

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia  
Faculté des Sciences de la nature et de la Vie  
Département de biologie physico-chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

**Master**

En biologie

Option : biochimie appliquée

**Thème**

Activité anti-oxydante et effet sur la peroxydase de l'extrait  
méthanolique des feuilles de *citrus grandis* (pamplemousse)

**Proposé par :**

M<sup>lle</sup> LATRECHE SIHAM

M<sup>r</sup> SAADI NABIL

**Membre de Jury :**

Présidente : M<sup>me</sup> AMROUCHE W. (M.A.A.)

Promotrice: Dr KHETTAL B. (M.C.A.)

Copromoteur: M<sup>r</sup> TIGHILET K. (Magister)

Examineurs: M<sup>r</sup> BOUGUEZZA Y. (M.A.A.)

M<sup>r</sup> TACHERFIOUT M. (M.A.A.)

Année 2012-2013

# Remerciements

*En préambule à ce mémoire, nous adressons nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu » le plus puissant de nous avoir guidé vers le chemin de savoir et de nous avoir donné le courage, la patience et la santé qui nous ont été utile tout au long de nos parcours.*

*Toute notre estime et notre respectueuse gratitude vont au docteur KHETTAL B. D'avoir accepté d'être notre promotrice, malgré ses multiples occupations, elle a dirigé ce travail avec rigueur et objectivité, et à monsieur TIGHLET K. D'avoir accepté d'être notre Co-promoteur. Ce travail témoigne de leur confiance et de leur soutien dans les moments les plus difficiles, qu'ils trouvent ici l'expression de notre haute considération et notre profonde reconnaissance.*

*Nous remercions très sincèrement M<sup>me</sup> AMROUCHE W. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à M' TACHERFIOUT M. et M' BOUGUEZZA Y. d'avoir d'accepté d'examiner ce travail.*

*Ces remerciements ne seraient pas complait si n'apparaissait pas tous les membres du laboratoire de recherche biotechnologie végétale et ethnobotanique, particulièrement, Saïda et Habiba que nous avons eu l'occasion de côtoyer durant notre travail.*

# Dédicaces

*J'adresse, surtout plus profonde gratitude et tout mon amour*

*A ma mère, A mon père et, qui ont su me faire confiance et me soutenir en  
toutes circonstances au cours de toutes mes années d'étude, c'est avec émotion que je*

*Leur exprime tout mon affection, mon admiration et mon profond respect.*

*Mes dédicaces sont adressées à mon adorable frère Faouzi et ma chère sœur Yamina*

*A ma chère sœur et son marie ainsi que sa fille Salssabil*

*A mes chers oncles et tantes parentales et maternelles*



# *Dédicaces*

*Je dédie ce présent mémoire à ma grand-mère et mes parents à  
qui le grand mérite revient.*

*Je le dédie également :*

*A mon frère fares*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis(e)*

*nabil*

# *Sommaire*

<i>Introduction</i> .....	01
---------------------------	----

## *Partie théorique*

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

I.1. Généralité .....	3
I.2. Valeur nutritive des citrus dans le régime alimentaire humain .....	5
I.3. Pamplemousse .....	6
I.3.1. Origine et historique .....	6
I.3.2. Classification .....	7
I.3.3. Description botanique .....	8
I.3.4. Composition et valeur nutritive .....	8
I.3.5. Utilisation et effet thérapeutique .....	9

### **Chapitre II : Antioxydants des agrumes**

II.1. Radicaux libres et stress oxydant .....	11
a. Radicaux libres .....	11
b. Stress oxydant .....	11
II.2. Antioxydants des agrumes .....	12
II.2.1. Acide ascorbique .....	13
II.2.1.1. Propriétés antioxydantes .....	13
II.2.2. Les caroténoïdes .....	15
II.2.2.1. Propriétés antioxydantes .....	15
II.2.3. Les composés phénoliques .....	16
II.2.3.1. Classification .....	16
a. Les acides phénolique .....	18
b. Les flavonoïdes .....	18
II.3. Activité antioxydants des composés phénoliques .....	21
II.4. Autres rôles biologiques des composés phénoliques .....	22

# *Partie pratique*

## **Chapitre I : Matériels et méthodes**

I. Le matériel végétal .....	25
I.1. Description du matériel végétal .....	25
I.2. Préparation de la poudre végétale .....	26
II. Extraction méthanolique .....	26
III. Dosage des composés phénoliques .....	27
III.1. Les polyphénols totaux .....	27
III.2. Les flavonoïdes .....	28
IV. Evaluation de l'activité antioxydante .....	29
IV.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le DPPH .....	29
IV.2. Activité scavenger du radical ABTS <sup>+</sup> .....	30
IV.3. Pouvoir réducteur : test au ferrocyanure de potassium .....	32
IV.4. Pouvoir réducteur : test au phosphomolybdate d'ammonium .....	34
V. Effet sur l'activité de la peroxydase .....	35

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

I. Taux d'extraction .....	37
II. Dosage des polyphénols .....	37
III. Activité antioxydante .....	37
III.1. Activité scavenging du radical DPPH .....	37
III.2. Activité scavenging du radical ABTS .....	39
III.3. Pouvoir réducteur au ferrocyanure de potassium .....	39
III.4. Pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium .....	40
IV. Effet sur la peroxydase .....	42
<b>Conclusion</b> .....	43

## ***Références bibliographiques***

## ***Annexe***



## Liste des figures

N°	Titre	PAGE
02	Proportion de production de citrus dans le monde	5
03	Le pamplemoussier, arbre, fleur, feuille, et fruit	8
04	Structure chimique de l'acide ascorbique.	13
05	Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération	14
06	Régénération des tocophérols par l'action de l'acide ascorbique.	14
07	Structure chimique d'un caroténoïde	15
08	Structure de base des flavonoïdes	19
09	Flavanones des agrumes	20
10	Flavones des agrumes	21
11	Feuille du pamplemoussier ; <b>A)</b> surface dorsale <b>B)</b> surface ventrale	25
12	localisation géographique du lieu de récolte des feuilles de <i>citrus grandis</i>	25
13	Protocole de dosage des polyphénols totaux	27
14	Complexes flavonoïdes $AlCl_3$	28
15	Les étapes de dosage des flavonoïdes.	29
16	Forme libre et réduite du DPPH	29
17	Formation et piégeage du radical $ABTS^{•+}$ par un antioxydant donneur de $H^•$	31
18	Protocole de test du pouvoir réducteur	33
19	Protocole de test du phosphomolybdate d'ammonium	34
20	Activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des feuilles du <i>citrus grandis</i>	38
21	Activité scavenging du radical ABTS des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des feuilles du <i>citrus grandis</i> .	39



## Liste des figures

22	Représentation graphique du pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux de l'extrait méthanolique du <i>citrus grandis</i> .	40
23	Représentation graphique du pouvoir réducteur phosphomolybdate d'ammonium d'extrait méthanolique du <i>citrus grandis</i>	41
24	Cinétique de la peroxydase en absence et en présence de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>citrus grandis</i>	43

**Liste des tableaux**

N°	Titre	Page
<b>I</b>	Quelque espèce de citrus et leur origine	3
<b>II</b>	La production de citrus dans quelque pays du monde	4
<b>III</b>	La valeur nutritive du jus de quelque citrus	6
<b>IV</b>	Classification botanique de pamplemousse	7
<b>V</b>	valeur nutritive de pamplemousse pour 100 gramme	9
<b>VI</b>	sources de stress oxydant	12
<b>VII</b>	Les classes des composés phénoliques	16
<b>VII I</b>	Résultats des IC <sub>50</sub> pour le test DPPH	38
<b>IX</b>	Résultats des IC <sub>50</sub> pour le test du pouvoir réducteur du fer ferrique	40
<b>X</b>	Résultats des IC <sub>50</sub> pour le test du pouvoir réducteur phosphomolybdate d'ammonium	42

# ***Introduction***

# Introduction

Le corps humain produit des espèces réactives de l'oxygène par plusieurs systèmes à partir de l'oxygène consommé, ces espèces radicalaires, à des concentrations modérées, sont d'une importance capitale pour l'organisme puisqu'elles interviennent dans la régulation de la transduction des signaux. Malgré cela, à forte concentration ces radicaux provoquent un déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les antioxydants ce qui génère de nombreuses maladies, dont le cancer, les crises cardiaques et la maladie d'Alzheimer (**Rathee et al., 2006**).

Pour suppléer à cela, la recherche scientifique s'est dirigée vers les plantes médicinales, une source principale d'antioxydants naturels, comme, les vitamines C, E et les polyphénols tels que les flavonoïdes, vu que les antioxydants synthétisés par voies chimiques présentent eux aussi des risques cancérigènes.

Depuis quelques années un, grand nombre de recherches ont démontré que les polyphénols des agrumes disposent de plusieurs applications thérapeutiques. Les études épidémiologiques prouvent que la consommation de l'orange et des produits à base d'orange peuvent protéger la santé contre diverses pathologies. En effet, l'orange est un réservoir de diverses molécules antioxydantes, dont les polyphénols (**Kim et lee, 2002**).

De nombreux travaux ont été réalisés sur les polyphénols de différentes parties de fruit d'agrumes, pulpes, écorces et jus, mais pas autant que ça sur les feuilles, dans ce cadre on a choisi de réaliser cette étude sur les feuilles de *citrus grandis* (pamplemousse).

Dans le contexte de valorisation biotechnologique des l'extrait des feuilles des citrus qui s'inscrit la thématique du sujet rapporté dans ce mémoire. Le travail a été réalisé au sein de l'équipe d'érigé par le docteur KHETTAL. B de laboratoire de recherche biotechnologie végétale, et dont l'objectif est la valorisation des substances actives d'origine végétale. Le sujet de ce travail est l'étude de l'activité antioxydante et effet antiperoxydase de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis*, d'origine locale (cultivé à la région d'Akbou wilaya de Bejaia).

Ce travail est réparti en deux parties, en premier lieu, la synthèse bibliographique qui est devisée en deux chapitres. Le premier c'est des généralités sur les agrumes et le deuxième sur

les antioxydants, la seconde partie est l'étude expérimentale, elle est de deux chapitres. Le premier est la description des matériels et méthodes utilisées. Tandis que l'autre chapitre est une description des résultats obtenus et leurs interprétations.

# ***Partie Théorique***

***Chapitre I :***

***Généralités sur les citrus***

## I. Les citrus

### I.1. Généralité

Sous le terme « agrumes » sont regroupées de nombreuses espèces des genres botaniques *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*, différentes hypothèses ont été formulées sur l'histoire et l'origine géographique des agrumes. Il semblerait que toutes les espèces du genre citrus sont originaires des régions tropicales et subtropicales du sud-est d'Asie ; nord-est de l'Inde et du sud de la Chine. Actuellement, ils sont cultivés dans plus de 100 pays situés dans les régions tropicales, subtropicales et dans le bassin méditerranéen (Nicolosi, 2000).

Deux grandes classifications du citrus sont généralement utilisées : celle de Tanaka(1961) qui comporte 156 espèces, et celle de Swingle et Reece (1967) qui n'en distingue que 16 espèces (Nicolosi, 2000). Les citrus appartiennent à la famille des *Rutaceae*, sous-famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous-tribu des *Citrineae*.Elles englobent plusieurs variétés, parmi lesquelles on trouve l'orange, la mandarine, le citron, la bergamote, la bigarade, le cédrat, le kumquat, le pamplemousse, le pomelo, lime et beaucoup d'autres hybrides sont aussi commercialement importants (Ladaniya, 2010 ; Khan et al, 2010). Quelques espèces appartiennent au genre Citrus sont représentés dans le **Tableau I**

**Tableau I:** Quelques espèces de citrus et leur origine (Fred et al., 2007)

Nom d'espèce	Nom scientifique	Place possible de leur origine
<b>Citron</b>	<i>C. medica</i>	Inde et Chine
<b>Pamplemousse</b>	<i>C. grandis</i>	Malaisie et Inde
<b>Mandarine</b>	<i>C. reticulata</i>	Sud-est Asie
<b>Lime</b>	<i>C. aurantifolia</i>	Est d'Inde
<b>Orange amer</b> (Pamplemousse×mandarine)	<i>C. aurantium</i>	Chine
<b>Orange</b> (Pamplemousse×mandarine).	<i>C. sinensis</i>	Chine
<b>Limon</b> (Citron × Lime).	<i>C. limon</i>	Inconnu, possible origine de Chine
<b>Pomelo</b> (Pamplemousse × orange)	<i>C. paradisi</i>	Barbados Island



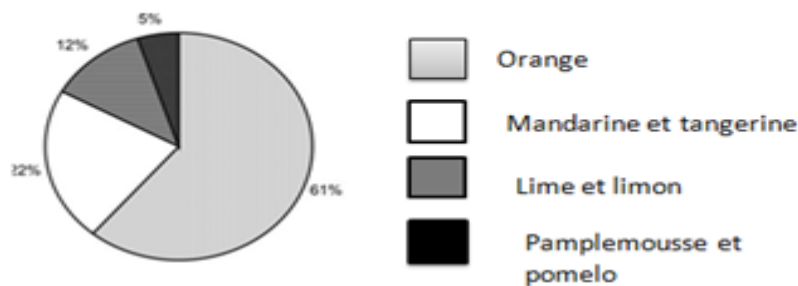
Les agrumes occupent la première place dans le commerce international des fruits. La production mondiale des citrus a augmenté par 4.5% depuis l'année 1990. Il en résulte une production de 98.35 millions de tonnes en 2001–2002 et 100 millions de tonnes en 2003–2004 (FAO, 2006) (Tableaux II). La production mondiale est aujourd'hui estimée à 120 millions de tonnes par an, dont 58% seraient autoconsommés, 30 % transformés en jus et seulement 12 % feraient l'objet d'échanges internationaux (source FAO).

La Chine et le Brésil se partagent équitablement le 1/3 de cette production mondiale, suivi des USA (10 millions de tonnes), de l'Inde et du Mexique (chacun environ 7 millions de tonnes), 10–12% étaient en Espagne, Italie, Égypte, Maroc, Grèce, Algérie, et en Tunisie qui sont les principales agrumicoles du bassin méditerranéen (Ladaniya, 2010). Les tendances de la production indiquent que les oranges constituent approximativement 60% de la production totale des citrus, suivis par les mandarins, clémentines, qui comprennent approximativement 20 % de la production. Le groupe de citrons et limes constitue 11–12%, pamplemousse et les pomelos comprennent 5–6% (FAO, 2006) (Figure 2)

**Tableaux II** : La production de citrus dans quelque pays du monde (million de tonnes)

Pays	1970	1980	1990	2000-2001	2001-2002	2002-2003	2003-2004	2004-2005
<b>Brésil</b>	7.39	11.67	16.90	16.49	19.91	17.73	21.39	18.90
<b>USA</b>	11.59	10.29	12.65	14.04	14.09	13.73	14.78	10.49
<b>Chine</b>	0.65	1.70	7.36	9.20	12.03	12.46	13.88	15.22
<b>Mexico</b>	1.90	2.48	4.42	6.14	6.35	6.08	6.58	6.91
<b>Espagne</b>	2.68	3.47	5.03	5.40	5.75	5.94	6.23	6.18
<b>Inde</b>	1.89	3.30	4.31	4.39	4.63	4.66	4.66	4.66
<b>Italie</b>	2.68	3.10	3.15	3.01	3.01	2.76	2.75	3.32
<b>Égypte</b>	0.90	1.40	2.20	2.50	2.90	2.48	2.31	2.70
<b>Production totale</b>	47.13	57.77	81.12	89.70	98.35	94.08	100.85	94.79

Source: FAO (2003), FAO (2006).



**Figure 2.** proportion de production des citrus dans le monde (Jésus, 2002)

### I.2. La valeur nutritive des *citrus* dans le régime alimentaire humain

Le jus d'agrumes peut être une source excellente de substances nutritives importante pour la santé. Il est préférable de manger le fruit que boire son jus, parce que beaucoup d'antioxydants présentent dans la pulpe ou la partie fibreuse. Les citrus représentent une excellente source de vitamine C. Cette vitamine diminue avec la maturité du fruit dans des oranges, mandarines, et pamplemousse. Les citrus renferment également : la vitamine A (rétinol), B3 (nicotinamide), B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine) et E (tocophérols) d'approximativement 0.5–0.6 g à 0.75–0.8 g par gramme de jus (Dugo et Di Giacomo, 2004). Les citrus sont riches en acides organiques tels qu'acide citrique, acide malique, acide oxalique, acide succinique, et acide malonique ainsi qu'en plusieurs métabolites importants pour la santé, tels que les flavonoïdes, limonoïdes, les fibres et la pectine

Les agrumes possèdent un faible taux de lipide. Cependant, les agrumes ne sont pas une bonne source de protéines. La valeur nutritive et l'apport énergétique de quelque citrus sont représentés dans le tableau III.

Tableau III : la valeur nutritive du jus de quelque citrus (jésus,2002)

élément nutritif	Jus d'orange	Jus de la mandarine	Jus de pomelo
Vitamine C	45–50 mg	30–31 mg	30–35 mg
Vitamine A	190– 400 IU	350–420 IU	Trace–21 IU
Vitamine D	-	-	-
Vitamine E	100 µg	-	-
Thiamine (B1)	50–80 µg	50–80 µg	30–40 µg
Riboflavine	20–40 µg	20–40 µg	-
Niacine	300–600 µg	200–250 µg	200 µg
Calcium	10–11 mg	-	9–10 mg
Fer	0.1–0.2 mg	-	-
Vit B6 (Pyridoxine)	47–66 µg	40–50 µg	18–20 µg
Acide Folique	34 µg	21 µg	8 µg
Vitamine B12	-	-	-
Phosphore	14–20 mg	16–18 mg	15–18 mg
Iode	0.25 µg	-	-
Magnésium	8–12 mg	10–15 mg	8–10 mg
Zinc	25–30 µg	-	-
Cuivre	-	-	-
Biotine	50–160 µg	-	280–300 µg

### I.3. Pamplemousse (*Citrus grandis*)

#### I.3.1. Origine et historique

Le pamplemousse est probablement originaire de région tropicale ; d'après Hodgson (1967), ce fruit est originaire de l'archipel de Malaisie et d'Indonésie, et qu'il s'est diffusé de là vers la Chine et l'Inde, puis vers la Perse, la Palestine et l'Europe. Selon Tolkowsky (1938), il a été mentionné après Jésus-Christ en Palestine et en Espagne en (1187). Webber (1943) a rapporté que le pamplemousse a été décrit pour la première fois en Jamaïque par Sloane (1696), et le même auteur ajoute, plus tard, en 1707 que la graine du pamplemousse a été apportée à Barbade par le capitaine Shaddock, commandant d'un Bateau de l'Est indien (Nicolosi, 2000).

Le Pamplemousse (*Citrus grandis*) est le nom le plus employé en français. Le pamplemousse est connu également sous le nom de Chadèque, dérivé de l'anglais Shaddock. Le nom de Pomelo est utilisé, à tort puisque cette appellation n'est qu'une des nombreuses dérivations du mot Pomelo (pumelow, pumelo); quant à l'Afrique du Nord (Maroc et Algérie notamment), seul le mot Pomelo est utilisé, en particulier dans les pépinières et sur les étiquettes des caisses d'exportation. Il n'est malheureusement pas possible de réformer cet usage. Il semble donc que soient définitivement adoptées les dénominations françaises suivantes : *C. grandis* Osb. = pamplemousse; *C. paradisi* Macf = pomelo (au lieu de grape-fruit). Risso a pris le mot pamplemousse pour désigner l'ensemble des cultivars de *citrus maxima*, (**Chauvet, 1980**).

### I.3.2. Classification

Le pamplemousse est aussi appelé Shaddock, (capitaine Anglais Philip Shaddock qui a d'ailleurs donné son nom au pamplemousse en anglais). Son nom botanique est *citrus grandis* ou *citrus maxima*, il appartient à la famille des *Rutaceae* et au genre *Citrus* (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : Classification botanique de pamplemousse (**Aswini et al., 2012**)

Taxon	Nom
Règne	<b>Plantae – végétal</b>
Division	<b>Magnoliophyta</b>
Classe	<b>Magnoliopsida</b>
Ordre	<b>Rosidae</b>
Genre	<b>Citrus.</b>
Famille	<b>Rutacées</b>
Espèce	<b><i>Citrus grandis.</i></b>

### I.3.3. Description botanique

Le pamplemoussier est un arbre imposant, impressionnant même qui peut atteindre jusqu'à 10 mètres de hauteur, d'où son appellation latine *grandis*. Ses feuilles sont larges (15 à 23 centimètres de longueur), elles sont ovales et pubescentes en dessous avec des pétioles largement ailés (**Figure 3**) (Aswini et al., 2012).

Les fleurs de cet arbre sont blanches pouvant atteindre 6 centimètres. Le pamplemousse est un fruit dont le diamètre peut atteindre jusqu'à 15 à 20 centimètres, de forme ronde (quelques variétés de formes aplaties ou piriformes) dont l'écorce est épaisse à très épaisse (3 à 4 centimètres) et de couleur vert à jaune lorsque elle est mature (**Figure 3**) fruit à peau lisse jaunâtre, rose ou rougeâtre (Ladaniya, 2010)



**Figure 3** : le pamplemoussier, arbre, fleur, feuille et fruit (ferme à akbou)

### I.3.4. Composition et valeur nutritive

La valeur nutritive de pamplemousse pour 100 grammes est représentée dans le tableau V. Le pamplemousse est riche en huiles essentielles, sa quantité varie selon la variété et maturité de fruit. Les huiles essentielles de citrus maxima sont composées de  $\alpha$ -Pinène, Sabinine,  $\beta$ -Pinine, méthyle hepténone,  $\beta$ -Mycènes, Hexanal, DL-Limonène, t-Ocimene, Linalool, 1-

Hexene, 4-méthyle; 1-Hexene,3,3-dimethyl;Geranyl formate, E-Citral, Geranylacetate,  $\beta$ -Farnesene. Il contient, en outre, du chlore, du cuivre, du fer, du manganèse et du sodium (Wu Tian-Shunge *et al*, 1996).

**Tableau V** : quelque valeur nutritive de pamplemousse pour 100 grammes (Sylvie haineault, 2011)

Composition	Teneur
Eau	89 g
Énergie	43 cal
Glucides	9 g
Lipides	0,1 g
Vitamine P	0,3 mg
Vitamine C	40 mg
Vitamine B1	0,07 mg
Vitamine B2	0,05 mg
Provitamine A	0,1 mg
Potassium	190 mg
Calcium	20 mg
Phosphore	18 mg
Magnésium	12 mg

*Citrus grandis* peut être une source majeure d'antioxydants naturels tels que bêta-carotène, acide ascorbique, terpénoïdes, alcaloïdes, bêta-sitostérol, carotène, polyphénols tels que flavonoïdes, glycosides du flavone et rutine. La Naringine, neohespéridine, et l'hespéridine sont les flavonoïdes majeurs trouvés dans le pamplemousse. Le profil des flavonoïdes varie selon les espèces et cultivars, et peut donc être utilisé pour distinguer entre les différentes variétés. (Ladanya, 2010).

### I.3.5. Utilisation et effet thérapeutique de pamplemousse

La pulpe juteuse de pamplemousse est consommée fraîche ou elle est utilisée principalement pour produire du jus pour la nutrition humaine. Dans quelques pays d'Asie d'Est du sud, les fleurs, les fruits et les graines sont utilisés pour les buts médicaux, les fleurs sont aussi

utilisées pour parfumer. La pelure épaisse du pamplemousse est quelquefois utilisée pour préparer des marmelades et des bonbons sucrés (**Paudyal et Haq, 2000**).

Le péricarpe de fruit a été utilisé dans ancienne médecine pour traiter l'asthme, douleur abdominale et douleur de l'estomac. Les études pharmacologiques ont démontré que les extraits des péricarpes de pamplemousse possèdent une activité antioxydante, anti-micro-organisme et une activité hypoglycémiant (**Zhang et al., 2012**).

Le pamplemousse possède une activité antimutagène et un pouvoir anti carcinogène. Les flavonoïdes de ce fruit ont une grande gamme d'effets biologiques tels que l'activité anti-inflammatoire et antimicrobienne. Naringenine joue un rôle dans la réduction de cholestérol plasmatique et hépatique.

Les huiles essentielles extraites à partir de pamplemousse constituent un moyen efficace pour conserver le système immunitaire en santé. Ils sont utilisés en parfumerie et en cosmétologie (**Pichaiyongvongdee et Haruenkit, 2009**)

La consommation du pamplemousse frais chaque jour avec des repas, provoque la perte du poids (3.6 kilos dans 3 mois).

***Chapitre II :***

***Les antioxydants des agrumes***



## II.1. les radicaux libres et le stress oxydant

### a. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules neutres ou chargées portant un électron non apparié (électron célibataire) formés par voie chimique, photochimique ou biologique. Ils sont très instables, leur durée de vie est généralement très courte et leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de réappairier leur électron célibataire ; elle entraîne la propagation du phénomène par création d'un nouveau radical (**Tessier et Marconnet, 1995**).

Dans la plupart des cas, les radicaux libres sont formés à partir de l'oxygène, d'où leur appellation : espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO renferment l'ensemble des dérivés oxygénés radicalaires comme l'anion-superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'oxygène singulet ( $O_2^{\cdot}$ ) et le radical hydroxyle (OH $\cdot$ ) mais également d'autres composés non radicalaires, dont le peroxyde d'hydrogène (**Milane, 2004**)

Il existe deux sources de production des espèces oxydantes, une endogène et l'autre exogène. Une faible partie (2% à 5%) de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie, peut être une source endogène des radicaux libres oxygénés (**Tessier et Marconnet, 1995**). Les rayonnements représentent la principale source exogène des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou  $\gamma$ , soit en activant des molécules photosensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxyde et de l'oxygène singulet (**Favier, 2003**)

### b. Stress oxydatif

On parle d'un stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre dans la balance antioxydants/ pro-oxydants en faveur de ces derniers. Le déséquilibre peut être engendré par un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'une activation de systèmes enzymatiques, d'irradiation ou d'autres choses [**Tableau VI**] (**Favier, 2003 ; Haleng, 2007**)

Le stress oxydatif est impliqué dans un certain nombre de maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer et les maladies neurodégénératives (**Valko et al., 2007**).

**Tableau VI** : sources de stress oxydant (**Haleng, 2007**)

<b>Mode de vie</b>	Tabagisme Faible consommation en fruits et légumes Alcool Médicaments Pilule contraceptive Exposition en soleil Exercice intense ou mal géré
<b>Environnement</b>	Pollution Ozone Amiante Radiations Contacts avec des substances cancérogènes
<b>Mécanismes biochimiques</b>	Xanthine-oxydase Inflammation Altération de la fonction endothéliale Surcharge en fer Oxydation de l'hémoglobine Altérations mitochondriales Biosynthèse des prostaglandines Interventions chirurgicales (Circulation extracorporelle, transplantations)

## II.2. Les antioxydants des agrumes

De façon générale, un antioxydant peut être défini comme étant une substance qui est présente, dans un milieu à des faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation de ce dernier en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydant (**Princmail et al., 1999**).

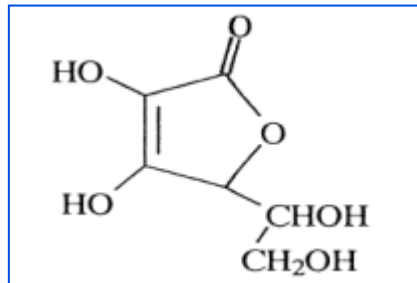
Selon Rice-Evans, Miller et Paganga (1997), un bon antioxydant devrait à la fois agir à des concentrations physiologiques relativement faibles; agir spécifiquement sur les radicaux libres et être stable après l'oxydation.

Les agrumes sont importants en raison de leurs propriétés nutritionnelles et antioxydantes. Ils contiennent une multitude de composés phytochimiques actifs qui contribuent à la santé. Plus de 170 composés phytochimiques ont été identifiés chez les oranges (**Betoret et al., 2009**). Il est bien connu que les agrumes sont riches en vitamine C et en caroténoïdes, tout comme d'autres molécules bioactives (les acides phénoliques, les flavonoïdes, etc.) (**Rapisarda et al., 2008**).

### II.2.1. Acide ascorbique

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble importante, cette dernière ne peut pas être synthétisée par l'organisme elle doit être apportée par l'alimentation (**klimeczak et al., 2007**).

La structure de la vitamine C est représentée dans la **figure 4**



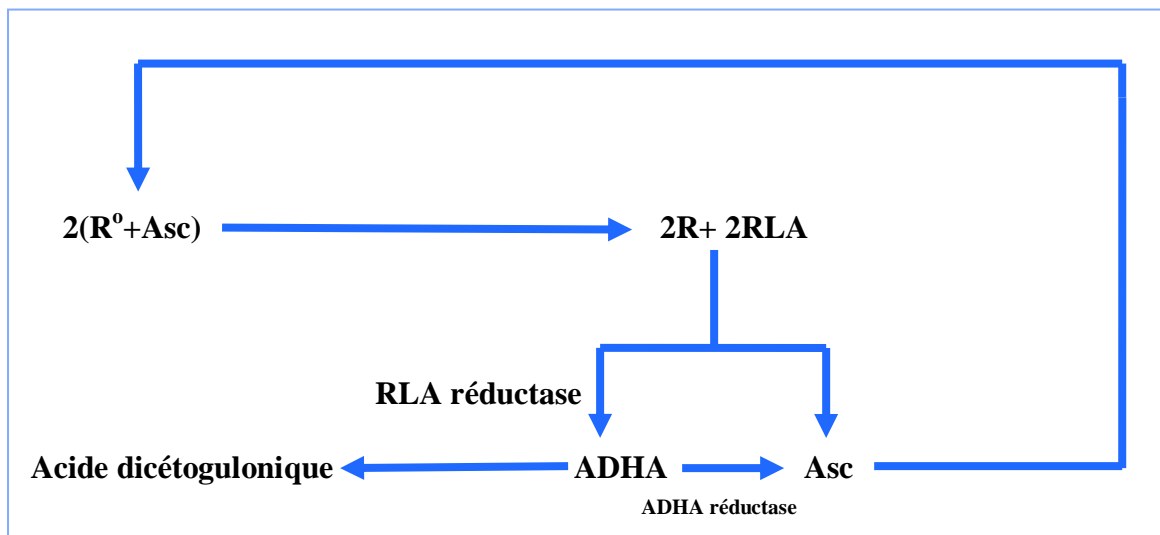
**Figure 4:** Structure chimique de l'acide ascorbique.

#### II.2.1. 1. Propriétés antioxydantes de l'acide ascorbique

##### *a. Neutralisation des radicaux libres*

L'acide ascorbique est une molécule antioxydante fortement réductrice, elle est capable de piéger l'oxygène singulet et les radicaux libres, dont le radical, superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (**klimeczak et al., 2007**).

La figure 5 montre l'action de l'acide ascorbique (Asc) sur un radical libre ( $R^\bullet$ ) et les voies de sa régénération. Le  $R^\bullet$  est neutralisé par le transfert d'un électron provenant de l'acide ascorbique (Asc). Il résulte un produit (R) et un radical libre ascorbyl (RLA). Deux molécules de ce dernier peuvent réagir entre elles pour donner une molécule d'acide ascorbique et une molécule d'acide déshydroascorbique (ADHA) qui peut être transformé en acide ascorbique par ADHA réductase ou se transformé en produit stable, l'acide dicétogulonique (**Rose et Bode, 1993**).

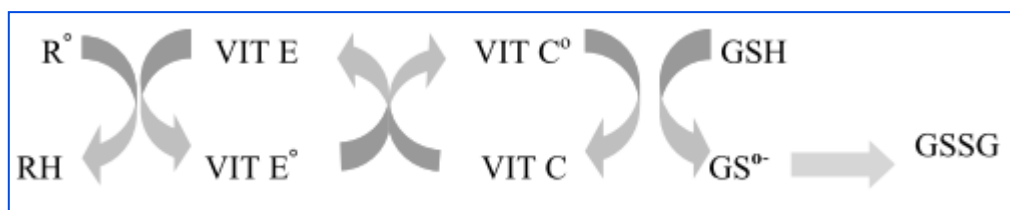


**Figure 5** : Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération (Rose et Bode, 1993).

### b. Régénération des tocophérols

La vitamine C joue aussi un rôle fondamental en régénérant la vitamine E (Figure 6) (Curtay et Robin, 2000).

Par interaction avec un radical lipidique  $R^\circ$ , la vitamine E (VIT E) se transforme en un radical tocophéryl (VIT E $^\circ$ ). Ce dernier est régénéré en VIT E. sous l'action de la vitamine C (VIT C) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (VIT C $^\circ$ ). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la vitamine C en se transformant en un radical thyl (GS $^\circ$ ) et par réaction de ce dernier avec une autre molécule thyl, il donne du glutathion oxydé (GSSG).



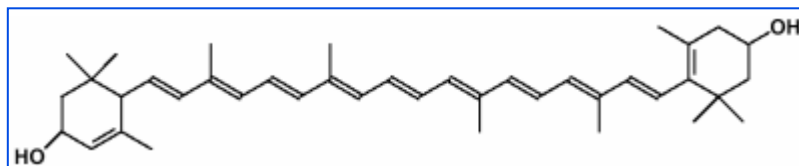
**Figure 6** : Régénération des tocophérols par l'action de l'acide ascorbique (Pincemail et al., 1998).

## II.2.2. Les Caroténoïdes

Les caroténoïdes, pigments liposolubles, sont responsables des couleurs jaune, rouge et orange des fruits et des légumes. Leurs structures chimiques dérivent du lycopène (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>). Elles contiennent une chaîne polyinsaturée et peuvent également comporter une structure cyclique à chaque extrémité (**Dionne, 2002**).

### II.2. 2.1. Propriétés antioxydantes

Grâce à leur longue chaîne carbonée polyinsaturée, les caroténoïdes présentent une activité anti-radicalaire. Ces composés possèdent pour la plupart dans leur structure chimique (**Figure 7**) de très nombreuses doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de leur activité antioxydante (**Pincemail et al., 1998**).



**Figure 7** : structure chimique d'un caroténoïde (**Princemail et al., 1998**).

- **Piégeage de l'oxygène singulet**

Les caroténoïdes sont des piègeurs très efficaces contre l'oxygène singulet en le transformant en oxygène moléculaire triplet par la réaction suivante (**Beutner et al., 2001**)



L'oxygène singulet est piégé par transfert de son énergie d'excitation vers le caroténoïde qui va revenir à son état initial par la dissipation de cette énergie sous forme de chaleur (**Dutta et al., 2004**).

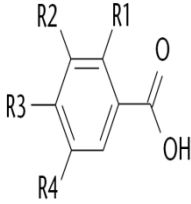
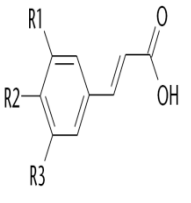
### II.2.3. Les composés phénoliques

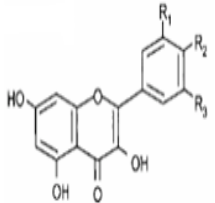
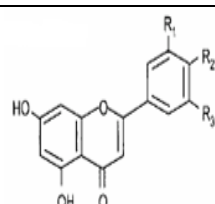
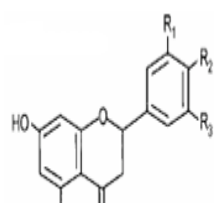
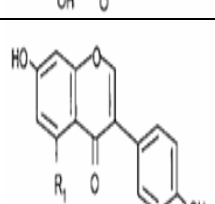
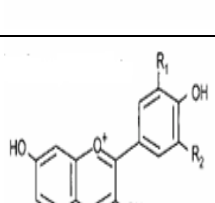
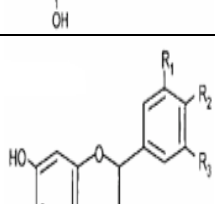
Un composé phénolique est un dérivé non azoté, dont l'élément structural de base est un noyau benzénique, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une fonction chimique (Varcautren et al., 1998). Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux, ils ne sont pas impliqués dans la croissance et le métabolisme énergétique. Ils sont ordinairement engendrés en réponse aux stress environnementaux (Harnly et al., 2007)

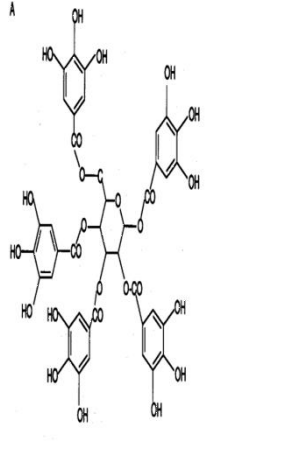
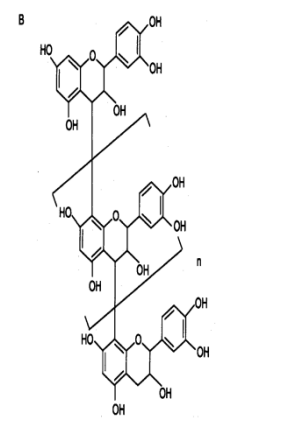
#### II.2.3.1. Classification

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en trois grandes catégories : Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins (Ba et al., 2010) (Tableau VII) qui ont toutes un point commun : un cycle aromatique à 6 atomes de carbone qui porte un nombre variable de fonctions hydroxyles (Ladanyia et Ladanyia, 2010).

**Tableau VII : Les classes des composés phénoliques (Andersen et Markham, 2010 ; Bennicki, 2002)**

Catégories des polyphénols	classes	structures	exemples
Acides phénoliques	Dérivés de l'acide benzoïque		<b>R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H</b> Acide benzoïque <b>R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH</b> Acideprotocatéchique <b>R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=OH</b> Acide gallique <b>R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H</b> Acide salicylique <b>R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H</b> Acide gentisique
	Dérivés de l'acide cinnamique		<b>R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H</b> Acide cinnamique <b>R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH</b> Acide p-coumarique <b>R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H</b> Acide caféique <b>R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H</b> Acide Férulique <b>R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OH</b> Acide sinapique

Flavonoïdes	Flavonols		$R_2=OH$ ; $R_1=R_3=H$ Kaempferol $R_1=R_2=OH, R_3=H$ Quercétine $R_1=R_2=R_3=H$ Myricétine
	Flavones		$R_1=H, R_2=OH$ Apigénine $R_1=R_2=OH$ Luteoline
	Flavanones		$R_1=H, R_2=OH$ Narigénine $R_1=R_2=OH$ Eriodictyol $R_1=OH, R_2=OCH_3$ Hesperitine
	Isoflavons		$R_1=H$ Daidzeine $R_1=OH$ Genesteine
	Anthocyanidine		$R_1=R_2=H$ Pelargonidine $R_1=OH, R_2=H$ Cyanidine
	Flavanols		$R_1=R_2=OH, R_3=H$ <b>Ctéchine</b> $R_1=R_2=R_3=OH$ <b>Galocatéchine</b>

Tannins	Tannins hydrolysables	 <p>A</p>	
	Tannins condensés	 <p>B</p>	

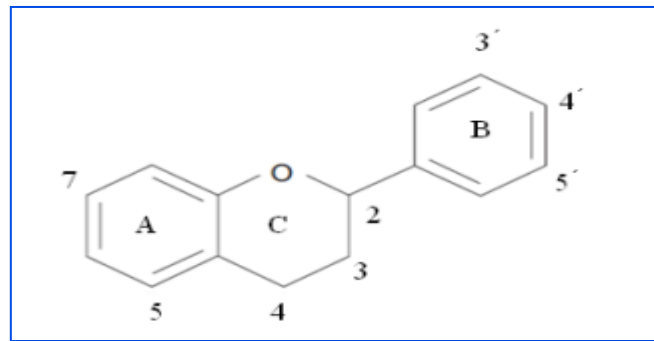
### a. Les acides phénoliques

Le pamplemousse est riche en acides phénoliques dont l'acide gallique, procatechique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, caffeique, p-coumarique, salicylique, férulique, sinapique et anisique. Le pouvoir antioxydant des acides phénoliques réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres (**Gorinstein et al., 2004**).

### b. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 600 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ce sont des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2005**). Les flavonoïdes dérivent de la même structure de base : les flavanes (**Figure 8**) (**Derbel et Ghedira, 2005**).



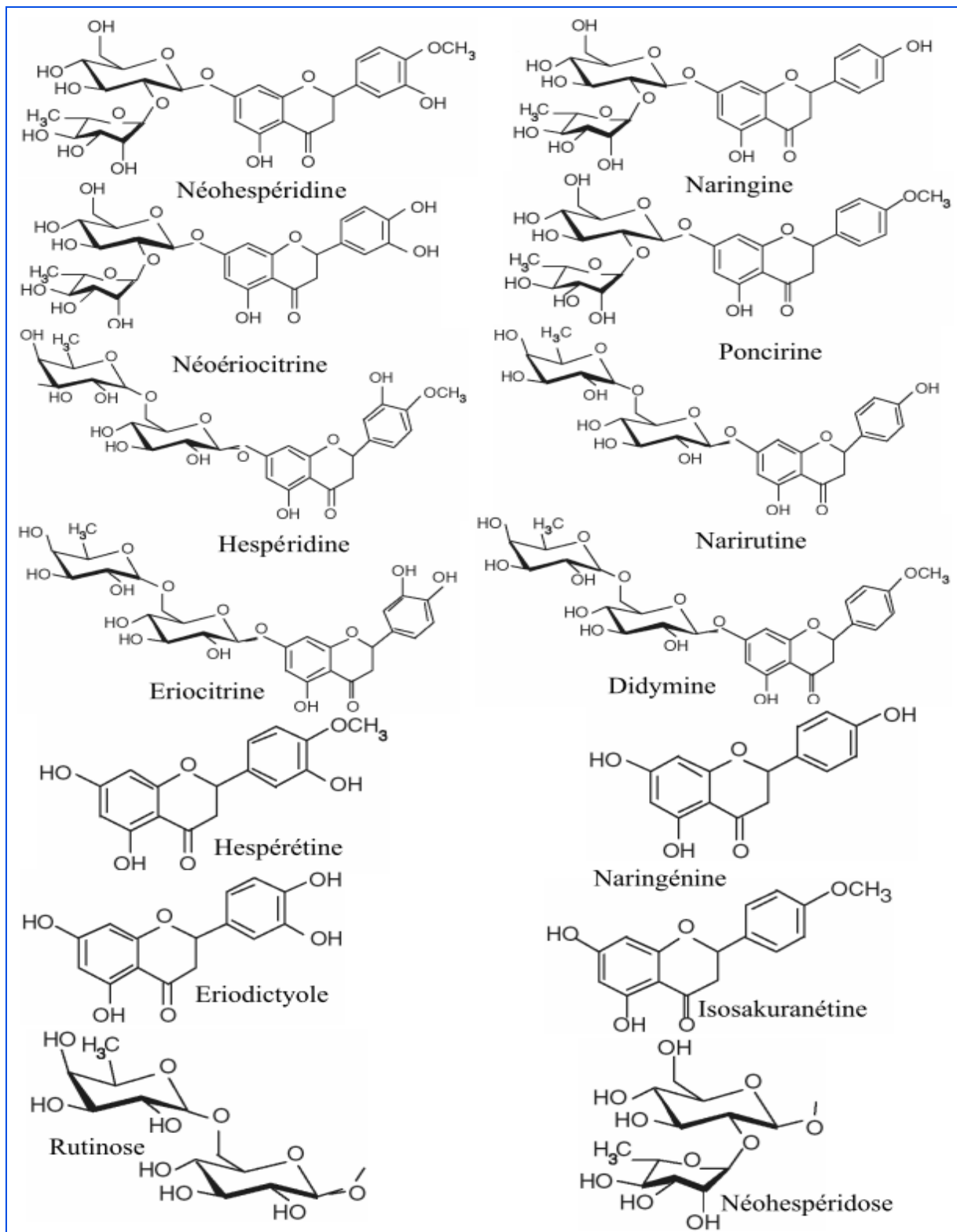


**Figure 8** : Structure de base des flavonoïdes (**Derbel et Ghedira, 2005**)

Les agrumes sont riches en flavonoïdes ; ils contiennent plus de 60 flavonoïdes, repartis selon les quatre classes: flavones, flavanones, flavonols et anthocyanines (**Peterson et al ., 2006**)

### **b.1. Les flavanones**

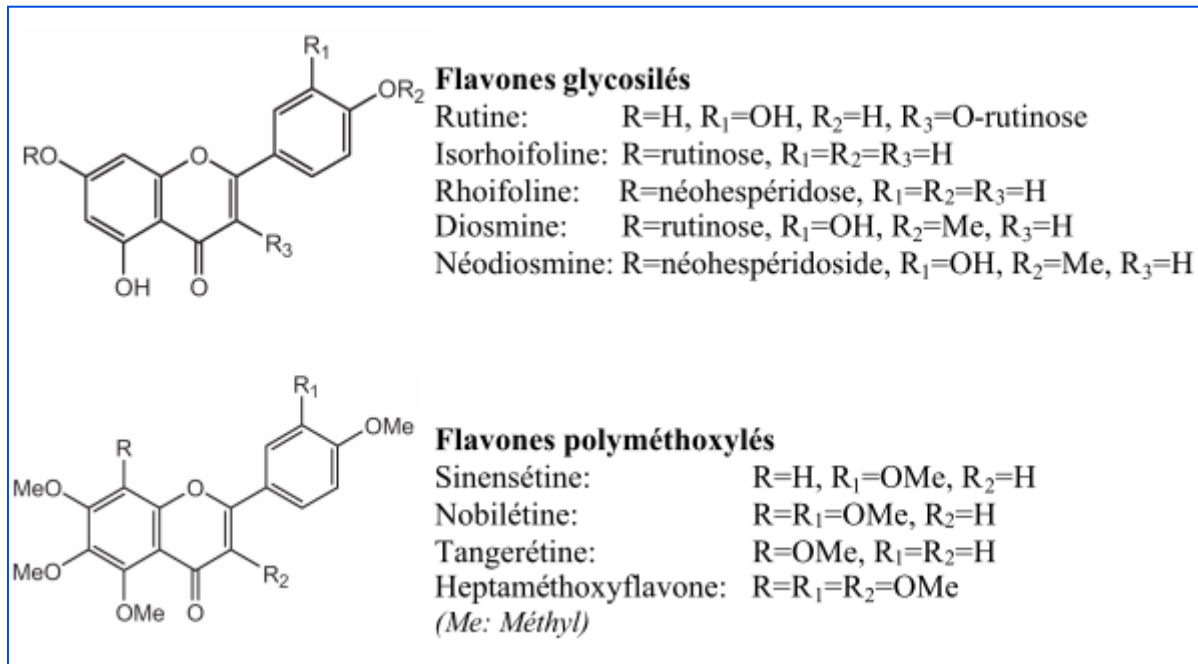
Les flavanones constituent presque la totalité des flavonoïdes présents dans les agrumes : 98% dans le pamplemousse. Les flavanones (**Figure 9**) identifiés dans le jus du pamplemousse sont: la didymine, l'ériocitrine, l'héspéridine, la narirutine, la naringine, la néoériocitrine, l'hespéridine et la poncérine ; la naringine est le composé dominant dans le pamplemousse. La quantité de ces composés varie d'une variété à l'autre (**Vanamala et al., 2006**).



**Figure 9** : Flavanones des agrumes (Peterson *et al.*, 2006)

## b.2. Les flavones

Dans certaines espèces d'agrumes, les flavonoïdes se retrouvent sous forme de flavones glycosylés (rutine, isorhoifoline, diosmine, etc.) et polyméthoxylés (sinensétine, nobilétine, tangerétine, etc.) (**Figure 10**) (**Jayaprakasha et Patil, 2007**).



**Figure 10** : Flavones des agrumes (**Nogata et al., 2006**)

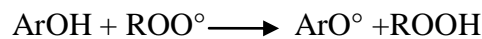
## II.3. Activité antioxydante des composés phénoliques

Les antioxydants agissent de plusieurs manières et leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (vitamine C) et la réparation de l'ADN (Zn, acide folique, niacine) (**Berger, 2006**).

### II.3.1. Les polyphénols

L'efficacité anti-radicalaire d'un composé phénolique dépend de sa capacité à céder un ou plusieurs H<sup>+</sup> et ensuite à se stabiliser, la position et le degré d'hydroxylation, et la méthylation du cycle aromatique sont des facteurs importants qui déterminent l'activité antioxydante des acides cinnamiques et de leurs dérivés (**Robards et al., 1999**).

L'activité antioxydante des acides cinnamiques suit l'ordre suivant : acide chlorogénique > acide caféique > acide férulique > acide coumarique. Le mécanisme d'action des polyphénols est le suivant :

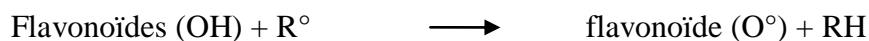


ArOH : polyphénol

ArO<sup>°</sup> : radical polyphénolique.

### II.3.2. Les flavonoïdes

L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend étroitement de leur structure : la présence de groupe hydroxyle dans la position ortho du noyau aromatique B, le nombre de groupe hydroxyle libres, la présence de la double liaison entre le carbone 2 et le carbone 3 du noyau C et la présence du groupe 3-hydroxyle sont les conditions de leur meilleure activité antioxydante. Le groupe hydroxyle libre au niveau de carbone C4', C3' et/ou C3 et la double liaison entre le carbone C3 et C2 confèrent aux flavonoles une activité anti-radicalaire importante. Tandis que les flavanones avec une simple liaison entre les carbones C3 et C2 et un groupe hydroxyle au niveau du carbone C4' du noyau B possèdent une faible activité anti-radicalaire (**Dugo et Di giacomo, 2004**):



R<sup>°</sup> : radicale libre

(O<sup>°</sup>) : oxygène radicalaire.

### II.4. Autres rôles biologiques des composés phénoliques

En plus de leur activité antioxydante, les polyphénols sont parmi les substances bioactives les plus puissantes et les plus prometteuses en thérapie. Des activités antitumorales, antivirales, antibiotiques, ...etc., sont attribuées à ces substances naturelles.

#### II.4.1. Activité antiallergique

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l'AMPC phosphodiesterase et la Ca<sup>++</sup> ATPase. En outre, la quercétine exerce un

puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes (**Kotani et al., 2000**).

#### **II.4.2. Activité anti-inflammatoire**

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires.

*In vitro*, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement (**Sanchez de Medina et al., 2002**).

#### **II.4.3. Activité anti-ulcérogène**

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes.

La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Il a été suggéré que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes via la production de mucus et ses propriétés antioxydantes. Par ailleurs, il a été établi que la quercétine inhibe la croissance d'*Helicobacter pylori* ainsi que la formation d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine (**Andersen et Makham, 2010**).

#### **II.4.4. Activité antibactérienne**

Les effets antimicrobiens d'extraits de plantes ont été rapportés par de nombreux chercheurs (**Hayder et al., 2005**). Il a été montré que l'activité antibactérienne des extraits de plantes est attribuée à leurs composés phénoliques (**Vander watt et Pretorius, 2001**).

- **Action sur les membranes cellulaires**

La membrane cytoplasmique bactérienne présente la même sensibilité aux composés phénoliques qu'il s'agisse d'une bactérie Gram positif ou Gram négatifs. Les polyphénols pénètrent dans la cellule bactérienne et inactivent les perméases du périplasme qui sont

impliquées dans le transport des aminoacides et des polysaccharides. Cela entraîne une modification de la perméabilité cellulaire, avec une lyse de la cellule bactérienne suivie par une perte de ses constituants (**Dugo et Giacomo, 2004**).

# ***Partie Pratique***

## ***Matériel et méthodes***



## I. Le matériel végétal

### I.1. Description du matériel végétal

Notre étude a eu pour but l'évaluation de l'activité antioxydante et anti peroxydase de l'extrait des feuilles du pamplemoussier.

Les feuilles du pamplemoussier sont persistantes de couleur verte, ovale, grandes de 15 à 23 centimètres de longueur et une largeur variant entre 5,5 et 6,5 centimètres, légèrement ailées.

(Figure 11)

Les feuilles ont été récoltées au mois de février au niveau de la région de Guendouza de la commune d'Akbou à une altitude de 315 mètres, située à 75 km à l'ouest de Bejaïa (Figure 12), elles ont été cueillies saine et fraîche sur un seul arbre.

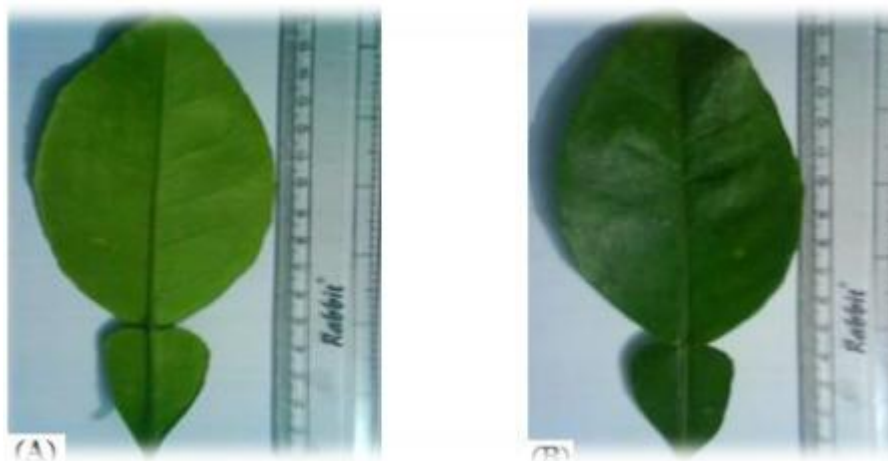


Figure 11 : A) surface dorsale

B) surface ventrale



Figure 12 : localisation géographique du lieu de récolte des feuilles de pamplemoussier

## I.2. préparation de la poudre végétale

Après récolte, les feuilles ont été lavées par l'eau de robinet pour éliminer la poussière et tous les autres polluants, puis séchées dans l'étuve à 40°C pendant sept jours.

Les feuilles séchées ont été ensuite broyées à l'aide d'un moulin à café jusqu'à obtention d'une poudre homogène puis tamisée avec un tamiseur de marque « RETSCH ». Trois tamisages successifs ont été réalisés, dont les diamètres des mailles sont de 500 µm, 250µm et 200 µm. La poudre ainsi obtenue a été ensuite conservée dans des récipients hermétiques à l'abri de la lumière.

## II. Extraction méthanolique

Plusieurs solvants organiques peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques, mais le méthanol est le solvant le plus recommandé, car il donne le meilleur rendement d'extraction (**Fellah et al., 2008**).

### *Le procédé d'extraction*

L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par (**Fellah et al., 2008**).

10 g de la poudre végétale ont été mélangés à 100 ml de méthanol absolue. Puis laisser macérer sous agitateur magnétique pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Le macérât a été ensuite laissé à 4°C pendant 24 heures, puis filtré à l'aide d'un papier Wattman N° 3. Le filtrat ainsi obtenu a été ensuite séché sous hotte pour une durée de cinq jours, puis à l'étuve (40°C) pendant 24 heures jusqu'à évaporation complète du méthanol (stabilité du poids de bécher).

L'extrait méthanolique récupéré après évaporation a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés, bien étiquetés et à l'abri de la lumière.

### *Calcul du rendement*

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de matière extraite (\%)} = (P1 - P0 / P_i) \cdot 100$$

P<sub>0</sub> : poids du bécher vide en mg

P<sub>1</sub> : poids du bécher avec l'extrait sec

P<sub>i</sub> : poids de la poudre initial

### III. Dosage des composés phénoliques

#### III.1. Dosage des polyphénols totaux

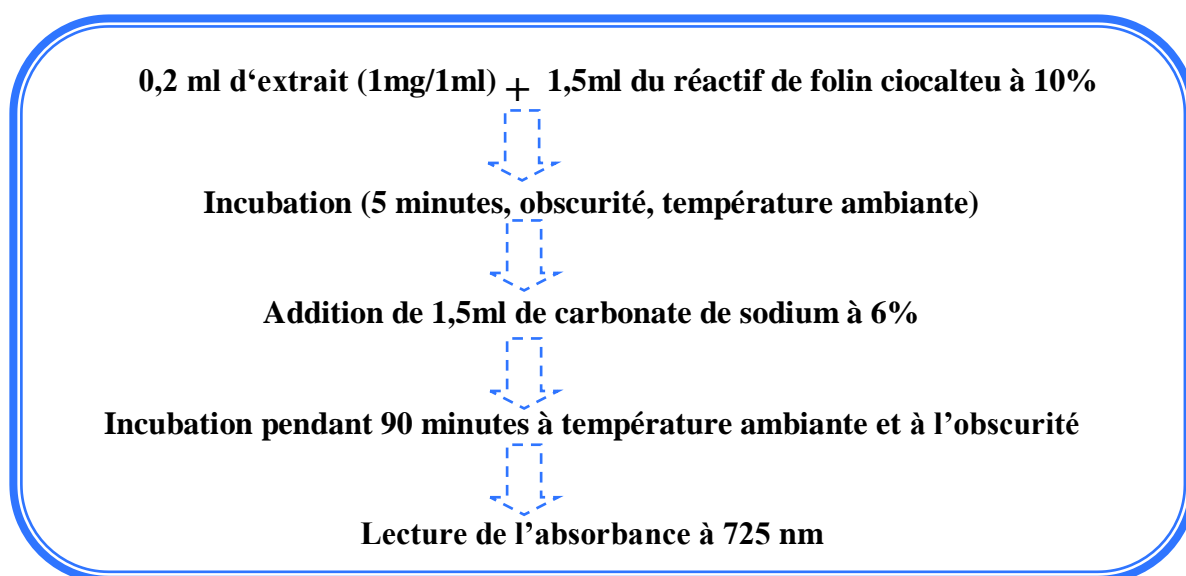
##### *Principe*

Les composés phénoliques totaux ont été quantifiés par une méthode colorimétrique, utilisant le réactif de Folin ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique,  $H_3PW_{12}O_{40}$  et d'acide phosphomolybdique,  $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Ces derniers de couleur jaune, lors de l'oxydation des phénols, sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. (Singleton et Rossi, 1965)

##### *Mode opératoire*

Le protocole utilisé pour le dosage des polyphénols totaux est celui de Singleton et Rossi (1965) modifié par Ryan et al. (2013) (Figure 13).

1 mg d'extrait méthanolique a été solubilisé dans 1 ml de méthanol. 0,2 ml de la solution méthanolique sont ensuite mélangés à 1,5 ml de réactif de folin (10%). Après incubation (5 min) à l'obscurité et à température ambiante, 1,5 ml de carbonate de sodium (6%) ont été additionnés. Après 2 heures d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 725 nm par un spectrophotomètre de type SPECORD 50



**Figure 13** : Protocole de dosage des polyphénols totaux (Ryan et al., 2013)

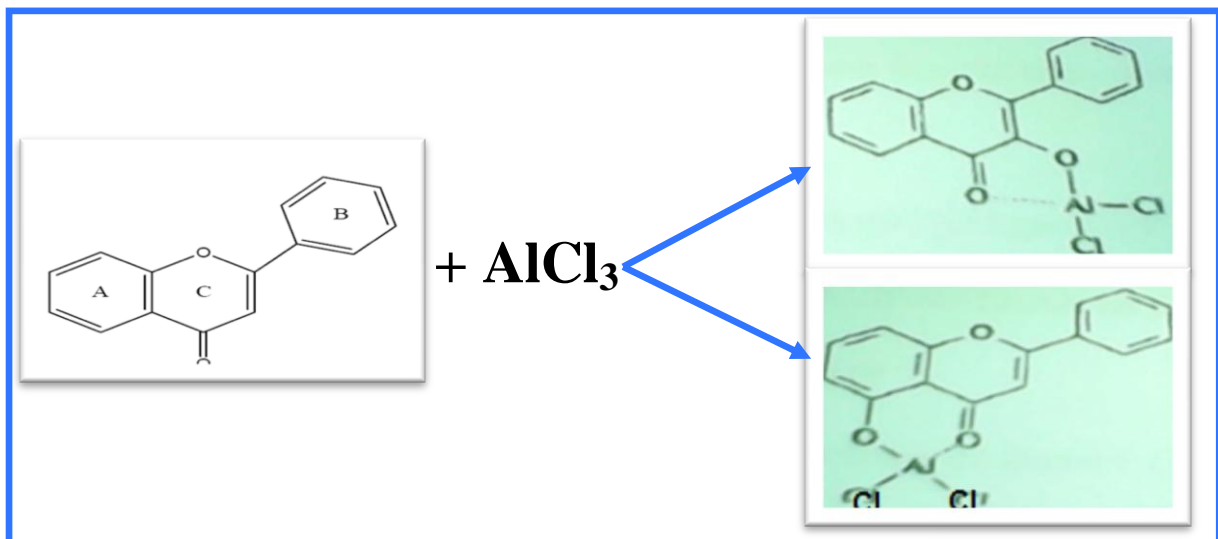
### *Expression des résultats*

Le taux des polyphénols totaux est exprimé en se référant à une courbe d'étalonnage, établie avec différentes concentrations de l'acide gallique comme standard dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en équivalent milligramme d'acide gallique/gramme de matière sèche.

### III. 2. Dosage des flavonoïdes

#### *Principe*

La teneur des flavonoïdes est estimée par la méthode du chlorure d'aluminium décrite par **Quettier Deleue et al.,(2000)**. Les groupements (OH) libres en position C<sub>3</sub> et C<sub>5</sub> et de l'oxygène en C<sub>4</sub> de la majorité des flavonoïdes sont susceptibles de former des complexes (**Figure 14**) de couleur jaunâtre en présence de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>).



**Figure 14** : Complexes flavonoïdes AlCl<sub>3</sub>

#### *Mode opératoire*

1ml de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub> à 2%) est ajouté à 1mg de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* (1mg/ml). Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 410 nm contre un témoin préparé dans les mêmes conditions réactionnelles en remplaçant l'extrait méthanolique par du méthanol. (**Figure 15**)

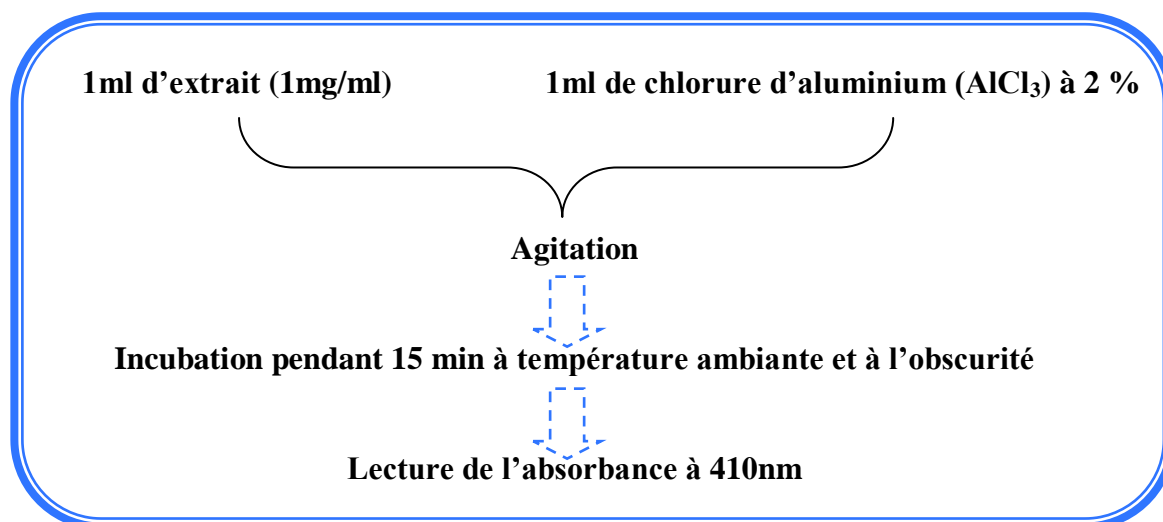


Figure 15 : les étapes de dosage des flavonoïdes. (Quettier-Deleue et *al.*, 2000)

### Expression des résultats

Le taux de flavonoïdes est exprimé en se référant à une courbe d'étalonnage, établie avec différentes concentrations de quercétine comme standard dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats sont exprimés en équivalent milligramme de quercétine/gramme de matière sèche.

## IV. Évaluation de l'activité antioxydante

### IV.1. Évaluation de l'activité antioxydante par le radical DPPH

#### Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 16) (Brand-Williams et *al.*, 1995)

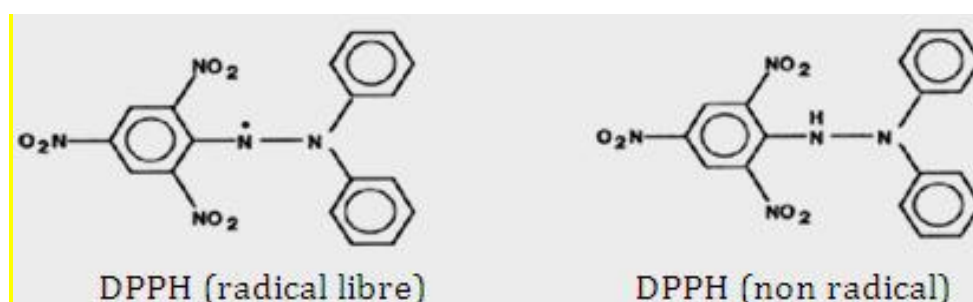


Figure 16 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams et *al.*, 1995)

#### Mode opératoire

L'effet scavenger du DPPH a été exprimé selon la méthode décrite par **Masuda et al. (1999)** modifiée par **Misuthisakul (2007)**.

25 µl de solution de DPPH (2,5 mM) sont ajoutés à 1ml de l'extrait méthanolique des feuilles de pamplemoussier à différentes concentrations (25 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 ; 250 et 300 µg/ml). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante les absorbances sont mesurées à 517 nm. La lecture d'absorbance a été réalisée contre un blanc ne contenant que la solution méthanolique du DPPH.

Le pourcentage de captation des radicaux libres a été calculé à partir de la formule :

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

Avec :

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

$A_1$  = DO de l'extrait + DPPH

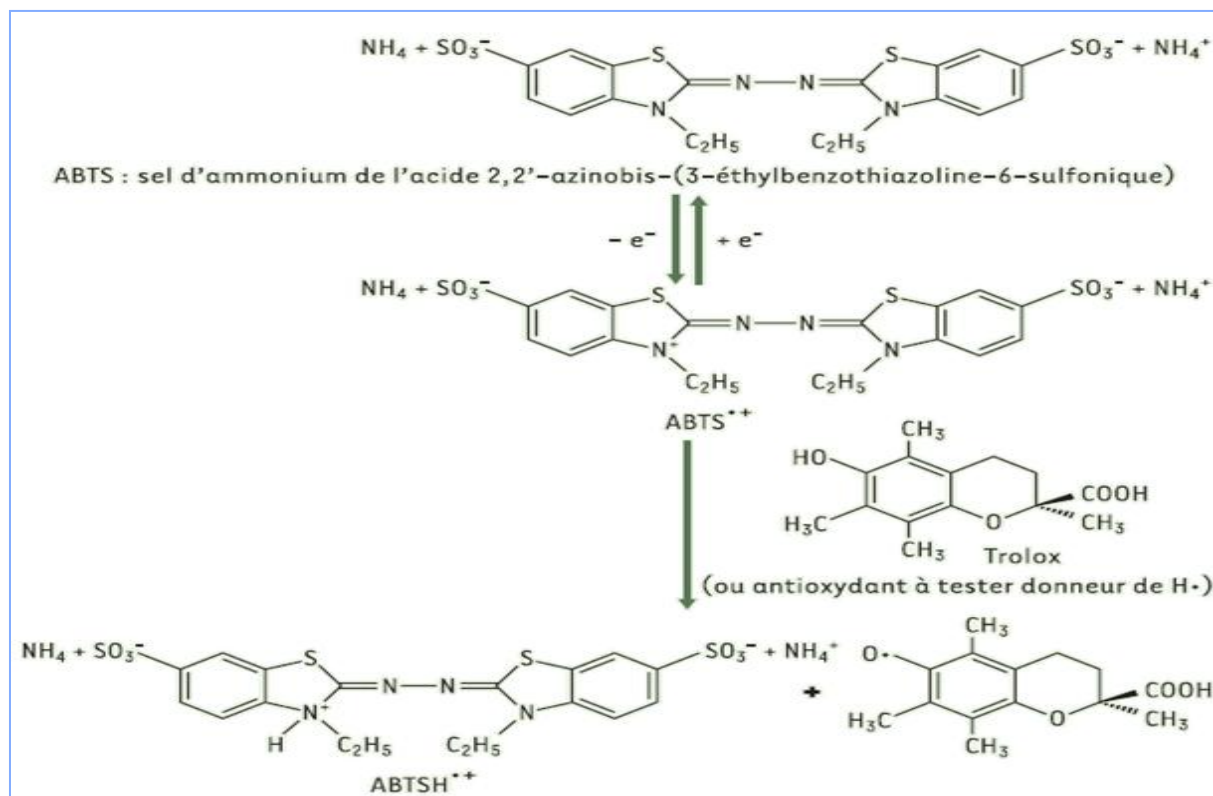
$A_2$  = DO du blanc (extrait + méthanol)

#### IV. 2. Activité scavenger du radical ABTS<sup>+</sup>

##### *Principe*

Le test d'ABTS permet de mesurer la capacité d'un antioxydant à piéger le radical ABTS<sup>+</sup>, qui est généré par oxydation du ABTS avec un sel fort tel que persulfate potassium (**Brice Nadal et al., 2010**).

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> (**Figure17**) de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore, par piégeage d'un proton.



**Figure 17** : Formation et piégeage du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  par un antioxydant donneur de  $\text{H}^{\bullet}$  (Lien et al., 1999).

### Mode opératoire

L'activité scavenger du radical ABTS est mesurée selon le protocole de Van den Berg et al., (2000).

#### i-Préparation de la solution radicalaire $\text{ABTS}^+$

72 mg d'ABTS solubilisés dans l'eau à 7 mM ont été mélangés à 13,24 mg de persulfate de potassium (2,5mM). Le mélange ainsi obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante durant 16 heures. Avant usage, la solution d' $\text{ABTS}^+$  a été diluée avec du l'eau distillée pour obtenir une absorbance à 734 nm de  $0.700 \pm 0.020$ .

#### ii- Mesure de l'activité

1,9 ml d'une solution d' $\text{ABTS}^+$  ont été mélangés à différents volumes de l'extrait méthanolique des feuilles du pamplemoussier (5-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) à concentration de 2 mg /ml puis ajustés à un volume final de 2 ml avec du méthanol. Après 5 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 734nm.

*iii-expression des résultats*

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS de l'extrait méthanolique de feuilles de pamplemoussier est calculé comme suit :

$$\text{PI (ABTS}^+) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition de radical ABTS<sup>+</sup>

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

A<sub>1</sub> : absorbance de l'extrait + ABTS

**IV. 3. Pouvoir réducteur : test au ferrocyanure de potassium***Principe*

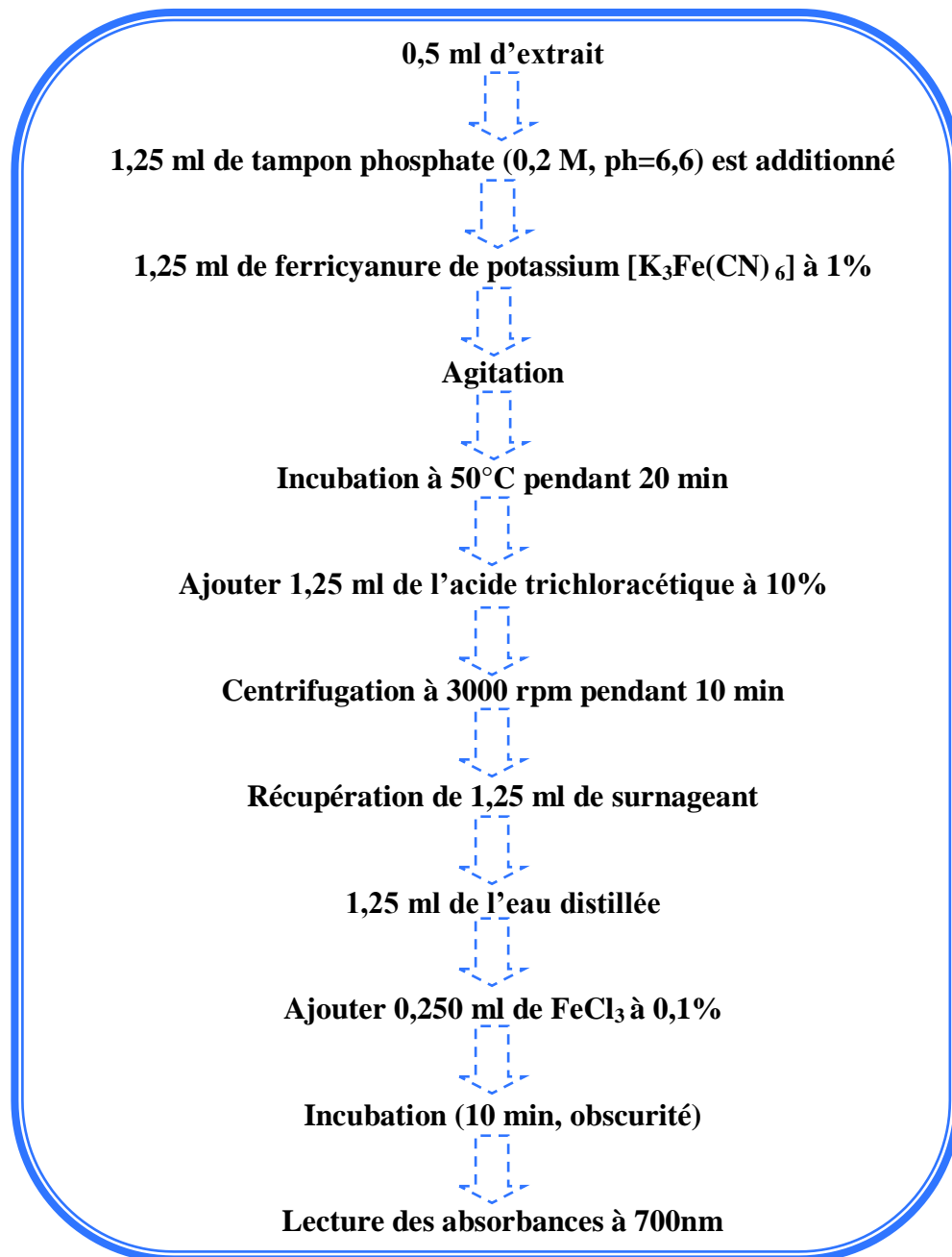
La méthode est basée sur la réaction de réduction du (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en (Fe<sup>2+</sup>), la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

*Mode opératoire*

Le protocole expérimental utilisé est celui **d'Oyaizu (1986)**. 0.5 ml de l'échantillon à différentes concentrations (25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 et 200 µg/ml), sont mélangé avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 minutes. 1,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 1.25 ml du surnageant sont ajoutés à 1.25 ml d'eau distillée et 250 µl d'une solution de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O) à 0.1%. La lecture des absorbances se fait contre un blanc (absence de l'extrait) à 700 nm. **(Figure 18)**

Les résultats exprimés par l'IC<sub>50</sub> seront interprétés par comparaison à l'activité antioxydante du BHA comme standard réalisé dans les mêmes conditions.





**Figure 18** : le protocole de test du pouvoir réducteur d'Oyaizu(1986) in Amarowicz et *al.*,(2004)

#### IV. 4. Pouvoir réducteur : Test au phosphomolybdate d'ammonium

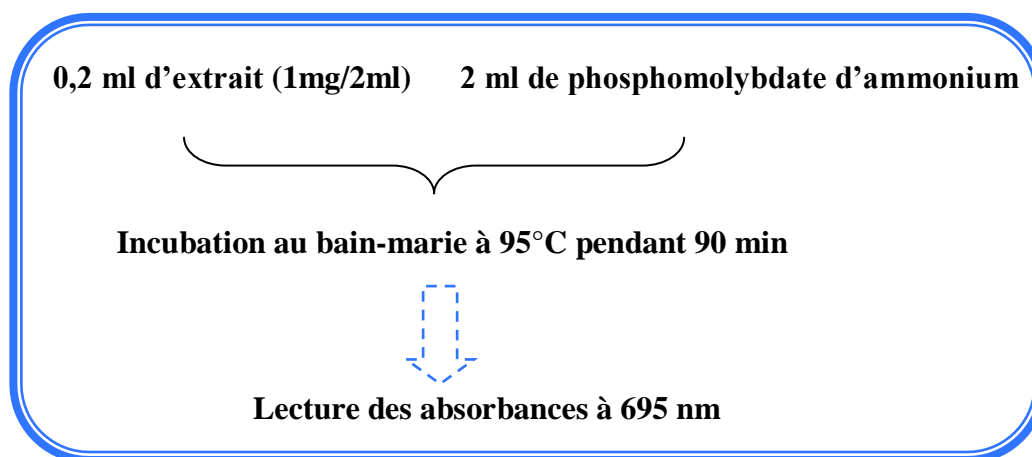
##### *Principe*

Le test phosphomolybdate (PPM) est basé sur la réduction, en milieu acide, de l'ion  $M^{0+6}$  en ion  $M^{0+5}$  par des substances réductrices présentes dans l'extrait végétal qui forment avec le phosphate- $M^{0+5}$  des complexes de couleur verdâtre. (Prieto et al., 1999)

##### *Mode opératoire*

L'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* à différentes concentrations (50 ; 100 ; 150 ; 200 et 250  $\mu\text{g/ml}$ ) est mélangé à 2 ml de réactif molybdate (préparé à partir de molybdate d'ammonium à 4 mM, du phosphate de sodium à 28 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 mM). Les solutions ont été ensuite incubées à 95°C pendant 90 minutes. L'absorbance a été mesurée à 695 nm. (Figure 19)

Les résultats exprimés par l'IC50 seront interprétés par comparaison à l'activité antioxydante des standards tels que l'acide gallique et la quercétine réalisée dans les mêmes conditions.



**Figure 19** : protocole de test du phosphomolybdate d'ammonium (Prieto et al., 1999)

## V. Effet sur l'activité de la peroxydase

### V.1. Généralité sur la peroxydase végétale

Les peroxydases des plantes (E.C. 1.11.1.7), appelées aussi peroxydases de classe III, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats, dont les phénols, en présence du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). (**Baaziz et al., 2006**).

Les POD sont généralement connues comme peroxydase de gaïacol, parce que le gaïacol est un donneur d'électrons fréquemment utilisé pour estimer leurs activités (**Talano et al., 2006**). Elles possèdent une large variété de substrat et peuvent oxyder un grand nombre de composés aromatique en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tel que les composés phénoliques (**Marciel et al., 2007**)

### V.2. Rôles physiologiques des peroxydases

Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels les précurseurs de la lignine ou des phénols (flavonoïdes ou autres).

Ils jouent des rôles critiques dans la fonction physiologique telle que lignification, métabolisme du mur cellulaire, et participent dans le catabolisme de l'auxine, qui joue un rôle clé dans le contrôle de l'ensemble des processus de croissance et de développement de la plante. Les Produits de ces enzymes sont aussi utilisés communément dans industrie pharmaceutique, traitement de l'eau du gaspillage, et industrie de la nourriture.

D'autre part, les peroxydases sont considérées comme un facteur responsable dans la détérioration quand les légumes ou fruits sont traités tel que râper ou couper. En modifiant ses caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles telles que la couleur, le goût et l'arôme, en causant la dégradation des aliments. (**Bakalovic et al., 2012**)

Il s'agit d'une réaction où le peroxyde d'hydrogène sera réduit et le substrat sera oxydé en présence de POD selon l'équation suivante :



Ces réactions d'oxydation observée dans les produits alimentaires nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles. Par exemple, l'oxydation enzymatique des phénols autrement appelée brunissement enzymatique (**Dogans et al, 2007**).

### V.3. Mesure de l'activité anti peroxydase

#### Préparation de l'extrait enzymatique :

La peroxydase a été extraite à partir de chou vert selon le protocole décrit par **Ponce et ses collaborateurs (2004)**. Après nettoyage des têtes de chou, 10g de chou hachés ont été homogénéisés avec 30ml d'eau à l'aide d'un mélangeur électrique à haute vitesse pendant 3 minutes à 4°C. La suspension obtenue a été filtrée sur papier de wattman et centrifugée à 1000g pendant 15 minutes. Le surnageant récupéré est aliquoté et conservé jusqu'à utilisation à - 20°C.

#### Préparation de la solution substrat

L'activité enzymatique de la peroxydase est mesurée en utilisant le gaïacol comme le substrat, et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) comme donneur d'hydrogène. L'oxydation du gaïacol en présence de l'enzyme donnant une couleur brun-rose

La solution de substrat est formée de 1ml de gaïacol (1%), 1ml peroxyde d'hydrogène (0,3%) et 10ml de tampon phosphate (0,05M, pH=6,5).

#### Mesure de l'activité peroxydasique

L'activité de la peroxydase a été mesurée en présence et en absence de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* comme suit : 2,87ml de la solution de substrat sont mélangés à 0,03ml de méthanol ou d'extrait méthanolique de feuilles de citrus. L'activité enzymatique est initiée par l'ajout de 0,1ml de l'extrait enzymatique. L'oxydation du gaïacol est ensuite suivie en fonction du temps par mesure de la variation de l'absorbance à 470 nm pendant 5 min à température ambiante.

Le pourcentage de l'activité peroxydase résiduelle est calculé selon la loi suivante :

$$\% \text{ d'Activité} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min en absence de l'EMC} - \Delta\text{DO}/\text{min en présence EMC}}{\Delta\text{DO}/\text{min en absence de l'EMC}} \times 100$$

**EMC**= Extrait méthanolique du Citrus

## ***Résultats et Discussions***

### I. Le taux d'extraction

Le taux d'extraction par macération au méthanol à partir des feuilles de *citrus grandis* a été calculé par rapport au poids initial de la poudre végétale (20g). Le poids de l'extrait sec obtenu est de 1,27 g ce qui correspond à un rendement de 6,35%.

Nous avons choisi le méthanol pur comme solvant d'extraction, car plusieurs études ont montré sa capacité à extraire le maximum de composés phénoliques (**Falleh et al., 2008**) en plus d'autres facteurs tel que le diamètre des particules de l'échantillon, la durée et les conditions de stockage. (**Nacz et Shahidi, 2004**).

### II. Dosage des composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été déterminées en se référant aux courbes d'étalonnage réalisées soit avec l'acide gallique (**Annexe I**) et la quercétine (**Annexe II**) respectivement. Les résultats montrent que l'extrait des feuilles du *citrus grandis*, contient  $54,27 \pm 1,5$  mg EAG/ g MS en polyphénol et  $8,57 \pm 0,33$  mg EQ/g MS en flavonoïdes.

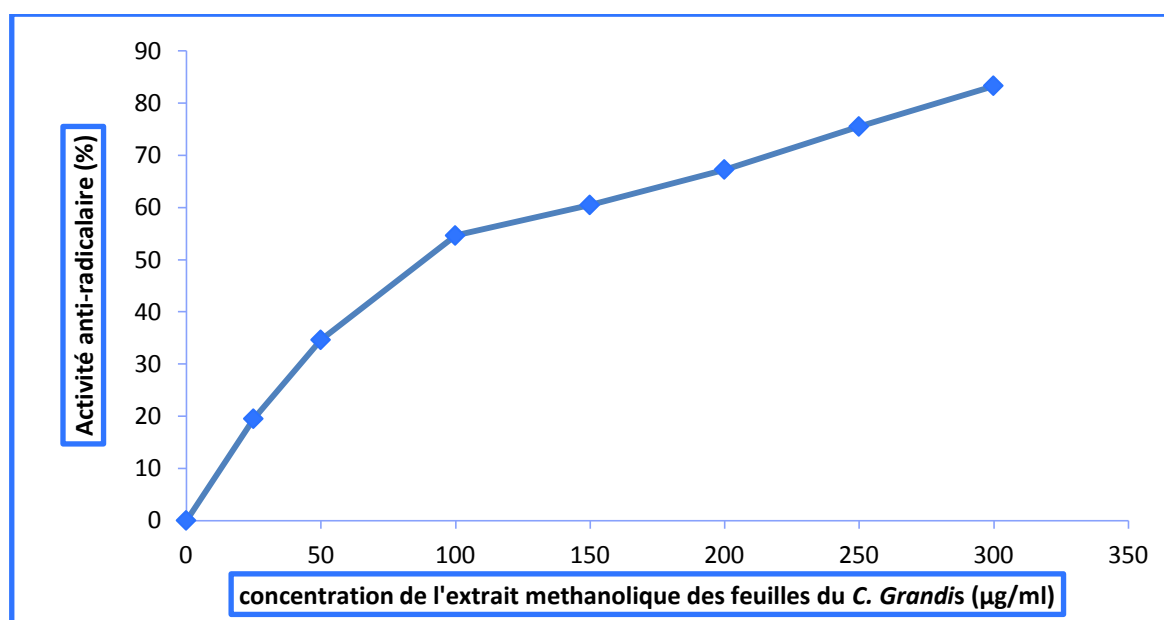
En comparant aux résultats obtenus par Okwu et ses collaborateurs (2007), dont les polyphénols et flavonoïdes des extraits au diethyl éther des feuilles de *citrus grandis* du Nigeria, sont respectivement de 0,1 % et 0,89 %, on en déduit que le *citrus grandis* d'Algérie est plus riche en polyphénols totaux et proches en flavonoïdes. En effet, les taux en polyphénol totaux et en flavonoïdes sont de  $5,427\% \pm 0,15$  et  $0,857\% \pm 0,03$  respectivement. Cette différence peut être due à la méthode d'extraction, la nature du solvant utilisé et ainsi qu'à l'origine géographique (climat, sol ...).

### III. L'activité antioxydante

#### III.1. l'activité scavenging du radical DPPH

La méthode du DPPH est utilisée généralement pour évaluer le pouvoir anti-radicalaire des extraits de plantes, elle est décrite comme étant simple et rapide (**Jayaprakasha et Pati, 2007**).

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* exprimées par le test du DPPH montre que cet extrait présente une activité Scavenging du DPPH dépendante de la concentration (**figure 20**). Pour une concentration de  $300\mu\text{g/ml}$ , le taux d'inhibition est supérieur à 80%.



**Figure 20 :** activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des feuilles du *citrus grandis*.

Dans ce travail, nous avons comparé l'effet anti-radicalaire du DPPH, exprimé en concentration inhibitrice à 50% ( $IC_{50}$ ), de l'extrait du *citrus grandis* à celui de deux polyphénols purs, l'acide gallique et la quercétine (**Annexe III**). Les résultats obtenus [**Tableau VIII**] montrent que l'acide gallique, un polyphénol simple et la quercétine, un flavonoïde, présentent une meilleure efficacité anti-radicalaire que l'extrait du citrus.

**Tableau VIII :** Résultats des  $IC_{50}$  pour le test DPPH

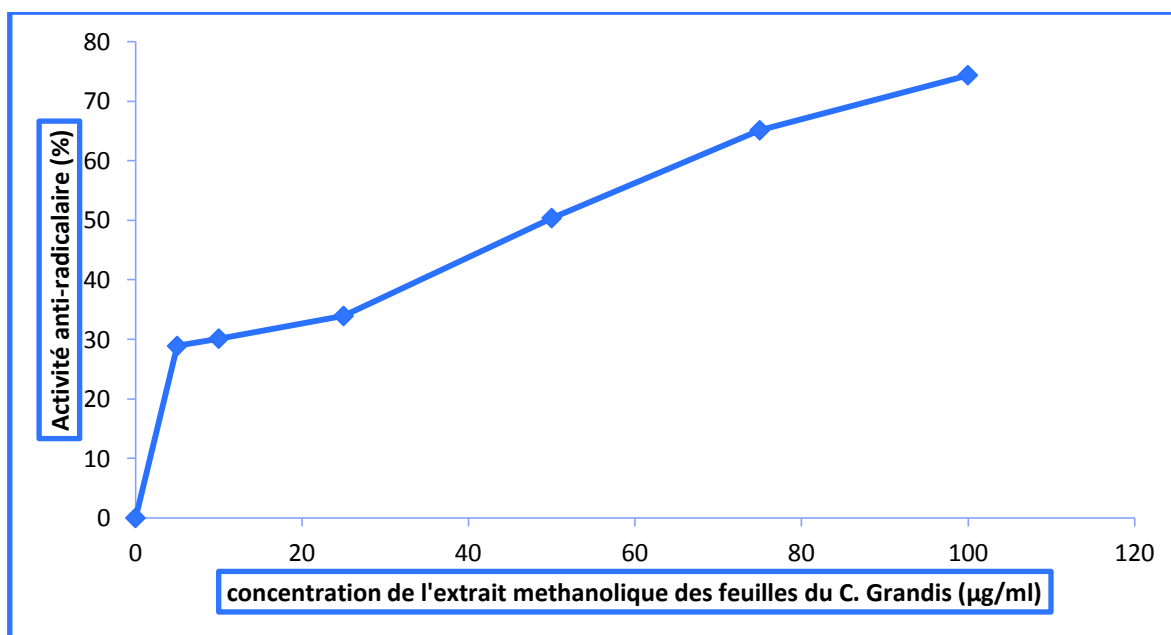
	$IC_{50}$
<b>Extrait</b>	94,22 µg/ml
<b>Acide gallique</b>	1,85 µg/ml
<b>Quercétine</b>	2,03 µg/ml

En comparant nos résultats à ceux trouvés dans la littérature pour les extraits méthanoliques de feuilles d'autres espèces de Citrus tel que *Citrus aurantium* et *Citrus limetta* (**Muthiah et al., 2012**) et *citrus medica* (**Menichini et al., 2011**) on a trouvé que le citrus grandis a une meilleure efficacité anti-radicalaire pour le DPPH. En effet, les  $IC_{50}$  des feuilles de *Citrus*

*aurantium* et *Citrus limetta* et *citrus medica* sont 142,25 $\mu$ g/ml, 148,16 $\mu$ g/ml et 502 $\mu$ g/ml respectivement.

### III.2. l'activité scavenging du radicale ABTS

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des feuilles du *citrus grandis* déterminées par le test ABTS montre que l'extrait citrus possède l'effet scavenging du radical ABTS. L'efficacité de l'activité anti-radicalaire dépend de la concentration de l'extrait (**figure 21**). Pour 300 $\mu$ g/ml de l'extrait, le taux d'activité anti-radicalaire atteint 83%. La concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) de cet extrait exprimée par TEAC (Trolox Équivalent Antioxydant Capacity) est de 48,12  $\mu$ g/ml, elle correspond à une concentration de l'extrait méthanolique de 49,14  $\mu$ g/ml, le résultat est calculé à partir d'une courbe de trolox (**Annexe IV**)

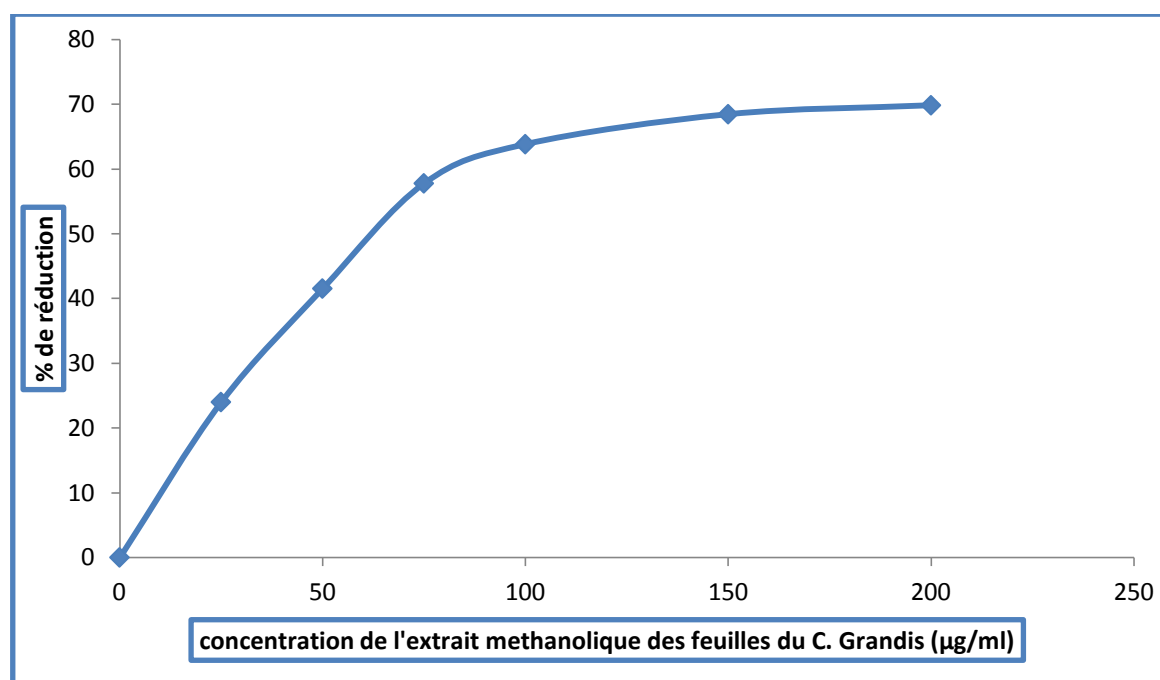


**Figure 21** : Activité scavenging du radical ABTS des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des feuilles du *citrus grandis*.

### III.3. Test du pouvoir réducteur de fer ferrique en fer ferreux

La réduction du fer ferrique en fer ferreux par l'extrait méthanolique du *citrus grandis* montre que cet extrait présente une activité réductrice proportionnelle à la concentration (**figure 22**). Pour une concentration de 200  $\mu$ g/ml, le taux de réduction est de 69,84%.





**Figure 22** : Représentation graphique du pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux de l'extrait méthanolique du *citrus grandis*.

Dans cette étude nous avons comparé le pourcentage de réduction, exprimé en concentration inhibitrice à 50% ( $IC_{50}$ ), de l'extrait méthanolique des feuilles du *citrus grandis* à celui de la BHA (**Annexe V**). Les résultats obtenus [**Tableau IX**] montrent que la BHA présente une meilleure efficacité anti-radicalaire que l'extrait du *citrus grandis*

**Tableau IX** : Résultats des  $IC_{50}$  pour le test du pouvoir réducteur du fer ferrique

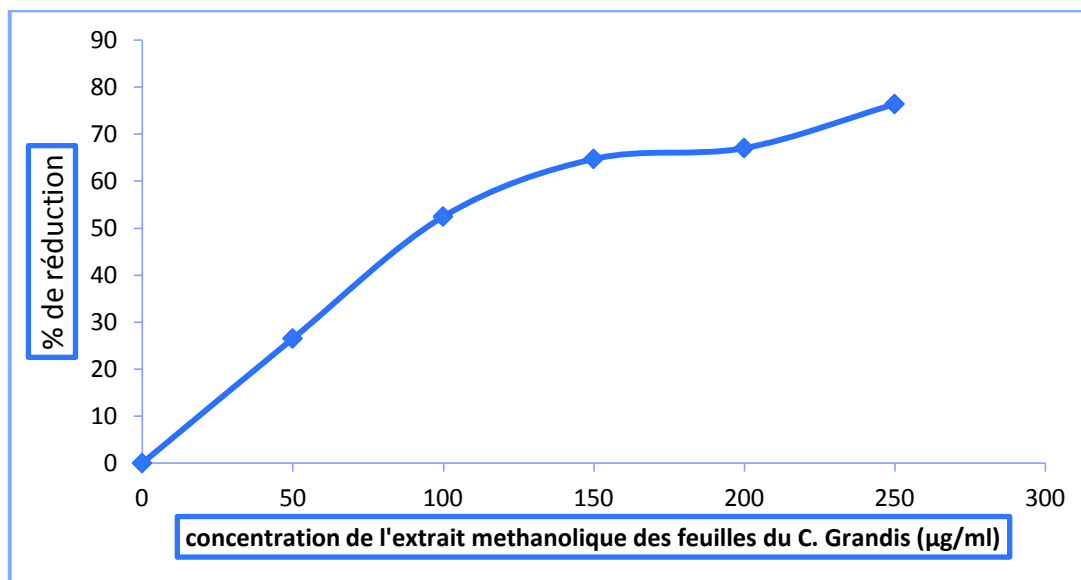
	$IC_{50}$
<b>Extrait</b>	64,75 µg/ml
<b>BHA</b>	20,9 µg/ml

En comparant nos résultats à ceux trouvés dans la littérature pour les extraits méthanoliques de feuilles d'autres espèces de Citrus tel que *Citrus aurantium*, *Citrus limetta* et *citrus limon* (**Muthiah et al., 2012**) on a trouvé que le *citrus grandis* a une meilleure efficacité réductrice. En effet, les  $IC_{50}$  des feuilles de *Citrus aurantium* et *Citrus limetta* et *citrus limon* sont 362µg/ml, 286,16µg/ml et 707, 16µg/ml respectivement.

### III.4. Pouvoir réducteur de phosphomolybdate d'ammonium

La méthode du phosphomolybdate d'ammonium est basée sur la réduction du molybdate  $MO^{+6}$  en  $MO^{+5}$  par les antioxydants de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis*.

Les résultats du test (**Figure 23**) montrent qu'il existe une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du molybdate et la concentration de l'extrait. Pour une concentration de 250 $\mu$ g/ml, le taux de réduction est de 76,38%.



**Figure 23** : Représentation graphique du pouvoir réducteur phosphomolybdate d'ammonium d'extrait méthanolique du *citrus grandis*

Dans ce travail, nous avons comparé le pourcentage de réduction, exprimé en concentration inhibitrice à 50% ( $IC_{50}$ ), de l'extrait méthanolique des feuilles du *citrus grandis* à celui de l'acide gallique et de la quercétine (**Annexe VI**). Les résultats obtenus [**Tableau X**] montrent que l'acide gallique et la quercétine présentent une meilleure efficacité anti-radicalaire que l'extrait des feuilles de *citrus grandis*.

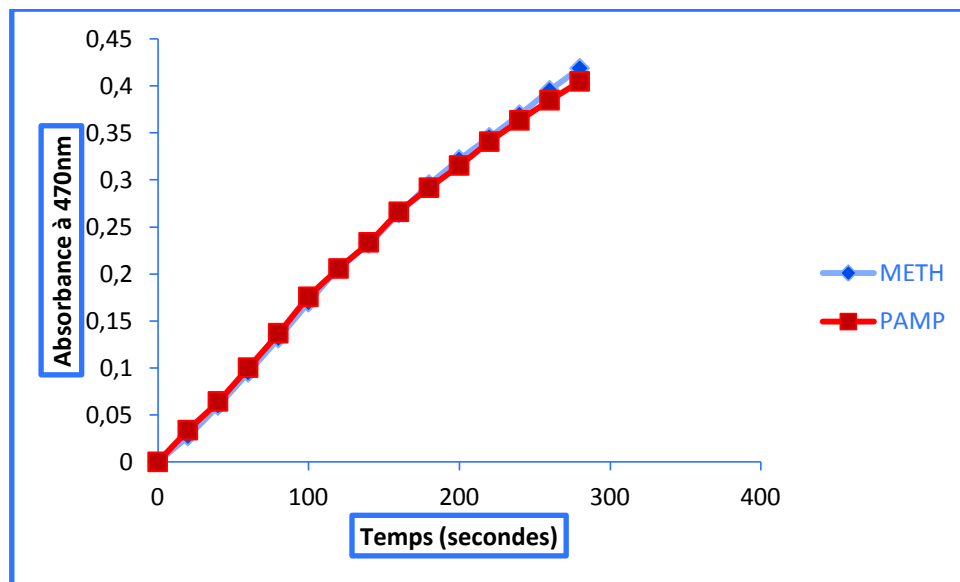
**Tableau X** : Résultats des IC<sub>50</sub> pour le test du pouvoir réducteur phosphomolybdate d'ammonium

	<b>IC<sub>50</sub></b>
<b>Extrait</b>	43,17 µg/ml
<b>Acide gallique</b>	6,16 µg/ml
<b>Quercétine</b>	10,14 µg/ml

#### IV. Effet sur la peroxydase

Les résultats d'évaluation de l'effet sur la peroxydase (**Figure 24**), montrent que l'extrait méthanolique des feuilles de pamplemoussier à une concentration de 200 µg/ml ne présente aucun effet sur l'activité de la peroxydase de chou.

Des études menées par **Ponce *et al.* (2004)** sur un extrait brut de la peroxydase de chou en présence des huiles essentielles de *Citrus lemon* montrent une activité anti peroxydase très faible avec une concentration minimal inhibitrice (MIC) de 0,05 ml/100ml, alors que en présence des huiles essentiels de *Rosmarinus officinalis* elle est de 0,13ml/100ml qui représente une activité inhibitrice de 59%, elle est de 35% dans le cas de l'acide ascorbique (vitamine C).



**Figure 24** : Cinétique de la peroxydase en absence et en présence de l'extrait méthanolique des feuilles de *Citrus grandis*

## ***Conclusion***

## Conclusion

Les feuilles de *citrus grandis* ont fait l'objet de la présente étude. Différentes analyses sont appliquées : le dosage des différents antioxydants (polyphénols totaux, flavonoïdes) et l'évaluation des effets antioxydants de l'extrait méthanolique par deux moyens ; pouvoir réducteur, test de phosphomolybdate d'ammonium d'une part et l'activité anti-radicalaire à l'égard du DPPH et l'ABTS d'autre part, ainsi que l'effet sur la peroxydase. Cette étude est faite sur les feuilles du pamplemoussier cultivées dans la région de Bejaïa (Akbou), en utilisant le méthanol pur comme solvant d'extraction.

L'analyse quantitative des polyphénols par la méthode spectrophotométrique a montré que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont de  $54,27 \pm 1,5$  mg EAG/ g MS et de  $8,57 \pm 0,33$  mg EQ/g MS en flavonoïdes.

À travers tous les testes, nous avons constaté que les feuilles de pamplemoussier présentent une bonne activité antioxydante, à titre d'exemple, leur capacité à réduire le molybdate est de 76,33% à une concentration de 250µg et qu'elles ne présentent aucun effet sur la peroxydase.

À l'avenir, il intéressant de procéder à une séparation par des méthodes plus avancées telles que l'HPLC et la RMN, afin d'identifiés les composés responsables de cette activité antioxydante. Tester individuellement in vivo les composés identifiés.

## ***Références bibliographiques***

### A

- Amarowicz, R., R. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl & J. Weil (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Andersen, O. M. & K. R. Markham. 2010. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis.
- Aswini, K., K. Mangesh, V. Kailash, C. Pratibha & G. Mahavir (2012) Pharmacognostic investigation on leaves of citrus maxima (burm.) merr. (rutaceae) *CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences*.

### B

- Ba, K., E. Tine, J. Destain, N. Cissé & P. Thonart (2010) Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement [= BASE]*, 14.
- Baaziz, A. (2006) *Apport du Knowledge Management dans l'amélioration de la prise de décision dans une Organisation*, 5ème Inforum. Oran, Avril.
- Bakalovic, N., F. Passardi, V. Ioannidis, C. Cosio, C. Penel, L. Falquet & C. Dunand (2006) PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. *Phytochemistry*, 67, 534-539.
- Bennick, A. (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 184-196.
- Berger, M. M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20, 48-53.
- Beutner, S., B. Bloedorn, S. Frixel, I. Hernández Blanco, T. Hoffmann, H. D. Martin, B. Mayer, P. Noack, C. Ruck & M. Schmidt (2001) Quantitative assessment of



antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 559-568.

Brand-Williams, W., M. Cuvelier & C. Berset (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.

### C

Chauvet, M. (1980) Pamplemousse ou pomelo: Un cas exemplaire de conflit entre usage et norme. *J. Agric. Trad. Bot. Appl*, 27, 55-81.

Choi, M. H., G. H. Kim & H. S. Lee (2002) Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Research International*, 35, 753-759.

### D

Derbel, S. & K. Ghedira (2005) Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 3, 28-34.

Dionne, S. D., F. J. Yammarino, L. E. Atwater & L. R. James (2002) Neutralizing substitutes for leadership theory: Leadership effects and common-source bias. *Journal of Applied Psychology*, 87, 454.

Doğan, S., P. Turan, M. Doğan, O. Arslan & M. Alkan (2007) Variations of peroxidase activity among *Salvia* species. *Journal of Food Engineering*, 79, 375-382.

Dugo, G. & A. Di Giacomo. 2004. *Citrus: The Genus Citrus*. Taylor & Francis.

Dutta, D., U. R. Chaudhuri & R. Chakraborty (2004) Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 4.

### F

Falleh, H., R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba & C. Abdelly

(2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

Favier, A. (2003) Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.

Fred Gmitter, G., Jr., C. Chen, M. Nageswara Rao & J. Soneji. 2007. Citrus Fruits. In *Fruits and Nuts*, ed. C. Kole, 265-279. Springer Berlin Heidelberg.

### G

Ghedira, K. (2005) Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3, 162-169.

Gorinstein, S., M. Cvikrova, I. Machackova, R. Haruenkit, Y.-S. Park, S.-T. Jung, K. Yamamoto, A. Leticia Martinez Ayala, E. Katrich & S. Trakhtenberg (2004) Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits. *Food Chemistry*, 84, 503-510.

### H

Haineault, S. 2011. *Vertus thérapeutiques des agrumes: Citron, lime, pamplemousse, orange*. Editions Quebecor.

Haleng, J. (2007) Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62.

Harnly, J. M., S. Bhagwat & L.-Z. Lin (2007) Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389, 47-61.

Hayder, N., R. Ben Ammar, A. Abdelwahed, S. Kilani, A. Mahmoud, J. Ben Chibani, A.-M. Mariotte, K. Ghedira, M.-G. Dijoux-Franca & L. Chekir-Ghedira (2005) Antibacterial and antimutagenic activity of extracts and essential oil from (Tunisian) *Pistacia lentiscus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 87, 567-573.

### J

Jayaprakasha, G. K. & B. S. Patil (2007) In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, 101, 410-418.

### *K*

Khan, M. K., M. Abert-Vian, A.-S. Fabiano-Tixier, O. Dangles & F. Chemat (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119, 851-858.

Klimczak, I., M. Małecka, M. Szlachta & A. Gliszczyńska-Świgło (2007) Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.

Kotani, M., M. Matsumoto, A. Fujita, S. Higa, W. Wang, M. Suemura, T. Kishimoto & T. Tanaka (2000) Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 159-166.

### *L*

Ladaniya, M. & M. Ladaniya. 2010. *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*. Academic press.

Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls & J. D. Radolf (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 33419-33425.

### *M*

Maciel, H. P. F., C. M. C. P. Gouvêa, M. Toyama, M. Smolka, S. Marangoni & G. M. Pastore (2007) Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Química Nova*, 30, 1067-1071.

Maisuthisakul, P., R. Pongsawatmanit & M. H. Gordon (2007) Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry*, 100, 1620-1629.

Menichini, F., M. R. Loizzo, M. Bonesi, F. Conforti, D. De Luca, G. A. Statti, B. de Cindio, F. Menichini & R. Tundis (2011) Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1549-1555.

Milane, H. A., G. Ubeaud, T. F. Vandamme & L. Jung (2004) Isolation of quercetin's salts and studies of their physicochemical properties and antioxidant relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 3627-3635.

Muthiah, P. (2012) In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, 2, pp. 13-20.

### N

Naczki, M. & F. Shahidi (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

Nadal, B., S. A.-L. Thetiot-Laurent, S. Pin, J.-P. Renault, D. Cressier, G. Rima, A. Le Roux, S. Meunier, A. Wagner & C. Lion (2010) Synthesis and antioxidant properties of pulvinic acids analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18, 7931-7939.

Nicolosi, E., Z. N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella & E. Tribulato (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1155-1166.

Nogata, Y., K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. YANO & H. Ohta (2006) Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70, 178-192.

### O

Okwu, D., A. Awurum & J. Okoronkwo. 2007. Phytochemical composition and in vitro antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of Okra Plant (*Hibiscus esculentus*). In Proceeding of International Conference on African Crop Science, 1755-1758.

Oyaizu, M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J nutr*, 44, 307-315.

### *P*

Paudyal, K. & N. Haq (2000) In vitro propagation of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck). In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36, 511-516.

Peterson, J. J., J. T. Dwyer, G. R. Beecher, S. A. Bhagwat, S. E. Gebhardt, D. B. Haytowitz & J. M. Holden (2006) Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66-S73.

Pichaiyongvongdee, S. & R. Haruenkit (2009) Effect of Ethylene Treatments on Limonin Reduction in Thai Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Fruit.

Pincemail, J., M. Meurisse, R. Limet & J. Defraigne (1998) Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *MédiSphères*, 73, 29-33.

Pincemail, J., M. Meurisse, R. Limet & J. Defraigne (1999) Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Medi-Sphere*, 97, 29-33.

Ponce, A. G., C. E. del Valle & S. I. Roura (2004) Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 37, 199-204.

Prieto, P., M. Pineda & M. Aguilar (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.

### *Q*

Quettier-Deleu, C., B. Gressier, J. Vasseur, T. Dine, C. Brunet, M. Luyckx, M. Cazin, J.-C. Cazin, F. Bailleul & F. Trotin (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.

### R

Rapisarda, P., M. L. Bianco, P. Pannuzzo & N. Timpanaro (2008) Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 348-354.

Rathee, J. S., S. A. Hassarajani & S. Chattopadhyay (2006) Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts. *Food Chemistry*, 99, 436-443.

Rice-Evans, C., N. Miller & G. Paganga (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.

Robards, K., P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang & W. Glover (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.

Rose, R. & A. Bode (1993) Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *The FASEB journal*, 7, 1135-1142.

Ryan, L. (2013) Polyphenol Bioaccessibility and Sugar Reducing Capacity of Black, Green, and White Teas. *International Journal of Food Science*, 2013.

### S

Sanchez de Medina, F., B. Vera, J. Galvez & A. Zarzuelo (2002) Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life sciences*, 70, 3097-3108.

Singleton, V. & J. A. Rossi (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

### T

- Talano, M. A., E. Agostini, M. I. Medina, H. Reinoso, M. del Carmen Tordable, H. A. Tigier & S. M. de Forchetti (2006) Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: The relationship with the release of a basic peroxidase. *Journal of Plant Physiology*, 163, 740-749.
- Tessier, F. & P. Marconnet (1995) Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*, 10, 1-13.

### V

- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur & J. Telser (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Van Antwerpen, P. & J. Nève (2006) Antioxydant Properties of Several Therapeutical Molecules: Focus on the Myeloperoxidase/Hydrogen Peroxide/Chloride System/Contribution à l'Etude du Pouvoir Antioxydant de Divers Agents d'Intérêt Thérapeutique: Ciblage du Système Myéloperoxydase/Peroxyde d'hydrogène/Chlorure.
- van den Berg, R., G. R. Haenen, H. van den Berg & A. Bast (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, 511-517.
- van der Watt, E. & J. C. Pretorius (2001) Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 87-91.
- Vanamala, J., L. Reddivari, K. S. Yoo, L. M. Pike & B. S. Patil (2006) Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 157-166.
- Vercauteren, J., C. Chèze, J. Triaud & J. Triaud. 1998. Polyphenols 96: 18th International

Conference on Polyphenols, Bordeaux (France), July 15-18, 1996. Institut national de la recherche agronomique.

### W

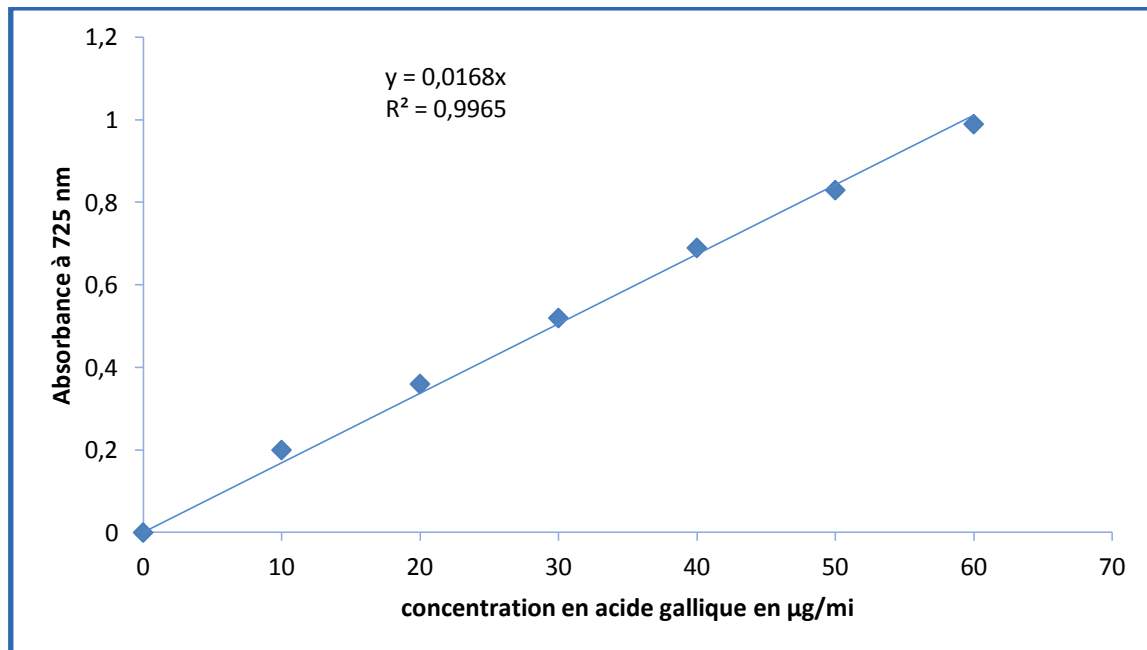
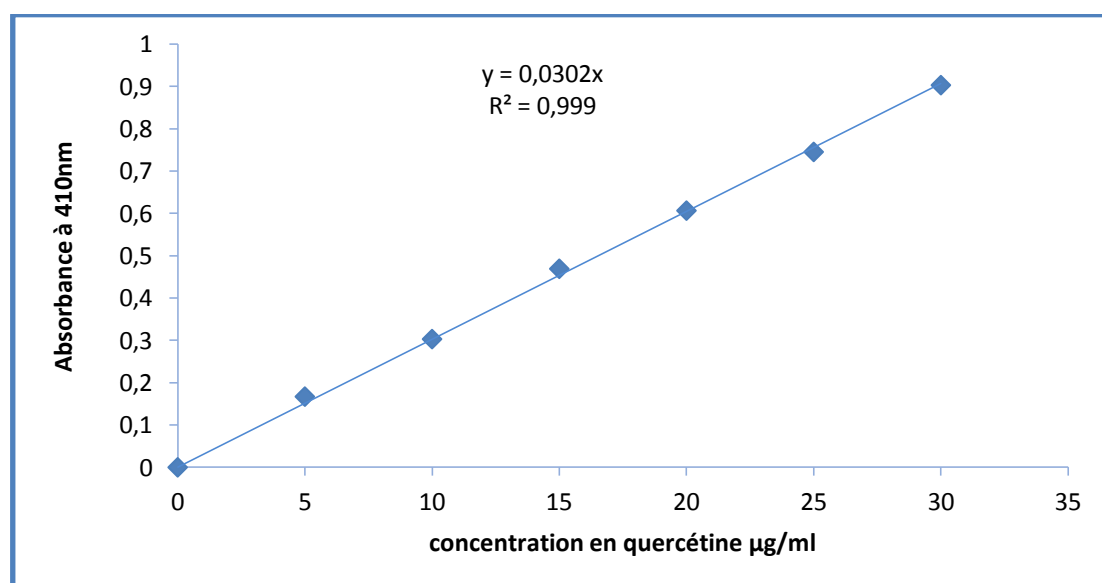
Wu, T.-S., S.-C. Huang & P.-L. Wu (1996) Buntanbismine, a bisacridone alkaloid from *Citrus grandis* f. *buntan*. *Phytochemistry*, 42, 221-223.

### Z

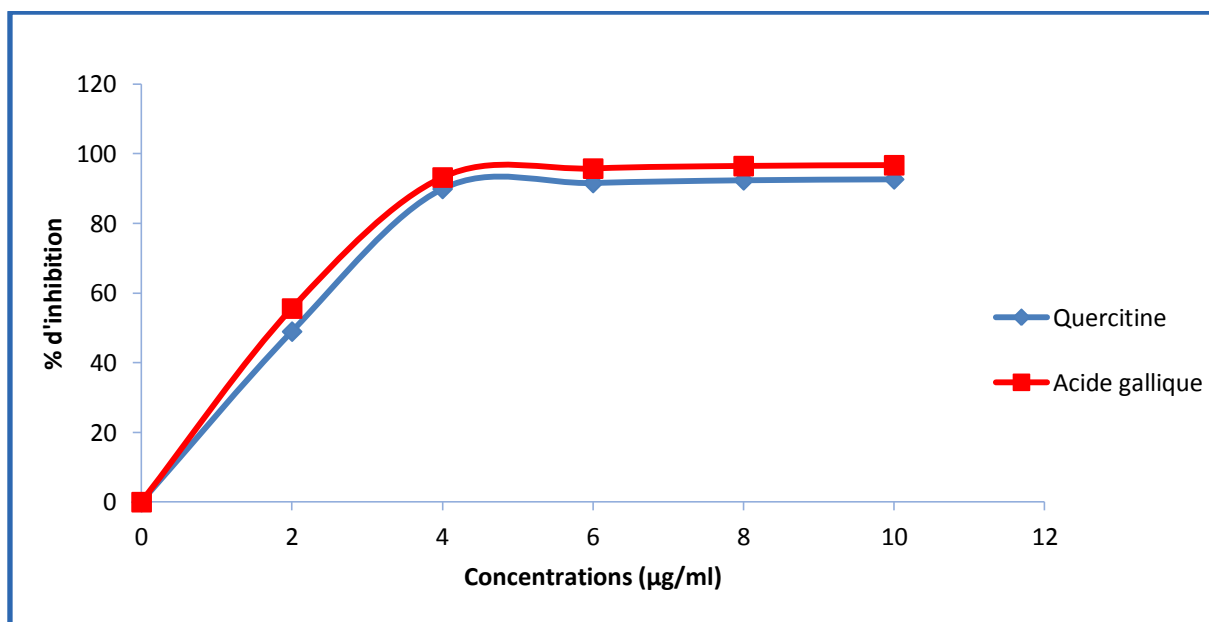
Zhang, X.-Q., T.-T. Hu, L. Wang, G.-C. Wang, C.-L. Fan, Y. Zhang, Q.-W. Zhang & W.-C. Ye (2012) A new coumarin from *Citrus grandis* 'Shatianyu'. *Biochemical Systematics and Ecology*, 42, 124-127.



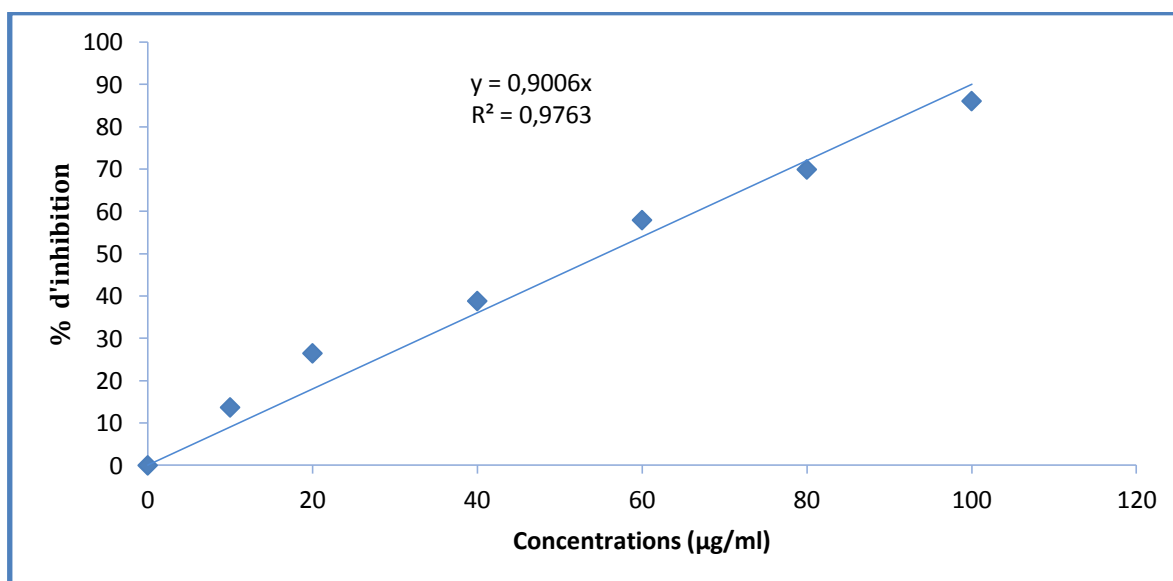
# *Annexes*

**Annexe I** : courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux**Annexe II** : courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

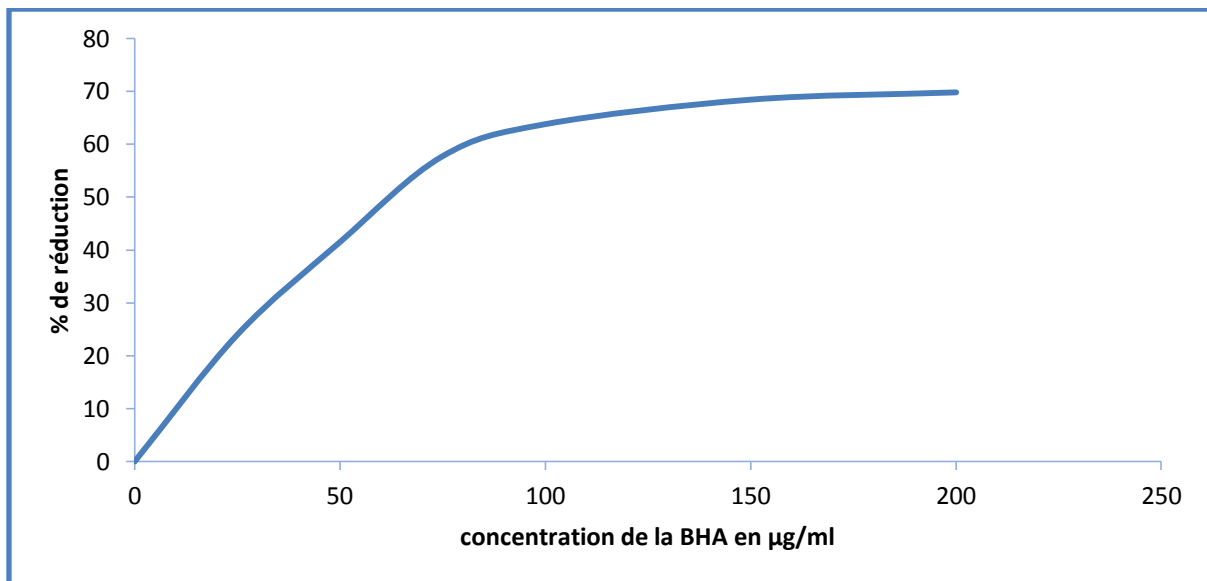
**Annexe III** : activité scavenging du radical DPPH à différentes concentrations des standards (quercétine et l'acide gallique)



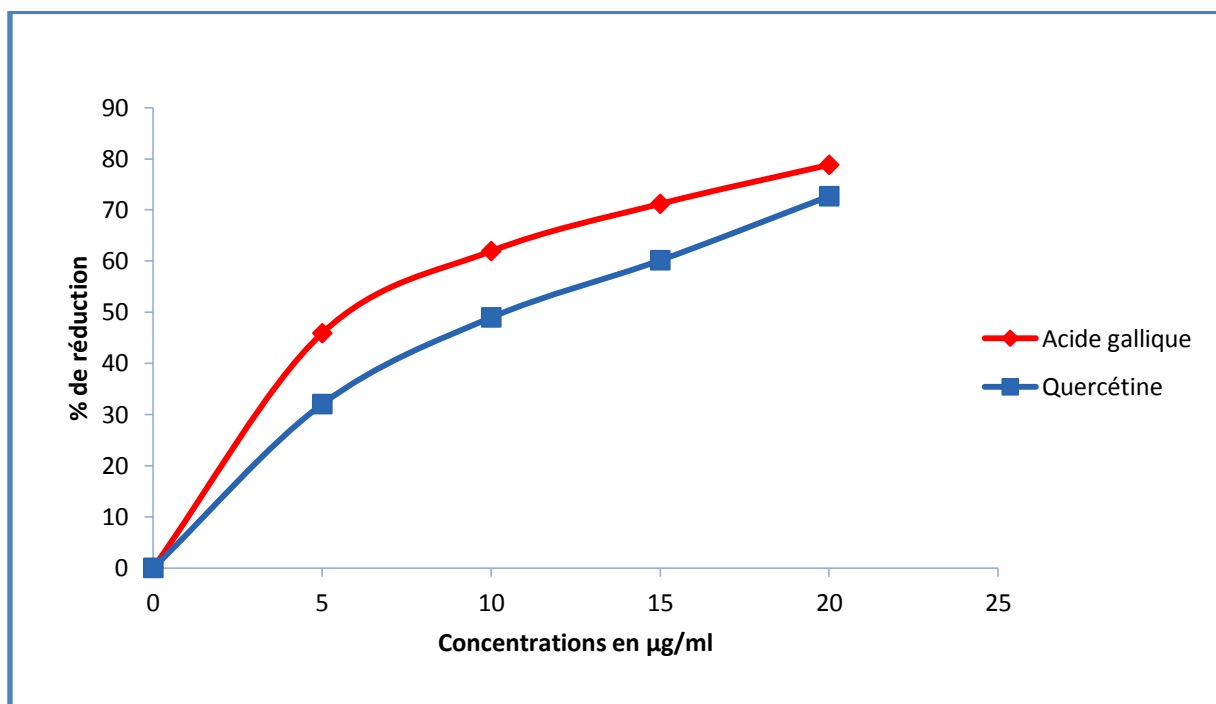
**Annexe IV** : Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentrations du standard (trolox)



**Annexe V** : présentation graphique du pouvoir réducteur au fer ferrique de la BHA prit comme standard



**Annexe VI** : présentation graphique du pouvoir réducteur au phosphomolybdate d'ammonium des deux standards (acide gallique, et la quercétine)



## Résumé

L'activité anti-radicalaire et réductrice de l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* est estimée par le test du DPPH, ABTS, et le pouvoir réducteur, le test de phosphomolybdate d'ammonium respectivement. Il a été trouvé que l'extrait méthanolique des feuilles de *C. grandis* présente un effet scavenger sur l'ABTS et DPPH, avec des IC<sub>50</sub> de 48,12 µg/ml et de 94,22 µg/ml respectivement. Le taux de réduction de fer et de phosphomolybdate d'ammonium est de 69,84% à 200 µg/ml et de 76,38% à 250µg/ml successivement.

L'étude de l'effet sur la POD a démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *citrus grandis* n'a aucun effet.

**Mots clés :** *Citrus grandis*, activité antioxydant, activité anti peroxydase.

## Abstract

The antiradical and reducing activity of the methanolic extract of *C. grandis* leaves, is investigated by using the decolorisation tests of DPPH and ABTS radicals, the reducing power and phosphmolybdate test. It has been found that the methanolic extract of *C. grandis* leaves present a scavenging effect on the ABTS and DPPH with IC<sub>50</sub> values of 48,12µg/ml and 94,22 µg/ml respectively. The rate of iron and molybdum reduction of the methanolic extract ranged from 69, 84% to 200 µg/ml and from 76,38% to 250µg/ml. The extracts did not show an inhibition activity on POD.

**Keywords:** *Citrus grandis*, antioxidant activity, anti-peroxidase activity.