de réponses (MSR). La méthode séquentielle montre les effets des quatre paramètres étudiés : type de solvant (eau, méthanol, éthanol, acétone) sa concentration (0, 25, 50, 75, 100%) le temps d'extraction (0, 15, 30, 45, 60min) et température d'extraction (20, 30, 40, 50, 60°C), les paramètres optimaux semblent 75% du méthanol pendant 30min et à 30°C qui permettent d'extraire des teneurs élevées (73,00±1,80mgEAG/100gMS) et 97,62±2,14mgEAG/100gMS) en composés phénoliques et l'activité antioxydante, respectivement.

La MSR où le plan Box-Behnken est utilisé, étudie les effets des trois variables indépendantes, méthanol (40, 70, 100%), temps d'extraction (10, 35, 60min) et température d'extraction (20, 35, 50°C). L'analyse par la MSR montre que les conditions optimales d'extraction des antioxydants sont méthanol (76,93%), temps (36,42min) et température (35,15°C), qui donnent un rendement de 111,75mgEAG/100g MS et 98,25mgEAG/100g MS en les composés phénoliques et l'activité antioxydante, respectivement.

Mots clés : *Optimisation, écorces d'orange, composés phénoliques, activité antioxydante (radical DPPH*), méthode séquentielle, méthodologie surface de réponse, Box-Behnken.*

Abstract:

The optimal conditions for the phenolic compound extraction of and the antioxidant activity (DPPH* radical neutralisation) of orange peels (*Citrus sinensis*) were optimized by the sequential method and also by the response surface methodology (SRM). The sequential method shows the effects of the four studied parameters: type of solvent (water, methanol, ethanol and acetone), its concentration (0, 25, 50, 75, 100%), the extraction time (0, 15, 30, 45, 60min) and extraction temperature (20, 30, 40, 50, 60°C), the optimal parameters were 75% for the methanol for 30min and 30°C which make it possible to extract high contents (73,00±1,80mgGAE/100gDM) and 97,62±2,14mgGAE/100gDM) in phenolic compounds and antioxidant activity, respectively.

The SRM where the Box-Behnken plane was used, studies the effects of the three independent variables, methanol (40, 70, 100%), extraction time (10, 35, 60min) and extraction temperature (20, 35, 50°C). The SRM analysis showed that the optimal conditions for extraction of the antioxidants are methanol (76,93%), time (36,42min) and temperature (35,15°C), which give a yield of 111,75mgGAE/100gDM) and 98,25mgGAE/100gDM) in phenolic compounds and antioxidant activity, respectively.

Key words: *optimisation, orange peels, phenolic compounds, antioxidant activity (DPPH* radical), sequential method, response surface methodology, Box-Behnken..*