

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

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Agronomiques et des Sciences Biologiques
Département de Biochimie et Microbiologie

Mémoire :

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*

Encadré par :

M^r OUELHADJ. A., MCA à l'UMMTO

Présenté par :

- *M^{lle} Ousmer Lila*
- *M^{lle} TAHRI Safia*

Soutenu le 20/09/20 17 devant le jury :

- Président : *M^r TAZDAIT. D.*, MCB à l'UMMTO
- Examineur : *M^r YEZID. H.*, MCB à l'UMMTO
- Examinatrice : *M^{elle} ASMANI. K.*, MCB à l'UMMTO

Promotion : 2016/2017

Remerciements

Nous remercions le bon dieu pour nous avoir donné courage et volonté pour réaliser ce travail et qui nous a éclairé les chemins avec la lumière de son immense savoir.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à certaines personnes, qui grâce à leur aide et orientations notre travail a vu le jour :

Notre encadreur Mr OUELHADJ A., Maitre de conférences classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, qui nous a fait l'honneur de diriger ce projet de fin d'étude.

M^r TAZDAIT D., Maitre de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté de présider le jury.

M^r YEZID H., Maitre de conférences classe B à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

M^{lle} ASMANI K., Maitre assistant classe B à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions également tout le personnel du laboratoire pour leurs aide et orientations précieuses, et tous ceux qui nous ont aidé et soutenu moralement, en particulier M^{lle} ALIANE L. qui a mis toujours ces cours à notre disposition durant les deus du Master.

Dédicaces

Ce modeste travail est dédié à la mémoire de ma mère qui a toujours cru en ma réussite et qui n'avait cessé de m'encourager et de me soutenir, malgré sa souffrance jusqu'à la fin de ces jours.

Je le dédie aussi à mon père qui n'a jamais cessé de se sacrifier pour nous.

OUSMER L.

Ce modeste travail est dédié à la mémoire de mes grands parents dont les mots ne suffisent pas pour exprimer ma gratitude à leur égard.

Je le dédie également à mes très chers parents pour leur soutien et encouragement.

TAHRI S.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

I. Partie bibliographique

Chapitre I : Les polyphénols

1. Généralités.....	3
2. Structure et la classification des polyphénols.....	3
2.1. Les acides phénoliques	5
2.1.1. Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1)	5
2.1.2. Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3)	6
2.2. Les flavonoïdes.....	7
2.2.1. Structure des flavonoïdes.....	7
2.2.2. Les différentes classes de flavonoïdes.....	8
2.2.3. Les flavonoïdes d'agrumes.....	11
2.3. Les tanins.....	11
2.4. Les lignanes.....	12
3. Biosynthèse des polyphénols.....	13
4. Rôle des polyphénols chez la plante.....	13
5. Les méthodes d'extraction des polyphénols	15
5.1. La méthodes conventionnelle	15
5.2. Les techniques modernes	15
5.3. Les facteurs influençant l'extraction des polyphénols.....	17

Chapitre II : Les propriétés physiologiques des polyphénols

1. Généralité.....	19
2. Activité antioxydante des polyphénols.....	19
2.1. Les espèces réactives d'oxygène (ERO).....	19
2.1.1. Les radicaux libres.....	21
2.1.2. Origines des ERO.....	21
2.2. Le stress oxydatif.....	22
2.3. Effet des radicaux libres sur les molécules biologiques.....	24
2.4. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif.....	25

2.4.1. Les antioxydants.....	25
2.4.1.1. Les antioxydants synthétiques.....	25
2.4.1.2. Les antioxydants naturels.....	25
2.4.1.2.1. Les antioxydantes enzymatiques.....	25
2.4.1.2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	27
2.4.2. Modes d'action des polyphénols dans la défense antioxydative.....	29
2.4.2.1. Le piégeage direct des ERO.....	29
2.4.2.2. La chélation des ions métalliques.....	30
2.4.2.3. L'inhibition de l'activité enzymatique pro-oxydante.....	30
2.5. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	30
3. Activités thérapeutiques des polyphénols.....	30
3.1. Activité anticancéreuse.....	31
3.2. Activité anti-inflammatoire.....	32
3.3. Activité antidiabétique.....	32
4. Activité antimicrobienne et antivirale.....	34
5. Intérêt des polyphénols dans l'industrie agroalimentaire.....	36
6. Industrie pharmaceutique.....	37

Chapitre III : L'orange

1. Généralités.....	38
2. Systématique de l'orange.....	38
3. Anatomie et description des fruits d'agrumes (l'orange).....	39
4. Valeur nutritionnelle et thérapeutique des agrumes.....	40
5. L'espèce <i>Citrus aurantium</i> (orange amère).....	41
6. Utilisation des agrumes.....	42
6.1. Industrie alimentaire et utilisation culinaire domestique.....	42
6.2. Industrie pharmaceutique.....	43
6.3. Industrie cosmétique.....	43
7. Valorisation des sous-produits d'agrumes (orange).....	43

II. Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1. Matériel.....	45
1.1. Matériel biologique.....	45

1.2. Matériel du laboratoire.....	46
1.3. Appareillage	47
1.4. Souches microbiennes utilisées.....	48
1.5. Antibiotiques et antifongique utilisées.....	49
2. Extraction des polyphénols.....	49
2.1. Pré-traitement.....	49
2.2. Préparation des extraits aqueux et organiques par macération.....	50
2.3. Rendement d'extraction.....	52
3. Dosages biochimiques.....	52
3.1. Dosage des polyphénols Totaux.....	52
3.2. Dosage des flavonoïdes.....	53
3.3. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	55
3.3.1. Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP)	55
3.3.2. Test de piégeage du radical (DPPH).....	56
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	58
5. Analyse statistique.....	61

Résultats et discussion

1. Caractéristiques générales de la matière végétale.....	62
2. Rendement d'extraction des polyphénols.....	62
3. Dosages biochimiques.....	64
3.1. Teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i>	64
3.2. Teneur en flavonoïdes totaux.....	68
3.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	70
3.3.1. Pouvoir réducteur.....	70
3.3.1.1. Réduction du fer des extraits aqueux.....	70
3.3.1.2. Réduction du fer des extraits éthanoliques.....	71
3.3.2. Piégeage du radical libre (DPPH).....	72
4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	74
Conclusion	92

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µl : Microlitre

DPP3 : Gène qui code pour l'enzyme Dipeptidyl aminopeptidase 3.

g: Gramme

h: Heure

kcal : Kilo calories

kJ : Kilojoule

mg : Milligramme

mg/ml : Milligramme par millilitre

mol/L : Mole par litre

N: Normalité

nm : Nanomètre

p/v : Poids par volume

pH : Potentiel d'hydrogène

Rdt : Rendement

t : Temps

UV : Ultraviolet

V : Volume

v/v : Volume par volume

Liste des tableaux

Tableau I : Les principales classes des flavonoides.....	9
Tableau II : Les méthodes modernes d'extraction des polyphénols	16
Tableau III : Les espèces réactives majeures d'oxygène	20
Tableau IV : Quelques activités thérapeutiques des polyphénols et modes d'action.....	33
Tableau V : Quelques activités antimicrobiennes des polyphénols.....	36
Tableau VI : Composition nutritionnelle de <i>Citrus sinensis</i>	41
Tableau VII : Date et lieu de collecte des fruits étudiés.....	45
Tableau VIII : Produits utilisés dans l'étude	46
Tableau IX : Milieux de culture employés.....	47
Tableau X : Appareillage utilisé	47
Tableau XI : Les souches microbiennes utilisées	48
Tableau XII : Antibiotiques et antifongique utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne.....	49
Tableau XIII : Caractéristiques générales de <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus aurantium</i> (n = 20).....	62
Tableau XIV : Le rendement en PPT des différents extraits de <i>Citrus sinensis</i> et <i>Citrus aurantium</i> exprimé en % (n = 3)	63
Tableau XV : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> exprimés en mg EAG/g MS (n = 2).....	65
Tableau XVI : Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> (n = 2)	68
Tableau XVII : Pourcentages de réduction du fer par l'acide ascorbique et les différents extraits aqueux de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> (n = 3)	71
Tableau XVIII : Pourcentages de réduction du fer par l'acide ascorbique et les différents extraits éthanoliques de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> (n = 3).....	71
Tableau XIX : Valeurs d'IC50 des extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> et du standard pour le test FRAP.....	72
Tableau XX : Pourcentage de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique et les extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> (n = 2).....	72
Tableau XXI : Valeurs d'IC50 des extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i> et du standard.....	73
Tableau XXII : Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents antibiotiques (n = 2)	75

Tableau XXIII : Les différentes zones d'inhibition des souches microbiennes testées à une concentration de 2000 µg/ml pour les différents extraits (n =2).....	78
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Liste des figures

Figure 1 : Structure du noyau phénolique	3
Figure 2 : Diagramme de classification des polyphénols	4
Figure 3 : Structure de l'acide hydroxybenzoïque et quelques dérivés	6
Figure 4 : Structure de l'acide hydroxycinnamique et quelques dérivés.....	6
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes	8
Figure 6 : Structure de base des tanins condensés	12
Figure 7 : Les voies de formation des ERO	20
Figure 8 : Les étapes de la réduction de l'oxygène moléculaire et les ERO générés	21
Figure 9 : Origines extra- et intracellulaires des radicaux libres oxygénés	22
Figure 10 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants	23
Figure 11 : Conséquences des ROS sur les molécules biologiques	24
Figure 12 : Le mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	26
Figure 13 : Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol	29
Figure 14 : Anatomie du fruit d'orange	40
Figure 15 : Fleurs, feuilles et fruit de <i>Citrus aurantium</i>	42
Figure 16 : <i>Citrus aurantium</i>	45
Figure 17 : <i>Citrus sinensis</i>	45
Figure 18 : Illustration du principe d'extraction solide-liquide	50
Figure 19 : Schéma du protocole de la préparation des extraits phénoliques	51
Figure 20 : L'élimination de l'éthanol des extraits organiques par le rotavapeur	51
Figure 21 : Schéma du protocole du dosage des polyphénols totaux	53
Figure 22 : Schéma du protocole du dosage des flavonoïdes totaux	54
Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyl triazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant AH	55
Figure 24 : Schéma du protocole du test de réduction du Fer (FRAP)	56
Figure 25 : Structure de DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH	57
Figure 26 : Schéma du protocole du test de piégeage du radical DPPH... ..	57

Figure 27 : Représentation graphique du rendement d'extraction des PPT des extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i>	63
Figure 28 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique	65
Figure 29 : Représentation graphique de la teneur en PPT des extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i>	66
Figure 30 : Courbe d'étalonnage à la quercétine.....	68
Figure 31 : Représentation graphique de la teneur en FT des extraits de <i>C.sinensis</i> et <i>C.aurantium</i>	69
Figure 32 : Témoins négatifs réalisés avec le DMSO sur les espèces bactériennes testées.....	76
Figure 33 : L'antibiogramme des différentes souches microbiennes employées	77
Figure 34 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Escherichia coli</i>	79
Figure 35 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	81
Figure 36 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Figure 37 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Staphylococcus aureus</i> MU50.....	83
Figure 38 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	84
Figure 39 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	85
Figure 40 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	86
Figure 41 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452.....	87
Figure 42 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Aspergillus niger</i>	89
Figure 43 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur <i>Candida albicans</i>	90

Abstract

Natural plant extracts (which orange has long been regarded as a food and as a medicinal plant) contain a variety of phenolic compounds to which antioxidant and antimicrobial properties are attributed.

Phenolic extracts obtained by maceration using distilled water as solvent presented extraction yields ranging from 4.75 to 13.87% and polyphenol content from 29.53 and 36.97 mg EAG / g MS better than using ethanol. *Citrus sinensis* peel extracts are richer in PPT while *Citrus aurantium* peel extracts are the richest in flavonoids (320,8mg EQ / g MS for the aqueous extract and 85.72 mg EQ / g MS for the ethanolic extract).

The objective of this study is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of different parts (peel and seed) of the two fruits (*C.sinensis* and *C.aurantium*).

The evaluation of antioxidant power using two methods: reduction of iron and scavenging of the DPPH radical made it possible to classify the extracts as follows in descending order with respect to their antioxidant powers: *C.aurantium* (peel), *C.sinensis* (peel), *C.aurantium* (seed) and finally *C.sinensis* (seed). This may well provide that the peel of both species can potentially be used as a source of easily accessible natural antioxidant.

Screening of the antimicrobial activity was carried out by the Agar diffusion technique at a concentration of 2000 µg / ml. The aqueous extracts were tested for antibacterial activity against various Gram-negative pathogenic species (*E. coli* of clinical origin, *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *K.pneumonia*) and Gram-positive (*S. aureus* of food origin, *S. aureus* MU50, *E. faecalis* ATCC 49452, and *B.cereus* ATCC 14579), and for antifungal activity against *A. niger* and *C.albicans*, whose peel and seed extracts from two orange species were generally effective against the majority of microorganisms with the best activity (17mm inhibition zone) recorded by the aqueous peel extracts against *S. aureus* MU50 (*C. aurantium*) and *E. faecalis* ATCC 49452 (*C.sinensis*). Therefore aqueous seed and peel extracts can be used as effective antimicrobial agents against the above-mentioned microorganisms.

Key words: *Citrus sinensis* (peel and seed), *Citrus aurantium* (peel and seed), aqueous extracts, ethanolic extracts, polyphenol, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Résumé

L'orange est une plante médicinale importante de la famille des *Rutaceae*. Elle est principalement utilisée par les industries de transformation des fruits, ou l'écorce et les pépins sont généralement jetés en grande quantité

Les extraits phénoliques obtenus par macération utilisant l'eau distillée comme solvant ont présenté de bons rendements d'extraction par rapport à l'éthanol. Les extraits d'écorce de *citrus sinensis* sont plus riches en PPT tandis que les extraits d'écorce de *Citrus aurantium* sont les plus riches en flavonoïdes (320,8mg EQ/g MS pour l'extrait aqueux et 85,72 mg EQ/g MS pour l'extrait éthanolique). Les extraits étudiés ont présenté une activité antioxydante appréciable suivant deux méthodes : réduction de fer et piégeage du radical DPPH.

Le dépistage de l'activité antimicrobienne a été effectué par la technique de diffusion sur gélose à une concentration de 2000µg/ml .Les extraits aqueux ont été testés pour une évaluation de l'activité antimicrobienne contre diverses espèces pathogènes Gram négatif (*E.coli* d'origine clinique, *E.coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853 et *K.pneumonia*) et Gram positif (*S.aureus* d'origine alimentaire, *S.aureus* MU50, *E.faecalis* ATCC 49452, et *B.cereus* ATCC 14579) et contre *A.niger* et *C.albicans*. Les extraits d'écorce et de pépins de deux espèces d'orange étaient efficaces dans l'ensemble contre la majorité des microorganismes dont une activité plus intéressante (zone d'inhibition de 17mm) était enregistrée par les extraits aqueux d'écorce des deux espèces contre *S.aureus* MU50 et *E.faecalis* ATCC 49452.

Mots clés : *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, extraction, polyphénols, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Introduction

L'orange est une plante médicinale importante de la famille des *Rutaceae*. Elle est principalement utilisée par les industries de transformation des fruits, où l'écorce et les pépins sont généralement jetés en grande quantité.

Ces déchets sont très périssables et constituent un problème pour ces industries et les organismes de surveillance de la pollution, par exemple au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou, ces déchets sont déversés dans la rivière (Oued Sibaou) où des changements d'écosystème sont constatés.

Les écorces et les pépins d'orange jetés sont riches en nutriments et contiennent de nombreux produits photochimiques, bioactifs tels que les polyphénols qui constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques, associés en structures plus en moins complexes.

Les polyphénols sont le produit de métabolisme secondaire des plantes. Ils sont dotés de multiples propriétés thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique attribué à leur potentiel antioxydant.

L'une des contraintes majeures des industries pharmaceutiques est l'augmentation de la résistance des microorganismes aux médicaments, due à la capacité génétique des bactéries de d'acquérir et de transmettre cette résistance.

Pour surmonter le problème de toxicité des antioxydants synthétiques et de résistance aux médicaments, l'intérêt accordé aux antioxydants et aux substances antimicrobiennes naturelles, a augmenté considérablement au cours de ces dernières années.

En conséquence, des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de nouvelles molécules telles que les polyphénols, à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les sous-produits agroalimentaires, parmi eux l'écorce et les pépins d'orange.

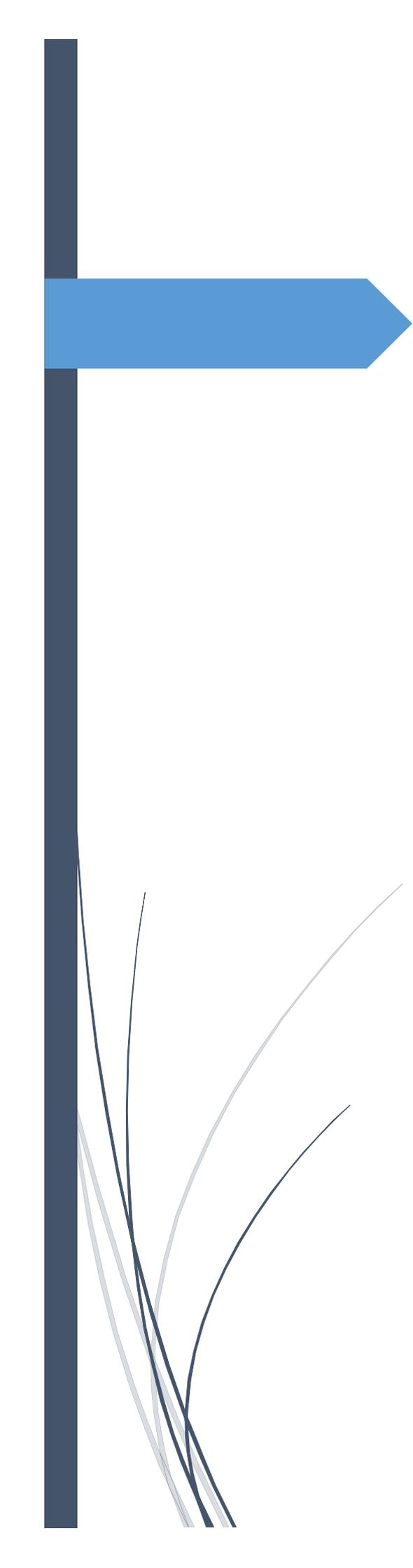
Ces déchets (pépins et écorce) sont-ils réellement une source de substances bioactives telles que les polyphénols qui seraient capables d'exercer une activité antioxydante et antibactérienne efficace ?

Pour répondre à cette problématique, nous avons étudié les extraits aqueux et organiques (éthanolique) d'écorce et des pépins de *Citrus sinensis* cultivé de la région de

Chamlal et fournie par l'unité de fabrication du concentré de jus « Fruit d'Or », et de *Citrus aurantium* de la région Ouacif de la wilaya de Tizi-Ouzou.

Pour la réalisation de cette étude nous avons procéder comme suit :

- Extraction des polyphénols par deux solvants (eau et éthanol) ;
- Dosage des polyphénols et de flavonoïdes totaux et
- Révélation et évaluation des activités antioxydante et antibactérienne.



Partie bibliographique

Chapitre I : Les polyphénols

1. Généralités

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments et font donc une partie intégrante de l'alimentation humaine (ARABBI *et al.*, 2004 ; DAI et MUMPER, 2010). Ils sont abondants dans la majorité des fruits et légumes, olives, céréales, chocolat, et boissons telles que la bière, le vin, le café et le thé (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007 ; MOJZER *et al.*, 2010 ; DAI et MUMPER, 2010 ; KEERTHI *et al.*, 2014).

Ils sont un groupe important et diversifié de métabolites secondaires des plantes. Ils se révèlent posséder une forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques (PAVITHRA *et al.*, 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; MRAIHI *et al.*, 2015 ; HEGDE *et al.*, 2016 ; LI *et al.*, 2016).

Les polyphénols alimentaires les plus courants sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (MOJZER *et al.*, 2010 ; RENARD *et al.*, 2014).

2. Structure et classification des polyphénols

Les polyphénols représentent un grand groupe d'au moins 10 000 composés différents, qui sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupements phénol (cycle aromatique), avec un ou plusieurs groupes hydroxyle qui leur sont attachés, allant de molécules phénoliques simples à fortement polymérisées (BARBONI., 2006 ; AJILA *et al.*, 2010 ; DAI et MUMPER, 2010 ; POLINATI *et al.*, 2010 ; SUN *et al.*, 2011 ; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013 ; KEERTHI *et al.*, 2014). La structure du noyau phénolique est représentée dans la figure suivante.

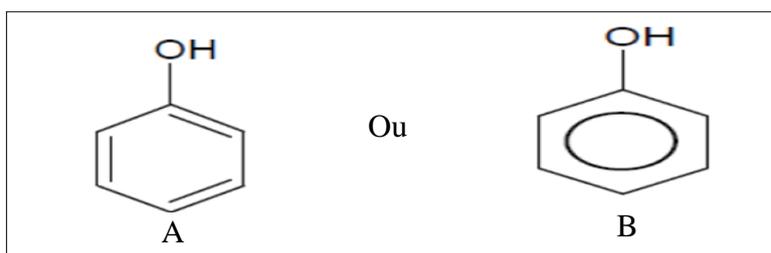


Figure 1: Structure du noyau phénolique (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Les polyphénols sont classés sur la base du nombre de noyaux phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structuraux qui lient ces noyaux l'un à l'autre (KUMAR *et al.*, 2015). Cette classification est représentée dans la figure 2.

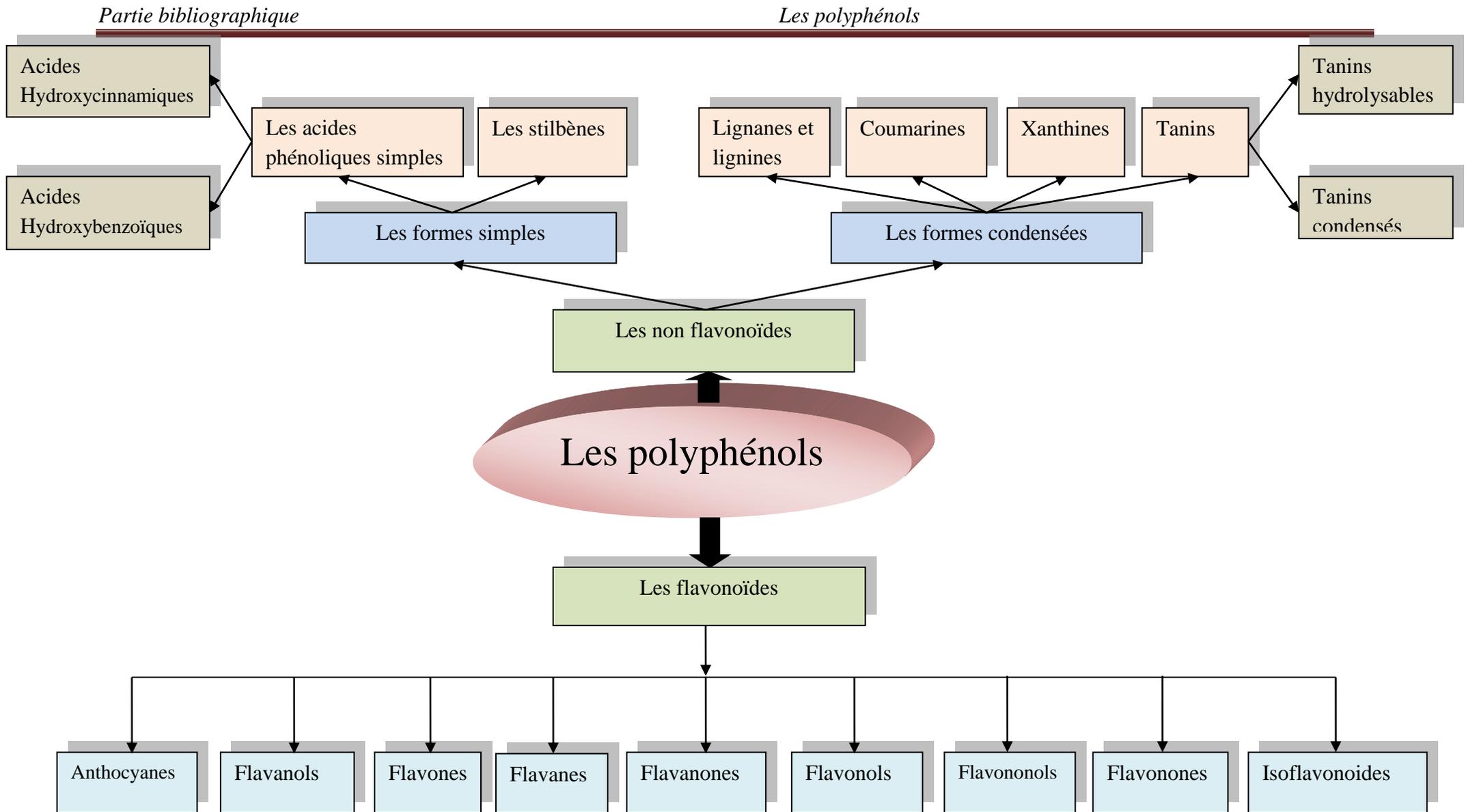


Figure 2 : Diagramme de classification des polyphénols (MACHEIX *et al.*, 2005 ; STALIKAS, 2007 ; KUMAR *et al.*, 2015).

La plupart des composés phénoliques naturels sont présents plus souvent sous forme de glycosides, qui sont des mono et des polysaccharides liés à un ou plusieurs groupes phénoliques (cas des flavonoïdes), ou sous forme d'esters ou d'esters méthyliques (cas des acides phénoliques), et rarement sous forme libre dite aglycone (AJILA *et al.*, 2010 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014).

2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires aromatiques, largement répartis dans l'ensemble de la plante, mais qui sont particulièrement abondants dans les fruits acides. Ce sont les métabolites les plus abondants dans les aliments en plus des flavonoïdes. Le terme acide phénolique désigne en général les phénols possédant une seule fonction carboxylique acide (STALIKAS, 2007 ; AJILA *et al.*, 2010 ; WISSAM *et al.*, 2012 ; KUMAR *et al.*, 2014).

Cependant, en ce qui concerne les métabolites végétaux, il s'agit d'un groupe distinct d'acides organiques. Ces acides phénoliques naturels contiennent deux structures de carbone représentatives et distinctives : les structures hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques. Bien que le squelette de base reste le même, les nombres et les positions des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique font la différence et établissent la variété des structures et de composés (STALIKAS, 2007 ; AJILA *et al.*, 2010 ; KUMAR *et al.*, 2014).

Les acides phénolique sont rarement présents à l'état libre, mais ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques (MACHEIX *et al.*, 2005).

2.1.1. Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1)

Les acides hydroxybenzoïques ont une structure courante de type (C6-C1), ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides. Ils sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes (MACHEIX *et al.*, 2005 ; DYKES et RONNEY, 2006 ; DAI et MUMPER, 2010 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; KAUR *et al.*, 2014).

La structure de base de l'acide hydroxybenzoïque et les principaux composés dérivés de cette structure sont indiqués dans la figure 3 ci-après.

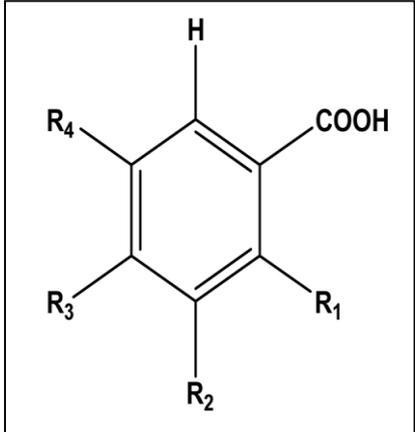
	Nom	R1	R2	R3	R4
	Acide benzoïque	H	H	H	H
Acide p-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H	H
Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H	H
Acide gallique	H	OH	OH	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H	H
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH	H
Acide veratrique	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
Acide salicylique	OH	H	H	H	H

Figure 3 : Structure de l'acide hydroxybenzoïque et quelques dérivés (MACHEIX *et al.*, 2005 ; DYKES et RONNEY, 2006 ; STALIKAS, 2007 ; CASTELLANO, 2012 ; KUMAR *et al.*, 2014).

2.1.2. Les acides hydroxycinnamiques (C6-C3)

Les acides hydroxycinnamiques sont des composés aromatiques avec une chaîne latérale à trois carbones (C6-C3). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (telle que la méthylation), sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. Les acides caféique, ferulique, p-coumarique et sinapique étant les plus courants (MACHEIX *et al.*, 2005 ; DYKES et RONNEY, 2006 ; STALIKAS, 2007 ; DAI et MUMPER, 2010 ; KAUR *et al.*, 2014). La figure 4 ci-après, représente la structure de base de l'acide hydroxycinnamique et quelques dérivés.

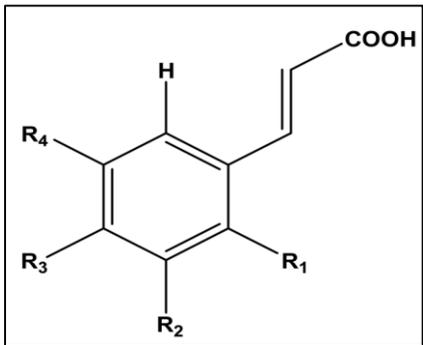
	Nom	R1	R2	R3	R4
	Acide cinnamique	H	H	H	H
Acide o-coumarique	H	OH	H	H	H
Acide m-coumarique	H	OH	H	H	H
Acide p-coumarique	H	H	OH	H	H
Acide ferulique	H	OCH ₃	OH	H	H
Acide sinapique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
Acide caféique	H	OH	OH	H	H

Figure 4 : Structure de l'acide hydroxycinnamique et quelques dérivés (MACHEIX *et al.*, 2005 ; DYKES et RONNEY, 2006 ; STALIKAS, 2007 ; CASTELLANO, 2012 ; MIGUEL *et al.*, 2014).

2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un grand groupe de composés phénoliques bioactifs, végétaux, les plus importants et les plus abondants des produits naturels diététiques. Ce sont les pigments les plus fréquents à côté de la chlorophylle et des caroténoïdes (STALIKAS, 2007 ; PAVITHRA *et al.*, 2013 ; SOUSA *et al.*, 2013 ; ARRABI *et al.*, 2004 ; TEH *et al.*, 2014 ; MRAIHI *et al.*, 2015).

Les flavonoïdes sont la classe la plus importante de composés phénoliques (DALLAS *et al.*, 2008). Ils sont très répandus dans les légumes comme les herbes, les fruits, les céréales, les graines et les aliments dérivés tels que les jus, vins, huiles et divers suppléments diététiques (LIU *et al.*, 2008 ; SOUSA *et al.*, 2013).

Ils sont souvent plus concentrés dans les zones externes du fruit ou du légume. Ils sont impliqués dans la couleur soit sous forme native (anthocyanes et flavonols), soit après oxydation par le phénomène de brunissement enzymatique (AJILA *et al.*, 2010 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014).

2.2.1. Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire (LIU *et al.*, 2008 ; AJILA *et al.*, 2010), ayant une structure phényl benzopyrone (LIU *et al.*, 2008 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

La structure de base des flavonoïdes est le noyau flavane, qui comprend 15 atomes de carbone disposés dans une configuration caractéristique C6-C3-C6 (PIETTA *et al.*, 2000 ; AJILA *et al.*, 2010 ; DAI et MUMPER, 2010 ; PAVITHRA *et al.*, 2013 ; ENGIDAA *et al.*, 2013 ; MRAIHI *et al.*, 2015).

Cette structure est représentée par deux cycles benzéniques (C6), étiquetés A et B, unis par une chaîne linéaire à trois atomes de carbone (C3) sous forme d'un noyau hétérocyclique oxygéné (AJILA *et al.*, 2010 ; WISSAM *et al.*, 2012 ; TEH *et al.*, 2014 ; KUMAR *et al.*, 2014 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Le premier cycle benzénique (A) est condensé avec le sixième carbone du troisième cycle (C), qui porte en position 2 un groupe phényle (B) en tant que substituant (NAKAJIMA *et al.*, 2014).

Les flavonoïdes sont hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et / ou 5'. Souvent, un ou plusieurs de ces groupes hydroxyle sont méthylés, acétylé ou sulfaté. Dans les plantes et à l'exception des leucoanthocyanines, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme de

glycosides O ou C, ils sont dits des flavonoïdes glycosylés (LIU *et al.*, 2008 ; MARUTI *et al.*, 2011 ; WISSAM *et al.*, 2012 ; NAKAJIMA *et al.*, 2014).

Les substituants glucidiques comprennent : le D-glucose, le L-rhamnose, le galactose et l'arabinose. Lorsque le flavonoïde est exempt de glucides, la structure s'appelle aglycone (LIU *et al.*, 2008 ; NAKAJIMA *et al.*, 2014 ; MRAIHI *et al.*, 2015). La figure 5 suivante représente la structure de base des flavonoïdes.

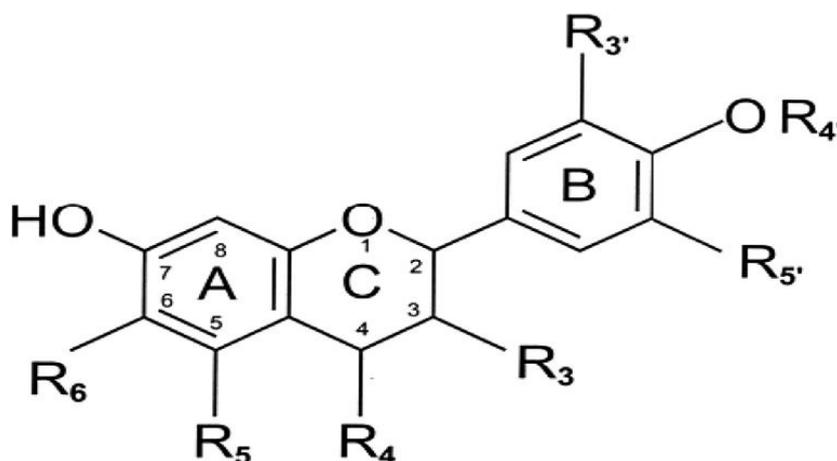


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (DAMIAN-RAYNA *et al.*, 2016).

2.2.2. Les différentes classes de flavonoïdes

Selon la structure et l'état d'oxydation du noyau central C, les flavonoïdes comprennent les classes suivantes : les flavanones, les flavones, les flavanols (catéchines), les flavonols, les flavanonols, les isoflavones, et les anthocyanines (ARRABI *et al.*, 2004 ; DAI et PUMPER, 2010).

Les flavonoïdes sont divisés en différentes classes suivant la position des cycles B et C, le degré de saturation, d'oxydation et d'hydroxylation du cycle C. Tandis que le type de substitution sur les cycles A et B donnent naissance aux différents composés de la même classe de flavonoïdes (PIETTA, 2000 ; DALLAS *et al.*, 2008 ; ATROUZ, 2009 ; AJILA *et al.*, 2010).

Le tableau I suivant résume les principales caractéristiques et les sources alimentaires des différentes classes des flavonoïdes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013 ; KUMAR *et al.*, 2014).

Tableau I : Les principales classes des flavonoïdes.

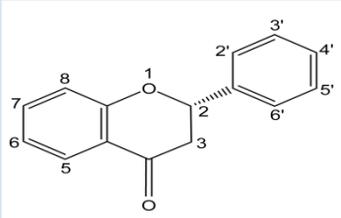
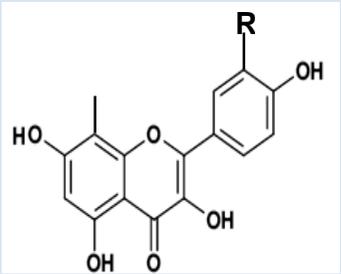
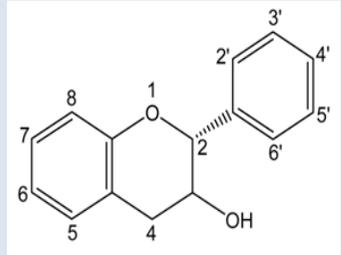
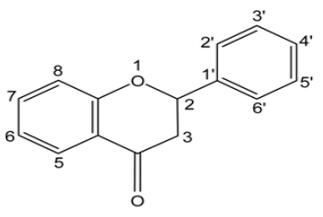
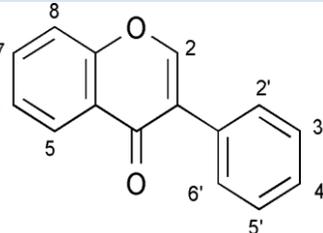
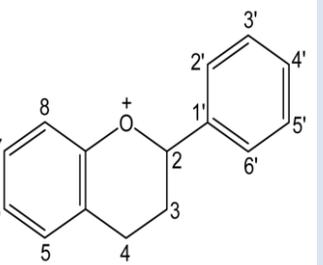
Structure chimique	Caractéristiques	exemple	Source principale	Références
<p>Les flavanones</p> 	<p>Absence de la double liaison entre C2 et C3, Ils sont glycosylés soit par du rutinose (6-O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) soit par de la néohesperidose (2-O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) liés en position 7</p>	<p>-Naringénine; -Naringine; -Hesperitine; -Hesperidine; -Eriodictyol;</p>	<p>Ecorce d'agrumes Agrumes, raisin</p>	<p>PIETTA, 2000 ; ONO <i>et al.</i>, 2006 ; PINCEMAIL <i>et al.</i>, 2007 ; STALKAS, 2007 MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO <i>et al.</i>, 2014 ; YANG <i>et al.</i>, 2014 ; MARIN <i>et al.</i>, 2015 ; OMOBA <i>et al.</i>, 2015.</p>
<p>Flavonols</p> 	<p>Les plus réponsus et les plus diversifiés structurellement, se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison entre C2-C3, Ils existent sous forme d'aglycones ou d'hétérosides, structure similaire à celle des flavones avec un hydroxyle en position C3 du noyau pyrone C, s'accumulent dans les tissus extérieurs et aériens (peau et feuilles)</p>	<p>-Quercétine ; -Kaempferol ; -Galangine ; -Fisetine ; -Myricétine ; -Sorhamnetine.</p>	<p>brocoli, thé, tomate, oignon, épinard, chou, brocoli, baies laitue, pomme, raisin et peaux des fruits.</p>	<p>PIETTA, 2000 ; AJILA <i>et al.</i>, 2010 ; SAEWAN et JIMTAISONG, 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO <i>et al.</i>, 2014 ; TUSZYŃSKA, 2014 ; MARIN <i>et al.</i>, 2015 ; OMOBA <i>et al.</i>, 2015 ; TELESZKO <i>et al.</i>, 2016.</p>
<p>Flavan 3 ols ou Flavanols</p> 	<p>flavonoïdes les plus complexes, souvent appelés catéchines. Leurs structures diffèrent de la plupart des flavonoïdes : il n'y a pas de double liaison entre C2 et C3, et pas de carbonyle C4 dans le cycle C de f L'hydroxylation en C3 permet aux flavanols d'avoir deux centres chiraux sur la molécule (sur C2 et C3), donc quatre diastéréoisomères possibles.</p>	<p>-(+) Catéchine ; -(-) Catéchine ; -(+) Epicatechine ; -(-) Epicatechine.</p>	<p>Chocolat, thé vert, vin rouge et fruits</p>	<p>TSAO, 2010 ; HAYTOWITS <i>et al.</i>, 2013 ; SAEWAN et JIMTAISONG, 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO <i>et al.</i>, 2014 ; MARIN <i>et al.</i>, 2015 ; MRAIHI <i>et al.</i>, 2015 ; TELESZKO <i>et al.</i>, 2016).</p>

Tableau I : Les principales classes des flavonoïdes (suite).

Structure chimique	Caractéristiques	exemple	Source principale	Références
<p>Flavones</p> 	<p>-Les plus réponsus et les plus diversifiés structurellement</p> <p>-Groupe phényl B comme substituant en position 3 du noyau pyrone C</p> <p>-Présence de double liaison entre C2 et C3 et une fonction oxo en C4.</p>	<p>-Chryisine ;</p> <p>-Apgénine,</p> <p>-luteoline ;</p> <p>-Chryisine ;</p> <p>-Eupaline ;</p> <p>-Balcalin.</p>	<p>Graine de céréales, persil, thym, tisane, pommes, thé, cerise, céleri, raisins, haricots, brocolis, poireaux, oignons, et tomate.</p>	<p>PIETTA., 2000 ; STALKAS., 2007 ; AJILA <i>et al.</i>, 2010 ; SAEWAN et JIMTAISONG., 2013 ; HAYTOWITS <i>et al.</i>, 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO <i>et al.</i>, 2014.</p>
<p>Isoflavones</p> 	<p>Rencontrés sous forme d'aglycones ou de glycosides, la structure des isoflavones diffère des flavones en localisation du groupe phényle (cycle B), car il est substitué à la position C3 du cycle pyrone (noyau C)</p>	<p>-Genisteine;</p> <p>-Genistine;</p> <p>-Daidzeine;</p> <p>-Daidzine;</p> <p>-Ononine.</p>	<p>les légumes, y compris le soja, les haricots verts et les pois chiches. Les germes de luzerne et de trèfle, les graines de tournesol.</p>	<p>PIETTA., 2000 ; REYNAUD., 2005 ; TSAO., 2010 ; HAYTOWITS <i>et al.</i>, 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO <i>et al.</i>, 2014 ; MRAIHI <i>et al.</i>, 2015.</p>
<p>Les anthocyanines</p> 	<p>les antioxydants puissants, structures caractérisée par le noyau flavone avec différentes substitutions d'hydroxyle ou de méthoxyle, apparaissent principalement dans les fruits mais aussi dans les feuilles et les racines sous forme de glycosides, ce sont des pigments hydrosolubles présents uniquement dans le cytoplasme des plantes terrestres.</p>	<p>-Cyanidine;</p> <p>-Cyanine;</p> <p>-Peonidine;</p> <p>-Delphinidine;</p> <p>-Pelargonidine;</p> <p>-Malvidine;</p> <p>-Delphinidine.</p>	<p>Raisin rouge, pommes, grains d'orge baies (fraise, cassis, mûres. . .), vin, fraises, framboises, prunes rouges, et agrumes.</p>	<p>PIETTA., 1999 ; CONSTANTA <i>et al.</i>, 2006 ; DYKES <i>et al.</i>, 2006 ; PINCEMAIL <i>et al.</i>, 2007 ; SAEWAN et JIMTAISONG., 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO <i>et al.</i>, 2014 ; MRAIHI <i>et al.</i>, 2015.</p>

2.2.3. Les flavonoïdes d'agrumes

Les écorces d'agrumes et les graines sont très riches en composés phénoliques, comme les acides phénoliques et les flavonoïdes. La peau d'agrumes est plus riche en flavonoïdes que les graines (MARUTI *et al.*, 2011 ; OMOBA *et al.*, 2015 ; CASTRO-VAZQUEZ, 2016 ; MOJZER *et al.*, 2016).

Une grande partie des composés phénoliques des oranges et des jus d'orange sont les acides hydroxycinnamiques (HCA) et les flavonoïdes, dont les flavanones, les flavones, les flavonols, et les anthocyanines sont quantitativement les plus prédominantes (BIBAO *et al.*, 2007 ; KLIMCZAK *et al.*, 2007 ; POLINATI *et al.*, 2010 ; HEGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; EVANS *et al.*, 2012 ; CHANET *et al.*, 2013 ; NAKAJIMA *et al.*, 2014).

L'utilisation et la valorisation des écorces d'agrumes ont fait l'objet de diverses recherches, ce sont des sources potentielles d'antioxydants naturels. Elles sont riches en composés phénoliques comme les flavanones, les glycosides de flavanones et les flavones polyméthoxylées (FPM), qui sont physiologiquement très actifs. Ces FPM sont représentés par la nobiletine, la tangerétine, la sinesétine, la 3,5,6,7,8,3',4'-heptaméthoxyflavone et la 3,5,6,7,3',4'-hexaméthoxyflavone. Les peaux d'agrumes sont aussi une source de polyhydroxyl flavonoïdes (FPH) tels que l'héspéridine, la neohéspéridine et la naringine qui sont des glycosides de flavanones (EVANS *et al.*, 2012 ; KARSHEVA *et al.*, 2013 ; DONG *et al.*, 2014 ; GOSSLAU *et al.*, 2014 ; NAKAJIMA, 2014 ; RAWSON *et al.*, 2014 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Les FPM et les glycosides de flavanones se retrouvent exclusivement dans les peaux du genre *Citrus*, en particulier dans les peaux d'oranges douces (*Citrus sinensis*) et les mandarines, ils se produisent relativement rarement dans les autres plantes (EVANS *et al.*, 2012 ; KARSHEVA *et al.*, 2013 ; CASTRO-VAZQUEZ, 2016 ; MAGWAZA *et al.*, 2016).

Selon MORAND et MILENKOVIC (2014), les aglycones de flavanones varient selon les types d'agrumes : l'héspéridine est majoritaire dans l'orange et la clémentine, et la naringénine dans le pamplemousse et l'ériodictyol dans le citron.

2.3. Les tanins

Les tanins constituent le troisième groupe important de composés phénoliques, ils ont des poids moléculaire relativement élevé. Sur le plan structural, ils peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et tanins condensés (MACHEIX *et al.*, 2005).

Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique, ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (MACHEIX *et al.*, 2005).

Les tanins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères de monomères de polyhydroxyflavan-3-ol, reliés par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (SCHOLFIELD *et al.*, 2001 ; AJILA *et al.*, 2010 ; ACHAT, 2014). La figure 6 ci-après représente la structure de base des tanins condensés.

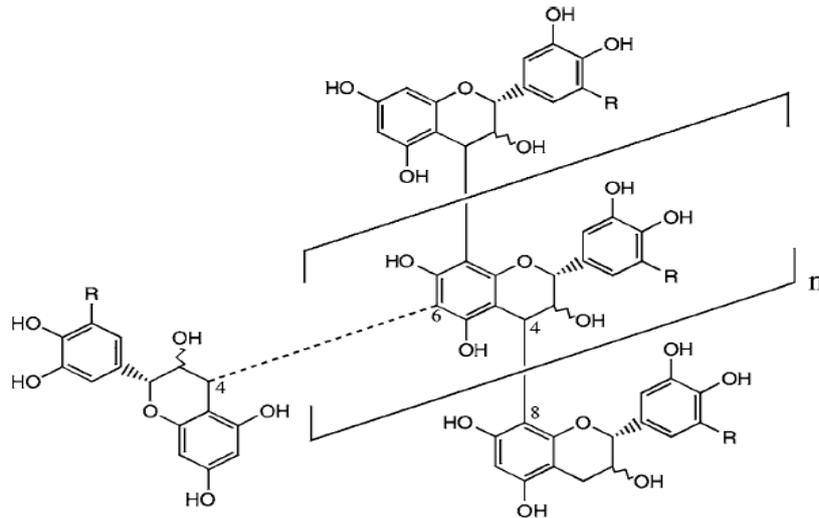


Figure 6 : Structure de base des tanins condensés (SCHOLFIELD *et al.*, 2001).

En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire,...etc.) et de certaines boissons (vin, cidre, thé,...etc.) ainsi que de l'amertume du chocolat (MACHEIX *et al.*, 2005 ; ACHAT, 2014).

Une troisième subdivision à savoir les phlorotannins, composés entièrement de phloroglucinol ont été isolés de plusieurs genres d'algues brunes (AJILA *et al.*, 2010).

Selon (MACHEIX *et al.*, 2005 ; AJILA *et al.*, 2010), les tanins sont des polyphénols qui se lient avec des protéines, des composés tels que les alcaloïdes ou des ions métalliques lourds dans une solution, ce qui les rendent insolubles et provoquent des précipitations.

2.4. Les lignanes

Les lignanes sont un groupe de diphenols (deux unités de phenylpropane), relativement simples, ayant une structure de 2,3-dibenzylbutane, qui est formée par la dimérisation de deux résidus d'acide cinnamique (KEERTHI *et al.*, 2014 ; KUMAR *et al.*, 2014). Ce sont des composés mineurs non nutritifs et non caloriques, associés aux fibres alimentaires et se

sont révélés produire des effets physiologiques importants. Ils sont produits dans une grande variété d'aliments végétaux, principalement dans les graines oléagineuses, les céréales, les légumes, les fruits et des légumineuses. La graine de lin et de sésame, ainsi que le thé est une source riche de lignanes.

Les lignanes végétales se produisent généralement sous forme de glycosides (AJILA *et al.*, 2010 ; PETERSON *et al.*, 2011 ; KEERTHI *et al.*, 2014).

3. Biosynthèse des polyphénols

Selon STALIKAS (2007), les composés phénoliques sont synthétisés au cours du développement de la plante tels que les acides phénoliques qu'on retrouve au cours des différents stades de la maturation. Les phénols insolubles se retrouvent au niveau des parois cellulaires tandis que les phénols solubles sont localisés dans les vacuoles des cellules végétales.

Les polyphénols dans les plantes dérivent des voies de pentose phosphate, shikimate et phénylpropanoïde (AJILA *et al.*, 2010 ; TEH *et al.*, 2014 ; MRAIHI *et al.*, 2015). La biosynthèse des flavonoïdes se produit généralement dans le cytoplasme ou sur la surface cytoplasmique du réticulum endoplasmique (DONG *et al.*, 2006).

La plupart des polyphénols dont les flavonoïdes, proviennent d'une origine commune qui est le malonate et les acides aminés aromatiques : phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont désaminés en acides cinnamiques, qui pénètrent dans la voie du phénylpropanoïde (PIETTA, 2000 ; CASTELLANO, 2012 ; ENGIDAA *et al.*, 2013). Une étape importante dans cette voie biosynthétique est l'introduction d'un ou plusieurs groupes hydroxyle dans le cycle phényle. D'après CASTELLANO (2012), la biosynthèse produit une grande variété de phénols végétaux tels que les acides cinnamiques (C6-C3) et les acides benzoïques (C6-C1).

Selon TUSZYNSKA (2014), les polyphénols sont produits dans les plantes principalement sous forme de glycosides conjugués de plusieurs types d'aglycones avec des hydrates de carbone.

4. Rôle des polyphénols chez la plante

D'après STALIKAS (2007), les plantes vasculaires sont capables de synthétiser une multitude de métabolites secondaires, ces métabolites sont impliqués dans plusieurs rôles durant la vie de la plante allant de la structure à la protection.

Les polyphénols sont synthétisés en réponse à certaines conditions telles que l'infection, les blessures et les changements soudains de température (STALIKAS, 2007 ; DAI et MUMPER, 2010 ; POLINATI *et al.*, 2010).

Selon (STALIKAS, 2007 ; NAKAJIMA *et al.*, 2014), les polyphénols exercent une fonction de photoprotection des rayonnements UV, grâce à leurs propriété absorbante de ces rayons. D'après PUTHUR (2016), les plantes capables de synthétiser ces composés phénoliques étaient plus tolérantes aux rayonnements UV. Ils sont aussi impliqués dans la défense contre les microorganismes pathogènes, les insectes, les parasites et les prédateurs ou une attaque herbivore, conférée par l'astringence des catéchines et autres flavanols, et permettent de protéger les plantes contre le stress oxydatif (PIETTA, 2000 ; NACZK et SHAHIDI, 2003 ; STALIKAS, 2007 ; LIU *et al.*, 2008 ; MEHINAGIC *et al.*, 2011 ; FEJZIC et CAVAR, 2014 ; MOJZER *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les polyphénols d'après DAI et MUMPER (2010), sont partiellement responsables des propriétés organoleptiques globales des aliments végétaux (fruits et légumes). Par exemple, les composés phénoliques contribuent à l'amertume et à l'astringence des fruits et des jus de fruits, dues à l'interaction entre les phénoliques, principalement la procyanidine et les glycoprotéines dans la salive.

Dans les agrumes et les boissons dérivées, les flavanones sont présentes sous forme de glycosides, qui donnent un goût amer pour certains fruits comme la naringine du pamplemousse, tandis que d'autres sont sans saveur (hespéridine, ériocitrine). Ces composés étant abondants dans les parties solides et comestibles du fruit, leurs teneurs sont nettement plus élevées dans les fruits (150-625 mg/100g) que dans les jus (40 à 60 mg/100ml), et cela d'après MORAND et MILENKOVIC (2014).

De plus, les rôles physiologiques des flavonoïdes dans l'écologie des plantes sont divers ; en raison de leurs couleurs attrayantes, les flavones, les flavonols et les anthocyanines peuvent servir de signaux visuels pour les insectes pollinisateurs (PIETTA, 2000 ; MOJZER *et al.*, 2016).

Les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes agissent comme catalyseurs de la photosynthèse et/ou en tant que régulateurs des canaux ioniques impliqués dans la phosphorylation. Ils fonctionnent également comme des protecteurs du stress oxydatif dans les cellules végétales en éliminant les espèces réactives d'oxygène ERO et d'azote (PIETTA, 2000 ; MOJZER *et al.*, 2016), produites par le système de transport d'électrons photosynthétiques (PIETTA, 2000 ; STALIKAS, 2007).

5. Les méthodes d'extraction des polyphénols

Les phénoliques peuvent être extraits d'échantillons de plantes fraîches, congelées ou séchées. L'extraction de composés phénoliques majeurs est importante pour le développement de produits à valeur ajoutée, à partir de résidus de cultures agricoles qui sont des sous-produits renouvelables (AARABI *et al.*, 2016 ; MOJZER *et al.*, 2016).

Avant l'extraction, le matériel végétal est prétraité par broyage, séchage et homogénéisation. Ensuite la procédure d'extraction appropriée doit être considérée. La décision sur la méthode d'extraction à employer est influencée par la nature chimique de la substance, la taille des particules de l'échantillon et aussi par la présence de substances interférentes (MOJZER *et al.*, 2016).

5.1. La méthode conventionnelle

En dépit de plusieurs inconvénients, l'extraction liquide-liquide et solide-liquide sont encore des procédés d'extraction les plus couramment utilisés. De tels procédés impliquent l'utilisation de solvant classique comme les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle, souvent mélangés avec différentes proportions d'eau (AJILA *et al.*, 2010 ; MOJZER *et al.*, 2016).

L'extraction classique est habituellement effectuée à des températures allant de 20°C à 50°C. Des températures supérieures à 70°C ne sont pas souhaitées et entraînent une dégradation rapide des anthocyanines (MAGWAZA *et al.*, 2016 ; MOJZER *et al.*, 2016).

Les temps d'extraction prolongés et la nécessité de grande quantité de solvants sont des inconvénients de l'extraction conventionnelle. Cette extraction est rendue encore difficile par la complexité des composés phénoliques dans la matrice végétale (MOJZER *et al.*, 2016).

5.2. Les techniques modernes

Au cours de ces dernières années, de nouvelles méthodes d'extraction des polyphénols sont développées, visant à surmonter les inconvénients de l'extraction conventionnelle (MAGWAZA *et al.*, 2016 ; MOJZER *et al.*, 2016). Les différentes nouvelles techniques d'extraction sont résumées dans le tableau II suivant.

Tableau II : Les méthodes modernes d'extraction des polyphénols (FRANCO *et al.*, 2008 ; AJILA *et al.*, 2010 ; DAI et MUMPER, 2010 ; MOJZER *et al.*, 2016 ; AMMER *et al.*, 2017).

Technique d'extraction	Principe de la technique	Avantage
Extraction liquide sous pression et extraction au solvant accéléré	Utilise des solvants organiques à des températures et pressions supérieures à leurs points d'ébullition normale pendant de courte durée (5-15mn). Utilisée pour l'extraction rapide de composés organiques thermiquement stables.	<ul style="list-style-type: none"> - Consommer moins de solvant lors de l'extraction ; - Temps d'extraction et de manipulation de l'échantillon réduit.
Extraction par fluide super critique	Basée sur le point critique d'une substance pure, qui est la température la plus élevée et la pression à laquelle la substance peut exister dans un équilibre vapeur-liquide. Au-delà de ce point critique, se forme le liquide super critique. L'addition de co-solvant améliore l'extraction.	<ul style="list-style-type: none"> - Rapide et récupération facile du fluide super critique à partir des extraits ; - Non toxicité, extraction de substances thermolabiles et thermostables ; - Grande qualité d'extraction.
Extraction assistée par ultrasons	Basée sur le phénomène de cavitation acoustique, qui est la formation, la croissance et l'effondrement des micro-bulles à l'intérieur d'une phase liquide soumise à la cavitation ultrasonore.	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité d'extraction améliorée ; - Temps d'extraction raccourci ; - Simplification des conditions de traitement ; - Sure et écologique ; - Employer pour les substances thermolabiles.
L'ultrafiltration	Elle dépend principalement de la taille des particules des composés dans le mélange. L'entraînement des particules à travers les membranes est dû à la pression différentielle entre les membranes	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode rapide et faciles pour séparer et concentrer les polyphénols ; - Une sélectivité d'extraction élevée.

Tableau II : Les méthodes modernes d'extraction des polyphénols (suite).

Technique d'extraction	Principe de la technique	Avantages
Extraction assistée par micro-ondes	Repose sur l'effet direct des micro-ondes sur les molécules par conduction ionique et rotation du dipôle. Les molécules polaires comme les polyphénols et les solutions ioniques, absorbent fortement l'énergie des micro-ondes (présence d'un moment dipolaire permanent) entraînant une élévation rapide de la température et l'achèvement rapide de la réaction. La température élevée augmente la pénétration du solvant dans la matrice et les constituants sont libérés dans le solvant chaud environnant.	- Méthode rapide et capacité d'extraction haute performance ; - Réduction de consommation en solvant ; - Un taux d'extraction plus élevé, avec possibilité d'agitation pendant l'extraction, ce qui améliore le transfert de masse et permet d'extraire des traces de constituants.
Extraction assistée par enzymes	Désintégration des parois cellulaires végétales par des enzymes hydrolysant les hydrates de carbone telles que les pectinases, la cellulase, l'hémicellulose.	- Méthode rapide et facile pour séparer et concentrer les polyphénols.

5.3. Les facteurs influençant l'extraction des polyphénols

L'extraction des composés polyphénoliques dépend principalement des techniques analytiques, du temps d'extraction, de la température, du nombre d'extractions répétées de l'échantillon, la présence de substances interférentes ainsi que du choix des solvants d'extraction, qui sont les paramètres cruciaux qui affectent le rendement d'extraction (AJILA *et al.*, 2010 ; DAI et MUMPER, 2010 ; KOFFI *et al.*, 2010 ; ANDRADE *et al.*, 2015 ; MOJZER *et al.*, 2016).

➤ La température et le temps d'extraction

Le temps d'extraction et la température influencent la solubilité des polyphénols ; une température plus élevée augmente simultanément les vitesses de solubilité et de transfert de masse et diminue la viscosité et la tension superficielle des solvants, contribuant à un taux d'extraction plus élevé (MOJZER *et al.*, 2016).

Un temps d'extraction long et une haute température augmentent le risque d'oxydation des polyphénols, ce qui diminue par conséquent leur rendement total (AJILA *et al.*, 2010 ; WISSAM *et al.*, 2012).

➤ **La nature du solvant**

Le rendement et le taux d'extraction phénolique sont liés aux caractéristiques du solvant. Diverses études montrent que le méthanol est plus efficace dans l'extraction de polyphénols de poids moléculaire inférieur, tandis que l'acétone aqueux est un solvant approprié pour l'extraction des flavanols à poids moléculaire plus élevé (AJILA *et al.*, 2010 ; MOJZER *et al.*, 2016).

➤ **La polarité**

L'efficacité d'extraction des polyphénols est tributaire de la polarité des solvants ainsi que de celle des composés phénoliques. Par conséquent, la combinaison de solvant de différente polarité est recommandée pour une extraction plus efficace des molécules bioactives (AJILA *et al.*, 2010 ; ANDRADE *et al.*, 2015).

Chapitre II : Les propriétés physiologiques des polyphénols

1. Généralités

Les activités biologiques et biochimiques des polyphénols et de leurs métabolites dépendent de leur structure chimique, qui peut varier avec la nature et la position des substituants, et le nombre de groupes hydroxyle (RAHMAN, 2007 ; NAKAJIMA *et al.*, 2014). Ces facteurs déterminent également si un polyphénol agit comme antioxydant ou comme modulateur de l'activité enzymatique, et s'il possède des propriétés antimutagènes ou cytotoxiques (RAHMAN, 2007 ; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Les flavonoïdes d'agrumes ont un large spectre d'activités biologiques incluant les activités antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse et antidiabétique. Les flavonoïdes sont des antioxydants directs et ont la capacité de moduler l'activité enzymatique (MARUTI *et al.*, 2011 ; CASTRO-VAZQUEZ, 2016).

2. Activité antioxydante des polyphénols

Les propriétés antioxydantes des plantes sont attribuées aux polyphénols et partiellement à leur capacité de piéger les radicaux libres (POPOVICI *et al.*, 2009 ; EDZIRI *et al.*, 2012 ; PAVITHRA *et al.*, 2013). L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité de résister à l'oxydation (POPOVICI *et al.*, 2009).

L'oxydation est un phénomène largement répandu aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides), que physiologique (stress oxydant). L'ingestion de polyphénols par l'intermédiaire des fruits et des légumes, pourrait permettre à notre organisme de renforcer ses moyens de défense contre les processus d'oxydation, qui menacent quotidiennement nos cellules (GBOHAIDA *et al.*, 2015).

2.1. Les espèces réactives d'oxygène (ERO)

Chez les plantes, les espèces réactives d'oxygène (ERO) sont produites au niveau de plusieurs organites cellulaires : chloroplaste, mitochondrie, membrane plasmique, peroxysomes, réticulum endoplasmique, ...etc. (SHARMA *et al.*, 2012 ; PUTHUR, 2016).

Les ERO indiquées dans le tableau III suivant, sont générées par le métabolisme de l'oxygène, et ont un seul électron non apparié dans leur orbite externe qui devient très réactif. Elles sont produites dans tous les organismes aérobies pour effectuer des métabolismes cellulaires (NOORI, 2012).

superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), ainsi que les molécules non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) (VAMECQ *et al.*, 2004 ; SHARMA *et al.*, 2012).

La figure 8 ci-dessous illustre les étapes de la réduction de l'oxygène moléculaire et les ERO générés.

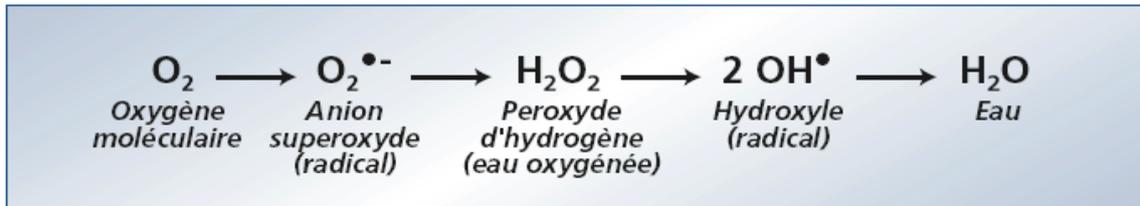


Figure 8 : Les étapes de la réduction de l'oxygène moléculaire et les ERO générés (GARDES-ALBERT *et al.*, 2003 ; VAMECQ *et al.*, 2004).

Le corps humain possède de nombreux mécanismes de défense utilisant des enzymes antioxydantes et des composés non enzymatiques contre ces contraintes oxydatives. Mais lorsque ces radicaux libres sont hors du contrôle, l'organisme devient incapable de récupérer tous les ERO qui peuvent entraîner des maladies chroniques, telles que le cancer, l'artériosclérose, la néphrite, le diabète, lésion hépatique, rhumatisme, ischémie, troubles cardiovasculaires et neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (RAHMAN, 2007 ; RAHMAN *et al.*, 2012 ; KAMEL *et al.*, 2015).

2.1.1. Les radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui a un électron non apparié dans l'orbitale externe (YOSHIKAWA et NAITO, 2000 ; GARDES-ALBERT *et al.*, 2003 ; PAVITHRA *et al.*, 2013 ; BARHE et TCHOUYA, 2016). Les radicaux libres sont habituellement instables et très réactifs, car les électrons non appariés ont tendance à former des paires avec d'autres électrons (YOSHIKAWA et NAITO, 2000 ; DORCAS *et al.*, 2016). Ces radicaux libres sont produits continuellement dans le corps humain (DORCAS *et al.*, 2016).

2.1.2. Origines des ERO

La production des ERO pendant les processus métaboliques est un processus normal et nécessaire qui assure des fonctions physiologiques importantes (PAVITHRA *et al.*, 2013). Dans les cellules mammifères, la production des ERO est essentiellement d'origine

enzymatique ; la NADPH oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire en sont les principales sources (BEAUDEUX *et al.*, 2006).

Cependant, lorsqu'un déséquilibre entre la production des ERO et les défenses antioxydantes se produit, il entraîne un stress oxydatif qui est impliqué dans plus d'une centaine de pathologies humaines (PAVITHRA *et al.*, 2013 ; KAMEL *et al.*, 2015).

Les radicaux libres peuvent aussi être formés en réaction à des agressions de notre environnement, ainsi que par ces réactions initiées par des rayonnements ionisants (la lumière ultraviolette). Ils sont également générés par d'autres sources externes telles que la fumée de cigarette, les polluants environnementaux, certains médicaments, les pesticides, l'ozone, les anesthésiques et les solvants industriels (GARDES-ALBERT *et al.*, 2003 ; TEH *et al.*, 2014 ; KAMEL *et al.*, 2015 ; GBOHAIDA *et al.*, 2015).

Les différentes origines de formation des ERO (en particulier les radicaux libres) sont illustrées dans la figure suivante.

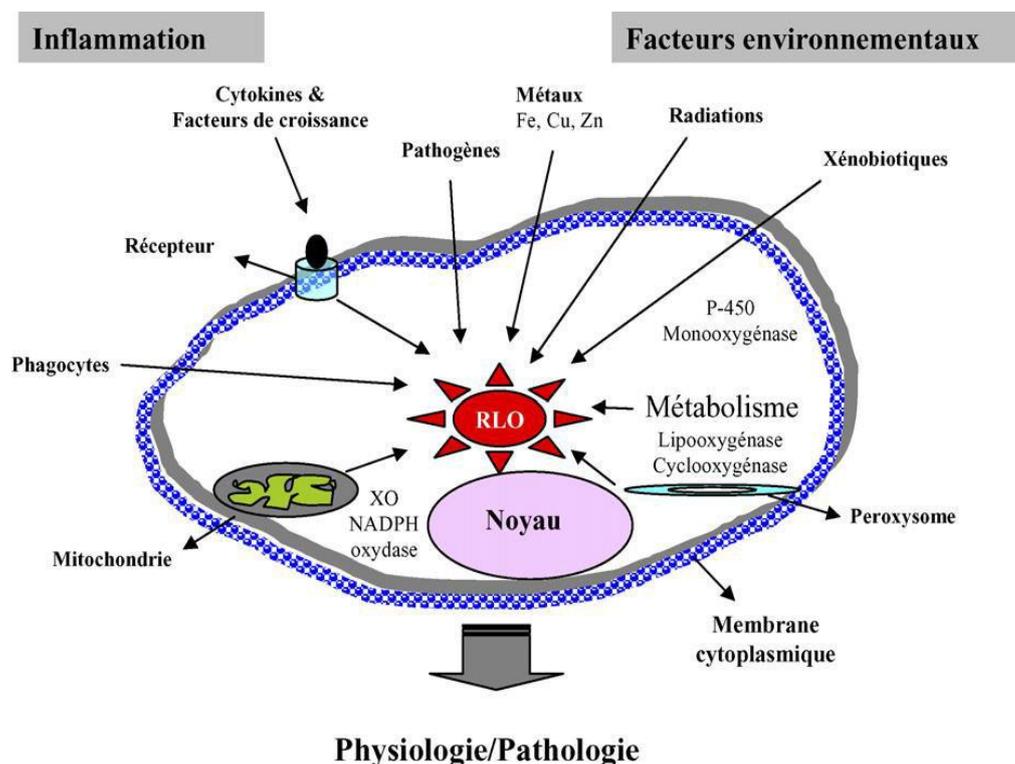


Figure 9 : Origines extra- et intracellulaires des radicaux libres oxygénés (ACHAT, 2014).

XO : xanthine oxydase, P-450 : cytochrome P-450, RLO : radicaux libres oxygénés.

2.2. Le stress oxydatif

Selon NEGDAL et SERRES (2011), les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et

leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance redox) est en équilibre.

Cependant cette homéostasie redox peut être rompue, c'est-à-dire que l'oxydation dépasse les systèmes antioxydants (figure 10), soit par une production excessive d'ERO (cas du vieillissement ou l'athérosclérose), soit par une diminution des capacités antioxydantes (cas des personnes souffrant d'obésité et les fumeurs). On parle alors de stress oxydatif (YOSHIKAWA et NAITO, 2000 ; NEGDAL et SERRES, 2011 ; RAHMAN *et al.*, 2012 ; BARHE et TCHOUYA, 2016).

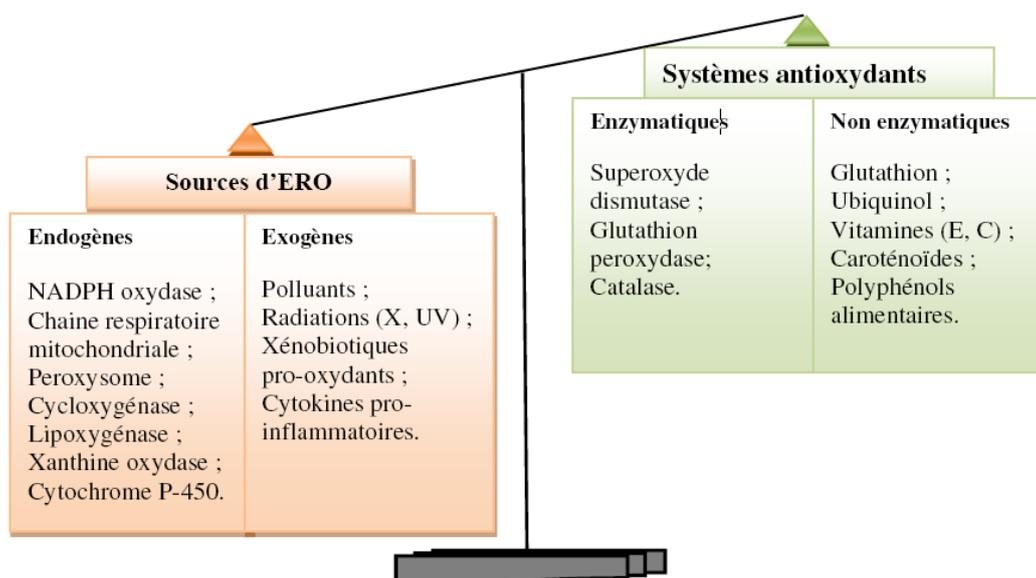


Figure 10 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants (RAHMAN *et al.*, 2012).

Une surproduction d'ERO et/ou un déficit en système antioxydant sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiopathologiques (BEAUDEUX *et al.*, 2006).

En effet, les espèces réactives d'oxygène et les radicaux libres peuvent attaquer des molécules dans les membranes biologiques et les tissus, induisant ainsi diverses maladies (YOSHIKAWA et NAITO, 2000).

Le stress oxydatif provoque des maladies chroniques comme le cancer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiaques, l'arthrite (PAVITHRA *et al.*, 2013 ; EVERETTE *et al.*, 2012 ; KAMEL *et al.*, 2015), la cataracte, l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète sucré et le vieillissement (TEH *et al.*, 2014). L'apport d'une quantité suffisante d'antioxydants tels que les polyphénols et les caroténoïdes présents dans les fruits et légumes neutralisent les radicaux libres, et préviennent des maladies dégénératives (PAVITHRA *et al.*, 2013 ; EVERETTE *et al.*, 2014).

2.3. Effet des radicaux libres sur les molécules biologiques

Les radicaux libres entraînent des dommages de toutes les macromolécules cellulaires, y compris les protéines, les hydrates de carbone, les lipides et les acides nucléiques (l'ADN et l'ARN), ce qui est à l'origine des maladies chroniques et dégénératives (YOSHIKAWA *et al.*, 2000 ; RAHMAN, 2007 ; SHARMA *et al.*, 2012 ; TEH *et al.*, 2014 ; KAMEL *et al.*, 2015 ; DORCAS *et al.*, 2016).

Les EOR interagissent avec des acides aminés spécifiques des chaînes peptidiques. Ceci entraîne des modifications structurelles dues à la fragmentation de la chaîne peptidique et à l'altération de la charge électrique, par conséquent, une inactivation des protéines se produit (NOORI, 2012 ; SHARMA *et al.*, 2012).

L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires, initie le processus de peroxydation lipidique qui favorise la propagation des réactions des radicaux libres (EDZIRI *et al.*, 2012 ; NOORI, 2012 ; SHARMA *et al.*, 2012).

Les EOR brisent les brins d'ADN et provoquent la dégradation et l'oxydation des sucres et des bases azotées, qui se traduisent par des mutations génétiques (NOORI, 2012 ; SHARMA *et al.*, 2012).

Les différents dommages engendrés par ces radicaux libres sur les macromolécules biologiques sont résumés dans la figure 11 suivante.

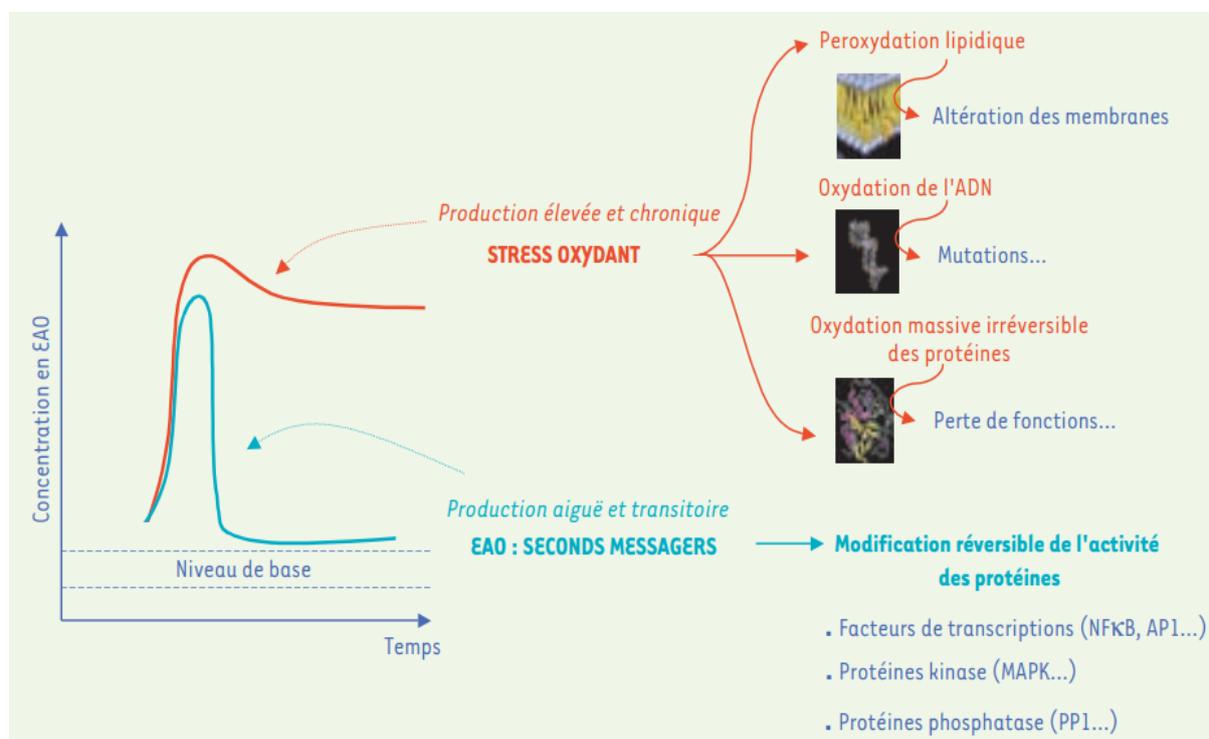


Figure 11 : Conséquences des ROS sur les molécules biologiques (CARRIERE *et al.*, 2017).

2.4. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif

La formation de radicaux libres se produit constamment dans les cellules à la suite de réactions enzymatiques et non enzymatiques (TEH *et al.*, 2014). Cette formation incessante peut être contrôlée par des antioxydants naturels ou synthétiques (KAMEL *et al.*, 2015).

2.4.1. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui peuvent retarder les processus d'oxydation ou inhiber le stade de propagation des réactions radicalaires, afin de protéger les cellules du corps de l'oxydation. Ils possèdent des capacités telles que le piégeage des radicaux libres, la réduction de l'activité enzymatique (pro-oxydante), la chélation des métaux pro-oxydants, l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'extinction de l'oxygène singulet (TEH *et al.*, 2014 ; OMOBA *et al.*, 2015).

2.4.1.1. Les antioxydants synthétiques

Plusieurs antioxydants synthétiques existent, ce sont des composés avec des structures phénoliques de divers degrés de substitution d'alkyle. L'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont les plus couramment utilisés (EDZIRI *et al.*, 2012 ; SHALABY *et al.*, 2013 ; KAMEL *et al.*, 2015 ; OMOBA *et al.*, 2015).

Ces antioxydants synthétiques peuvent être inappropriés pour la consommation humaine chronique, car les publications récentes ont mentionné leurs effets toxiques possibles sur la santé humaine et l'environnement (ATROUZ, 2009 ; EDZIRI *et al.*, 2012). Le BHT et le BHA ont été prétendus responsables des dommages au niveau du foie et de la carcinogenèse, ce qui augmente l'intérêt pour les antioxydants naturels (KAROUI et MARZOUK, 2013 ; OMOBA *et al.*, 2015).

2.4.1.2. Les antioxydants naturels

2.4.1.2.1. Les antioxydantes enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques s'agissent principalement des trois enzymes :

- ✓ La superoxyde dismutase (SOD) qui se retrouve chez l'homme sous trois isoformes différents par leurs composition en acides aminés et la nature du cofacteur à savoir Cu, Zn-SOD, Mn-SOD mitochondriale, et SOD extra cellulaire (GARDES-ALBERT *et al.*, 2003 ; RAHMAN, 2007 ; RAHMAN *et al.*, 2012 ; PUTHUR, 2016).
- ✓ La catalase (CAT) catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (VAMECQ *et al.*, 2004 ; SHARMA *et al.*, 2012).

- ✓ La glutathion peroxydase dont il y a deux formes : sélénium dépendante (GPx) et sélénium-indépendante GST ou glutathionne-S-transférase (RAHMAN, 2007 ; PUTHUR, 2016).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire, elles permettent l'élimination des radicaux superoxyde, peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (RAHMAN *et al.*, 2012 ; SHALABY *et al.*, 2013 ; PUTHUR, 2016).

Le mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques est indiqué dans la figure ci-dessous.

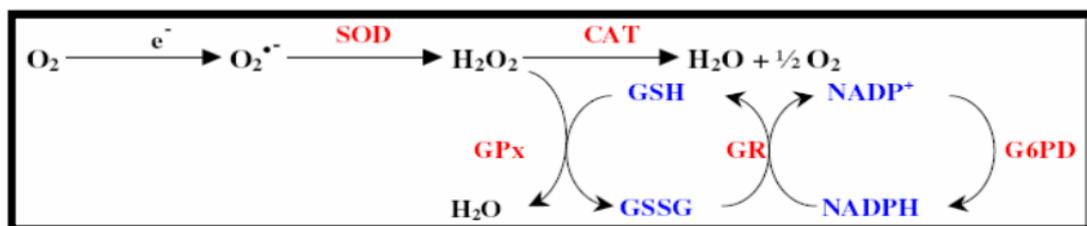
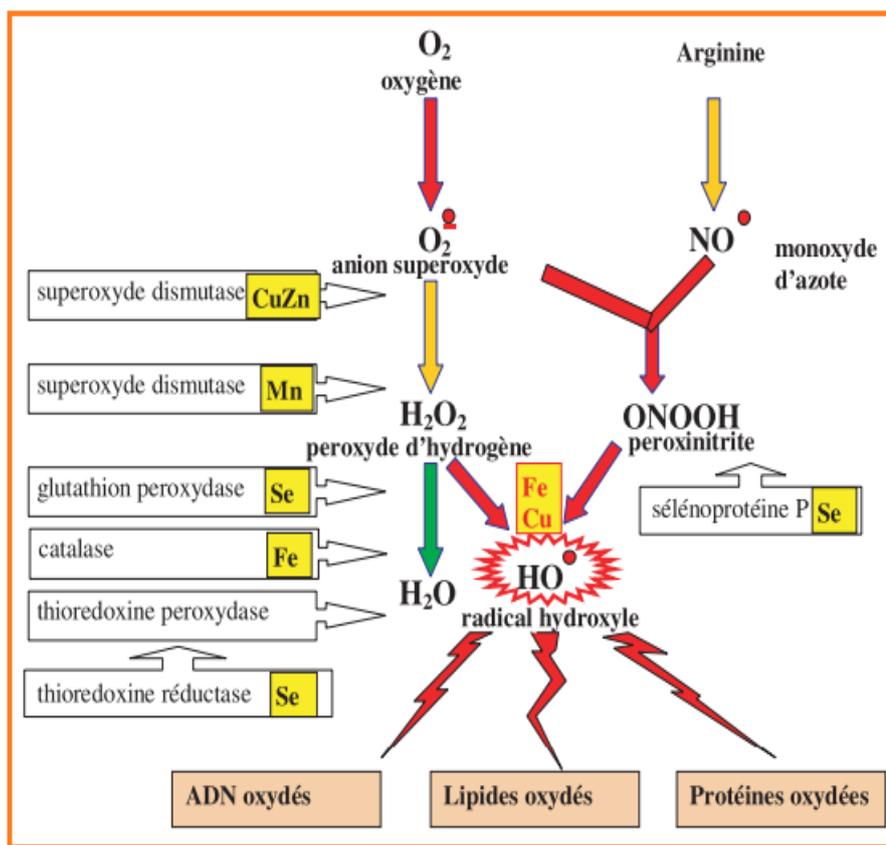


Figure 12 : Le mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (FAVIER, 2003).

2.4.1.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), les composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques, et les composés azotés comme les alcaloïdes, les dérivés de la chlorophylle, les acides aminés et les amines (POPOVICI *et al.*, 2009 ; OMOBA *et al.*, 2015).

- **La vitamine C**

La vitamine C est considérée comme l'antioxydant naturel le plus puissant (KLIMCZAK *et al.*, 2007 ; ATROUZ, 2009 ; FAVELA-HERNANDEZ *et al.*, 2016). C'est la vitamine hydrosoluble la plus abondante et la plus importante, qui est produite dans tous les tissus végétaux d'après (KLIMCZAK *et al.*, 2007).

Elle protège les composés dans les espaces extracellulaires et intracellulaires dans la plupart des systèmes biologiques, et réduit les radicaux tocophérol à leur forme active sur les membranes cellulaires (VAMECQ *et al.*, 2004 ; KLIMCZAK *et al.*, 2007). Elle fournit aussi selon PUTHUR (2016), une protection en éliminant les radicaux libres superoxydes, l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle.

La dose journalière recommandée en vitamine C est de 100-120 mg / jour pour obtenir une saturation cellulaire et une réduction optimale du risque des maladies chroniques. La teneur en vitamine C dans les jus d'orange varie de 150 à 450 mg/l. Un verre de jus d'orange (200 ml) peut fournir environ 30 à 80% de l'apport quotidien recommandé en vitamine C (KLIMCZAK *et al.*, 2007).

La vitamine C est l'inhibiteur le plus efficace du brunissement enzymatique, grâce à l'inhibition des enzymes oxydatives présentes dans les fruits (POLINATI *et al.*, 2010).

- **Le Glutathion (GSH)**

Sous sa forme réduite, le Glutathion est un tripeptide naturel synthétisé par les cellules, et doté d'un groupement réducteur représenté par la fonction thiol de la cystéine (RAHMAN *et al.*, 2012 ; VAMECQ *et al.*, 2004). Il est localisé dans le cytosol, le réticulum endoplasmique, les vacuoles, les mitochondries, les chloroplastes,...etc. C'est un piègeur potentiel de $^1\text{O}_2^-$, H_2O_2 et OH^- et régénère également un autre antioxydant soluble dans l'eau qui est l'ascorbate (PUTHUR, 2016).

- **La proline**

Selon PUTHUR (2016), la proline est un potentiel antioxydant et un inhibiteur de la mort cellulaire programmée. C'est un osmo-protecteur, un stabilisant de protéines, un inhibiteur de la peroxydation lipidique et éliminateur de radicaux OH^\cdot et O_2^\cdot . L'accumulation accrue de la proline améliore la tolérance des plantes contre différentes contraintes, en particulier la salinité et la sécheresse.

- **α -Tocophérol (Vitamine E)**

C'est un antioxydant lipidique soluble, localisé dans la membrane des tilacoïdes et du chloroplaste. Parmi les quatre isomères (α , β , γ , δ), l' α -tocophérol a la plus haute activité antioxydante, elle aide à éliminer le radical O_2^\cdot et permet de protéger les lipides de l'oxydation (VAMECQ *et al.*, 2004 ; RAHMAN, 2007 ; PUTHUR, 2016).

- **Les caroténoïdes**

RAHMAN (2007) indique que les caroténoïdes sont des pigments importants des plantes qui contiennent des doubles liaisons conjuguées. Leur activité antioxydante est due à la capacité de ces doubles liaisons à délocaliser les électrons non-appariés, à éliminer l'oxygène singulet et à réagir avec les radicaux libres.

- **Les polyphénols**

Les polyphénols sont les antioxydants les plus répandus dans notre alimentation (POLINATI *et al.*, 2010 ; PAVITHRA *et al.*, 2013 ; GBOHAIDA *et al.*, 2015). Certains polyphénols exercent une action antioxydante encore plus élevée que la vitamine C et une activité équivalente à celle de α -tocophérol *in vitro* (SHARMA *et al.*, 2012 ; KAROUI et MARZOUK, 2013 ; MOJZER *et al.*, 2016).

D'après RAHMAN (2007), l'activité la plus signalée des flavonoïdes est leur protection contre le stress oxydatif. Ils agissent sur les ERO et empêchent les dommages aux protéines, l'ADN et aux lipides membranaires (PAVITHRA *et al.*, 2013).

Les anthocyanines ont des propriétés antioxydantes exceptionnelles ; elles peuvent éliminer les radicaux libres et protéger les cellules contre les dommages membranaires, par inhibition de la peroxydation lipidique, les protégeant ainsi du stress oxydatif, ce qui contribue à la prophylaxie cardiovasculaire (ZHIRKOVAA *et al.*, 2016).

La forte activité antioxydante des flavonoïdes est associée à leur aptitude à éliminer les radicaux libres, due à leur grande capacité de don d'électron ou d'atomes d'hydrogène, à briser les réactions radicalaires en chaîne, à chélater les ions métalliques catalytiques et à l'élimination de l'oxygène singulet. Ils peuvent prévenir diverses maladies associées au stress oxydatif, telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et l'inflammation (ATROUZ, 2009 ; PAVITHRA *et al.*, 2010 ; POLINATI *et al.*, 2010).

2.4.2. Modes d'action des polyphénols dans la défense antioxydative

Les propriétés antioxydantes des polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques, (KLIMCZAK *et al.*, 2007 ; ATROUZ, 2009 ; SIMONE *et al.*, 2016) sont principalement attribuables à leurs propriétés redox. Ce qui leur permet d'agir comme agents réducteurs par don d'électron ou d'hydrogène et inhibiteurs d'oxygène singulet, ou due à la complexation avec des espèces oxydantes, notamment le peroxyde ; en rompant et neutralisant sa chaîne de formation, permettant ainsi d'empêcher l'oxydation des LDL (AJILA *et al.*, 2010 ; FEJZIC et CAVAR, 2014 ; KAMEL *et al.*, 2015 ; ALAM *et al.*, 2016). Ceci permet de stimuler le mécanisme de défense de l'homme contre le stress oxydatif (ATROUZ, 2009 ; ALAM *et al.*, 2016). Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes à savoir :

2.4.2.1. Le piégeage direct des ERO

Les flavonoïdes sont oxydés par des radicaux, ce qui entraîne un radical plus stable et moins réactif (OMOBA *et al.*, 2015). En effet, les polyphénols dont les flavonoïdes peuvent éliminer directement les radicaux libres par don d'hydrogène à partir de groupes hydroxyle phénoliques. Le radical phénoxy résultant tend à être peu réactif en raison de la délocalisation d'électrons dans le cycle aromatique, et par conséquent, le radical réactif est remplacé par un radical d'activité limitée (HEGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; ENGIDAA *et al.*, 2013 ; FEJZIC et CAVAR, 2014 ; MIGUEL *et al.*, 2014 ; GBOHAIDA *et al.*, 2015 ; DORCAS *et al.*, 2016 ; PUTHUR, 2016 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

La figure 14 ci-dessous, indique le mécanisme de piégeage des EOR.

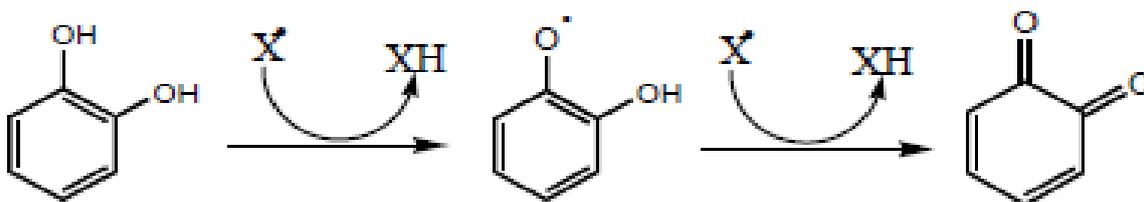


Figure 13 : Piégeage des ERO ($X\bullet$) par un noyau catéchol (ACHAT, 2014).

2.4.2.2. La chélation des ions métalliques

La chélation des ions métalliques de transitions, responsables de la production des ERO, empêche la formation catalysée (par des métaux) de radicaux libres (ATROUZ, 2009 ; AJILA *et al.*, 2010 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Les polyphénols sont des chélateurs de nombreux cations, dont Fe^{2+} qui est un catalyseur d'oxydation. La quercétine en particulier est connue pour ses propriétés de chélation et de stabilisation du fer, cette propriété expliquerait leurs effets antioxydants et éliminant ainsi un facteur de formation des radicaux libres (AMIOT-CARLIN, 2014 ; OMOBA *et al.*, 2015).

2.4.2.3. L'inhibition de l'activité enzymatique pro-oxydante

L'activité antioxydante est également assurée via l'inhibition des activités enzymatiques pro-oxydantes génératrices d'ERO et par la modulation des voies de signalisation intracellulaires contrôlant l'expression des enzymes antioxydantes par l'induction de leurs biosynthèse (KYSELOVA, 2011 ; ACHAT, 2014 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014).

2.5. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres tels que les peroxydes $ROO\bullet$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), réduction des ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH \bullet (DiPhenyl-PicrylHydrazyle (POPOVICI *et al.*, 2009).

Le test au radical libre DPPH \bullet est recommandé pour des composés contenant des groupes SH, NH et OH. Il s'effectue à température ambiante, ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (POPOVICI *et al.*, 2009).

3. Activités thérapeutiques des polyphénols

Contrairement aux composés pharmacologiques qui agissent spécifiquement via un récepteur ou une voie de signalisation, les polyphénols ont des modes d'action multi-cibles. De nombreuses études *in vitro* montrent que les flavonoïdes pourraient affecter leurs cibles biologiques en modulant certaines activités enzymatiques, l'expression de gènes ou bien la signalisation cellulaire, en interagissant avec des récepteurs membranaires ou cellulaires, ou via des régulations épigénétiques et ce d'après MORAND et MILENKOVIC (2014).

Les polyphénols sont reconnus pour leurs activités antimutagène, insecticide, ostrogénique, kératolytique, anti-inflammatoire, antioxydante, anticancérogène, antinéoplasique, antimicrobienne (effet bactéricide et bactériostatique), antivirale, anti-thrombotique, antiallergique, cardioprotecteur due à leurs effets vasodilatateurs (DONG *et al.*, 2014; RENARD *et al.*, 2014 ; TEH *et al.*, 2014 ; TUSZYŃSKA, 2014 ; GBOHAIDA *et al.*, 2015 ; MRAIHI *et al.*, 2015 ; SIMONE *et al.*, 2016 ; CASTRO-AVAQUEZ, 2016 ; RAWSON *et al.*, 2016).

En outre, certains polyphénols exercent des actions hormonales, des effets inhibiteurs sur la résorption osseuse et contribuent à établir le système immunitaire du corps en inhibant l'angiogenèse nécessaire à la croissance tumorale (MOJZER *et al.*, 2016). Plusieurs flavonoïdes tels que la catéchine, l'apigénine, la quercétine, la naringénine et la rutine sont signalés pour leurs activités hépatoprotectives (OMOBA *et al.*, 2015 ; SALAMA *et al.*, 2016).

Les flavonoïdes d'agrumes, en particulier l'hespéridine et l'hespéritine, ont montré une large gamme de propriétés thérapeutiques telles que les activités anti-tumorales anti-inflammatoires, antihypertenseurs, diurétiques, analgésiques, hypolipidémiques et antioxydants (KLIMCZAK *et al.*, 2007 ; YANG, 2014).

3.1. Activité anticancéreuse

Parmi la large gamme de propriétés biochimiques et pharmacologiques des flavonoïdes, leur prévention du cancer est l'une de leurs activités les plus étudiées. Les flavonoïdes alimentaires peuvent inhiber la formation de tumeur et la prolifération de cellules cancéreuses à travers divers mécanismes biologiques (SOUSA *et al.*, 2013).

Les flavonoïdes exercent des fonctions chimiothérapeutiques par leurs interactions avec les enzymes de la famille CYP, notamment avec les résidus d'acides aminés des sites actifs de CYP2C9 et CYP1A2, et en subissant un métabolisme oxydatif par le cytochrome P450 à des produits de conversion, qui inhibent la croissance de cellules tumorales (SOUSA *et al.*, 2013 ; RAWSON *et al.*, 2014).

Les flavonoïdes d'agrumes (FPH et FPM) pourraient être des agents anticancéreux efficaces, en particulier contre le cancer de la peau, du colon, de la prostate, des poumons et du foie (RAWSON *et al.*, 2014). Les PMF ont démontré l'inhibition de la croissance des lignées de cellules leucémiques humaines (HL-60). Les PMF dont la tangerétine ont joué un rôle inhibiteur important dans la phase de prolifération et de métastase des cellules cancéreuses, en inhibant l'adhésion et l'invasion cellulaire, et par l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1, par l'inhibition de la cycline kinase dépendante et le facteur IGF-1, réduisant ainsi

le potentiel métastatique des tumeurs (KUMAR *et al.*, 2014 ; RAWSON *et al.*, 2014 ; MOJZER *et al.*, 2016).

Les polyphénols peuvent également supprimer les effets secondaires de certaines thérapies, déjà utilisées dans le traitement du cancer comme la chimiothérapie et la radiothérapie, et améliorer leurs actions (MOJZER *et al.*, 2016).

3.2. Activité anti-inflammatoire

La peau d'orange est riche en flavonoïdes, y compris les dérivés méthylés tels que les polyméthoxyflavones (FPM) qui présentent de forts effets anti-inflammatoires ; à la fois au niveau de l'expression des gènes et de l'activité enzymatique. En outre, l'induction de l'apoptose par la signalisation calcique via les PMF, peut atténuer l'inflammation (RAWSON *et al.*, 2014).

Les FPM telles que la tangerétine et la nobiletine, se sont révélés d'avoir des effets anti-inflammatoires élevés ; par l'inhibition de la phospholipase PLA2, la cyclooxygénase COX-2, le facteur de nécrose tumorale TNF- α , la lipoxycgénase 15-LOX et les interleukines IL-1 β et IL6 dans différents modèles cellulaires (GOSSLAU *et al.*, 2014). Ainsi que la régulation négative des gènes inflammatoires par PMF qui correspond à la suppression de NFB (nuclear factor – kappa B), et des facteurs de transcription AP-1 et CREB (GOSSLAU *et al.*, 2014).

D'après HIGAZY et IBRAHIUM (2012), les flavonoïdes sont des anti-inflammatoires par leur effet d'anti-péroxydation des lipides.

3.3. Activité antidiabétique

Plusieurs mécanismes sont attribués aux flavonoïdes pour l'activité antidiabétique. Les flavonoïdes empêchent le diabète par leur effet antioxydant (TEH *et al.*, 2014 ; KASALI *et al.*, 2016).

Le tableau IV qui suit, résume les principales activités thérapeutiques des polyphénols et leurs mécanismes d'action.

Tableau IV : Quelques activités thérapeutiques des polyphénols et modes d'action.

Activité	Composés	Mode d'action	Références
Activité antimicrobienne	quercétine-3-O-glycoside	<ul style="list-style-type: none"> - L'inhibition de la formation des biofilms ; - La réduction des ligands d'adhésion à l'hôte et - La neutralisation des toxines bactériennes. 	AKROUM <i>et al.</i> , 2009 ; NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2014 ; ALAM <i>et al.</i> , 2016 ; RAFIQ <i>et al.</i> , 2016.
Activité anticancéreuse	FPH et FPM, quercétine, catéchine, isoflavones, lignanes, flavanones	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la formation de tumeurs, la prolifération de cellules cancéreuses. - Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses par : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Inhibition du NF-κ B et ✓ Interaction avec les récepteurs d'œstrogènes et les enzymes métabolisant ces œstrogènes (enzymes de la famille CYP). - Inhibition de l'adhésion cellulaire et l'invasion et - inhibition des IGF-1 et la Cdk (arrêt du cycle cellulaire). 	KOFFI <i>et al.</i> , 2010 ; KYSELOVA., 2011 ; SOUSA <i>et al.</i> , 2013 ; GOSSLAU <i>et al.</i> 2014 ; RAWSON <i>et al.</i> , 2014 ; MOJZER <i>et al.</i> , 2016.
Activité antidiabétique	hesperitine, naringénine tangerétine nobiletine	<ul style="list-style-type: none"> - Effet antioxydant ; - Diminution des dépôts de glucose périphérique et - Régulation de l'expression des transporteurs de glucose. 	EVANS <i>et al.</i> , 2012 ; KASALI <i>et al.</i> , 2016.
Activité cardio-protectrice	les flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Effet vasodilatateur et - Effet antioxydant des LDL. 	KOFFI <i>et al.</i> , 2010 ; NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2014.

NF-κ B: nuclear factor-kappa B, IGF-1: insulin-like growth factor-1, CYP: cytochrome p, LDL:

Tableau IV : Quelques activités thérapeutiques des polyphénols et modes d'action (suite).

Activité	Composés	Mode d'action	Références
Activité anti-inflammatoire	PMF (tangerétine et la nobiletine), hesperitine et naringénine	<ul style="list-style-type: none"> - Effet sur l'expression des gènes (régulation négative des gènes inflammatoires) - Effet sur l'activité enzymatique ; - Apoptose par la signalisation calcique ; - Inhibition de PLA2, cyclooxygénase COX-2, iNOS, TNF-α, 15-LOX, IL-1β, IL-6 par PMF et - Effet antioxydant. 	KOFFI <i>et al.</i> , 2010 ; EVANS <i>et al.</i> , 2012 ; HIGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; GOSSLAU <i>et al.</i> , 2014 ; RAWSON <i>et al.</i> , 2014 ; ALAM <i>et al.</i> , 2016.
Effet anti-obésité	les flavonoïdes (PMF)	<ul style="list-style-type: none"> - Apoptose des adipocytes ; - Interférer dans le contrôle de faim et de satiété et - Réduction de différenciation des adipocytes. 	NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2014.
Protection contre les troubles neuro-dégénérative	les flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Effet antioxydant ; -Modulation de l'activité neuronale ; - Protéger les neurones contre les blessures induites par les neurotoxines ; -Supprimer la neuroinflammation et -Potentiel de la promotion de la mémoire. 	KEERTHI <i>et al.</i> , 2014 ; NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2014 ; CASTRO-VAZQUEZ, 2016.

4. Activité antimicrobienne et antivirale

Avec la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques suite à une mauvaise utilisation et d'une prescription excessive, il est nécessaire de développer de nouveaux antibiotiques pour surmonter ce problème de résistance. Les plantes ont été utilisées pendant

des siècles pour traiter les maladies infectieuses et présentent une source évidente de nouveaux composés antimicrobiens (ELLOF *et al.*, 2005 ; SAYARI *et al.*, 2016).

Les antimicrobiens d'origine végétale sont efficaces pour traiter les maladies infectieuses, tout en atténuant simultanément plusieurs effets secondaires, souvent associés aux antimicrobiens synthétiques (ABOSHORA *et al.*, 2014).

Les polyphénols sont dotés d'activité antimicrobienne et antivirale (ALAM *et al.*, 2016 ; RAFIQ *et al.*, 2016). Les flavonoïdes de la *Mentha langifolia* ont permis l'inhibition de certains microorganismes responsables des infections urinaires, intestinales et respiratoires chez l'homme. Parmi les flavonoïdes identifiés, la quercétine-3-O-glycoside a montré une bonne activité antibactérienne (AKROUM *et al.*, 2009 ; EDZIRI *et al.*, 2012).

L'étude réalisée par (EDZIRI *et al.*, 2012) a montré que les extraits polyphénoliques de la plante *Marrubium deserti*, exercent une activité antivirale contre le virus Coxsackie B3. Les extraits de la plante du romarin et des herbes de Provence ont une activité antivirale contre le HIV-1. En outre, certaines fractions de flavonoïdes et proanthocyanidines, obtenus à partir de la plante *Crataegus sinatia*, possèdent une activité antivirale vis-à-vis du virus HSV-1.

L'étude menée par (BOBIS *et al.*, 2015) a révélé l'effet antibactérien des extraits phénoliques de différentes plantes médicinales contre des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*), et partiellement contre des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*).

D'après (ANITHA *et al.*, 2016), les extraits de jus d'orange douce peuvent être utilisés comme agent antibactérien efficace contre les bactéries résistantes aux médicaments telles que : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus aureus*.

L'activité antimicrobienne des polyphénols peut impliquer des mécanismes complexes, tels que l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, des protéines, ainsi que l'inhibition du métabolisme des acides nucléiques (ABOSHORA *et al.*, 2014). Les flavan-3-ols, flavonols, et les tannins sont capables de supprimer les facteurs de virulence par l'inhibition de la formation du biofilm, la réduction des récepteurs de ligands d'adhésion à l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes (DAGLIA, 2012 ; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Selon DAGLIA (2012), les flavonols ont une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries Gram positif. Certains flavonoïdes ont une activité antibactérienne supérieure à celle de la tétracycline ou de la vancomycine, à des concentrations équivalentes. Par ailleurs, les polyphénols exercent un effet synergique avec les antibiotiques (ALBUQUERQUE *et al.*,

2013). Les activités antimicrobiennes de certains polyphénols sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau V : Quelques activités antimicrobiennes des polyphénols (DAGLIA, 2012 ; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Classe des polyphenols		Activité		
		Antibacterienne	Antifongique	Antivirale
Les flavonoids		<i>V.cholerae, S.mutans, C.jejuni, E.coli, B.cereus, C.perfringens, H.pylori, S.aureus, L.acidophilus, P.gingivalis, A.naeslundii, P.melaninagem, P.oralis, F.nucleatum, C.pneumonia.</i>	<i>C.albicans, M. gypseum, T.mentagrophytes, T.rubrum</i>	Adenovirus Enterovirus Flavivirus HIV
Les acides phénoliques		<i>S.aureus, L.brevis, L.fermentum, L.monocytogenes, E. coli, P.aeruginosa, B.cereus, B.megaterium, B. subtilis, M.tuberculosis.</i>	<i>C.albicans, C.krusei, C.parapsilosis, C.tropicalis</i>	HIV
Les coumarines		<i>S.mutans, S.aureus.</i>	<i>C.albicans</i>	
Les lignanes		<i>P.acnes, S. aureus, E.faecalis, E.coli, M.tuberculosis.</i>		HIV
Tannins	condensés	<i>S.mutans, E.coli, S.aureus.</i>	<i>C.albicans</i>	Influenza A, Herpes simplex (type 1), HIV
	hydrolysables	<i>Salmonella, Staphylococcus, Helicobacter, E.coli, Bacillus, Clostridium, Campylobacter, Listeria.</i>	<i>C.parapsilosis</i>	Epstein-Barr virus, Herpes virus HIV 1 et 2
Les stilbènes		<i>S. aureus, P. aeruginosa, P. syringae, B. subtilis.</i>	<i>A niger, B.cinerea, C.herbarum,c M.aucupariae.</i>	

5. Intérêt des polyphénols dans l'industrie agroalimentaire

Les principales causes de la détérioration des aliments, en particulier les produits à base de viande, sont l'oxydation des lipides et l'auto-oxydation. Des antioxydants synthétiques ont

été utilisés depuis des années pour éviter cette oxydation lipidique, qui peut modifier les paramètres de la qualité de la viande tels que la couleur, la saveur, l'odeur et la texture et même de la valeur nutritionnelle (RAFIQ *et al.*, 2016).

Pour surmonter les inconvénients de l'utilisation d'antioxydants synthétiques dans les produits à base de viande, les extraits de poudres d'agrumes peuvent être utilisés comme alternative plus sûre que les produits synthétiques (RAFIQ *et al.*, 2016). D'autre part, les extraits polyphénoliques de feuilles d'olives seraient des agents de conservation de viandes fraîches, suite à l'effet antibactérien de ces extraits manifestés contre certaines bactéries incriminées dans l'altération de ces viandes.

6. Industrie pharmaceutique

Les anthocyanines sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique, pour produire divers suppléments alimentaires à forte valeur ajoutée, biologiquement actifs, et qui sont principalement utilisés en ophtalmologie. Les anthocyanines sont facilement accumulées dans les tissus de la rétine, tout en renforçant les vaisseaux sanguins et en réduisant la perméabilité capillaire et la fragilité dans la rétine (SIMONE *et al.*, 2016 ; ZHIRKOVA *et al.*, 2016).

Chapitre III : L'orange

1. Généralités

L'orange est le fruit savoureux et juteux avec un petit arbre à feuilles persistantes, botaniquement connu sous le nom de *Citrus sinensis* et appartenant à la famille des *Rutaceae*. Elle est originaire du sud de la Chine, où elle a été cultivée pendant des millénaires (ETEBU et NWAUSOMA, 2014 ; OMOBA *et al.*, 2015 ; DORCAS *et al.*, 2016 ; RAFIQ *et al.*, 2016 ; SHETTY *et al.*, 2016).

Les agrumes sont maintenant cultivées dans le monde entier, ce sont l'une des cultures fruitières mondiales les plus importantes et populaires notamment *Citrus sinensis* L. Elles sont appréciées pour leurs jus et leurs bienfaits multiples sur la santé humaine. (ESCARTIN, 2011 ; HIRRI *et al.*, 2015 ; PALOU *et al.*, 2015 ; SHETTY *et al.*, 2016).

La production mondiale d'agrumes a significativement augmenté au cours des dernières années, elle est estimée à plus de 123 millions de tonnes en 2013, dont les oranges sont commercialement les agrumes les plus importants (PALOU *et al.*, 2015 ; LOUAILECHE *et al.*, 2015 ; OMOBA *et al.*, 2015 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Les pays les plus grands producteurs sont le Brésil, la Chine, les États-Unis, l'Inde, le Mexique, le Pakistan, le Japon et l'Espagne (PALOU *et al.*, 2015 ; TAWANDA *et al.*, 2015 ; SIMONE *et al.*, 2016).

2. Systématique de l'orange

Selon MILIND et DEV (2012), la classification botanique de l'orange douce est la suivante :

- Règne : Plantes
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Sapindales
- Ordre : Rosidae
- Famille : *Rutaceae*
- Sous-famille : Aurantioideae
- Genre : *Citrus*
- Sous-genre : Papeda
- Espèce : *Sinensis*

L'oranger est un arbre au port harmonieux et de croissance rapide, de 7,5 m de hauteur et dans certains cas jusqu'à 15 m. Son aspect est plutôt arrondi ou parfois en colonne. Les branches portent des feuilles vert sombre, ovales, coriaces et finement denticulées, le pétiole est légèrement ailé. Les fleurs sont très odorantes, à cinq pétales blancs recourbés vers l'arrière (ESCARTIN, 2011 ; ETEBU et NWAUSOMA, 2014).

3. Anatomie et description des fruits d'agrumes (l'orange)

D'après ESCARTIN (2011), le fruit est une baie généralement ronde, sa couleur et sa grosseur varient sensiblement selon la variété.

Le fruit est composé de peau, de pulpe, de graines et de jus. L'écorce représente entre 50 et 65 % du poids total du fruit (HEGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; OMOBA *et al.*, 2015 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Les fruits d'agrumes dont l'orange fait partie (figure 14), sont composés des éléments suivants :

- L'écorce est la couche externe du fruit qui est constituée de :
 - Epiderme de cire épicuticulaire avec de nombreuses petites glandes d'huiles aromatiques, qui donnent l'odeur particulière des agrumes (ETEBU et NWAUSOMA, 2014 ; FAVELA-HERNANDEZ *et al.*, 2016) ;
 - Péricarpe qui se compose selon (ETEBU et NWAUSOMA, 2014 ; FAVELA-HERNANDEZ *et al.*, 2016 ; RAFIQ *et al.*, 2016) de :
 - Epicarpe externe ou flavedo, qui est la surface périphérique colorée, très fine et très fragile, constitué en grande partie de cellules parenchymateuses et de la cuticule ;
 - Mésocarpe ou albédo, qui correspond à la couche douce et blanche au milieu, située sous le flavedo, très riche en flavonoïdes, il se compose de cellules tubulaires semblables réunies pour constituer la masse tissulaire comprimée dans la zone intercellulaire.
- L'endocarpe ou la pulpe avec sac de jus, généralement formée de 10 à 14 segments de jus remplis de saveur allant d'aigre à douce. Le fruit contient habituellement une pâte douce et quelques à de nombreuses graines à l'intérieur (ETEBU et NWAUSOMA, 2014 ; FAVELA-HERNANDEZ *et al.*, 2016 ; OULDYEROU *et al.*, 2016).
- Les graines sont pâles, blanchâtres ou verdâtres, aplaties et angulaires. Elles sont généralement polyembryonies, ce qui signifie qu'elles ont des embryons multiples qui peuvent germer d'après MILIND et DEV (2012).

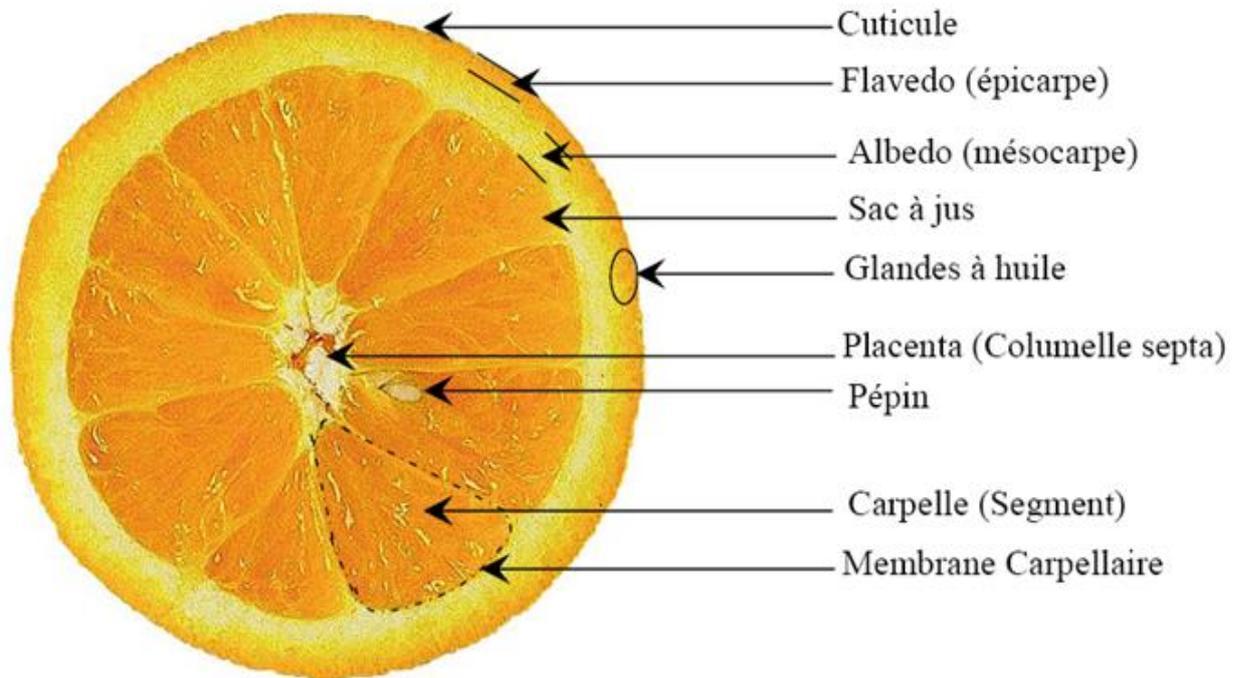


Figure 14 : Anatomie du fruit d'orange (OULDYEROU *et al.*, 2016 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

4. Valeur nutritionnelle et thérapeutique des agrumes

Il est bien connu que la composition chimique du jus d'agrumes varie avec les cultivars. La composition chimique des agrumes est le résultat de l'influence combinée des mécanismes génétiques et des facteurs chimiques, biologiques et environnementaux (HIRRI *et al.*, 2015).

Les agrumes contiennent des substances phytochimiques actives qui peuvent protéger la santé. Ce sont une source importante de vitamine A et C, d'acide folique, de fibre alimentaire, de potassium, de pectine et de composés polyphénoliques comme les flavonoïdes, les coumarines, les limonoïdes et les caroténoïdes (KLIMCZAK *et al.*, 2007 ; POLINATI *et al.*, 2010 ; HEGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; NAKAJIMA *et al.*, 2014 ; HIRRI *et al.*, 2015 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

La composition nutritionnelle des fruits d'orange est indiquée dans le tableau ci-après.

Tableau VI : Composition nutritionnelle de *Citrus sinensis* (ETEBU et NWAUSOMA, 2013).

Composition	quantité	Composition	quantité
Energie	197 kJ (47 kcal)	Vitamine C	3,2 mg (64%)
Sucres	9,35 g	Vitamine E	0,18 mg (1%)
Protéines	0,94 g	Choline	8,4 mg (2%)
Lipides	0,12 g	Folate (vit. B9)	30 µg (8%)
Eau	86,75 g	Calcium	40 mg (4%)
Fibres diététiques	2,4 g	Magnésium	10 mg (3%)
Riboflavine (vit. B2)	0,04 mg (3%)	Phosphore	14 mg (2%)
Acide pantothénique (vit B5)	0,25 mg (5%)	Zinc	0,07 mg (1%)
Vitamine A.	11 µg (1%)	fer	0,1 mg (1%)
Thiamine (vit. B1)	0,087 mg (8%)	Manganèse	0,025 mg (1%)
Niacine (vit. B3)	0,282 mg (2%)	Potassium	181 mg (4%)
Vitamine B6	0,060 mg (5%)	/	/

5. L'espèce *Citrus aurantium* (orange amère)

Citrus aurantium (orange amère) est une plante appartenant à la famille des *Rutaceae* la plus importante. Les constituants biologiquement actifs des fruits de *C. aurantium* sont la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les limonoïdes, les huiles essentielles, les minéraux et le complexe de vitamine B qui seront responsables des propriétés pharmacologique de la plante (SURYAWANSHI, 2011 ; DORCAS *et al.*, 2016).

Citrus aurantium diffère de *Citrus sinensis* par sa pulpe acide et son albédo qui est plus amère. Le goût acide et très amer de son jus le rend impropre à la consommation (ESCARTIN, 2011 ; DORCAS *et al.*, 2016).

Description de la plante

Selon GHEDIRA et GOETZ (2015), le *Citrus aurantium* ou le bigaradier (figure 15) est un arbuste atteignant 5 m à 8 de hauteur, à tronc ramifié, à feuillage toujours vert brillant et à floraison abondante. Les feuilles sont entières, elliptiques et persistantes. Les fleurs actinomorphes d'un blanc très pur, d'odeur agréable sont groupées par 2 à 3 à l'aisselle des feuilles et possèdent 5 à 8 pétales charnus ponctués de poches sécrétrices à huile essentielle.

De nombreuses étamines présentent un filet fusionnant en larges faisceaux dans la partie basale. La récolte des fleurs a lieu de Mars à fin Avril. Le fruit est multiloculaire récolté de

Janvier à Mars, possède une partie blanche ou mésocarpe plus épaisse que celle de l'oranger doux. La récolte des feuilles et des rameaux se fait de Mai à Juin.



Figure 15 : Fleurs, feuilles et fruit de *Citrus aurantium* (GHEDIRA et GOETZ, 2015).

6. Utilisation des agrumes

Les extraits de différentes parties végétales d'agrumes ont montré des propriétés antimicrobiennes, et en tant que tels présentent une application pénétrante dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (MEHRA *et al.*, 2015).

6.1. Industrie alimentaire et utilisation culinaire domestique

Les agrumes sont très consommés dans le monde entier, soit frais ou comme jus en raison de leur valeur nutritionnelle et de leur saveur particulière (ADNAN *et al.*, 2014 ; OULDYEROU *et al.*, 2016 ; RAFIQ *et al.*, 2016). Une grande partie de la production est orientée vers l'industrie de l'extraction de jus (HEGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; OMOBA *et al.*, 2015 ; PALOU *et al.*, 2015 ; RAFIQ *et al.*, 2016). Environ 34% des fruits sont utilisés pour la production de jus (RAFIQ *et al.*, 2016), ce qui provoque environ 44% des peaux en tant que sous-produits (OMOBA *et al.*, 2015 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Les huiles essentielles de l'écorce d'orange sont utilisées en industrie agroalimentaire, pour donner de la saveur aux aliments (ESCARTIN, 2011 ; KAROUI et MARZOUK, 2013 ; DJENANE, 2015 ; AL-SNAFI, 2016). Selon MILIND et DEV (2012), le zest de l'écorce d'orange est encore utilisé dans des préparations culinaires telles que les plats cuisinés, la pâtisserie, salades et confitures.

6.2. Industrie pharmaceutique

De nombreuses propriétés thérapeutiques ont été attribuées aux agrumes, telles que les activités antivirales, anticancéreuses et anti-inflammatoires (HIRRI *et al.*, 2015).

Les quantités élevées de composés bioactifs disponibles dans les agrumes, comme les flavonoïdes, les caroténoïdes, les vitamines, les limonoïdes, les huiles essentielles et les minéraux sont considérés comme responsables des nombreux avantages pour la santé (ADNAN *et al.*, 2014 ; LOUAILECHE *et al.*, 2015 ; HIRRI *et al.*, 2015 ; RAFIQ *et al.*, 2016).

Des études ont montré que les extraits d'écorce de *C. sinensis* et *C. limon* sont aussi efficaces que les antibiotiques synthétiques, la pénicilline et la méthicilline (MEHRA *et al.*, 2015).

D'après (FRANCO *et al.*, 2008 ; SURYAWANSHI, 2011 ; MILIND et DEV, 2012 ; FAVELA-HERNANDEZ *et al.*, 2016 ; SHETTY *et al.*, 2016), les flavonoïdes, les caroténoïdes, la vitamine C et les huiles essentielles (lemonine, linalol et myrcène) confèrent à l'orange une activité antioxydante, antifongique, antimicrobienne, anticancérogène, antidiabétique, hypo-cholestérolémique et permettent une protection cardiovasculaire.

Les huiles essentielles des agrumes, d'après KAROUI et MARZOUK (2013), sont aussi employées dans l'industrie pharmaceutique pour masquer le goût désagréable de certains médicaments.

6.3. Industrie cosmétique

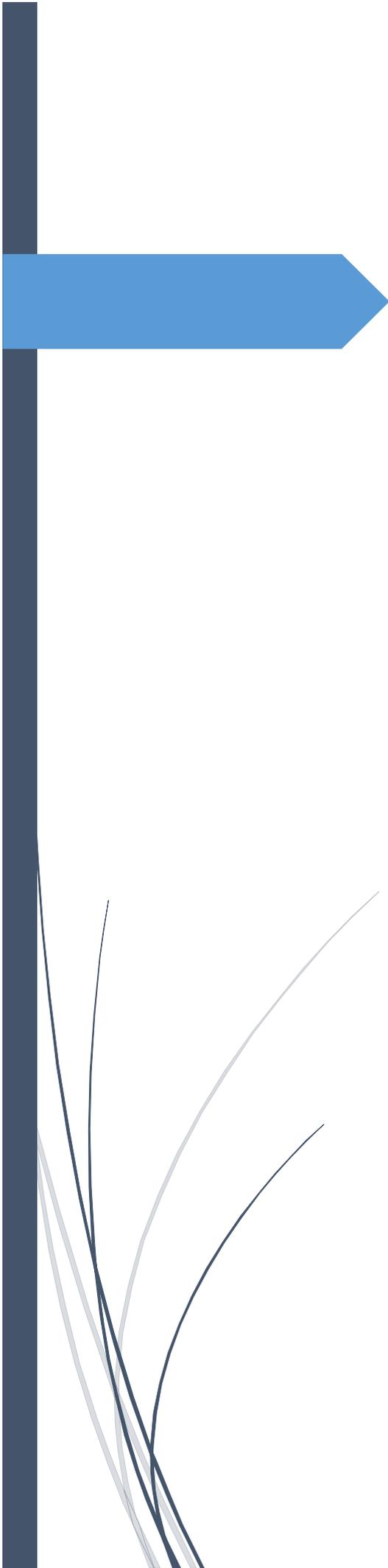
Les huiles essentielles des oranges (douces et amères), les extraits d'écorces d'orange (*Citrus Aurantium*) ainsi que les graines sont employés pour la fabrication des savons, parfums, produits de soins et exfoliants (ESCARTIN, 2011 ; SURYAWANSHI, 2011 ; DJENANE, 2015 ; AL-SNAFI, 2016).

7. Valorisation des sous-produits d'orange

L'écorce et les graines entraînent une quantité considérable de sous-produits (OMOBA *et al.*, 2015 ; OULDYEROU *et al.*, 2016). L'écorce d'orange est plus riche en polyphénols que la partie comestible du fruit (TEH *et al.*, 2014), ce qui lui confère une activité antioxydante et des effets thérapeutiques importants par rapport à d'autres parties du fruit (RAFIQ *et al.*, 2016 ; OULDYEROU *et al.*, 2016). Mais plus souvent, elle est éliminée comme déchets contenant une grande variété de composants secondaires et d'huile essentielles.

Les sous-produits d'agrumes pourraient être utilisés, en industries alimentaire, comme ingrédients bioactifs dans la production d'aliments fonctionnels, car ils sont de bonnes sources de fibres alimentaires et de composés bioactifs. L'écorce d'orange est une bonne source de

composés phénoliques susceptibles d'être utilisés dans des formulations alimentaires ou lorsqu'ils sont extraits, peuvent être utilisés comme antioxydants naturels pour empêcher l'oxydation d'aliments sélectionnés (OMOBA *et al.*, 2015).



Partie pratique

Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué au niveau des laboratoires communs I et II d'analyses physico-chimiques, le laboratoire pédagogique de microbiologie et le laboratoire d'analyses biochimiques et biotechnologiques (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMARI de Tizi Ouzou, durant la période allant du mois de Février au mois de Juillet de l'année 2017.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Notre étude est réalisée sur les pépins et les écorces de deux espèces d'orange : *Citrus aurantium* ou l'orange amère présentée (figure 16) et *Citrus sinensis* ou l'orange douce (figure 17) dont les données sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII : Date et lieu de collecte des fruits étudiés.

Espèce d'orange	Date de collecte	Lieu de collecte
<i>Citrus aurantium</i>	Mars et Avril	Région « Ouacif »
<i>Citrus sinensis</i>	Février et Mars	Région « Chamlal »



Figure 16 : *Citrus aurantium*.
(Originale)



Figure 17 : *Citrus sinensis*.
(Originale)

1.2. Matériel du laboratoire

La réalisation de la présente étude a nécessité l'emploi des produits résumés dans le tableau VIII ci-après.

Tableau VIII : Produits utilisés dans l'étude.

	Source	Utilisation
Solvants		
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma Aldrich (Allemagne)	Diffusion des extraits dans le milieu Mueller-Hinton
Eau distillée	/	Extraction des polyphénols
Ethanol	Sigma Aldrich (Allemagne)	Extraction des polyphénols
Methanol	Sigma Aldrich (Allemagne)	Solubilisation et conservation des extraits
Réactifs		
Folin- Ciocalteu	Sigma Life Science (Allemagne)	Dosage des polyphénols totaux
Carbonate de sodium	BiochemChemopharma (Québec)	Dosage des polyphénols totaux
Acide gallique	BiochemChemopharma (Québec)	Polyphénol standard
Nitrite de sodium	BiochemChemopharma (Québec)	Dosage des flavonoïdes totaux
Chlorure d'aluminium	BiochemChemopharma (Québec)	Dosage des flavonoïdes totaux
Hydroxyde de sodium	Riedel-de Haën (Allemagne)	Dosage des flavonoïdes totaux
Quercétine	Sigma Aldrich (Allemagne)	Flavonoïde standard
Tampon phosphate	/	Activité antioxydante
Ferricyanure de potassium	Prolabo (France)	Activité antioxydante
Acide trichloracétique	/	Activité antioxydante
Chlorure ferrique	Sigma Aldrich (Allemagne)	Activité antioxydante
1-1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma Aldrich (Allemagne)	Activité antioxydante
Acide ascorbique	BiochemChemopharma (France)	Antioxydant standard
Sels		
Chlorure de sodium	BiochemChemopharma (France)	Préparation de l'eau physiologique

L'utilisation des milieux de culture indiqués dans le tableau IX ci-après est nécessaire pour la réalisation de l'étude microbiologique.

Tableau IX : Milieux de culture employés.

Milieu	Source	Emploi
Bouillon Cœur-Cervelle (BHIB)*	Himedea (Inde)	Enrichissement des micro-organismes
Gélose Nutritive (GN)*	Himedea (Inde)	Repiquage des souches bactériennes
Gélose Bile Esculine Agar (BEA)	Himedea (Inde)	Isolement et repiquage d'Enterocoques
Mueller Hinton (MH)*	Himedea (Inde)	Aromatogramme
Sabouraud*	Himedea (Inde)	Repiquage des souches fongiques

* : La composition et la préparation des milieux de culture sont détaillées dans l'annexe 01.

1.3. Appareillage

La liste d'appareillage utilisé dans ce travail est détaillée dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X : Appareillage utilisé.

Appareil	Source
Agitateur à barreau magnétique non chauffant	GERHARDT (Allemagne)
Agitateur à barreau magnétique chauffant	RAYPA (Allemagne)
Autoclave	WEBECO (Allemagne)
Bain Marie	MEMMERT (Allemagne)
Balance de précision	SARTORIUS BP121S (Allemagne)
Broyeur électrique	KRUPS 75 (Allemagne)
Centrifugeuse	HETTICH UNIVERSAL / K2S (Allemagne)
Etuve	MEMMERT à 37°C (Allemagne) BINDER à 28°C (Allemagne)
Four Pasteur	BINDER (Allemagne)
Hôte chimique	KÖTTERMANN (Allemagne)
Microscope optique	MOTIC (Allemagne)
pH mètre	HANNA Hi210 (Allemagne)
Réfrigérateur	ENIEM (Algérie)
Rotavapeur	STUART (UK)
Spectrophotomètre Visible	Vis-7220G Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK)
Spectrophotomètre UV-Visible	UV- Vis Medline (UK)
Vortex	HEIDOLPH (Allemagne)

1.4. Souches microbiennes utilisées

Le tableau XI résume les différentes souches microbiennes utilisées pour l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux des sous-produits (écorce et pépins) de *C.sinensis* et *C.aurantium*.

Tableau XI : Les souches microbiennes utilisées.

	Gram	Souches référenciées	Souches non référenciées
Souches bactériennes	Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> MU 50	<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	
	Gram Négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Souches fongiques	Levure	/	<i>Candida albicans</i>
	Moisissure	/	<i>Aspergillus niger</i>

- a) Les souches bactériennes utilisées sont des espèces Gram négatif ou Gram positif, de type:
- Souches référenciées de l'American type culture collection (ATCC), gracieusement fournies par le laboratoire d'analyses biochimiques et biotechnologiques de l'Université Mouloud Maameri.
 - Souches d'origine hospitalières fournies par les responsables de laboratoire de Microbiologie du centre hospitalier universitaire (CHU Nadir Mohamed), à l'exception de *S.aureus* d'origine alimentaire ; de laboratoire d'analyses biochimiques et biotechnologiques (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- b) Les souches fongiques (d'origine alimentaire) sont fournies par le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Toutes les souches ont été identifiées soigneusement dans les laboratoires sources et conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée convenable. Pour une confirmation, une observation à l'état frais (les espèces fongiques) et une coloration de Gram (espèces bactériennes) ont été réalisées.

1.5. Antibiotiques et antifongique utilisées

Le tableau XII porte quelques informations sur les antibiotiques utilisés.

Tableau XII : Antibiotiques et antifongique utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne.

	Code	Dose	Compagnie
Antibiotique			
Amoxicilline	AM	25 µg/disque	
Chloramphénicol	C	30 µg/disque	Himedia
Imipénème	I	10 µg/disque	(Inde)
Néomycine	N	30 µg/disque	
Céfazoline	CZ	30 µg/disque	
Colistine	CS	50 µg/disque	Biorad (France)
Pénicilline	P	06 µg/disque	
Rifampicine	RA	05 µg/disque	
Céfotaxime	CTX	30 µg/disque	
Cefoxitine	FOX	30 µg/disque	Bioanalyse
Trimethoprim / Sulfamethoxazole	SXT	1,25 µg/disque / 23,75µg/disque	(Inde)
Antifongique			
Amphotéricine B (Fungizone®)	/	10%	Haupt Pharma (Allemagne)

2. Extraction des polyphénols

2.1. Pré-traitement

Les pépins et l'écorce de chaque fruit sont rincés à l'eau de robinet, afin d'éliminer les impuretés, égouttés puis séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant dix jours pour préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Après séchage, ils sont réduits séparément en une poudre fine prête à l'emploi dans un moulin électrique. La poudre obtenue est conservée dans des flacons ombrés en verre à 4°C, afin de faire l'objet d'une extraction des polyphénols totaux (PPT).

2.2. Préparation des extraits aqueux et organiques par macération

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique, dont l'eau et l'éthanol sont généralement les solvants d'extraction les plus utilisés (TURKMEN *et al.*, 2007).

Les polyphénols selon BOIZOT et CHARPENTIER (2006), sont extraits par macération à 4°C pour empêcher l'action de polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques.

Principe

Il s'agit d'une extraction solide-liquide. Le principe consiste à ce que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur (figure 18). D'après RIBEREAU (1968), l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion.

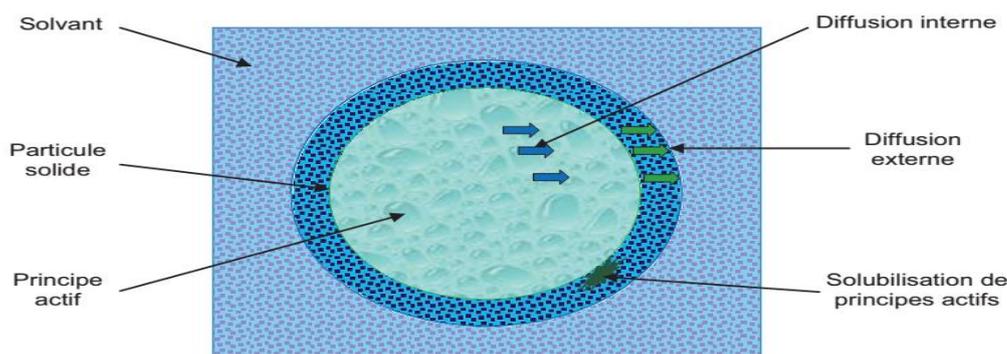


Figure 18 : Illustration du principe d'extraction solide-liquide (MURTO *et al.*, 2004).

Mode opératoire

Pour l'extraction par macération (figure 19), nous avons opté pour le protocole décrit par (MAHMOUDI *et al.*, 2013), en y apportant quelques modifications : 20 g de la poudre fine d'échantillon sont macérés à température ambiante (25 °C), pendant 24 h dans 100 ml d'eau distillée et d'éthanol 95 % (V/V) séparément. Après filtration sur un tissu mousseline, les filtrats sont centrifugés pendant 20 min à 4000 t/min, puis une deuxième filtration sur papier filtre N°1, et enfin le solvant d'extraction est éliminé en utilisant soit le rotavapeur (figure 20) ou l'hôte chimique ou simplement par l'évaporation à l'air libre.

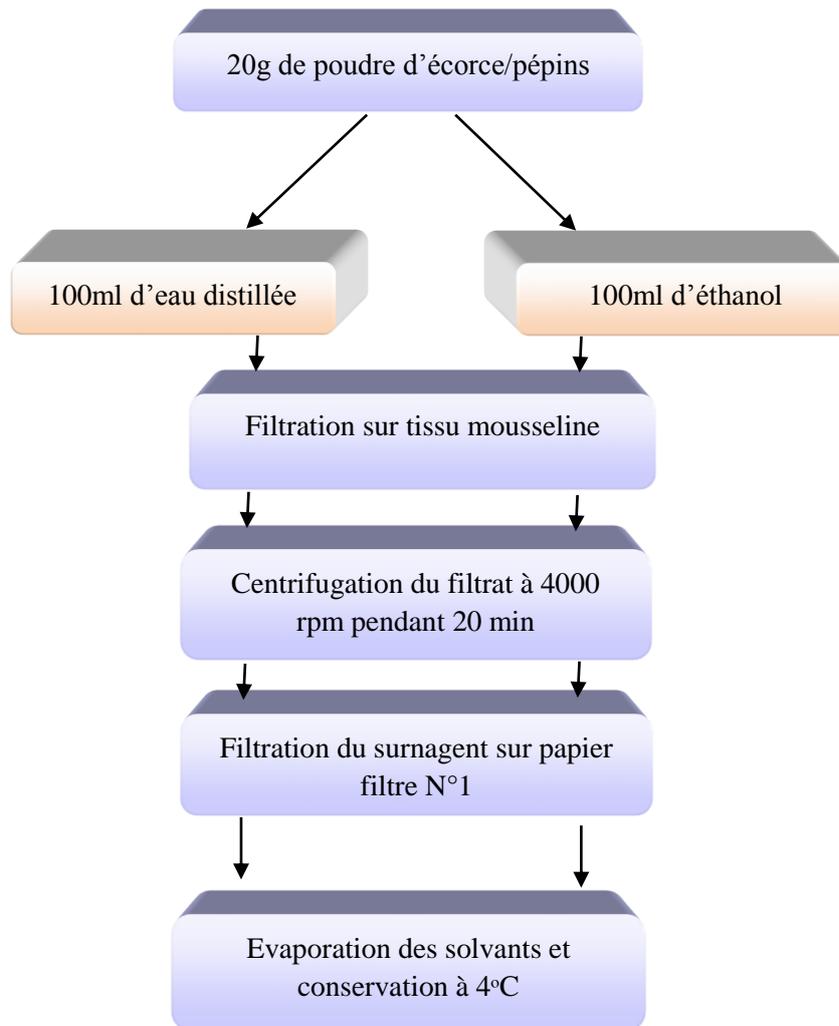


Figure 19 : Schéma du protocole de la préparation des extraits phénoliques.

(MAHMOUDI *et al.*, 2013)



Figure 20 : L'élimination de l'éthanol des extraits organiques par le rotavapeur.

(Originale)

2.3. Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est calculé suivant la formule décrite par (MAHMOUDI *et al.*, 2013). Il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

R : le rendement en % ;

M_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg et

$M_{\text{éch}}$: la masse de la matière sèche végétale en mg.

3. Dosages biochimiques

3.1. Dosage des polyphénols Totaux

Le dosage des polyphénols pour les quatre échantillons est effectué selon la méthode décrite par (TALBI *et al.*, 2015).

Principe

Le réactif de Folin-Cioecalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (SINGLETON et ROSSI, 1965 ; SINGLETON *et al.*, 1999 ; BOIZOT et CHARPENTIER, 2006).

La coloration produite, dont l'absorption est mesurée à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal (STANKOVIĆ, 2011 ; BONNAILLIE *et al.*, 2012).

Mode opératoire

Selon (TALBI *et al.*, 2015), 1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. L'absorbance est mesurée à 760 nm après 2 h d'incubation à température ambiante. Le protocole est élucidé dans la figure 21 qui suit.

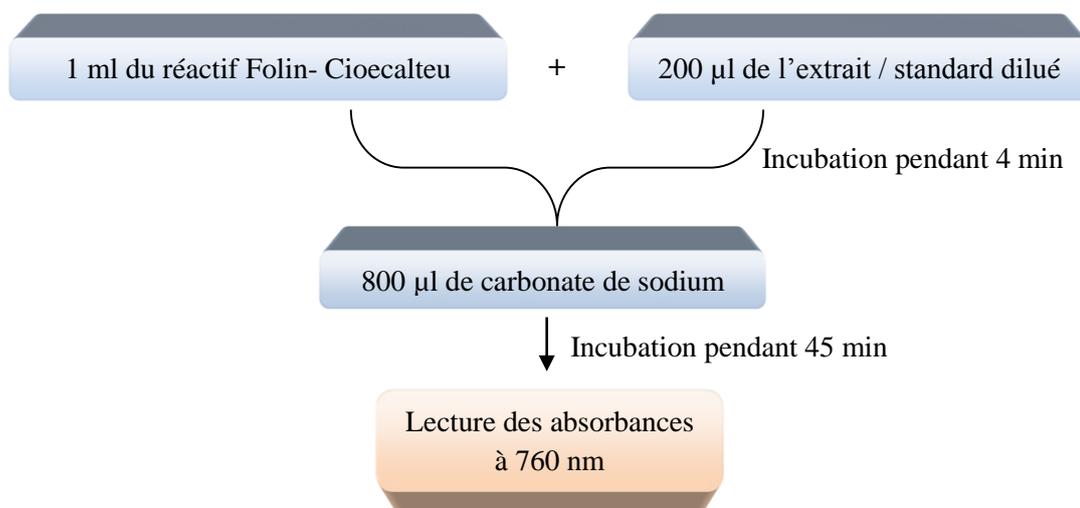


Figure 21 : Schéma du protocole du dosage des polyphénols totaux.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) selon l'équation suivante :

$$T = C \cdot V / M$$

T : Teneur en composés phénoliques (mg EAG / g d'extrait sec de la plante) ;

C : Concentration de l'extrait équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

V : Volume de l'extrait organique ou aqueux (ml) ;

M : Poids de la matière végétale sèche (g).

3.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux (FT) contenus dans les extraits est réalisée par la méthode décrite par (KIM *et al.*, 2003) avec quelques modifications.

Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, qui est susceptible de donner par son groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (RIBEREAU GAYON *et al.*, 1972 ; BOULEKBACHE, 2005).

D'après RIBEREAU (1968), les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux

électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons.

Mode opératoire

Un millilitre de l'extrait convenablement dilué ou de la solution du composé étalon (la quercétine) de concentration de 20, 40, 60, 80 et 100 mg/l, est introduit dans une fiole jaugée de 10 ml contenant au préalable 4 ml d'eau distillée.

- A l'instant ($t = 0$ mn) : 0,3 ml de NaNO_2 à 5 % (P/V) sont introduits ;
- A ($t = 5$ mn) : 0,3 ml de AlCl_3 à 10% sont ajoutés ;
- Six minutes après, 2 ml de NaOH 1M sont ajoutés au mélange et immédiatement 2,4 ml d'eau bidistillée sont additionnés sous une agitation vigoureuse.

L'absorbance est déterminée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

La figure 22 représente les différentes étapes du protocole suivi pour ce dosage.

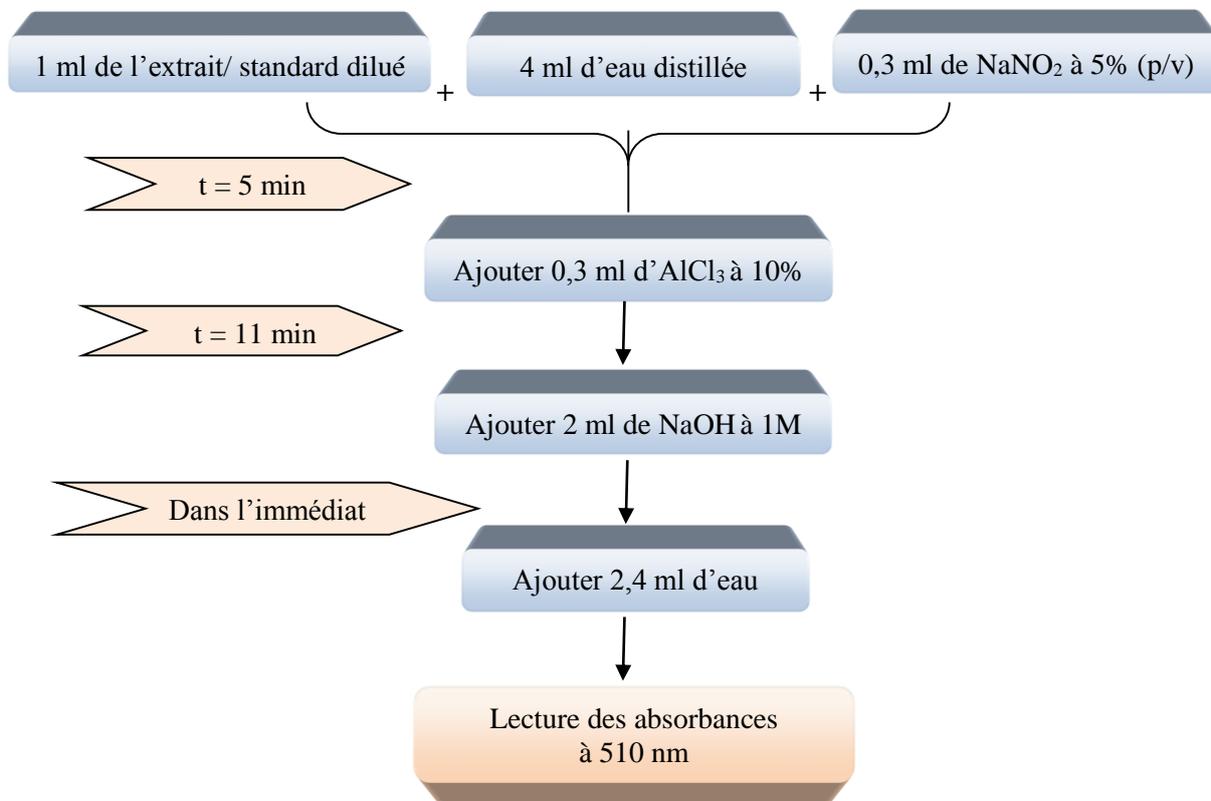


Figure 22 : Schéma du protocole du dosage des flavonoïdes totaux.

3.3. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

3.3.1. Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP)

Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait végétal est associé à son pouvoir antioxydant, l'activité réductrice du fer est déterminée selon la méthode décrite par (OYAIZU, 1986 ; YILDIRIM *et al.*, 2001), basée sur la réaction de réduction de fer ferrique (Fe^{3+}), présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant (DE SANTO *et al.*, 2013). Un mécanisme similaire est représenté dans la figure 23 en remplaçant le ferrocyanure de potassium par le tripyridyl triazine.

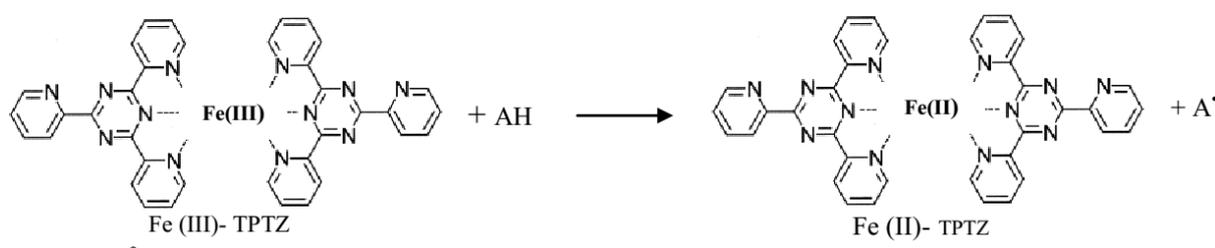


Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyl triazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant AH (DJAHRA, 2014).

La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu-vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de cette coloration mesurée par spectrophotométrie à 700 nm, est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés (PRAKASH *et al.*, 2001 ; KAROUI et MARZOUK, 2013).

Mode opératoire

Le mélange réactionnel est constitué tripyridyl triazine de 400 μl de l'extrait de dilutions allant de 25 à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 μl de tampon phosphate (0,2 M et pH 6,6) et de 400 μl de ferrocyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (p/v).

Une fois incubé pendant 20 minutes à 50°C, ce dernier est additionné de 400 μl d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction, puis une centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm est effectuée. Ensuite, 400 μl du surnageant sont récupérés et complétés de 400 μl d'eau distillée et de 80 μl de chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0,1% (p/v).

La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme référence dans les mêmes conditions opératoires et la même gamme de concentrations (YILDIRIM *et al.*, 2001 ; KAROUI et MARZOUK, 2013).

Le protocole expérimental employé est illustré dans la figure 24 qui suit.

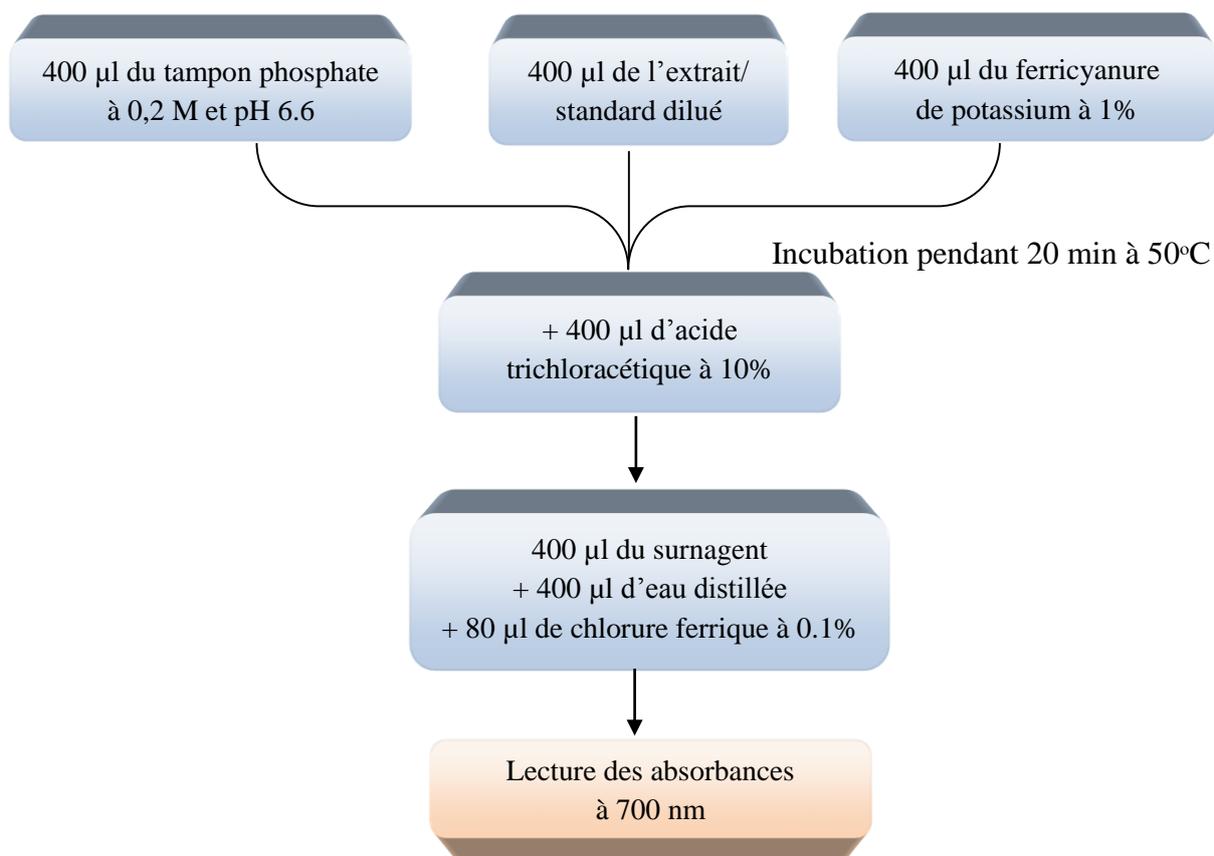


Figure 24 : Schéma du protocole du test de réduction du Fer (FRAP).

3.3.2. Test de piégeage du radical (DPPH)

L'activité antiradicalaire des extraits par la méthode au DPPH a été déterminée en se référant à celle de l'acide ascorbique qui est un antioxydant standard (VIRGINIE *et al.*, 2015).

Du point de vue méthodologique, le test du radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH (SALAH *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé pour les extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques (YI-ZHONG *et al.*, 2006, HATZIDIMITRIOU *et al.*, 2007).

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été retenue pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des plantes, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité de ce radical (BOZIN *et al.*, 2008).

Principe

D'après (ALAM *et al.*, 2013), le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante

des composés phénoliques. (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. De ce fait les molécules du radical ne forment pas des dimères (figure 25).



Radical libre (DPPH)
(Violet)

DPPH-H sous forme réduite
(Jaune)

Figure 25 : Structure de DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH (ROHMAN *et al.*, 2010).

Selon MOLYNEUX (2004), la mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue et le virage vers le jaune, due à une recombinaison des radicaux DPPH, par spectrophotométrie à une longueur d'onde variant entre 515-518 nm.

L'inconvénient de cette méthode est sa sensibilité vers la lumière. Pour cette raison, la réaction doit se faire à l'obscurité (KARSHEVA *et al.*, 2013).

Mode opératoire

Deux millilitres de la solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) sont ajoutés à 50 µl de la solution d'extraits et du standard, le mélange est vigoureusement agité selon MOLYNEUX (2004), puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes (figure 26).

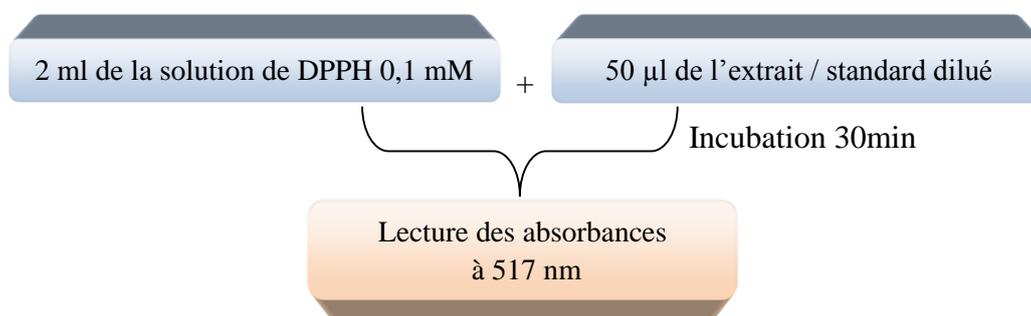


Figure 26 : Schéma du protocole du test de piégeage du radical DPPH.

Le blanc est représenté par le méthanol, le témoin négatif est composé de 2 ml de la solution méthanolique de DPPH. Le témoin positif est représenté par une solution

méthanolique d'un antioxydant standard « l'acide ascorbique ». Les lectures sont effectuées à 517 nm.

L'activité antioxydante est définie par l'indice de réduction de l'activité antiradicalaire exprimé en pourcentage % du RSA (Radical Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange exempt d'antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t, selon l'équation décrite par (TALBI *et al.*, 2015).

$$\% \text{ RSA} = (\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}} \times 100$$

Où : « Abs » est l'absorbance des échantillons à 517 nm.

Les résultats sont la moyenne de deux mesures séparées \pm écart type.

Etant donné que l'indice de réduction relative (% RSA) indique seulement la capacité de l'échantillon à une concentration fixée de réduire ou non les radicaux, la réactivité est estimée par l'IC 50 (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC 50 (Efficient concentration 50), qui correspond à la concentration de l'échantillon testé, nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH (SAMARATH *et al.*, 2008).

Les IC 50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés et du standard (TORRES *et al.*, 2006).

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Principe

Le principe d'évaluation de l'activité antimicrobienne des polyphénols consiste à réaliser une culture microbienne sur milieu solide, en présence de disques imbibés de polyphénols. Si les polyphénols ont une activité antimicrobienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque. Le diamètre de cette zone d'inhibition est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'échantillon (FATTOUCH *et al.*, 2006).

Mode opératoire

L'activité antimicrobienne des extraits est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose décrite par (OUELHADJ *et al.*, 2014). Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélosé Mueller-Hinton en surfusion sont laissées solidifiées et séchées à une température de 25

°C pendant 30 min. 100 µl de la solution standardisée d'inoculum (10^6 à 10^7 UFC/ml) est inoculé dans chaque boîte puis uniformément répartie avec un écouvillon. Les boîtes sont laissées séchées pendant cinq minutes. Des disques stériles en papier Wattman (5 mm) préalablement imbibés de 15 µl de chaque extrait sont déposés au milieu de la gélose.

a. Revivification des souches

Étant donné que les bactéries testées sont conservées à -20°C et que l'activité antibactérienne doit être réalisée sur une culture jeune, une revivification des souches en bouillon BHIB est effectuée pendant 24h à 37°C .

b. Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C , afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum. Les souches fongiques sont repiquées de la même manière, l'incubation est faite à 28°C .

c. Préparation des dilutions d'extraits

Les extraits sont dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations de 500, 1000, 1500 et 2000 µg/ml.

d. Préparation de l'inoculum et standardisation

Les souches bactériennes à tester sontensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. Ensuite, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. L'anse est déchargée dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,10 à 620 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est faiblement chargé, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop chargé (DIB *et al.*, 2013).

e. L'aromatogramme

L'aromatogramme est l'équivalent d'antibiogramme (technique utilisée en bactériologie médicale) où les antibiotiques sont remplacés par les extraits, réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé également appelée méthode des disques. Cet aromato-

tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques (HAMMOUDI, 2009 ; BORDJIBA *et al.*, 2011).

D'après HAMMOUDI (2009), cette méthode a l'avantage d'avoir une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, par l'application d'un grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale.

L'action d'un antibiotique ou d'un extrait sur une souche bactérienne aboutit d'après BOULAHBAL (1993) à deux états possibles :

- L'arrêt de l'augmentation de la population c'est l'effet bactériostatique ou ;
- La destruction des bactéries : c'est l'effet bactéricide qui aboutit à la lyse bactérienne.

➤ **Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de Pétri, l'écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. Il est frotté contre la totalité de la surface gélosée en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est terminé en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée.

➤ **Dépôt des disques**

Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. D'autre part, les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés, prêts à l'emploi, sont utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et des disques imprégnés de DMSO (témoin négatif). Finalement, les boîtes de Pétri sont maintenues pendant 2 h à 4 °C pour une meilleure diffusion des substances bioactives, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

f. Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne est appréciée par la mesure des diamètres des zones claires (en millimètres) qui se forment autour des disques ; le diamètre de ces zones d'inhibition inclus celui du disque, permet de distinguer les bactéries sensibles des bactéries résistantes.

On considère une bactérie sensible si le diamètre d'inhibition est supérieur à 8 mm (MOREIRA *et al.*, 2005).

Activité antifongique

La même technique est entreprise pour *Candida albicans* et *Aspergillus niger* avec l'utilisation du milieu Sabouraud. La standardisation de l'inoculum fongique est effectuée en utilisant une cellule de comptage (cellule de Mallassez) et l'incubation est faite à 28 °C pendant 24 à 48 h pour *Candida* et 72 h pour *Aspergillus*.

5. Analyse statistique

Les résultats sont représentés par la moyenne suivie de l'écart-type ($n = 3$) pour chaque extrait par le logiciel Statistica version 7.2, en utilisant le test de l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur, dont le niveau de signification est de 5 %.

Ce test nous permet de vérifier si les échantillons sont issus de la même population ou présentant des différences significatives. D'une autre manière, savoir si les différents facteurs (partie du fruit, espèce d'orange et le type de solvant) influencent significativement les différents paramètres d'étude.

Résultats et discussion

Citrus sinensis et *Citrus aurantium* sont deux orangers appartenant à la famille des *Rutaceae*. En raison de leurs nombreuses vertus ; de multiples études phytochimiques ont été réalisées, qui ont révélé la présence des polyphénols en particulier les flavonoïdes dans ces deux espèces, ce qui leurs confèrent de nombreuses propriétés biologiques.

1. Caractéristiques générales de la matière végétale

Tableau XIII : Caractéristiques générales de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* (n = 20).

Paramètre	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantium</i>
Diamètre du fruit (cm)	8,86 ± 0,55	7,54 ± 0,81
Poids du fruit entier (g)	110,62 ± 20,91	72,51 ± 15,47
Nombre de pépin /unité	3 ± 2	30 ± 6
Poids du pépin (g)	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,03
Epaisseur de l'écorce (cm)	0,38 ± 0,08	1,02 ± 0,18
pH du jus	5,51 ± 0,31	2,74 ± 0,16

D'après le tableau XIII, on peut distinguer entre les deux espèces d'orange par le poids du fruit pour lequel on a noté des valeurs plus élevées pour *C.sinensis* par rapport à *C.aurantium* qui contient un nombre de pépins élevé et une écorce d'épaisseur plus importante.

Concernant le concentré du jus, *C.aurantium* montre une acidité plus élevée par un pH de 2,74 ± 0,16 par rapport à celui de *C.sinensis*.

2. Rendement d'extraction des polyphénols

Le rendement d'extraction est le rapport entre la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant et la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il dépend de plusieurs paramètres tels que : le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (DO *et al.*, 2014).

Les différents rendements d'extraction (moyenne ± Standard Errors « SD ») obtenus en pourcentage (%), sont indiqués dans le tableau XIV ci-après.

Tableau XIV : Le rendement d'extraction des PPT des différents extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* exprimé en % (n = 3).

Espèce d'orange	Partie du fruit	Rendement en polyphénols totaux (%)	
		Extrait aqueux	Extrait éthanoliques
<i>Citrus sinensis</i>	Pépins	8,86 ± 0,63	6,67 ± 0,76
	Ecorce	13,87 ± 1,60	11,67 ± 1,53
<i>Citrus aurantium</i>	Pépins	4,75 ± 0,46	2,03 ± 0,58
	Ecorce	6,77 ± 0,91	5,30 ± 0,16

Les mêmes résultats sont représentés dans la figure ci-dessous.

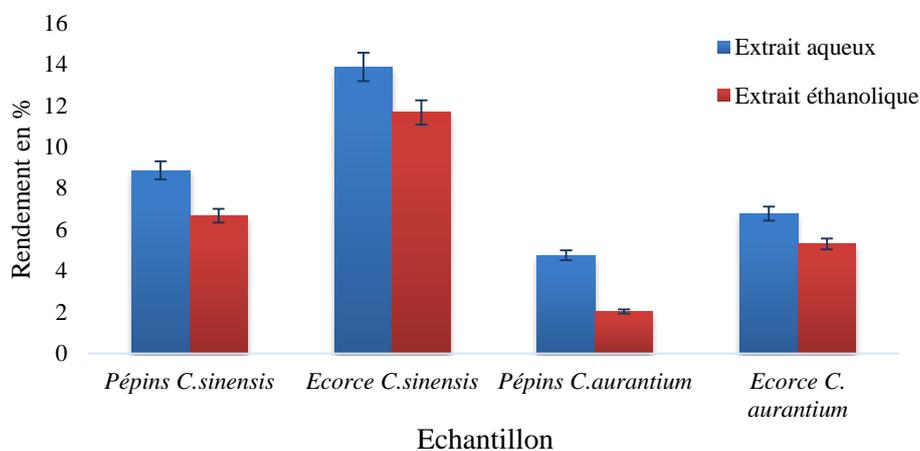


Figure 27 : Représentation graphique du rendement d'extraction des PPT des extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium*.

Les résultats du tableau montrent la présence des composés phénoliques dans les deux espèces d'agrumes avec des proportions variables selon l'espèce, la partie du fruit et le solvant d'extraction utilisé(e).

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction de la figure 26, que l'eau distillée donne un bon rendement d'extraction par rapport à l'éthanol, quelle que soit l'espèce et la partie étudiée (écorces et pépins), et cela par opposition aux résultats obtenus par (LI *et al.*, 2006).

Le rendement d'extraction éthanolique des polyphénols d'écorce de *Citrus sinensis* (11,67 ± 1,53 %) que nous avons trouvé, est supérieur à celui obtenu par KROYER (2009) qui est de 8 %. Cependant, (HEGAZY et IBRAHIUM, 2012 ; SINGH et IMMANUEL, 2014) ont

obtenu des rendements d'extraction des écorces d'orange supérieurs, qui sont de 23,91 % et 27,96 % respectivement, sous l'action du même solvant.

Le rendement d'extraction éthanolique des polyphénols d'écorce de *Citrus aurantium* ($5,30 \pm 0,16$ %) que nous avons obtenu, est inférieur à celui obtenu par (VIJI *et al.*, 2015) qui est de $16,14 \pm 0,91$ %.

Les rendements d'extraction aqueuse des polyphénols d'écorce de *Citrus sinensis* ($13,87 \pm 1,60$ %) et de *Citrus aurantium* ($6,77 \pm 0,91$ %) que nous avons trouvé, sont supérieurs au rendement obtenu par ARORA et KAUR (2013), qui est de 2,6 % pour les écorces d'oranges de l'Inde. Toutefois (MADHURI *et al.*, 2014) ont obtenu un rendement d'extraction méthanolique des PPT d'écorce de *C.aurantium* (12,35 %) supérieur à celui de l'écorce de *C.sinensis* (8%).

Le test de l'analyse de la variance (ANOVA) indique que le type de solvant d'extraction influence d'une manière significative le rendement d'extraction en donnant une p-value $< 0,001$ (figure 1 de l'annexe 3).

Le rendement d'extraction des polyphénols des écorces est plus élevé que celui des pépins pour les deux espèces quel que soit le type de solvant. Ce résultat concorde avec celui trouvé par EGBUONU et OSUJI (2016) pour *C.sinensis*, contrairement à KROYER (2009) qui a obtenu un rendement d'extraction éthanolique des PPT de l'écorce (8 %) inférieur à celui des pépins (23 %) pour l'espèce *Citrus sinensis*.

Les rendements d'extraction en polyphénols de l'espèce *Citrus sinensis* sont plus élevés que ceux de l'espèce *Citrus aurantium* (écorce et pépins) pour les deux types d'extraction.

En comparaison à d'autres espèces d'agrumes, le rendement de l'extraction éthanolique d'écorce d'orange est inférieur à celui du limon (25,8 %) trouvé par SINGH et IMMANUEL (2014).

Le test de l'analyse de l'ANOVA a donné une p-value $< 0,05$, ce qui indique que l'espèce influence significativement le rendement d'extraction (figure 2 de l'annexe 3).

Selon (SAFDAR *et al.*, 2017), le rendement d'extraction serait associé à la polarité des solvants, la solubilité, ainsi qu'autres paramètres tels que la concentration du solvant, la température et le temps d'extraction et la méthode d'extraction.

3. Dosages biochimiques

3.1. Teneur en polyphénols totaux des extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium*

Le dosage des PPT est effectué par la méthode spectrophotométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

La teneur en composés phénoliques dans les différents extraits (aqueux et éthanolique), exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). Elle est estimée grâce à une courbe d'étalonnage (figure 28), réalisée avec un standard de référence « l'acide gallique » à des concentrations variantes de 20 à 200 µg/ml suivant (WONG *et al.*, 2007).

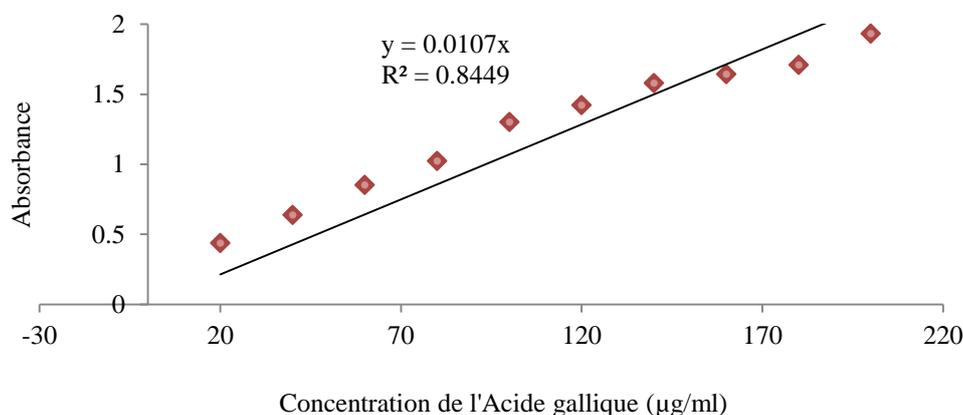


Figure 28 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique.

Les résultats (moyenne \pm SD) de deux répétitions obtenus pour le dosage des PPT, en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 0,0107 x$) sont rapportés dans le tableau XV et figure 29 ci-après.

Tableau XV : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* exprimées en mg EAG/g MS (n = 2).

Espèce d'orange	Partie du fruit	Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	
		Extrait aqueux	Extrait éthanolique
<i>Citrus sinensis</i>	Pépins	32,06 \pm 0,02	9,32 \pm 0,05
	Ecorce	36,97 \pm 0,14	26,77 \pm 0,02
<i>Citrus aurantium</i>	Pépins	29,53 \pm 0,00	6,75 \pm 0,35
	Ecorce	36,18 \pm 0,11	20,74 \pm 0,00

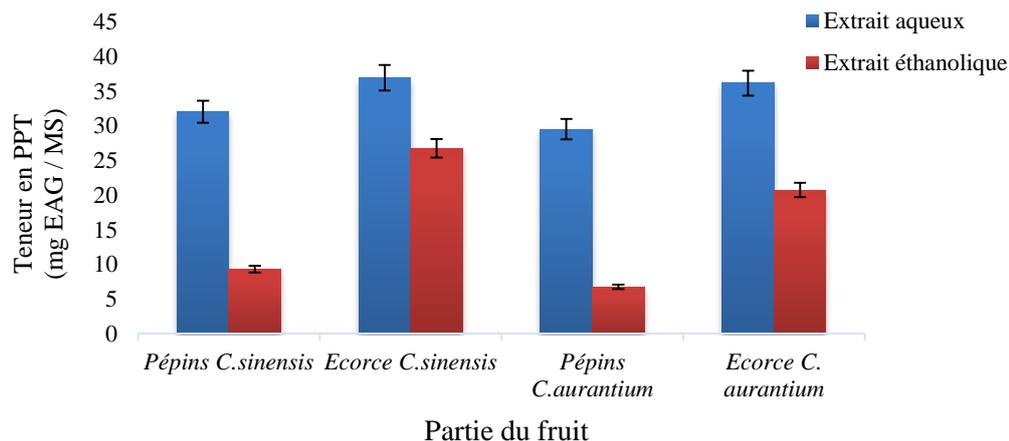


Figure 29 : Représentation graphique de la teneur en PPT des extraits étudiés.

Les résultats représentés, révèlent que les polyphénols sont présents dans l'écorce et les pépins des deux espèces d'orange, avec des teneurs variables.

La teneur en polyphénols dans tous les extraits aqueux, est plus élevée que celle contenue dans les extraits éthanoliques, bien que (MOLAN *et al.*, 2016) ont obtenu une teneur en PPT plus élevée dans les extraits éthanoliques ($25,90 \pm 1,70$ mg EAG/g MS) que dans les extraits aqueux ($15,10 \pm 1,70$ mg EAG/g) pour l'écorce de *C.sinensis*.

Les teneurs en polyphénols que nous avons obtenus à partir des extraits aqueux ($29,53 \pm 0,00$ mg EAG/g MS) et éthanoliques ($6,75 \pm 0,35$ mg EAG/g MS) des pépins de *Citrus aurantium*, excèdent la teneur en PPT des extraits acétoniques ($2,17 \pm 0,02$ mg EAG/g MS) des pépins de *Citrus aurantium* du Nord-Ouest algérien obtenue par (GORMAT *et al.*, 2015).

Le test de l'ANOVA a donné une p-value $< 0,05$, ce qui révèle une différence significative entre les teneurs en PPT des extraits aqueux et éthanoliques ; autrement dit la teneur en polyphénols totaux dépend du type de solvant utilisé (figure 3 de l'annexe 3).

La teneur en PPT des extraits éthanoliques de l'écorce de *C.aurantium* ($36,97 \pm 0,14$ mg EAG/g MS) indiquée dans le tableau XV est supérieure à la teneur en PTT retrouvée par (BEJAR *et al.*, 2011) qui est de 5,22 mg EAG/g MS.

Les résultats d'étude menée par (MOLAN *et al.*, 2016) indiquent que la teneur en PPT d'écorce de *C.sinensis* dans les extraits aqueux ($15,10 \pm 1,70$ mg EAG/g) est inférieure à notre résultat ($36,97 \pm 0,14$ mg EAG/g MS). Par ailleurs, (SELMY *et al.*, 2017) ont trouvé une teneur en PPT ($169,94 \pm 2,13$ mg EAG/g MS) supérieure à la celle trouvée dans notre étude.

Les extraits éthanoliques de l'écorce de *C.sinensis* de (MOLAN *et al.*, 2016) présentent une teneur en PPT ($25,9 \pm 1,7$ mg EAG/g MS), inférieure à celle que nous avons trouvée ($26,77 \pm 0,02$ mg EAG/g MS) pour le même type d'extrait (écorce de *C.sinensis*).

La teneur en PPT des extraits aqueux des pépins de *C.sinensis* est de $32,06 \pm 0,02$ mg EAG/g MS). Ce résultat est supérieur à celui trouvé par (MOLAN *et al.*, 2016), qui est de ($10,90 \pm 1,10$ mg EAG/g MS). Par ailleurs, nos résultats révèlent une teneur en polyphénols des extraits éthanoliques des pépins de *C.sinensis* ($9,32 \pm 0,05$ mg EAG/g MS), inférieure à celle retrouvée dans la même étude ($18,6 \pm 1,10$ mg EAG/g MS).

Les teneurs en polyphénols des extraits éthanoliques des pépins de *Citrus sinensis* ($9,32 \pm 0,05$ mg EAG/g MS) et de *Citrus aurantium* ($6,75 \pm 0,35$ mg EAG/g MS), sont très inférieurs à celles obtenues par AL-ANBARI et HASAN (2015) pour les extraits éthanoliques des pépins de *Citrus sinensis* (350 mg EAG/g MS) et de *Citrus aurantium* (262,7 mg EAG/g MS).

On constate également que l'écorce est plus riche en polyphénols que les pépins dans les deux espèces. Ce résultat concorde avec celui obtenu par DUDA-CHODAK et TARKO (2007), qui ont obtenu une teneur en polyphénols d'écorce ($849,3 \pm 21,8$ mg EAC/g MS) supérieure à celle des pépins ($212,0 \pm 8,4$ mg EAC/g MS), pour l'orange de la Pologne.

Comparativement à d'autres espèces d'agrumes, l'écorce de *C.sinensis* et *C.aurantium* sont moins riches en polyphénols que celle du *C.limon*, dont les teneurs en PPT sont de 420 mg EAG/g MS et $966,20 \pm 16,50$ mg EAG/g MS d'après les travaux de (LI *et al.*, 2006 ; DUDA-CHODAK et TARKO, 2007) respectivement. Concernant les pépins, les deux espèces présentent des teneurs en PPT inférieures à celle des pépins du *C.paradisi* (373,2 mg EAG/g MS) selon AL- ANBARI et HASAN (2015).

Cette différence de teneurs en polyphénols totaux serait due à la complication de l'extraction des polyphénols, qui sont susceptibles de subir une dégradation, une oxydation, ou une hydrolyse. De plus d'autres paramètres peuvent influencer la quantification de ces PPT tel que la variété, le mode de conservation des extraits, les conditions environnementales, le degré de maturité du fruit et les facteurs génétiques (LAGHA-BENAMROUCHE et MADANI, 2013). Ainsi que les paramètres liés à l'extraction notamment la nature et la concentration du solvant, la relation solvant-solide, la température et le temps d'extraction (LI *et al.*, 2006 ; LAGHA- BENAMROUCHE et MADANI, 2013 ; ABOSHORA *et al.*, 2014 ; AL-ANBARI et HASAN, 2015 ; LI *et al.*, 2016).

Selon AL-ANBARI et HASAN (2015), la teneur en polyphénols est également influencée par le tissu analysé et l'origine géographique de la plante.

3.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des différents extraits (aqueux et éthanolique), exprimée en milligrammes équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un standard de référence « la quercétine » à des concentrations variantes de 20 à 100 µg/ml (figure 30).

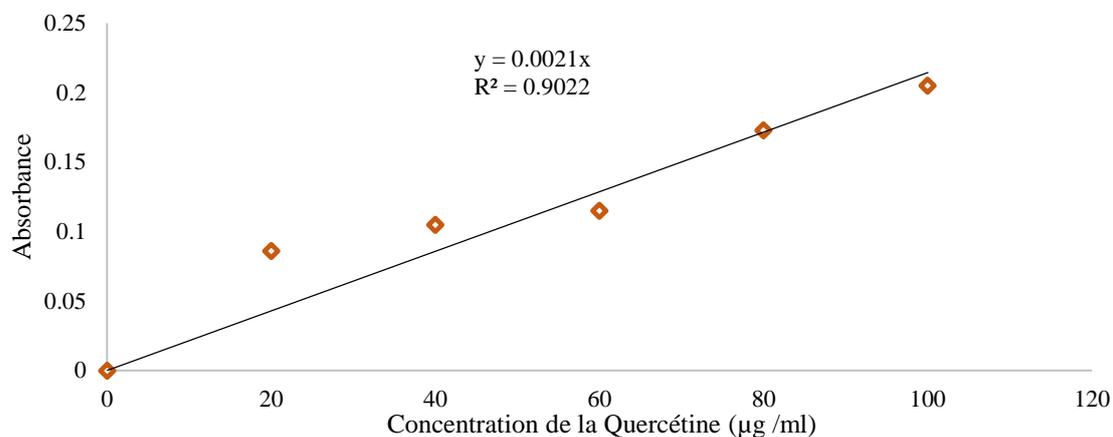


Figure 30 : Courbe d'étalonnage à la quercétine.

Les résultats (moyenne \pm SD) de deux répétitions obtenus pour le dosage des FT en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 0,0021x$) sont rapportés dans le tableau XVI et représentés dans la figure 31 ci- après.

Tableau XVI : Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* exprimées en mg EQ/g MS (n=2).

Espèce d'orange	Partie du fruit	Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/g MS)	
		Extrait aqueux	Extrait éthanolique
<i>Citrus sinensis</i>	Pépins	52,6 \pm 0,28	36,99 \pm 0,69
	Ecorce	75,8 \pm 0,28	45,56 \pm 0,62
<i>Citrus aurantium</i>	Pépins	71 \pm 0,70	44,29 \pm 0,30
	Ecorce	320,8 \pm 0,77	85,715 \pm 0,26

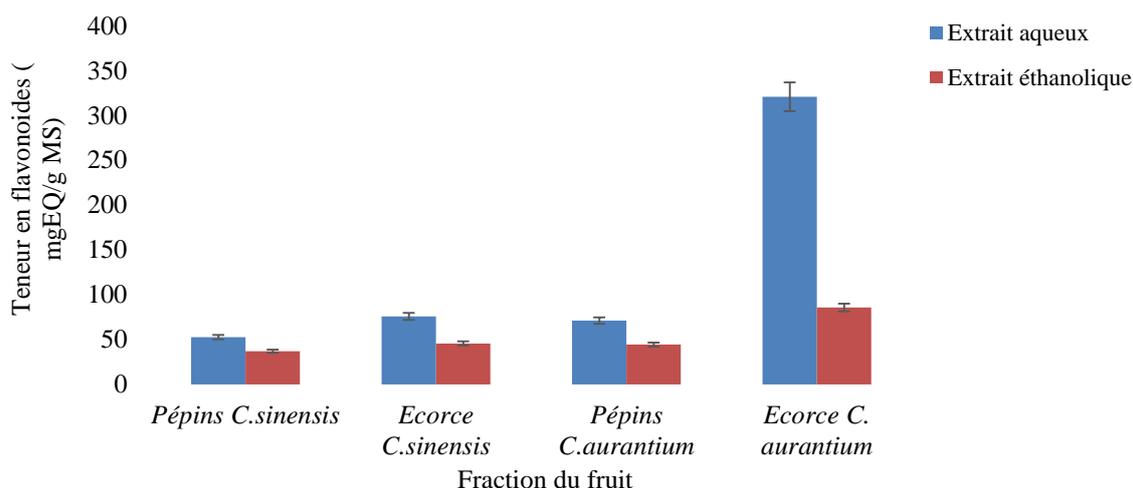


Figure 31 : Représentation graphique de la teneur en FT des extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium*.

Les résultats ci-dessus indiquent la présence des FT dans tous les extraits quelle que soit l'espèce, la partie du fruit analysée et le type de solvant d'extraction. Ainsi que les extraits aqueux sont plus riches en flavonoïdes que les extraits éthanoliques.

Le test de l'ANOVA décèle une différence significative ($p\text{-value} < 0,05$) ; c'est à dire que la teneur en flavonoïdes totaux varie de manière significative selon le solvant utilisé (figure 4 de l'annexe 3).

La teneur en flavonoïdes des extraits aqueux d'écorce de *Citrus sinensis* ($75,8 \pm 0,28$ mg EQ/g MS) est supérieure à celle trouvée par (OMOBA *et al.*, 2015) qui est de $3,30 \pm 0,30$ mg EQ/g MS, et elle est inférieure à celle trouvée par (SALMI *et al.*, 2017).

Les extraits éthanoliques d'écorce de *Citrus sinensis* contiennent $45,56 \pm 0,62$ mg EQ/g MS de flavonoïdes. Ce résultat est supérieur au résultat de SINGH et IMMANUEL (2014) qui ont trouvé une teneur de 0,3 mg EQ/g MS.

La teneur en flavonoïdes pour les extraits aqueux d'écorce de *Citrus aurantium* ($52,6 \pm 0,28$ mg EQ/g MS) est très élevée par rapport à celle obtenue par (ESSADIK *et al.*, 2015), qui est de $1,43 \pm 0,201$ mg EQ/g MS.

Les extraits éthanoliques d'écorce de *Citrus aurantium* contiennent $45,56 \pm 0,62$ mg EQ/g MS de flavonoïdes. Ce résultat est supérieur à celui de (DORCAS *et al.*, 2016), qui ont obtenu une teneur de 0,32 mg EQ/g MS.

La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques des pépins de *Citrus aurantium* ($71 \pm 0,70$ mg EQ/g MS) est plus élevée que celle des pépins de *Citrus sinensis* ($52,6 \pm 0,28$ mg EQ/g MS). Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par AL-ANBARI et HASAN (2015),

qui sont de (3,71 mg EQ/g MS) et (1,51 mg EQ/g MS) respectivement. Cependant, en termes de valeur, les teneurs en flavonoïdes des pépins des deux espèces que nous avons obtenus sont très supérieures à celles trouvées par ces auteurs.

Les résultats montrent que les extraits d'écorce sont plus riches en flavonoïdes que les extraits de pépins quelle que soit l'espèce et le solvant utilisé(e). Selon (OMOBA *et al.*, 2015), les écorces d'agrumes sont plus riches en flavonoïdes que les pépins.

Le test de l'ANOVA décèle une différence très significative (p -value < 0,001) ; c'est à dire que la teneur en flavonoïdes totaux varie de manière significative selon la partie du fruit étudiée à savoir pépins ou écorce (figure 6 de l'annexe 3).

En comparaison avec d'autres espèces du genre *Citrus*, les pépins des oranges d'après AL-ANBARI et HASAN (2015), sont plus riches en flavonoïdes que les pépins de pamplemousse (*Citrus paradisi*), qui contiennent 3,71 mg EQ/g MS.

D'après les mêmes auteurs, la composition en flavonoïdes dépend du temps de la récolte, des différentes parties de la plante et des différences génétiques entre les espèces végétales. La présence ou l'absence de flavonoïdes dans les pépins peut être affectée par le développement du fruit.

AL-ANBARI et HASAN (2015) démontrent que la différence des teneurs trouvées en polyphénols et en flavonoïdes est due à la complexité des mélanges naturels des composés phénoliques et à la méthode de dosage de ces composés.

3.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est mise en évidence utilisant deux méthodes : la réduction du fer ou FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et le piégeage du radical libre DPPH•.

3.3.1. Pouvoir réducteur

La mesure de la réduction directe de $\text{Fe}^{+3} \text{CN}(6)$ en $\text{Fe}^{+2} \text{CN}(6)$, décrite par (KHOLKHAL *et al.*, 2013 ; PAVITHRA *et al.*, 2013), est employée dans le but d'évaluation du pouvoir réducteur des extraits d'écorces et de pépins des deux espèces d'orange.

3.3.1.1. Réduction du fer des extraits aqueux

Les pourcentages de réduction du fer par l'acide ascorbique et les extraits aqueux de *C.sinensis* et *C.aurantium* sont notés dans le tableau XVII ci-après.

Tableau XVII : Pourcentages de réduction du fer par l'acide ascorbique et les différents extraits aqueux de *C.sinensis* et *C.aurantium* (n=3).

		Concentration (µg/ml)					
		15,62	31,25	62,5	125	250	500
Acide ascorbique		37,78 ± 0,21%	45,78± 0,50 %	58,05 ± 0,38 %	70,72 ± 0,16 %	80,94 ± 0,02 %	99,98 ± 0,90 %
<i>Citrus sinensis</i>	Pépins	7,56 ± 0,11%	12,28 ± 0,03%	17,56 ± 0,19 %	21,28 ± 0,00 %	26,11 ± 0,00 %	51,22 ± 0,12 %
	Ecorce	27,11 ± 0,20 %	30 ± 0,32%	37,89 ± 0,17 %	44,83 ± 0,05 %	52,89 ± 0,02 %	67 ± 0,00 %
<i>Citrus aurantium</i>	Pépins	7,3 ± 0,11%	12,89 ± 0,13 %	31,28 ± 0,06 %	33,55 ± 0,06 %	44,22 ± 0,12 %	54,44 ± 0,02 %
	Ecorce	40,22 ± 0,02 %	40,39 ± 0,05%	49,67 ± 0,10 %	61,89 ± 0,14 %	82,44 ± 0,00 %	98,22 ± 0,00 %

3.3.1.2. Réduction du fer des extraits éthanoliques

Les pourcentages de réduction du fer par l'acide ascorbique et les extraits éthanoliques de *C.sinensis* et *C.aurantium* sont notés dans le tableau XVII ci-après.

Tableau XVIII : Pourcentages de réduction du fer par l'acide ascorbique et les différents extraits éthanoliques de *C.sinensis* et de *C.aurantium* (n=3).

		Concentration (µg/ml)					
		15,62	31,25	62,5	125	250	500
Acide ascorbique		37,78 ± 0,21%	45,78± 0,50 %	58,05 ± 0,38 %	70,72 ± 0,16 %	80,94 ± 0,02 %	99,98± 0,90 %
<i>Citrus sinensis</i>	Pépins	16 ± 0,04 %	22,7 ± 0,04 %	27,14 ± 0,11 %	29,45 ± 0,20 %	32,78 ± 0,10%	41,66± 0,09 %
	Ecorce	13,72 ± 0,12 %	27,5 ± 0,14 %	35,5 ± 0,06 %	40,51 ± 0,00 %	44,44 ± 0,02 %	57,33± 0,12 %
<i>Citrus aurantium</i>	Pépins	7,44 ± 0,10 %	22,11 ± 0,11 %	25,67 ± 0,12 %	28,38 ± 0,08 %	31,11 ± 0,06 %	40,66± 0,00 %
	Ecorce	9,89 ± 0,02 %	12,44 ± 0,16 %	30,44 ± 0,03 %	46,11 ± 0,35 %	54,33 ± 0,14 %	80,67± 0,11 %

Les résultats des tableaux XVII et XVIII, indiquent que le pouvoir réducteur présente une augmentation proportionnelle à la concentration de l'extrait quelle que soit la nature du solvant utilisé (eau ou éthanol).

Pour mieux distinguer le pouvoir réducteur de chaque extrait à réduire le fer, les résultats sont exprimés en IC50 dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Valeurs d'IC50 des extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* et du standard pour le test FRAP.

	Extrait aqueux ($\mu\text{g/ml}$)	Extrait éthanolique ($\mu\text{g/ml}$)
Pépins <i>C.sinensis</i>	497.36	659.61
Ecorce <i>C.sinensis</i>	249.76	354.3
Pépins <i>C.aurantium</i>	389.87	647.23
Ecorce <i>C.aurantium</i>	66.12	243.76
Acide ascorbique	31.91	

D'après le tableau XIX, les extraits aqueux révèlent une bonne activité réductrice par rapport aux extraits éthanoliques et cela en opposition aux résultats de (PARASHAR *et al.*, 2006). Le pouvoir d'extraction d'un solvant est le facteur le plus important qui affecte le pouvoir antioxydant selon (ABOSHORA *et al.*, 2014).

3.3.2. Piégeage du radical libre (DPPH)

Le Pourcentage de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique et les extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* est indiqué dans le tableau XX.

Tableau XX : Pourcentage de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique et les extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* (n = 2).

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	80	100	120	140	160	180	200
Acide Ascorbique (%)	47,80 \pm 0,16	52,5 \pm 0,04	56,00 \pm 0,20	59,90 \pm 0,15	70,20 \pm 0,02	85,80 \pm 0,12	90,10 \pm 0,27
Pépins <i>C.sinensis</i> (%)	47,98 \pm 0,02	49,72 \pm 0,15	50,15 \pm 0,06	50,77 \pm 0,24	52,93 \pm 0,11	54,17 \pm 0,18	60,06 \pm 0,11
Ecorce <i>C.sinensis</i> (%)	44,52 \pm 0,14	47,53 \pm 0,11	53,65 \pm 0,04	60,33 \pm 0,16	64,93 \pm 0,21	65,39 \pm 0,06	66,47 \pm 0,10
Pépins <i>C.aurantium</i> (%)	41,09 \pm 0,00	50,33 \pm 0,21	57,52 \pm 0,13	63,12 \pm 0,27	64,26 \pm 0,18	66,45 \pm 0,04	71,95 \pm 0,20
Ecorce <i>C.aurantium</i> (%)	42,04 \pm 0,31	50,73 \pm 0,06	55,17 \pm 0,00	63,43 \pm 0,08	70,69 \pm 0,08	71,94 \pm 0,15	72,27 \pm 0,13

L'activité antiradicalaire des différents extraits augmente avec l'augmentation de la concentration (GHASMI *et al.*, 2009).

L'activité antioxydante de l'acide ascorbique est maximale ($90,10 \pm 0,27$ %), suivie des différentes parties du fruit des deux espèces d'oranges avec des proportions assez proches allant de ($60,06 \pm 0,11$ %) à ($72,27 \pm 0,13$ %).

Ainsi la différence de l'activité antiradicalaire est mise en évidence dans le tableau XXI utilisant le paramètre « IC 50 » qui est inversement proportionnel au potentiel antiradicalaire d'un antioxydant, une valeur d'IC 50 faible correspond à une activité antioxydante élevée.

Tableau XXI : Valeurs d'IC50 des extraits de *C.sinensis* et *C.aurantium* et du standard pour l'activité radicalaire.

Partie du fruit	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Pépins <i>C.sinensis</i>	113,62
Ecorce <i>C.sinensis</i>	102,57
Pépins <i>C.aurantium</i>	100,66
Ecorce <i>C.aurantium</i>	98,95
Acide ascorbique	96,74

Les extraits d'écorce de *C.aurantium* de notre étude manifestent une forte activité antioxydante ($\text{IC}_{50} = 98,95 \mu\text{g/ml}$), très proche de celle du standard utilisé (acide ascorbique), qui a donné une $\text{IC}_{50} = 96,74 \mu\text{g/ml}$. Cette activité antiradicalaire révélée est supérieure à celle déterminée par (ESSADIK *et al.*, 2015) qui est d'un $\text{IC}_{50} = 4439 \mu\text{g/ml}$ par rapport à une IC_{50} de l'acide ascorbique $\text{IC}_{50} = 97 \mu\text{g/ml}$.

Les extraits d'écorce de *C.aurantium* ayant une $\text{IC}_{50} = 98,95 \mu\text{g/ml}$, ont un pouvoir antioxydant légèrement puissant que les extraits des pépins ($\text{IC}_{50} = 100,66 \mu\text{g/ml}$) du même fruit, ce qui est compatible aux résultats de (DIVYA *et al.*, 2016).

Il ressort de nos résultats que le Bigardier (*C.aurantium*), quelle que soit la partie étudiée, présente la plus grande activité radicalaire par rapport à l'orange douce (*C.sinensis*) et cela est similaire aux résultats de la recherche effectuée par LAGHA-BENAMROUCHE et MADANI (2013).

Les extraits d'écorce de *C.sinensis* présentent une activité antiradicalaire ($\text{IC}_{50} = 102,57 \mu\text{g/ml}$) supérieure à celle trouvée par (SYAKIRAH-ZULKIFLI *et al.*, 2012) qui est de $564 \mu\text{g/ml}$ par rapport celle de l'acide ascorbique ($\text{IC}_{50} = 0,046 \mu\text{g/ml}$).

L'activité antioxydante des extraits des écorces et pépins de *C.sinensis* et *Citrus aurantium* peut être attribuée à la présence des composés phénoliques (ANAGNOSTOPOULOU *et al.*, 2006 ; PAVITHRA *et al.*, 2013 ; GORMAT *et al.*, 2015).

Les études ont montré que les pépins et les écorces de genre *Citrus* sont très riches en composés phénoliques, tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes en particulier, qui sont reconnues pour leur forte activité antioxydante (GORMAT *et al.*, 2015).

Le test au DPPH n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger ce radical et ainsi d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques. L'évaluation de l'activité antiradicalaire doit être interpréter avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH à 517 nm diminue sous l'action de la lumière, en fonction du pH du milieu et le type du solvant additionné à l'antioxydant.

Les résultats d'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits révèlent l'absence d'une corrélation positive entre cette activité antioxydante et les teneurs en polyphénols. Ceci pourrait être attribué à la non spécificité du réactif Folin-Ciocalteu aux polyphénols, qui réagit aussi avec d'autres molécules notamment les acides aminés : tyrosine et tryptophane, les protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique et les sulfites (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006 ; BA *et al.*, 2009).

4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

La présence ou l'absence d'une activité antimicrobienne est recherchée seulement pour les extraits aqueux d'écorce et de pépins de *Citrus sinensis* et de *Citrus aurantium*.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces extraits à la concentration de 2000 µg/ml a été exploitée, en comparant à celle des antibiotiques standards utilisés, ce qui permet de savoir quelle espèce d'orange a une bonne activité, selon la partie du fruit (pépins ou écorce).

Cette activité est mise en évidence en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé (milieu MH), décrite par (OUELHADJ *et al.*, 2014), en utilisant le DMSO comme témoin négatif (figure 32) et une gamme d'antibiotiques servant de témoin positif (figure 33).

Les extraits utilisés pour tester l'activité antimicrobienne sont traités délicatement pour éviter leur contamination possible avant l'analyse.

Le tableau XXII ci- après, indique la réponse des espèces microbiennes vis-à-vis des antibiotiques et antifongique testés.

Tableau XXII : Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm) pour n = 2.

Souche microbienne	Diamètre de la zone inhibition (mm)										
	I	RA	CS	N	SXT	AM	FOX	P	C	CZ	CTX
<i>Staphylococcus aureus</i> (MU 50)	60 ± 2	54 ± 2	NT	27 ± 2	40 ± 3	NT	-	-	NT	NT	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	34 ± 2	49 ± 2	NT	16 ± 2	25 ± 3	NT	-	-	NT	NT	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	38 ± 3	22 ± 2	14 ± 1	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT
<i>Escherichia coli</i>	40 ± 1	20 ± 2	14 ± 2	NT	-	10 ± 2	NT	-	NT	-	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	35 ± 2	18 ± 1	14 ± 0	NT	-	-	NT	-	NT	-	NT
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	40 ± 2	20 ± 0	NT	17 ± 2	-	NT	-	-	NT	NT	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 ± 3	20 ± 2	-	NT	23 ± 3	NT	10 ± 1	NT	NT	NT	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 14579)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	28 ± 2	NT	NT
Antifongique (Amphotéricine B)											
<i>Candida albicans</i>	10 ± 1										
<i>Aspergillus niger</i>	10 ± 2										

- : résistant (< 8 mm) ; NT : non testé

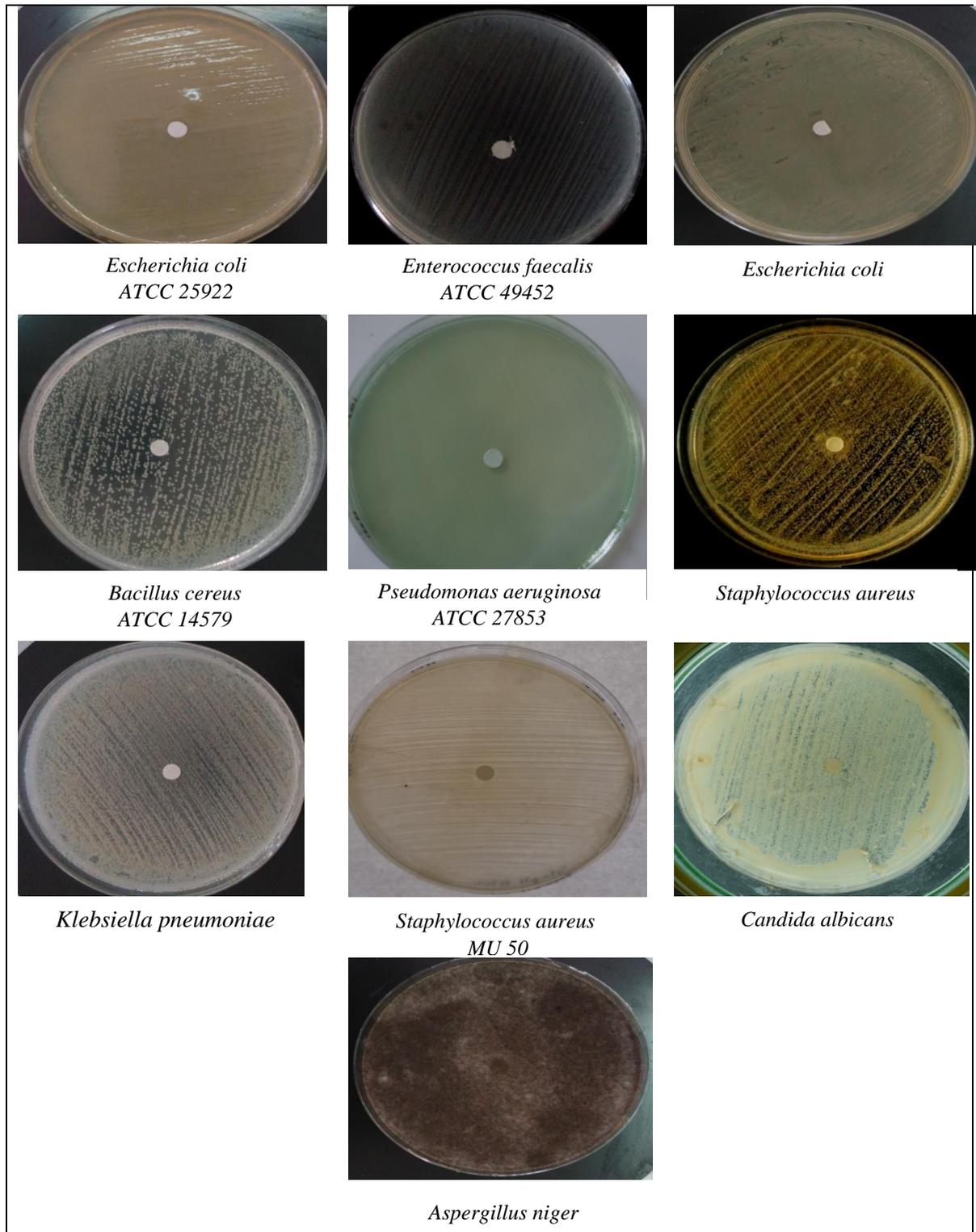


Figure 32 : Témoins négatifs réalisés avec le DMSO sur les espèces bactériennes testées.

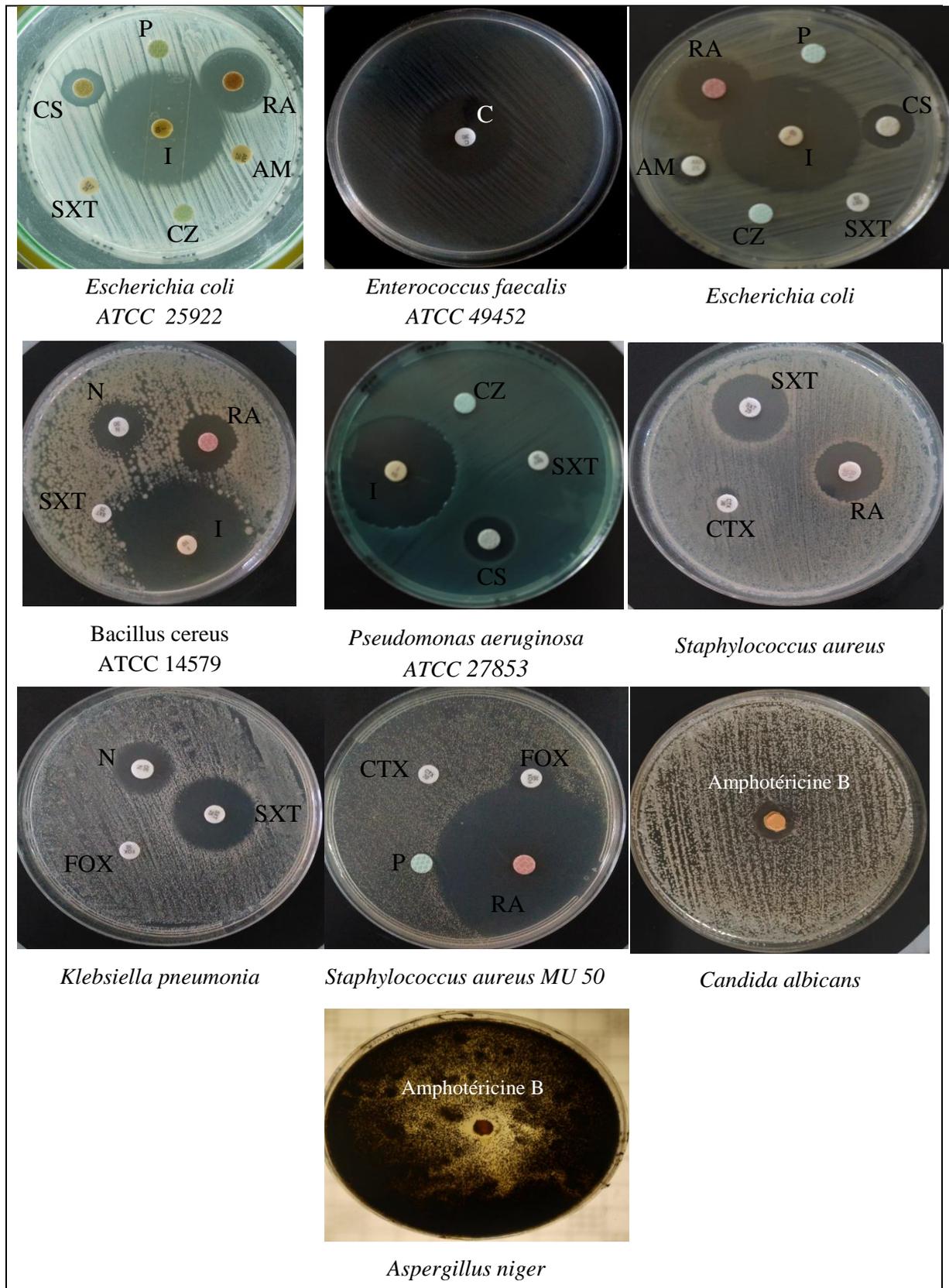


Figure 33 : L'antibiogramme des différentes souches microbiennes employées.

Le solvant utilisé pour la reconstitution des différents extraits est le DMSO, ce dernier n'a présenté aucune zone d'inhibition (figure 32), vis-à-vis des microorganismes testés. Il est considéré comme témoin négatif.

Un microorganisme (bactérie, levure, champignon) est considéré sensible aux antibiotiques et aux extraits si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002 ; MOREIRA *et al.*, 2005).

Le test de l'activité antimicrobienne des différents extraits aqueux d'écorce et de pépins de *C.sinensis* et de *C.aurantium*, à la concentration de 2000 µg/ml, a permis d'obtenir différentes zones d'inhibition (en mm) des souches microbiennes testées (voir tableau XXIII).

Tableau XXIII : Les différentes zones d'inhibition des souches microbiennes testées à une concentration de 2000 µg/ml pour les différents extraits.

Souche microbienne	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	Pépins <i>C.sinensis</i>	Ecorce <i>C.sinensis</i>	Pépins <i>C.aurantium</i>	Ecorce <i>C.aurantium</i>
<i>Escherichia coli</i>	12 ± 2	13 ± 3	13 ± 1	8 ± 2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14 ± 3	12 ± 4	10 ± 2	10 ± 0
<i>S.aureus</i>	14 ± 2	14 ± 1	13 ± 2	14 ± 2
<i>Staphylococcus aureus</i> MU 50	12 ± 3	12 ± 2	14 ± 2	17 ± 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12 ± 2	12 ± 2	12 ± 2	12 ± 2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	15 ± 2	12 ± 3	12 ± 0	14 ± 0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 ± 2	14 ± 1	16 ± 0	15 ± 1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	16 ± 2	14 ± 2	17 ± 2	10 ± 0
<i>Candida albicans</i>	12 ± 4	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 0
<i>Aspergillus niger</i>	14 ± 2	12 ± 2	12 ± 3	10 ± 1

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition répertoriées dans le tableau précédent, que pour une concentration de 2000 $\mu\text{g/ml}$ des différents extraits aqueux d'écorce et de pépins de *C. sinensis* et *C.aurantium*, que toutes les souches bactériennes testées manifestent des zones d'inhibition dont le diamètre varie de 10 à 17 mm, à l'exception de *E. coli* qui se révèle résistante à l'extrait aqueux d'écorce de *C.aurantium*.

Une bonne activité antibactérienne est notée pour les bactéries Gram positif plus précisément : *S.aureus* MU 50 et *E.faecalis* ATCC 49452 avec une zone d'inhibition de 17 mm. *C.albicans* s'est montrée résistante à tous les extraits sauf celui des pépins de *C.aurantium*. A l'opposé, *Aspergillus niger* s'est révélé sensible à tous les extraits aqueux étudiés.

Les résultats que nous avons trouvés pour la bactérie *E.coli* (figure 34), indiquent d'une part, qu'elle est sensible à l'extrait aqueux d'écorce de *C.sinensis*, qui se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition de 13 mm.

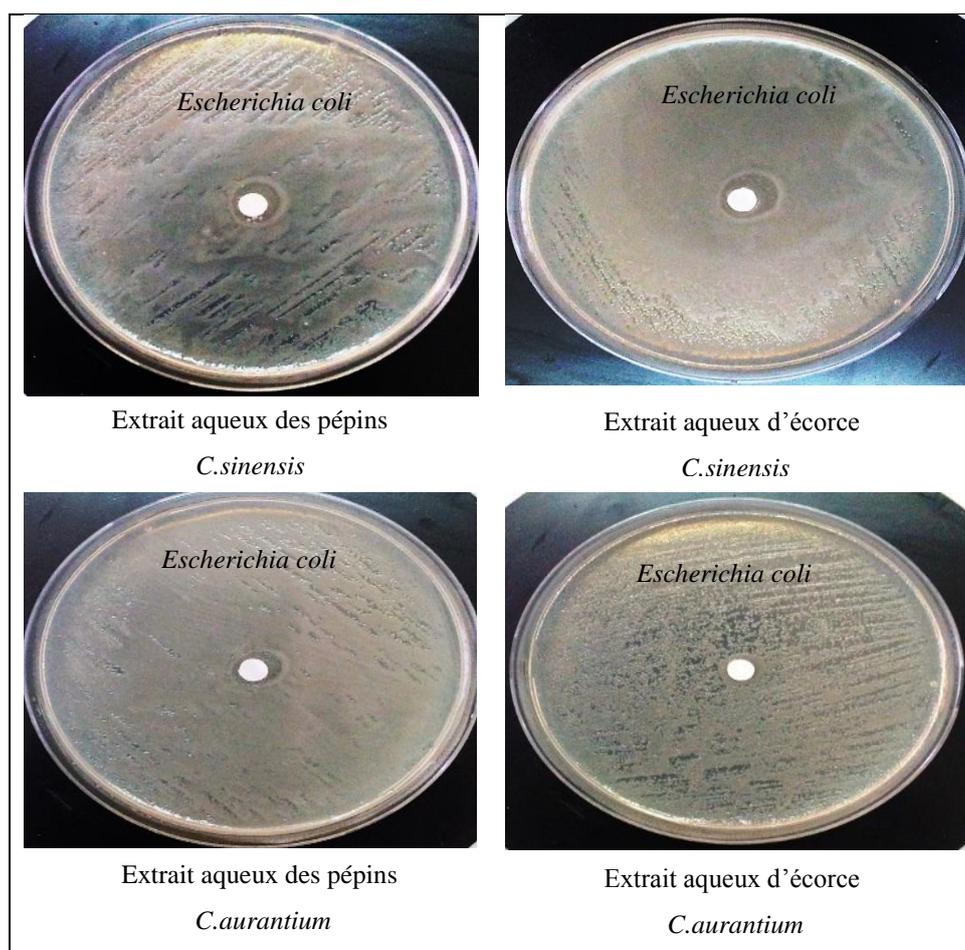


Figure 34 : Effet des extraits aqueux à 2000 $\mu\text{g/ml}$ sur *Escherichia coli*.

Ce résultat est en agrément avec les résultats obtenus par (SANTHOSH *et al.*, 2015 ; ALI *et al.*, 2016 ; EGBUONU et OSUJI, 2016), qui ont révélé des zones d'inhibition de 15,33 mm, 21 mm et de 11,33 mm respectivement. Par ailleurs, (NISHA *et al.*, 2013 ; SUJA *et al.*, 2017) ont révélé la résistance de cette bactérie au même type d'extrait.

D'autre part, cette bactérie exhibe une résistance vis-à-vis de l'extrait aqueux d'écorce de *C.aurantium*. Ces résultats sont compatibles avec les résultats de (DORCAS *et al.*, 2016 ; YATHIENDER, 2017). Bien que (SANTHOSH *et al.*, 2015) ont décelé une zone d'inhibition de 16,67 mm. Ceci indique la sensibilité de cette bactérie aux extraits aqueux de *C.aurantium*.

L'absence d'activité antibactérienne dans les extraits aqueux d'écorce de *C.aurantium* ne signifie pas que l'écorce de cette espèce n'a pas d'activité antibactérienne. Ceci peut bien être en rapport avec beaucoup de paramètres influençant cette activité antibactérienne, comme la concentration de l'extrait qui pourrait donner une activité s'il est suffisamment concentré, et le choix du solvant car les extraits éthanoliques, méthanoliques et acétoniques, testés par (TUMANE *et al.*, 2014 ; DORCAS *et al.*, 2016), ont manifesté une activité antibactérienne vis-à-vis de la même souche, dont les zones d'inhibition varient de 10 à 18 mm.

Les extraits aqueux des pépins de *C.sinensis* ont un effet antibactérien contre *Escherichia coli* (zone d'inhibition de 12 mm). Un résultat similaire est obtenu par EGBUONU et OSUJI (2016) qui ont révélé une zone d'inhibition de 9,67 mm.

E.coli s'est révélée sensible aux extraits aqueux des pépins de *C.aurantium*. Ceci se traduit par d'une zone d'inhibition de 13 mm, contrairement au résultat de YATHIENDER (2017), qui n'ont pas montré d'activité antibactérienne de ces extraits phénoliques contre *E.coli*.

Les extraits aqueux d'écorce de *Citrus limon* et de *Citrus limetta*, testés sur *E.coli* par HINDI et CHABUCK (2013), ont révélé la résistance de cette bactérie à ces extraits. Ce résultat est similaire à celui qu'on a trouvé pour l'extrait phénolique d'écorce de *C.aurantium* pour *E.coli*.

D'après la même étude, *E.coli* est une souche multi-résistante qui résiste aux médicaments et aux extraits de plantes, ce qui pourrait expliquer la résistance de cette bactérie à l'extrait d'écorce de *C.aurantium* pour *E.coli*.

Les résultats de l'aromatogramme (figure 35), nous montrent que les extraits aqueux d'écorce et de pépins de *C.sinensis* et *C.aurantium*, ont relativement les mêmes effets sur *E.coli* ATCC 25922 que ceux manifestés vis-à-vis d'*E.coli* d'origine hospitalière.

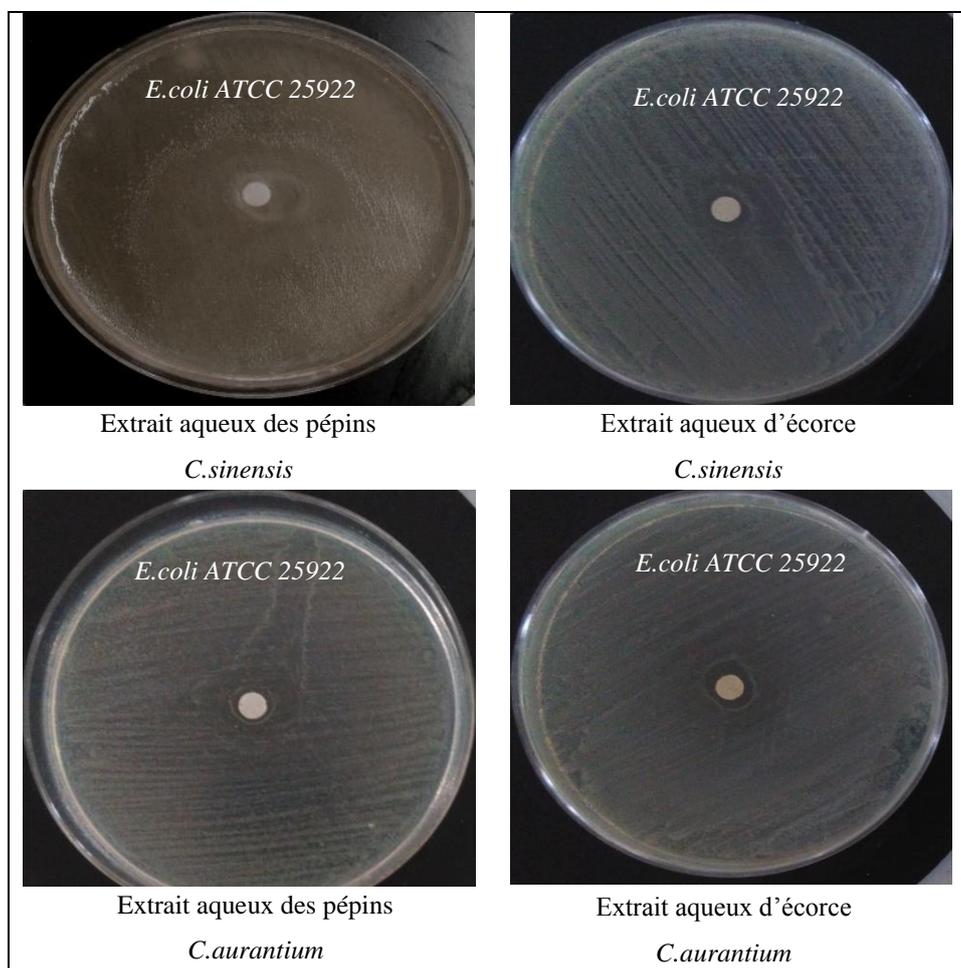


Figure 35 : Effet des extraits aqueux à 2000 $\mu\text{g/ml}$ sur *Escherichia coli* ATCC 25922.

Les extraits aqueux des écorces de *C.sinensis* et de *C.aurantium* testés sont efficaces contre *S.aureus* (figure 36), ceci est indiqué par l'apparition des zones d'inhibition de 13 et 14 mm, révélant ainsi la sensibilité de cette bactérie à ces extraits. Des résultats similaires sont obtenus par (SANTHOSH *et al.*, 2015) avec des zones d'inhibition de 10,33 mm et 12,67 mm pour *S.aureus*, en testant les mêmes extraits aqueux.

De plus, EGBUONU et OSUJI (2016) ont obtenu une zone d'inhibition de 14 mm pour l'écorce de *C.sinensis* alors qu'une résistance de *S.aureus* est notée par YATHIENDER (2017), pour les extraits aqueux d'écorce de *C.aurantium*.

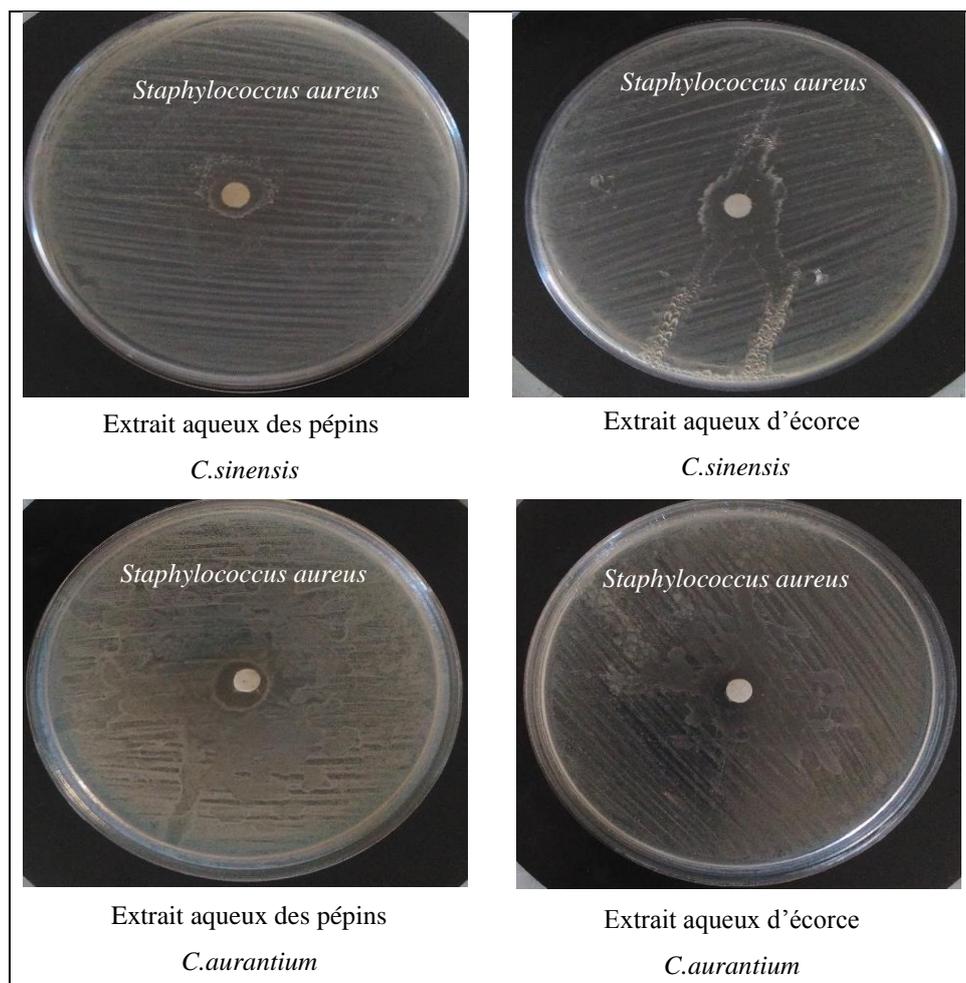


Figure 36 : Effet des extraits aqueux à 2000 μ g/ml sur *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus est également sensible aux extraits aqueux des pépins de *C.sinensis* et de *C.aurantium*, pour lesquels nous avons constaté des zones d'inhibition de 14 mm et 13 mm respectivement. Les travaux réalisés par EGBUONU et OSUJI (2016) ont révélé la sensibilité de *S.aureus* aux extraits des pépins *C.sinensis*. Par contre, YATHIENDER (2017) a montré la résistance de cette bactérie aux extraits aqueux des pépins de *C.aurantium*.

En 2013, HINDI et CHABUCK ont testé l'effet antimicrobien des différents extraits aqueux d'écorce de *Citrus limon* et *Citrus limetta*, sur des bactéries Gram positif (*S.aureus*, *E. faecalis*, ... etc.). Ces tests ont révélé que *S.aureus* est très sensible aux extraits aqueux d'écorce de *Citrus limon* et de *Citrus limetta* (zones d'inhibition de 20 à 30 mm). Nos résultats en ont permis aussi de déceler la sensibilité de ces souches bactériennes aux extraits aqueux des écorces de *C.sinensis* et de *C.aurantium*.

Par ailleurs, une zone d'inhibition de 11 mm est également constatée par (ESSADIK *et al.*, 2015) pour *S.aureus*, sous l'effet antibactérien des extraits méthanoliques de l'écorce de *Citrus aurantium*.

D'autres études réalisées par (NGELE *et al.*, 2014 ; TUMANE *et al.*, 2014 ; EGBUONU et OSUJI, 2016 ; SINGH *et al.*, 2016 ; YATHIENDER, 2017), ont mis en évidence la sensibilité de *S.aureus* vis-à-vis des extraits éthanoliques, méthanoliques et acétoniques des écorces et pépins de *C.sinensis* et de *C.aurantium*.

Une activité antimicrobienne remarquable des extraits aqueux d'écorce et des pépins des deux espèces d'orange sur la souche *S.aureus* MU50 (figure 37) est détectée, notamment pour les extraits d'écorce de *C.aurantium* avec une zone d'inhibition de 17 mm. Cette activité est plus puissante que celle exercée sur *S.aureus* d'origine alimentaire.

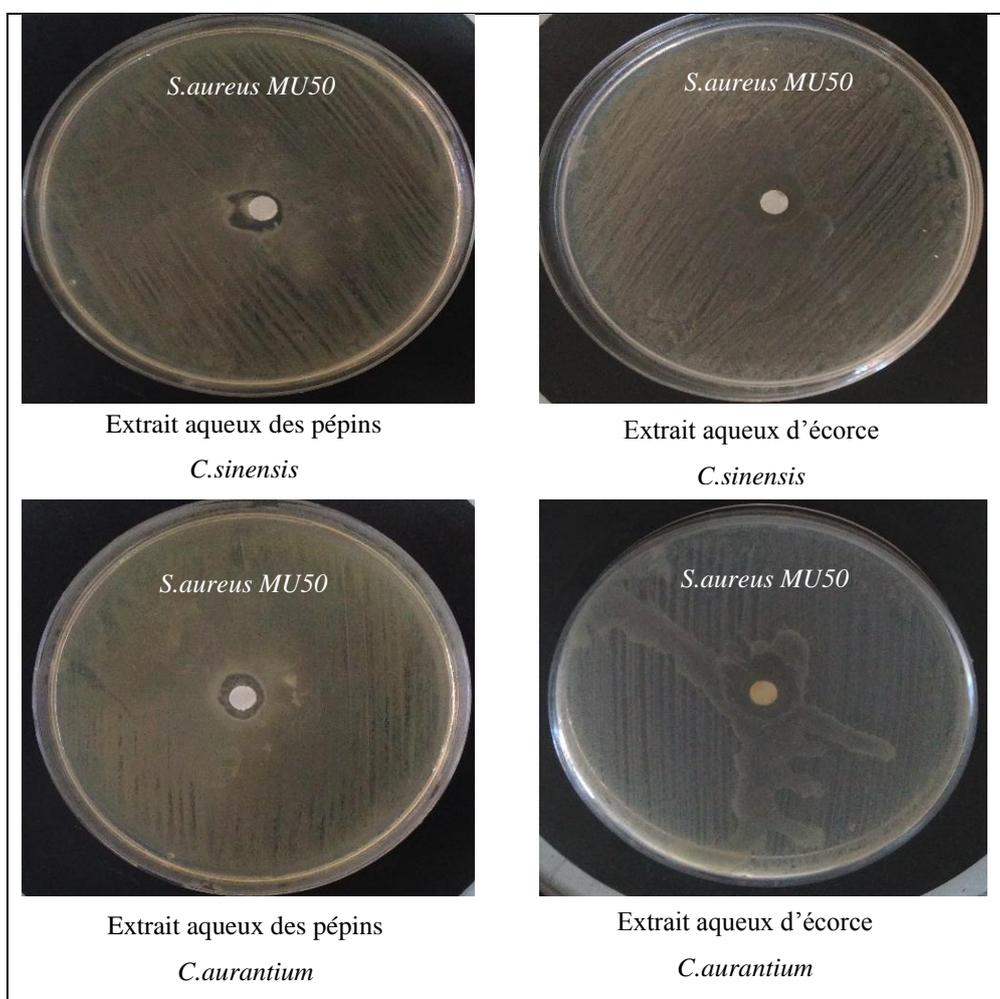


Figure 37 : Effet des extraits aqueux à 2000 $\mu\text{g/ml}$ sur *Staphylococcus aureus* MU50.

La souche *P.aeruginosa* ATCC 27853 (figure 38), qu'on a testé a exhibé des zones d'inhibition de 10 et 12 mm pour tous les extraits aqueux. La souche est alors sensible aux extraits aqueux d'écorces et de pépins de *C.sinensis* et de *C.aurantium*. Toutefois, HINDI et CHABUCK (2013) ont révélé la résistance de cette souche aux extraits aqueux d'écorce de *Citrus limon*.

Les extraits éthanoliques des pépins et pulpe de *Citrus paradisi*, testés par CVETNIC et VLADIMIR-KNEZEVIC (2004), sur dix souches Gram négatif dont *P.aeruginosa* ATCC 27853, n'ont pas montré d'effet antibactérien vis-à-vis de cette souche.

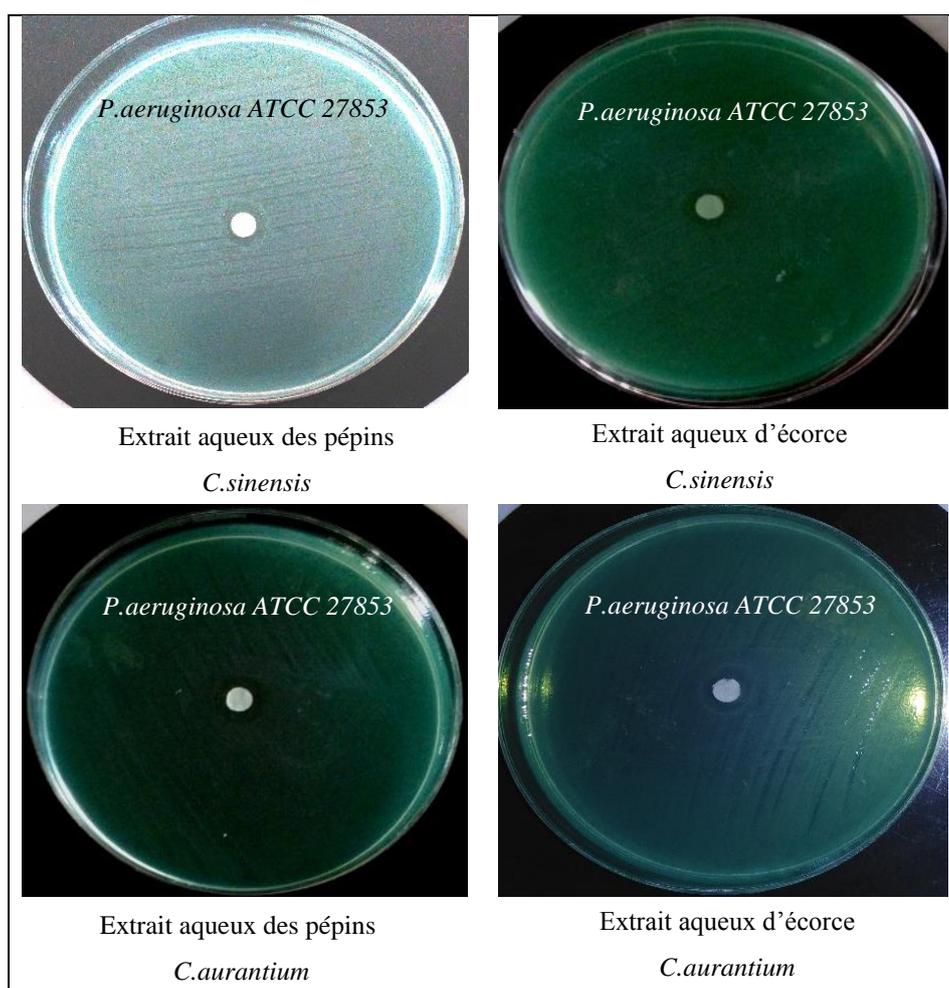


Figure 38 : Effet des extraits aqueux à 2000 $\mu\text{g/ml}$ sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Des zones d'inhibition de 15 mm, 13 mm et 16 mm sont apparues pour les bactéries *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli* respectivement, traitées avec des extraits aqueux d'écorce de *Citrus limetta*, par (MISHRA *et al.*, 2012). Ces résultats concordent partiellement avec les nôtres, pour les mêmes espèces bactériennes traitées avec les extraits aqueux d'écorce de *C.sinensis* et *C.aurantium*, pour lesquels nous avons décelé la résistance d'*E.coli* vis-à-vis de l'extrait aqueux d'écorce de *C.aurantium*.

D'autre part, (MISHRA *et al.*, 2012) ont montré que l'extrait aqueux des pépins de *Citrus limetta* n'a aucune activité antibactériennes sur les bactéries : *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli*. L'effet inverse est constaté lorsque nous avons testé les extraits aqueux des pépins de *C.sinensis* et *C.aurantium* sur ces bactéries. Cela signifie que *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli* sont sensibles aux extrais aqueux des pépins de *C.sinensis* et *C.aurantium*, et résistantes à celui de *Citrus limetta*.

Les résultats obtenus pour *Bacillus cereus* ATCC 14579 (figure 39) semblent être similaires avec les résultats d'étude réalisée par CVETNIC et VLADIMIR-KNEZEVIC (2004), réalisée sur des extraits éthanoliques des pépins et de pulpe de *Citrus paradisi* testés sur dix bactéries Gram positif, parmi elles des souches référenciées de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*. Toutes ces souches se sont révélées sensibles à ces extraits éthanoliques des pépins et de pulpe de *Citrus paradisi*.

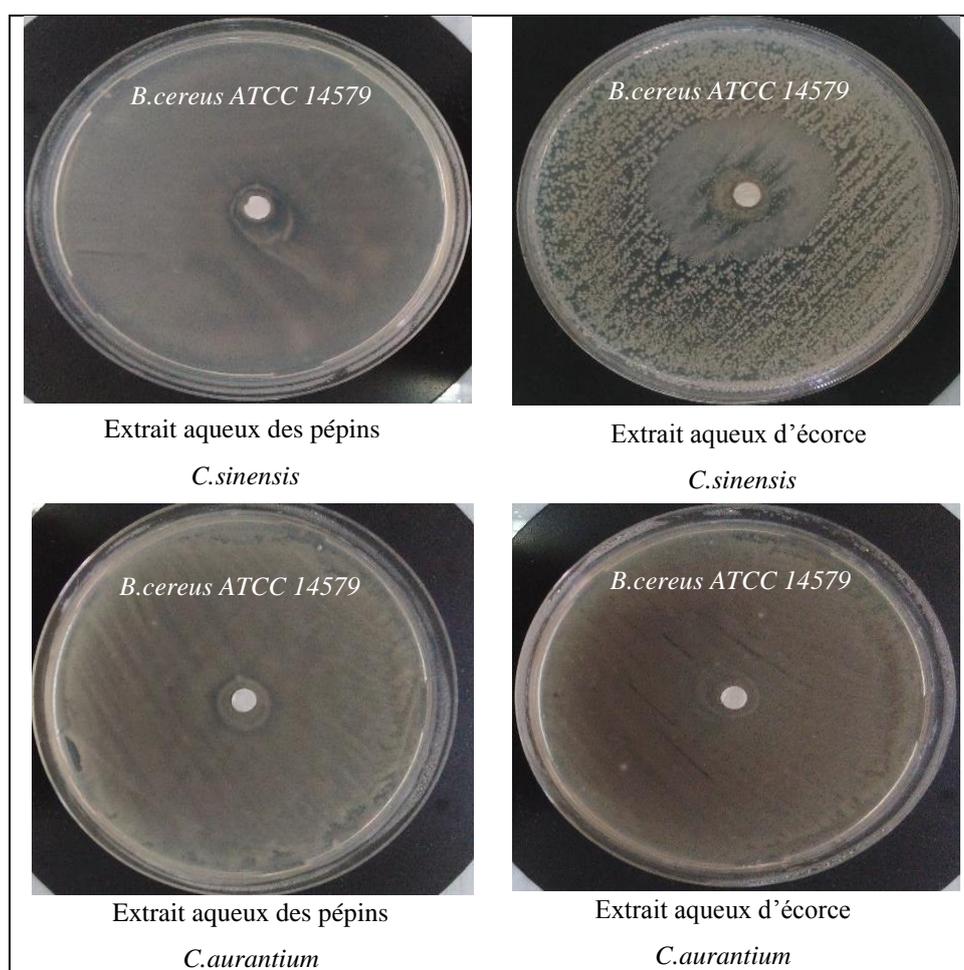


Figure 39 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Il ressort à travers nos résultats, que la bactérie *K.pneumoniae* est sensible aux extraits aqueux des écorces de *C.sinensis* et de *C.aurantium* (figure 40). Cette sensibilité est révélée par l'apparition des zones d'inhibition allant de 10 mm à 16 mm, cela signifie que ces extraits aqueux ont une activité antimicrobienne contre cette bactérie suivant les deux espèces d'orange.

Ce résultat est confirmé par les résultats de (SANTHOSH *et al.*, 2015), qui montrent la sensibilité de *K.pneumoniae* aux mêmes extraits aqueux testés, et ce par l'obtention de zones d'inhibition de 13,33 mm et 14 mm pour *C.sinensis* et *C.aurantium* respectivement. A l'inverse de (NISHA *et al.*, 2013 ; SUJA *et al.*, 2017 ; YATHIENDER, 2017) qui ont décelé la résistance de cette bactérie aux extraits aqueux des écorces de *C.sinensis* et de *C.aurantium*.

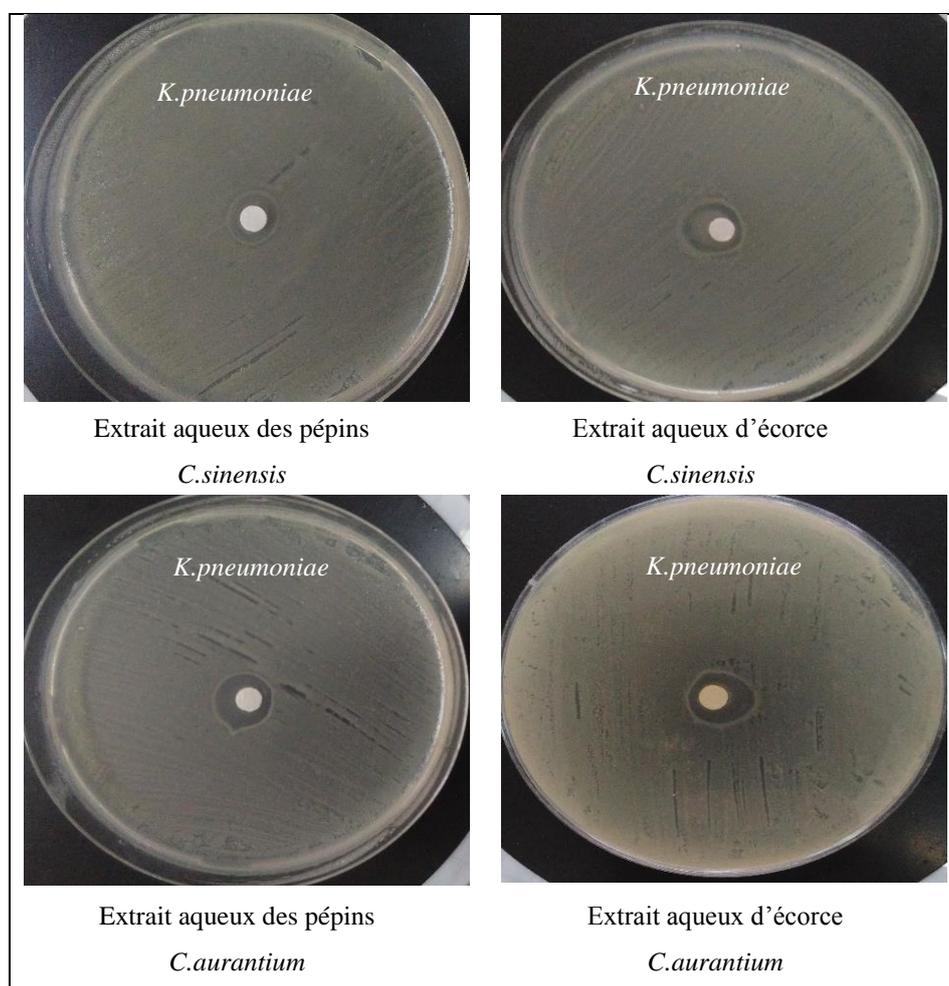


Figure 40 : Effet des extraits aqueux à 2000 $\mu\text{g/ml}$ sur *Klebsiella pneumoniae*.

Les extraits aqueux des pépins de *C.sinensis* et de *C.aurantium* ont une activité antibactérienne sur *K.pneumoniae*, les zones d'inhibition apparues sont de 10 mm et 16 mm

pour les deux extraits respectivement, contrairement aux résultats de YATHIENDER (2017) qui ont indiqué la résistance de cette bactérie aux extraits aqueux des pépins de *C.aurantium*.

Les résultats de notre étude, indiquent que les extraits d'écorces de *C.sinensis* et de *C.aurantium*, exercent une activité antimicrobienne sur la bactérie *K.pneumoniae* (zone d'inhibition de 14 mm et 15 mm). Un résultat similaire est rapporté par HINDI et CHABUCK (2013), qui ont noté que l'extrait de l'écorce de *Citrus limon* a une très bonne activité antimicrobienne sur *K.pneumoniae* avec une zone d'inhibition de 20 mm.

La souche bactérienne *E.faecalis ATCC 49452* est très sensible aux extraits aqueux (figure 41) d'écorce et de pépins des deux espèces exprimant des zones d'inhibition de 10 à 17 mm.

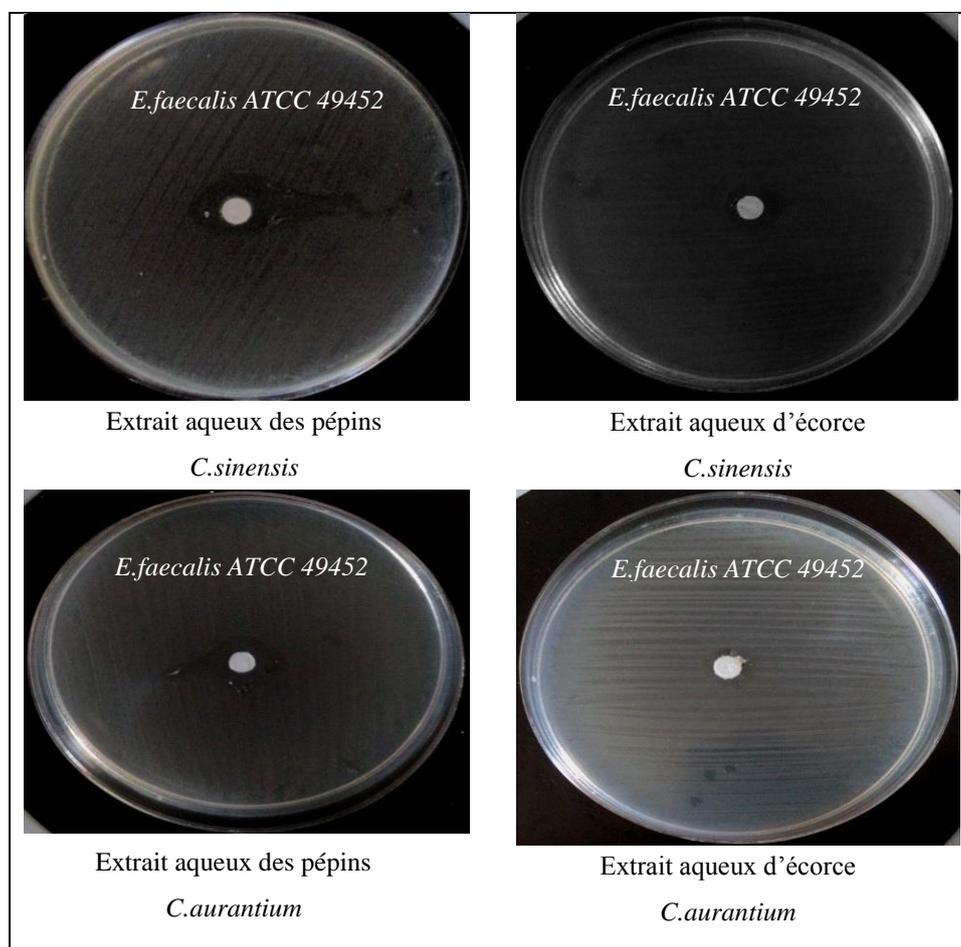


Figure 41 : Effet des extraits aqueux à 2000 $\mu\text{g/ml}$ sur *Enterococcus faecalis ATCC 49452*.

Selon HINDI et CHABUCK (2013), l'effet antimicrobien des différents extraits aqueux d'écorce de *Citrus limon* et *Citrus limetta* sur *E. faecalis* est bien marqué en révélant des zones d'inhibition de 20 à 30 mm.

Il est rapporté par (CASQUETE *et al.*, 2015), que les extraits d'écorces d'orange inhibent en général des bactéries Gram positif et des bactéries Gram négatif à partir d'une concentration de 1,5 mg/ml. En effet, (SANTHOSH *et al.*, 2015) indiquent que le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre selon le degré de diffusion de l'agent antibactérien et du taux de croissance des microorganismes.

Selon (HINDI et CHABUCK 2013 ; SAFDAR *et al.*, 2017), la différence de sensibilité entre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif est due à la différence de structure de la paroi bactérienne de ces deux groupes bactériens ; les bactéries Gram (+) sont généralement plus sensibles aux extraits que les bactéries Gram (-). Ceci pourrait être expliqué par la différence importante de la couche externe des Gram (+).

La perméabilité de la paroi bactérienne des Gram (-) est généralement moins efficace que celle des Gram (+) ; ceci est due probablement à la présence d'un taux élevé de phospholipides dans la paroi des Gram (-) par rapport à celle des Gram (+). De plus, les Gram (-) possèdent une membrane externe imperméable aux composés lipophiles (dont les polyphénols font partie) et un espace périplasmique qu'on ne retrouve pas chez les Gram (+) selon (DJENNANE *et al.*, 2012 ; IGNAT *et al.*, 2013).

La résistance des bactéries Gram (-) à des substances antibactériennes est liée à la surface hydrophile de leurs membrane externe, qui est riche en molécules polysaccharidiques constituant une barrière à la pénétration de nombreuses molécules antibiotiques et aussi aux enzymes de l'espace périplasmique capables de dégrader les molécules introduites de l'extérieur (KONATE *et al.*, 2012).

D'après (KONATE *et al.*, 2012 ; SHARIFI-RAD *et al.*, 2015), l'activité antimicrobienne des polyphénols est due à leur habilité à se complexer avec les protéines solubles extracellulaires et avec la paroi bactérienne.

Selon (SHETTY *et al.*, 2016), les tannins isolés des extraits d'écorce de *C.sinensis*, forment des complexes irréversibles avec une protéine riche en proline ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires.

Le mécanisme de toxicité des PPT contre les microorganismes serait lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases) et autres interactions qui inhibent l'adhésion microbienne et des protéines de transport de l'enveloppe cellulaire ainsi qu'aux interactions non spécifiques avec les hydrates de carbone (KAROU *et al.*, 2005 ; ABOSHORA *et al.*, 2014 ; SU *et al.*, 2015).

La souche fongique *Aspergillus niger* se révèle sensible à tous les extraits aqueux testés (figure 42), les zones d'inhibition obtenues varient de 10 à 14 mm, cela signifie que tous les extraits de *C. sinensis* et *C.aurantium* ont un effet antifongique sur *A.niger*. Ce résultat est similaire à celui trouvé par (ALI *et al.*, 2016) pour les écorces des mêmes espèces d'orange. Alors que (DARCAS *et al.*, 2016) ont montré que les extraits aqueux de *C.aurantium* n'ont aucun effet antimicrobien sur *A.niger*.

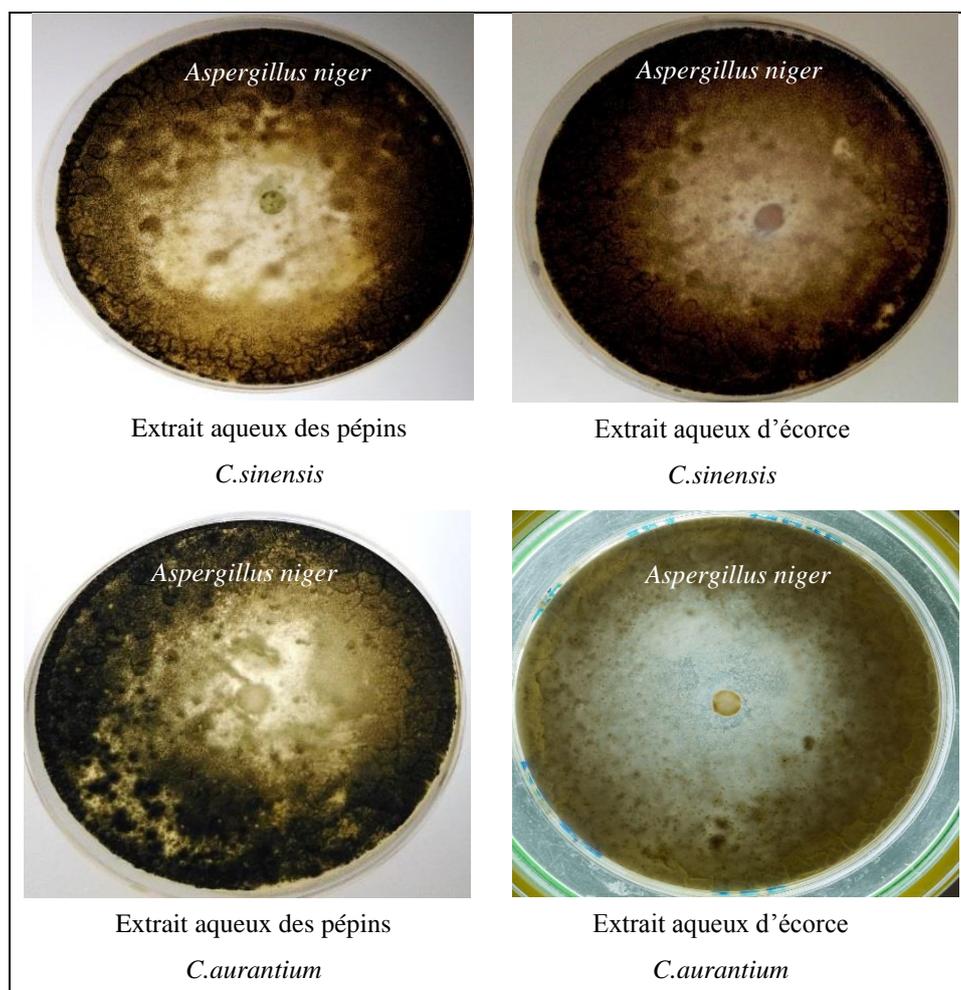


Figure 42 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur *Aspergillus niger*.

Les composés phénoliques ont une structure qui leur permet de se diffuser à travers la membrane microbienne et pénétrer dans la cellule, où ils peuvent pénétrer dans les voies métaboliques en interférant avec la synthèse de l'ergostérol, le glucane, la chitine, les protéines et les glucosamines chez les champignons (ANSARI *et al.*, 2013).

Les polyphénols peuvent également se lier directement avec les protéines, ce qui altère la structure tertiaire de ces dernières (ANSARI *et al.*, 2014).

La levure *Candida albicans* (figure 43) se montre sensible uniquement à l'extrait des pépins de *C.sinensis*, pour lequel la zone d'inhibition manifestée est de 12 mm.

Les extraits d'écorces de *C.sinensis* et *C.aurantium* ne sont pas efficaces contre *C.albicans*. Ce résultat est compatible avec celui obtenu par (HINDI et CHABUCK, 2013 ; SAFDAR *et al.*, 2017) pour la même espèce de levure, traité avec les extraits d'écorces de *Citrus limon* et de *Citrus limetta*.

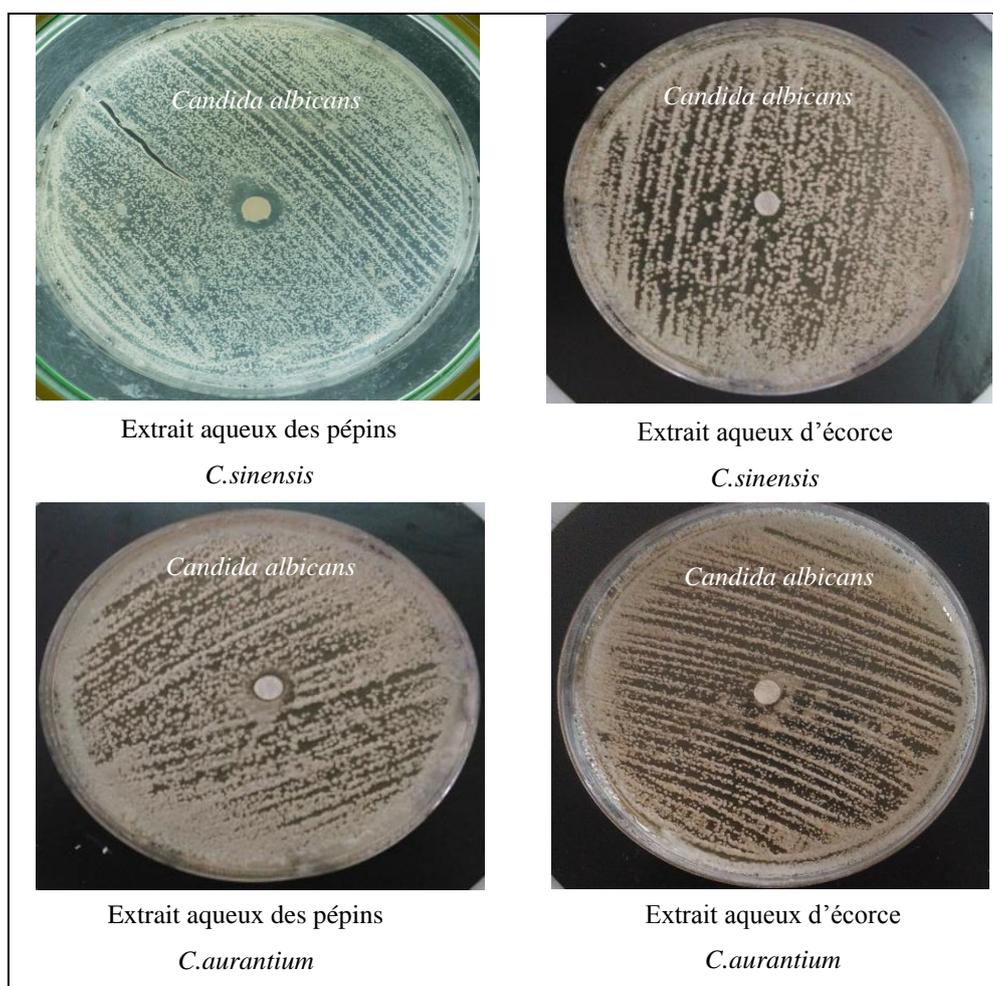


Figure 43 : Effet des extraits aqueux à 2000 µg/ml sur *Candida albicans*.

La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques (HAYOUNI *et al.*, 2007). Cette variation est encore affectée par d'autres facteurs tels que : le temps de la récolte, le stockage et le climat qui peuvent affecter le taux des constituants actifs comme les flavonoïdes, les tanins,...etc. (CASQUETE *et al.*, 2015).

D'après (ANSARI *et al.*, 2013), les polyphénols agissent également en augmentant les niveaux d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui inhibent la formation d'hyphes et diminuent par la suite la formation de biofilm, induisant une apoptose précoce.

Un autre type de composé phénolique fongicide est le bisbibenzyle qui est un nouveau type d'agent antifongique qui inhibe la croissance de *C. albicans* en inhibant le changement morphogénétique par la production de farnesol et en inhibant la formation de biofilm en raison de la régulation du gène DPP3. Ce dernier est connu pour jouer un rôle important dans la synthèse de farnesol car il code pour enzyme qui convertit le pyésphosphate de farnesyle en farnesol (ANSARI *et al.*, 2014).

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent que les écorces et les pépins de *Citrus sinensis* et de *Citrus aurantium* contiennent des polyphénols y compris les flavonoïdes. L'espèce *Citrus sinensis* est plus riche en polyphénols tandis que *Citrus aurantium* est plus riche en flavonoïdes suivant les deux types d'extraction aqueuse et éthanolique.

Les extraits phénoliques révèlent une activité antioxydante intéressante en comparaison à celle de l'acide ascorbique considéré comme antioxydant de référence. Par conséquent, *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis* pourraient être utilisés comme antioxydants naturels alternatifs si l'on désire se méfier des antioxydants synthétiques.

L'activité antibactérienne est mise en évidence pour les extraits aqueux sur huit souches bactériennes. Les résultats indiquent que tous les extraits phénoliques (pépins et écorce) des deux espèces possèdent une bonne activité antibactérienne sauf l'écorce de *C.aurantium* qui paraît sans effet sur *E.coli* d'origine clinique à la concentration de 2000µg/ml. L'activité antifongique est déterminée sur deux souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus niger* qui s'avèrent sensibles aux extraits, sauf *C.albicans*, qui se déclare sensible pour les extraits aqueux de pépins de *C.sinensis*).

Les résultats de cette étude révèlent que les sous-produits d'orange, généralement jetables, renferment des quantités importantes de composés phénoliques susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique,... etc.).

A partir de ces résultats, d'autres études plus élargies et approfondies s'avèrent nécessaires qui s'imposent en perspectives notamment :

- L'utilisation d'autres solvants d'extraction en chaîne afin d'avoir une meilleure solubilité des composés actifs et donc un meilleur rendement d'extraction ;
- La caractérisation des composés actifs dans les différentes parties du fruit (étude qualitative et quantitative) par l'emploi de technique plus performantes, en vue d'identification des différentes molécules responsables des différentes activités biologiques ;
- Réalisation d'étude toxicologique pour identification d'éventuels effets toxiques de ces composés sur la santé humaine - Étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens,...etc.
- Élargir le spectre d'étude en étudiant les mêmes espèces d'autres régions à des fins comparatives ;

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle, biologiquement actives. Une étude *in vivo* est souhaitable, pour avoir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des sous-produits de *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis* (pépins et écorces).

L'extraction des polyphénols à partir des sous-produits d'orange permettrait la valorisation de ces déchets, et donc l'obtention de substances bioactives d'intérêt thérapeutique et d'application industrielle. Cette extraction de polyphénols au moyen d'eau constitue un avantage économique, suite à l'isolement substances antioxydantes et antimicrobiennes à moindre cout d'une part, et la résolution du problème de pollution d'autre part.

- **AARABI A., HONARVAR M., MIZANI M., FAGHIHIAN H. et GERAMI A. (2016).** Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Italian Journal of Food Science*. 28: 362-375.
- **ABOSHORA W., LIANFU Z., DAHIR M., QINGRAN M., QINGRUI S., JING L., AL-HAJ N.Q.M. et AMMAR A-F. (2014).** Effect of extraction method and solvent power on polyphenol and flavonoid levels in *Hyphaene Thebaica L Mart (Arecaceae)* (Doum) fruit, and its antioxidant and antibacterial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13(12): 2057-2063.
- **ACHAT S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia. Algérie.
- **ADNAN M., UMER A., AHMAD I., HAYAT K. et SHAKEEL S.N. (2014).** In vitro evaluation of biological activities of Citrus leaf extracts (Penilaian *in vitro* aktiviti biologi ekstrak Daun Limau). *Sains Malaysiana*. 43(2): 185-194.
- **AJILA C.M., BRAR S.K., VERMA M., TYAGI R.D., GODBOUT S. et VALERO J.R. (2016).** Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1-22.
- **AKROUM S., BENDJEDDOU D., SATTI D. et LALAOUI K. (2009).** Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 4(2): 93-96.
- **ALAM M.N., BRISTI N.J et RAFIQUZZAMAN M. (2013).** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21:143–152.
- **ALAM M.K., RANA Z.H et ISLAM S.N. (2016).** Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh. *Foods*. 5(3): 1-6.

- **ALAM M.N., BRISTI N.J et RAFIQUZZAMAN M. (2013).** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21:143-152.
- **AL-ANBARI A. K. H. et HASAN M. A. (2015).** Antioxidant activity in some *Citrus* leaves and seeds ethanolic extracts. *International Conference on Advances in Agricultural, Biological and Environmental Sciences*. 93-97.
- **ALBUQUERQUE A.J.R., SILVA P.M.F., CAVALCANT A.L.F.A. et SAMPAIO F.C. (2013).** Polyphenols as a source of antimicrobial Agents against Human Pathogens. *Nova Science Publishers*. 276-293.
- **ALI J., ABBAS S., KHAN F.A., REHMAN S.U., SHAH J., RAHMAN Z.U., RAHMAN I.U., PARACHA G.M.U., KHAN M.A. et SHAHID M. (2016).** Biochemical and anti- microbial properties of Citrus peel waste. *Pharmacology on Line*. 3: 98-103.
- **AL-SNAFI A.E. (2016).** Nutritional value and pharmacological importance of Citrus species grown in Iraq. *International Organization of Scientific Research. Journal of Pharmacy*. 6(8): 76-108.
- **AMEER K., SHAHBAZ H.M. et KWON J-H. (2017).** Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A Review Comprehensive. *Reviews in Food Science and Food Safety*. 16.
- **AMIOT-CARLIN M.J. (2014).** Les phytomicronutriments : tour d’horizon et difficultés rencontrées pour établir des ANC. Liens avec la réglementation des allégations santé. *Innovations Agronomiques*. 42: 1-9.
- **ANAGNOSTOPOULOU M.A., KEFALAS P., PAPAGEORGIOU VASSILIOS P., ASSIMOPOULOU ANDREANA N. et BOSKOU D. (2006).** Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*. 94: 19-25.

- **ANDRADE R.A.M.S., MACIEL M.I.S., SANTOS A.M.P. et MELO E.A. (2015).** Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. *Food Science and Technology, Campinas*. 35(2) : 354-360.
- **ANSARI M., ZEESHAN F. et H. SAIF. (2014).** Sesamol: a natural phenolic compound with promising anticandidal potential. *Journal of Pathogens*. 10:1-12.
- **ARABBI P.R., GENOVESE M.I.S. et LAJOLO F.M. (2004).** Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J. Agric. Food Chemistry*. 52: 1124-1131.
- **ARORA M. et KAUR P. (2013).** Antimicrobial and antioxidant activity of orange pulp and peel. *International Journal of Science and Research*. 2(11): 412- 415.
- **ATROUZ O.M. (2009).** The Antioxidant activity and polyphenol contents of different plants seeds extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12(15): 1063- 1068.
- **AZIKA J., ROONEY L., XINLI W., PRIOR R. et ZEVALLOS L. (2003).** Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6657-6662.
- **BA K., TINE E., DESTAIN J., CISSE N. et THONART P. (2009).** Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant des différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*. 14(1) : 131-139.
- **BARBONI T. (2006).** Contribution des méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. *Molécules*. 10 :125-146.
- **BARHE A. et TCHOUYA G.R.F. (2016).** Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa L.*, *Glycine max L. Merr.*,

yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian. Journal of Chemistry*. 9: 1-8.

- **BEAUDEUX J-L., PEYNET J., BONNEFONT-ROUSSELOT D., THEROND P., DELATTRE J. et LEGRAND A. (2006).** Stress oxydant: Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. *Annales Pharmaceutiques*. 64 : 373-381.
- **BEJAR A.K, NABIL KECHAOU N. et BOUDHRIOUA MIHOUBI N. (2011).** Effect of Microwave Treatment on Physical and Functional Properties of Orange (*Citrus sinensis*) Peel and Leaves. *Food Processing and Technology*. 2(2): 109.
- **BILBAO M.M., ANDRE'S-LACUEVA C., JA'UREGUI O. et LAMUELA-RAVENTO R. M. (2007).** Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food Chemistry*. 101: 1742-1747.
- **BOBIS O., DEZMIREAN D. S., TOMOS L., CHIRILA F. et MARGHITAS L. AL. (2015).** Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against Gram positive and Gram negative bacteria applied. *Biochemistry and Microbiology*. 51(1): 113-118.
- **BOIZOT N. et CHARPENTIER J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 79-82.
- **BONNAILLIE C., SALACS M., VASSILIOVA E. et SAYKOVA I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de Génie Industriel*. 7 : 35-45.
- **BORDJIBA O., DJAHRA A.B. et BENKHERARA S. (2011).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Saugue officinale : *Salvia officinalis L.* sur quelques entérobactéries pathogènes. *Revue Science Technology*. 23:72-80.

- **BOULAHBAL F. (1993).** Microbiologie S1 clinique. *Edition OPU*. p 169.
- **BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., SAMOJLIK I., GORAN A. et IGIC R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*). *Food Chemistry*. 111: 925-929.
- **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E. et BERSET C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28(1): 25-30.
- **CARRIERE A., GALINIER A., FERNANDEZ Y., CARMONA M-C., PENICAUD L et CASTEILLA L. (2017).** Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecine Sciences*. 22(1) : 47-53.
- **CASQUETE R., CASTRO S.M., ALBERTO A., RUIZ-MOYANO S, SARAIVA J.A., GORDOBA M.G et TEIXEIRA P. (2015).** Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 7(5): 1-8.
- **CASTELLANO G. (2012).** Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its Relation to antioxidant properties of *Posidonia Oceanica* L. *Delile. MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry*. 67: 231-250.
- **CASTRO-VASQUEZ L., ALANON M.E., RODRIGUEZ-ROBLEDO V., PEREZ-COELLO M.S., HERMONSIN-GUTIERREZ I., DIAZ-MAROTO M.C., JORDAN J., GALINDO M.F. et ARROYO-JIMINEZ M.M. (2016).** Bioactive flavonoids, Antioxidant behavior, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-12.
- **CHANET A., MILENKOVIC D., CLAUDE S., MATER J.A.M., KHAN M.K., RAKOTOMANOMANA N., SHINKARUK S., BERARD A.M., BENNETAU-PELISSERO C., MAZUR A. et MORAND C. (2013).** Flavanone metabolites decrease

monocyte adhesion to TNF- α -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. *British Journal of Nutrition*. 110: 587-598.

- **CHEMLER J.A., LIM C.G., DAISS J.L. et KOFFAS M.A.G. (2010).** A Versatile Microbial System for Biosynthesis of Novel Polyphenols with Altered Estrogen Receptor Binding Activity. *Chemistry and Biology*. Cell press. 17 (23) : 392-401.
- **CLEMENTINE B., SALACS M., VASSIOLIOVA E. et SAYKOVA I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de Génie Industriel*. 07 : 35-45.
- **CVETNIC Z. et VLADIMIR-KNEZEVIC S. (2004).** Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica*. 54 : 243-250.
- **DABAS D. (2016).** Polyphenols as Colorants. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences*. 2: 51-56.
- **DAGLIA M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23: 174-181.
- **DAI J et MUMPER R.J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- **DALLAS C., GERBIB A., TENCAC G., JUCHAUX F. et BERNARD F-X. (2008).** Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine*. 15: 783-792.
- **DAMIAN-REYNA A.A., GONZALEZ-HERNANDEZ J.C et CHAVEZ-PARGA M.C. (2016).** Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoids current extraction of citrus. *Revue of Colombia. Biotechnology*. 18(1): 135-147.

- **DHANAVADE M.J., B.J. CHIDAMBER, GHOSH J.S. et SONAWANE K.D. (2011).** Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon L.*) Peel Extract. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2(3): 119-122.
- **D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGIULO R., C. GIOVANNINI et MASELLA R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist super Sanità*. 43(4): 348-361.
- **DE SANTO M.G., NUNEZ C.V. et MOYA H.D. (2013).** A new method for quantification of total polyphenol content in medicinal plants based on the reduction of Fe (III)/1,10-phenanthroline complexes. *Advances in Biological Chemistry*., 3: 525-535.
- **DIVYA P.J., JAMUNA P. et JYOTHI L.A. (2016).** Antioxidant proprieties of fresh and processed *Citrus aurantium* fruit. *Food and Agriculture 2*: 1-12.
- **DJAHRA A.B. (2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du marrube blanc ou *Marrubium vulgare L.* Thèse de Doctorat. *Faculté des Sciences*, Université d'Annaba (Algérie).
- **DJENANE D. (2015).** Chemical profil, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in *Sardina pilchardus*. *Foods*. 4: 208-228.
- **DJENANE D., YANGUELA J., DERRICHE F., BOUARAB L et RONCALES P. (2012).** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens ; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature and Technologie*. 07: 53-61.
- **DO Q.D., ANGKAWIJAYA A.E., TRAN-NGUYEN P.L., HUYNH L.H., SOETAREDJO F.E., ISMADJI S. et JU Y-H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22: 296-302.

- **DONG H., CHEN H-D., ZHAO Y-J et LI H-M. (2014).** Polymethoxy flavones do not exert an inducing effect on the biosynthesis and secretion of insulin by pancreatic β -cells. *Biomedical Reports*. 2: 287-291.
- **DONZO M., SARR A., SAMB A., BASSENE E. et BARRYM S. (2015).** Dosage des flavonoïdes totaux et détermination du pouvoir antioxydant dans l'extrait brut des écorces *Revue El Wahat*. 8(1) : 11-18.
- **DORCAS A.F., SHEILA J., ESTHER L. et PRIYADARSHINI S. (2016).** Phytochemical activity of bitter orange (*Citrus aurantium* l.) peel powder. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 55(4): 1711-1719.
- **DORCAS F., JOHN S., ESTHER L., IYER P. et PRIYADARSHINI S. (2016).** Study on the antimicrobial property of bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel powder and developing recipes using the powder. *International Journal of Home Science*. 2(2): 125-131.
- **DORCAS F., JOHN S., ESTHER L., IYER et PRIYADARSHINI S. (2016).** Antioxidant activity of bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel powder. *Indian Journal of Applied Research*. 6 (4): 544-546.
- **DUDA-CHODAK A. et TARKO T. (2007).** Antioxidant properties of different fruit seeds and peels. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 6(3) : 29-36.
- **DURAFFOURD C. et LAPRAZ J.C. (2002).** Traité de Phytothérapie clinique. *Endobiogénie et Médecine*. Edition Masson, Paris. p 827.
- **DYKES L et RONNEY L.W. (2006).** Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*. 44: 236-251.

- **EDZIRI H., MASTOURI M., AOUNI M et VERSHA EVE L. (2012).** Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*. 80: 104-109.
- **EGBUONU A.C.C. et OSUJI C.A. (2016).** Proximate compositions and antibacterial activity of *Citrus sinensis* (Sweet Orange) peel and seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*. 12(3): 1-7.
- **ELLOF J.N., FAMA KIN J.O. et KATERERE D.R.P. (2005).** Isolation of an antibacterial stilbene from *Combretum woodii* (Combretaceae) leaves. *African Journal of Biotechnology*. 4(10): 1167-1171.
- **ENGIDAA A.M., KASIMA N.S., TSIGIE Y.A., ISMADJIB S., HUYNHC L.H et JU Y-H. (2013).** Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Industrial Crops and Products*. 41: 392-396.
- **ESCARTIN I. (2011).** Guide des agrumes. Edition l'Institut Klorane.
- **ESSADIK F.Z., HAIDA S., KRIBII A., KRIBII A.R., OUNINE K. et HABSAOUI A. (2015).** Antioxidant activity of *Citrus aurantium L. var. amara* Peel from western of Morocco, identification of volatile compounds of its essential oil by GC-MS and a preliminary study of their antibacterial activity. *International Journal of Innovation and Scientific Research*. 16(2): 425-432.
- **ETEBU E et NWAUSOMA A. B. (2014).** A review on sweet orange (*Citrus sinensis L Osbeck*): Health diseases and management. *American Journal of Research Communication*. 2(2): 33-70.
- **EVANS M., SHARMA P. et GUTHRIE N. (2012).** Bioavailability of Citrus polymethoxylated flavones and their biological role in metabolic syndrome and hyperlipidemia, readings in advanced pharmacokinetics-theory, methods and Applications. *InTech, Available*. 14-284.

- **EVERETTE J.D., ZELELEM A., WALKER R.B. et ISLAM S. (2014).** Antioxidant activity and phenolic content of orange-fleshed sweet potatoes. *Arkansas Environmental, Agricultural and Consumer Sciences Journal*. 34-38.
- **FATTOUCH S., CABONI P., CORENEO V., TUBERESSO C., ANGIONI A., DESSI S., MARZOUKI N. et CABRAS P. (2006).** Antimicrobial activity of Tunisian Quince (*Cydonia Oblonga miller*) pulp and peel phenolic extracts, *Journal of Agricultural and food chemistry*. 50: 130-143.
- **FAVELA-HERNANDEZ M.J., GONZALE-SANTIAGO O., RAMIREZ-CABRERA M.A., ESQUIVEL-FERRINO P.C. et VAMACHO-CORONA M.R. (2016).** Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules*. 21(247) : 1-24.
- **FAVIER A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 109: 108-115.
- **FEJIE A. et CAVAR S. (2014).** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Citrus. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*. 42: 1-4.
- **FRANCO D., SINEIRO J., RUBILAR M., SANCHEZ M., JERE M., PINELO M., COSTOYA N. et MUNEZ M.J. (2008).** Polyphenols from plant materials extraction and antioxidant power. *Electronic journal of agriculture and food chemistry*. 7(8) : 3210-3216.
- **GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z. et JORE D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité Chimique*. 91-96.
- **GBOHAIDA V., MEDOATINSA S.E., NONVIHO G., BOGNINOU-AGBIDINOUM G.S.R., AGBANGNAND C.P. et SOHOUNHLOUE C.K.D. (2015).** Etude chimique et évaluation de l'Influence de la granulométrie sur la cinétique d'extraction des polyphénols naturels de *Pterocarpus erinaceus* acclimaté au Bénin. *International. Journal of Innovation and Applied Studies*. 12(2): 325-333.

- **GHASEMI K., GHASEMI Y. et EBRAHIMZADEH M.A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* 22(3): 277-281.
- **GHEDIRA K et GOETZ P. (2015).** *Citrus aurantium L.var. amara* Link, Oranger amer–Bigardier (Rutaceae). *Phytothérapie.* 13: 320-327.
- **GORMAT N., BELARBI M., MAMI Z. et DJAZIRI F.Z. (2015).** Physico-chemical characteristics and antioxidant activity of phenolic compounds and oil of *Citrus aurantium* seeds from Northern Algeria. *International Journal of Phytomedicine.* 7: 370-378.
- **GOSSLAU A., KUANG Y.C., CHI-TANG H et SHIMING L. (2014).** Anti-inflammatory effects of characterized orange peel extract enriched with bioactive polymethoxyflavones. *Food Science and Human Wellness.* 3: 26–35.
- **HAMMOUDI R., HADJ MOHAMMED M. et RAMDANE F. (2009).** Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante *Teucrium polium geyrii* provenant de la région Tamanrasset. *Algerian Journal of Arid Environment.* 2(1): 49-55.
- **HATZIDIMITRIOU E.F., NENADIS N. et TSIMIDOU M.Z. (2007).** Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry.* 105: 1504-1511.
- **HAYOUNI E-A., ABEDRABBA M., BOUX M. et HAMDI M. (2007).** The effect of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruits extracts. *Food Chemistry.* 105(3): 1126-1134.
- **HAYTOWITZ D.B., BHAGWAT S et HOLDEN J.M. (2013).** Sources of variability in the flavonoid content of foods. *Procedia Food Science.* 2 : 46–51.
- **HEGAZY A.E et IBRAHIUM M.I. (2012).** Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal.* 18(5): 684-688.

- **HINDI N.K.K. et CHABUCH Z.A.G. (2013).** Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3(6): 74-78.
- **HIRRI A., DE LUCA M., IOELE G., BALOUKI A., EI BASSBASI M., KZAIBER F., OUSSAMA A. et RAGNO G. (2015).** Chemometric Classification of Citrus Juices of Moroccan Cultivars by Infrared Spectroscopy. *Czech Journal of Food Sciences*. 33 (2): 137-142.
- **HEGDE P., AGRAWAL P. et GUPTA P. K. (2016).** Polyphenols - a useful biomaterial. *Journal of Environmental Research and Development*. 10(3): 547-554.
- **IGNAT I., RADU D.G., VOLF I., PAG A.I. et POPA V.I. (2013).** Antioxidant and antibacterial activities of some natural polyphenols. *Cellulose Chemistry and Technology*. 47(5). 387-399.
- **JAYAPRAKASH G.K., SINGH R.P. et SAKARIAH K.K. (2001).** Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 1018-1022.
- **KAMEL Z., ULLAH F., MUMAMMAD A., SADIQ A., AHMAD S., ANWAR Z., HUSSAIN A. et IMRAN M. (2015).** Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata L.*: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biological Research*. 48(21): 1-11.
- **KARSHEVA M., KIROVA E. et ALEXANDROVA S. (2013).** Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols; effect of operational conditions on total polyphenols contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48(1): 35-41.
- **KARSHEVA M., KIROVAL E., ALEXANDROVA S. et GEORGIEVA S. (2013).** Comparison of *Citrus* peels as source of valuable components: polyphenols and antioxidants. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48(5): 475-478.

- **KAROUI I. et MARZOUK B. (2013).** Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus Aurantium L.*) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International*. 8: 1-15.
- **KAROU D., DICKO M.H., SIMPORE J. et TRAORE A.S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. 4 (8): 823-828.
- **KASALI F.M., WENDO F.M., MUYISA S.K. et KADIMA J.N. (2016).** Comparative hypoglycemic activity of flavonoids and tannins fractions of *Stachytarpheta indica L.* leaves extracts in Guinea-Pigs and Rabbits. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*. 5(2): 48-57.
- **KAUR K.D., JHA A., SABIKHI L. et SINGH A. K. (2014).** Significance of coarse cereals in health and nutrition. *Journal of Food Science and Technology*. 51(8): 1429-1441.
- **KEERTHI M., LAKSHMI L.P.J., SANTHOSH A.M. et RAMA R.N. (2014).** Review on polyphenols as nature's gift. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(4): 445-455.
- **KHOLKHAL F., LAZOUNI H.A., BENDAHOU M., BOUBLENZA I., CHABANE S.D. et CHAOUCH T. 2013.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de *Thymus ciliatus ssp. coloratus*. *Afrique Science*. 9(01) : 151-158.
- **KIM H.P., SON K.H., CHANG H.W. et KANG S.S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 96(3): 229-245.
- **KLIMCZAK I., MALECKA M., SLACHTA M. et GLISZCZYNSKA-SWIGLO A. (2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10: 313-323.

- **KOECH K.R., WACHIRA F.N., NGURE R.M., WANYOKO J.K., BII C.C., KARORI S.M. et KERIO L.C. (2013).** Antimicrobial, synergistic and antioxidant activities of tea polyphenols. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. 11: 971-981.
- **KOFFI E., SEA T., DODEHE Y. et SORO S. (2010).** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty-three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 5 (3): 550- 558.
- **KONATE K., HILOU A., MAVOUNGOU J.F., LEPENGUE A.N., SOUZA A., BARRO N., DATTE J. Y., M'BATCHI B. et NACOUKMA O.G. (2012).** Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba L. (Malvaceae)* against cotrimoxazol-resistant bacteria strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11(5): 1-6.
- **KROYER G. (2009).** Antioxidant activity and total polyphenols in Citrus fruit peels and seeds. *European Food Chemistry*. 15 (4): 213-216.
- **KUMAR H., CHOUDHARY N., VARSHA. KUMAR N, SUMA N. et SETH R. (2014).** Phenolic compounds and their health benefits: A review. *Journal of Food Research and Technology*. 2(2): 46-59.
- **KYSELOVA Z. (2011).** Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdisciplinary Toxicology*. 4(4): 173-183.
- **LAGHA-BENAMROUCHE S. et MADANI K. (2013).** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis L.* and *Citrus aurantium L.*) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. 50: 723-730.
- **LI B.B., SMITH B. et HOSSAIN M.M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48: 182-188.
- **LI Y., LAI P., CHEN J., SHEN H., TANG B., WU L. et WENG M. (2016).** Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina Lindl.* *Food Science and Technology*. 36(3): 520-525.

- **LIU E-H., QI L-W., CAO J., Li P., Li C-Y et PENG Y-B. (2008).** Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*. 13: 2521-2544.
- **LOUAILECHE H., KHODJA Y.K. et BEY M.B. (2015).** Phytochemical contents and *In Vitro* antioxidant activity of Algerian orange juices. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*. 1(2) : 107-111.
- **LOUSSERT R. (1989).** Les agrumes - Volume 1 : arboriculture. *Edition Lavoisier*. p 136.
- **MACHEIX J-J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Les Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, Lousane. p 1-14.
- **MADHURI S., HEGDE A.U., SRILAKSHMI N.S. et PRASHITH-KEKUDA T.R. (2014).** Antimicrobial activity of Citrus sinensis et Citrus aurantium peel extracts. *Journal of pharmaceutical and Scientific Innovation*. 3(4) : 366-368.
- **MAHMOUDI S., KHALI M. et MAHMOUDI N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Nature et Technologie*. 09: 35-40.
- **MAGWAZA L.S., OPARA U.L., CRONJE P.J.R., LANDAH S., ORTIZ J.O. et TERRY L. A. (2016).** Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds. *Food Science and Nutrition*. 4(1): 4-10.
- **MARIN L., MIGUELEZ E., VILLAR C.J. et LOMBO F. (2015).** Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International*. 1-10.
- **MEHINAGIC E., BOURLES E. et JOURJON F. (2011).** Composés des fruits d'intérêt nutritionnel : impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*. 43(6) : 364-368.

- **MEHRA S., SHUKLA S., SRIVASTAVA R., MATHEW J. et MEHRA M. (2015).** Evaluation of antimicrobial activity of peel and pulp extracts of *C. paradise*, *C. medica* and *C. limon* against *B. Cereus* and *M. luteus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 9(1): 174-182.
- **M’HIRI N., VEYS-RENAUX D., IOANNOU I., ROCCA E., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. et GHOUL M. (2015).** Corrosion inhibition of carbon steel in acidic medium by orange peel extract and its main antioxidant compounds. *Article in press. Journal of Corrosion Science*.
- **MIGDAL C et SERRES M. (2011).** Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medecine Science*. 27: 405-412.
- **MIGUEL M.G., FALIERO M.L., GUERRIERO A.C., et ANTUNES M.D. (2014).** *Arbutus unedo L.* : chemical and biological proprieties. *Molecules*. 19: 15799-15823.
- **MILIND P et DEV C. (2012).** Orange: Range of Benefits. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(7): 59-64.
- **MISHRA R.P., YADAV S. et ANJALI (2012).** Study of antimicrobial activities of *Citrus limetta*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 19 (15): 1-4.
- **MOJZER E.B., HRNCIC M.K., SKERGET M., KNEZ Z., et BREN U. (2016).** Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 21(901): 1-38.
- **MOLAN A-L., ISMAIL M. H. et NSAIF R.H. (2016).** Phenolic contents and antioxidant activity of peels and seeds of orange (*Citrus sinensis*) cultivated in Iraq. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4): 473-482.
- **MOLYNEUX P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2): 211-219.

- **MORAND C. et MILENKOVIC D. (2014).** Polyphénols et santé vasculaire : mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques*. 42: 47-62.
- **MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E. et ROURA S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT- Food Science and Technology*. 38: 565-570.
- **MORREEL K., GEOMINNE G., STORME V., STERCK L. STEENACKERS J.R., COPPIETERS W., BREYNE P., STEENACKERS M., GEORGES M., MESSENS E. et BOERJAN W. (2006).** Genetical Metabolomics of Flavonoid Biosynthesis in Populus: a Case Study. *The Plant Journal*. 47: 224-237.
- **MRAIHI F., HIDALGO M, PASCUAL-TERESA S., TRABELSI-AYADI M et CHERIF J-K. (2015).** Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry*. 8: 570-578.
- **MURTO M., BJÖRNSSON L. et MATTIASSON B. (2004).** Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management*. 70(2) :101-107.
- **NACZK M. et SHAHIDI F. (2003).** Phenolics en food and nutraceuticals. *Edition Boca Raton*, London p151.
- **NAKAJIMA V.M, MACEDO G.A. et MACEDO J.A. (2014).** Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT-Food Science and Technology*. 59: 1205-1212.
- **NISHA S.N., SWEDHA A.A. et RAHAMAN S.N.J. (2013).** Antibacterial activity of *Citrus sinensis* peel against enteric pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bioscience*. 2(5):1-134.

- **NOORI S. (2012).** An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports*. 1(8): 1-9.
- **NUMONOV S., EDIRS S., BOBAKULOV K., QURESHI M.N., BOZIROV K., SHAROPOV F., SETZER W.N., ZHAO H., HABASI M., SHAROFORA M. et HADJI A.A. (2017).** Evaluation of the antidiabetic activity and chemical composition of *Geranium collinum* root extracts- computational and experimental investigations. *Molecules*. 22: 1-15.
- **NWAUZOMA A.B, M., CHOUDHARY I., ZULFIUQAR A et OLAIYA C. (2013).** Biological activity of crude extracts of Citrus species from Nigeria. *Nature and Science*. 11(7): 135-139.
- **OMOBA O.S., OBAFAYE R.O., SALAWU S.O., BOLIGNON A.A. et ATHAYDE M.L. (2015).** HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*. 4: 498-512.
- **ONO E., HATAYAMA M., ISONO Y., SATO T., WATANAB R., YONEKURA-SAKAKIBARA K., FUKUCHI-MIUTANI M., TANAKA Y., KUSUMI T., NISHINO T. et NAKAYAMA T. (2006).** Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *The Plant Journal*. 45: 133-143.
- **OUELHADJ A., AMEL A., SIZINE K. et DJENANE D. (2014).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* récolté en Algérie. *Revue de Microbiologie Industrielle, sanitaire et Environnementale*. 2(8) : 145-162.
- **OULDYEROU K., IBRI K., BOUHADI D., HARIRI A., MEDDAH B. et TIRTOUIL A. (2016).** Effect of orange *Citrus sinensis* peel from Algeria in food. *Banat's Journal of Biotechnology*. 3(14): 97-100.
- **OYAIZU M. (1986).** Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 103: 413-419.

- **PALOU L., VALENCIA-CHAMORRO S.A. et PEREZ-GAGO M.B. (2015).** Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit. *Coatings*. 5: 962-986.
- **PAMPALONI B., PALMINI G., MAVILIA C., ZBNEFRZTI R., TANINI A. et BRANDI M.L. (2014).** In vitro effects of polyphenols on colorectal cancer cells. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 6 (8): 289-300.
- **PARASHAR S., SHARMA H. et GARG M. (2014).** Antimicrobial and antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1): 160-164.
- **PAVITHRA G.M., SABA S., ABHISHIKTHA S.N et PRASHITH K.T.R. (2013).** Antioxidant and antimicrobial activity of flowers of *Wendlandia thyrsoidea*, *Olea dioica*, *Lagerstroemia speciosa* and *Bombax malabaricum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3(6) : 114-120.
- **PEREZ-CANO F.J., MASSOT-CLADERA M., RODRIGUEZ-LAGUNAS M.J. et CASTELL M. (2014).** Flavonoids affect host-microbiota cros talk through TLR modulation. *Antioxidants*. 3: 649-670.
- **PETERSON J., DWYER J., ADLERCREUTZ H., SCALBERT A., JACQUES P et CULLOUGH M.L.M. (2010).** Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*. 68(10): 571-603.
- **PIETTA P-G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63: 1035-1042.
- **PINCEMAIL J., DEGRUNE F., VOUSURE S., MALHERBE C., PAQUOT N. et GEFRAIGNE J-O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 21: 66-75.

- **POLINATI R.M., FALLER A.L.K. et FIALHO E. (2010).** The effect of freezing at 18 °C and 70 °C with and without ascorbic acid on the stability of antioxidant in extracts of apple and orange fruits. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 1814-1820.
- **POPOVICI C., SAYKOVA I et TYLKOWSKI B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4: 25-39.
- **PUTHER J.T. (2016).** Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. *South Indian Journal of Biological Sciences*. 2(1): 14-17.
- **RAFIQ S., KAUL R, SOFI S.A., BASHIR N., NAZIR F. et NAIK G.A. (2016).** Citrus peel as a source of functional ingredient. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 30 : 1-8.
- **RAHMAN K. (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2(2): 219-236.
- **RAHMAN T., HOSEN I., TOWHIDUL ISLAM M. M. et UDDIN SHEKHAR H. (2012).** Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3 : 997-1019.
- **RAWSON N.E., CHI-TANG H. et SHIMING L. (2014).** Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *Food Science and Human Wellness*. 3: 104-109.
- **RENARD C.M.G.C., CARIS-VEYRAT C., DUFOUR C. et BOUVELLEC C. (2014).** Le devenir des polyphénols et caroténoïdes dans les fruits et légumes traités thermiquement. *Innovations Agronomiques*. 42: 125-137.
- **REYNAUD J., GUILLET D., TERREUX R., LUSSIGNOL M. et WALCHSHOFER N. (2005).** Flavonoids in non-leguminous families: an update. *The Royal Society of Chemistry*. 22: 504 -515.

- **RIBEREAU G. P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Editions Dunod*, Paris. p 254.
- **RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD M., RIBEREAU-GAYON P. et SUDRAUD P. (1972).** Sciences et techniques du vin. Tome1, analyse et contrôle des vins. *Edition Dunod*, Paris. p671.
- **ROHMAN A., RIYANTO S., YUNIARTI N., SAPUTRA Z.R., UTAMI R. et MULATSIH W. (2010).** Antioxidant activity, total phenolic, .and total flavonoid of extracts and factions of red fruit (*Pandanus conoideus Lam*). *International Food Research*. 17: 97-106.
- **SAEWAN N. et JIMTAISONG A. (2013).** Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3(9): 129-141.
- **SAFDAR M.N., KAUSAR T., JABBAR S., MUMTAZ A., AHAD K. et SADDOZAI A.N. (2017).** Extraction and quantification of polyphenols from Kinnow (*Citrus reticulata L.*) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and Drug Analysis*. 25: 488-500.
- **SALAH N., MILLER N.J., PAGANGA G., TIJBURG L., BOLWELL G.P. et RICE-EVANS C.A. (1995).** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 339-346.
- **SALAMA R.A., MOHAMED M.M., ABD ELWAHAB M.B et SHAKWEER M.M. (2016).** Assessment effect of *Aloe Vera*, azadirachta indica and *Moringa Oleifera* aqueous extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 8(4): 83-89.
- **SAMARATH R.M., PANWAR M., KUMAR M., SONI A., KUMAR M. et KUMAR A. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food chemistry*. 106(2): 968-873.

- **SANTHOSH N.A., ANTO P.V. et NEETHU B.N. (2015).** Evaluation on antimicrobial activity of fruit peels of selected citrus species against human pathogenic microorganisms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4(3): 278-281.
- **SAVA C., SIRBU R. et DUMITRESCU C. (2006).** Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans des produits naturels. *Scientific Study and Research*. 7 (4) : 785 - 798.
- **SAYARI N., SAIDI M.N., SILA A., ELLOZ-CHAABOUNI S et BOUGATEF A. (2016).** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of *Ononis natrix* leaves extracts. *Free Radicals and Antioxidants*. 6(1): 23-33.
- **SCHOLFIELD P., MBUGUA D.M. et PELL A.N. (2001).** Analysis of condensed tannins. *Animal food Science and Technology*. 91: 21-40.
- **SELMIS., RTIBI K., GRAMI D., SEBAI H. et MARZOUKI. (2017).** Protective effects of orange (*Citrus sinensis L.*) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *Lipids in Health and Disease*. 16: 152: 1-12.
- **SHALABY E.A et SHANAB S.M.M. (2013).** Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 7(10): 528-539.
- **SHARIFI-RAD J., HOSEINI-ALFATEMI S.M., MIRI A., SHARIFI-RAD M., SOUFIL., SHARIFI-RAD M. et ROKNI M. (2015).** Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activities of various extracts from leaves and stems of *Chrozaphora tinctoria*. *Environmental and Experimental Biology*. 13: 169-175.
- **SHARMA P., BHUCHAN JHA A., DUBEY SHANKER R. et PESSARAKLI M. (2012).** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. 1-26.

- **SHETTY S.B., MAHIN-SYED-ISMAIL P., VARGHES S., THOMAS-GEORGE B., KANDATHIL-THAJURAJ P., BABY D., HALEEM S., SREEDAR S. et DEVANG-DIVAKAR-DARSHAN D. (2016).** Antimicrobial effects of *Citrus sinensis* peel extracts against dental caries bacteria: An *in vitro* study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 8(1): 70-77.
- **SIMONE S., CONIDI C., URSINO C., CASSANO et FIGOLI A. (2016).** Clarification of orange press liquors by PVDF hollow fiber membranes. *Membranes*. 6(1): 1-15.
- **SINGH S. et IMMANUEL G. (2014).** Extraction of antioxidants from fruit peels and its utilization in Paneer. *Food Processing and Technology*. 5(7): 1-5.
- **SINGH A., SRIVASTAVA J.N. et KUMAR A. (2016).** Phytotoxicity of citrus fruit waste against human pathogenic bacteria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 7(8): 3366-3372.
- **SINGLETON V.L., ORTHOFER R. et LAMUELA-RAVENTOS R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- **SINGLTON V.L. et ROSSI J.A. (1965).** Indice de Folin, polyphénols totaux. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- **SONIA N.S., MINI C. et GEETHALEKSHMI P.R. (2016).** Vegetable peels as natural antioxidants for processed foods. *Agricultural Reviews*. 37(1): 35-41.
- **SOUSA M.C., BRAGA R.C., CINTRA B.A.S. et ANDRADE V.O.C.H. (2013).** In silico metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Research International*. 50: 102-110.
- **STALIKAS D. (2007).** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30: 3268-3295.

- **STANKOVIĆ M.S. (2011).** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum L.* extracts. *Kragujevac. Journal of Science.* 33: 63-72.
- **SU P-W., YANG C-H., YANG J-F., SU P-Y. et CHUANG L-Y. (2015).** Antibacterial activities and antibacterial mechanism of *Polygonum cuspidatum* extracts against nosocomial drug-resistant pathogens. *Molecules.* 20: 11119-11130.
- **SUJA D., BUPESH G., NIVYA R., MOHAN V., RAMASAMY P., MUTHIAH NS., ARUL A.E., MEENAKUMARI K. et PRABU K. (2017).** Phytochemical Screening, Antioxidant, Antibacterial Activities of *Citrus Limon* and *Citrus Sinensis* Peel Extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine.* 1(2): 1-7.
- **SUN L. ZHANG J. LU X. et ZHANG Y. (2011).** Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food Chemistry and Toxicology.* 49: 2689-2696.
- **SURYAWANSHI S.J.A. (2011).** An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases . *African Journal of Plant Science.* 5(7): 390-395.
- **SYAKIRAH-ZULKIFLI K., ABDULLAH N., ABDULLAH A., AZIMAN1 N. et KAMARUDIN W.S.S.W. (2012).** Bioactive Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Fruit Peels. *International Conference on Environment, Chemistry and Biology.* 49: 66-70.
- **TALBI H., BOUMAZA A., EL-MOSTAFA K., TALBI J. et HILALI A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa L.* *Journal of Materials and Environmental Science.* 6(4) : 1111-1117.

- **TAWANDA M.S., ROBERT M., BRAY M.A. et MARCHALL M.S. (2015).** A preliminary study of the orange (*Citrus sinensis*) fruit value-chain in Chimanimani Rural District, Zimbabwe. *Academic Journals*. 10 (35): 3507-3516.
- **TEH S-S., BEKHIT A.E. et BIRCH J. (2014).** Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants*. 3: 67-80.
- **TELESZKO R., NOWICKAB P. et WOJDYLO A. (2016).** Effect of cultivar and storage temperature on identification and stability of polyphenols in strawberry cloudy juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 54:10-19.
- **TORRES R., FAINI F., MODAK B., URBINA F., LABBE C. et GUERRERO J. (2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*. 67: 984-987.
- **TSAO R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2: 1231-1246.
- **TURKMEN N., VELIOGLU Y. S., SARI F. et POLAT G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black Tea. *Molecules*. 12: 484-496.
- **TUSZYNSKA M. (2014).** Validation of the analytical method for the determination of flavonoids in broccoli. *Journal of Horticultural Research*. 22(1): 131-140.
- **VAMECQ J., VALLEE L., STORME L., GELE P. et BORDET R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*. 18(1): 16-23.
- **VIJI P., BINSI P.K., VISNUVINAYAGAM S., BINDU J., RAVISHANKAR C.N. et GOPAL T.K.S. (2015).** Efficacy of *Mentha arvensis* leaf and *Citrus aurantium* peel extracts as natural preservatives for shelf life extension of chill stored Indian mackerel. *Journal of Food and Technology*. 52(10): 6278-6289.

- **VIRGINIE G., ESPERANCE M.S., GUEVARA N., BOGNINOU AGBIDINOUM REINE G.S., AGBANGNAM PASCAL D.C. et SOHOULOU DOMINIQUE C.K. (2016).** Chemical study and evaluation of granulometry influence on the natural polyphenols kinetic extraction from *Pterocarpus erinaceus* acclimated in Benin. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 12(2): 325-333.
- **WANG J-G., ANDERSON R-A., GRAHAM G-M., CHU M-C., SAUER M-V., GUARNACCIA M-M. et LOBO R-A. (2007).** The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Fertil Steril*. 88(1): 240-243.
- **WISSAM Z, GHADA B., WASSIM A. et WARID K. (2012).** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3): 675-682.
- **YANG Z, LIU Y., DENG W., DAI J., LI F., YUAN Y., WU Q., ZHOU H., BIAN Z et TANG Q.(2014).** Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes. *Molecular medicine reports*. 9 : 1941-1946.
- **YATHIENDER S. (2017).** A comparative study of antimicrobial activity of citrus maxima and citrus aurantium plant extracts. *International Journal of Recent Scientific Research*. 7(8): 18507-18509.
- **YILDIRIM A., MAVI A. et KARA A. A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 411-420.
- **YI-ZHONG C., MEI S., JIE X., QIONG L. et CORKE H. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. 78 (25): 2872-2888.

- **YOSHIKAWA T. et NAITO Y. (2000).** What is oxidative stress? *The Journal of the Japan Medical Association*. 124(11): 1549-1553.
- **ZHIRKOVAA E.V., SKOROKHODOVAA M.V., MARTIROSYANB V.V., SOTCHENKOB E. F., MALKINAC V.D. et SHATALOVA T.A. (2016).** Chemical composition and antioxidant activity of corn hybrids grain of different pigmentation. *Foods and Raw Materials*. 4(2): 85-91.

ANNEXE 01 : Composition des milieux de culture utilisés

➤ Milieux liquides

• Eau physiologique stérile (Composition en g/l)

Chlorure de sodium (NaCl).....9g

Eau distillée.....1000ml

pH= 7

Préparation : 9g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

• Bouillon Cœur-Cervelle (Composition en g/l)

Infusion de cerveau de veau.....200g

Infusion de cœur de vache.....250g

Peptone pancréatique de gélatine.....10g

Na Cl.....5g

Phosphate disodique.....2,5g

Dextrose.....2,5g

Ph=7,4 ± 0.2

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

➤ Milieux solides

• Muller Hinton (Composition en g/l)

Hydrolysate acide de caséine.....17,5g

Infusion de viande.....300g

Amidon soluble.....1,5g

Agar bactériologique..... 17g

pH = 7,3 ± 0.1

Préparation : 38g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

• Gélose Nutritive (Composition en g/l)

Extrait de viande.....1,5g

Extrait de levure 1,5g

Digestion peptique du tissu animale..... 5g

NaCl.....5g

Agar15g

pH = 7,4 ± 0.2

Préparation : 28g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

• Sabouraud Dextrose Agar (Composition en g/l)

Dextrose40g

Peptone10g

Agar15g

pH = 5,6 ± 0.2

Préparation : 36.5g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn.

ANNEXE 02 : Courbes de régression de l'activité antioxydante qui ont servi au calcul de l'IC 50

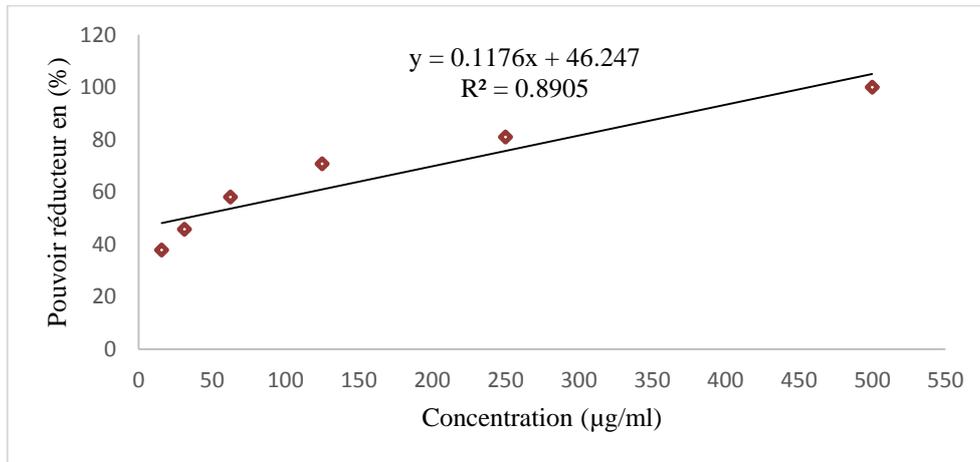


Figure 1 : Activité antioxydante (FRAP) du standard (l'acide ascorbique)

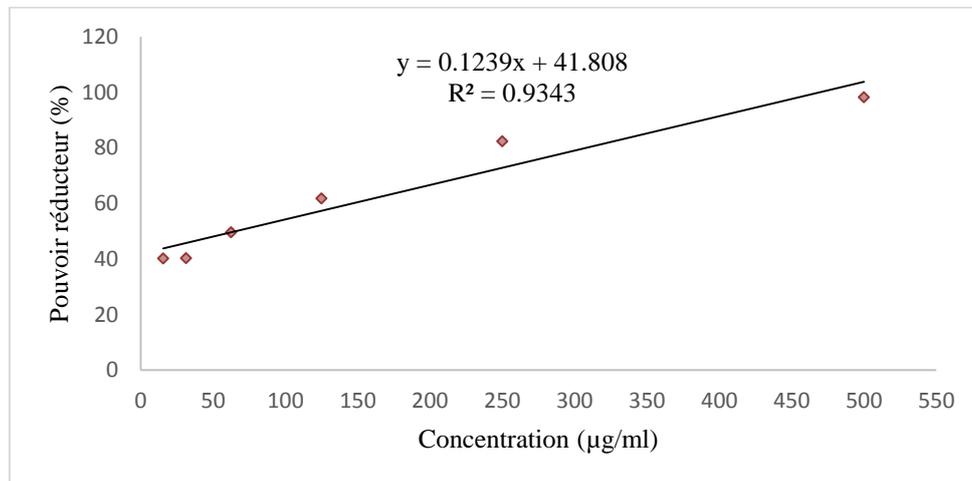


Figure 2 : Activité antioxydante (FRAP) de l'extrait aqueux de *C.aurantium* (écorce)

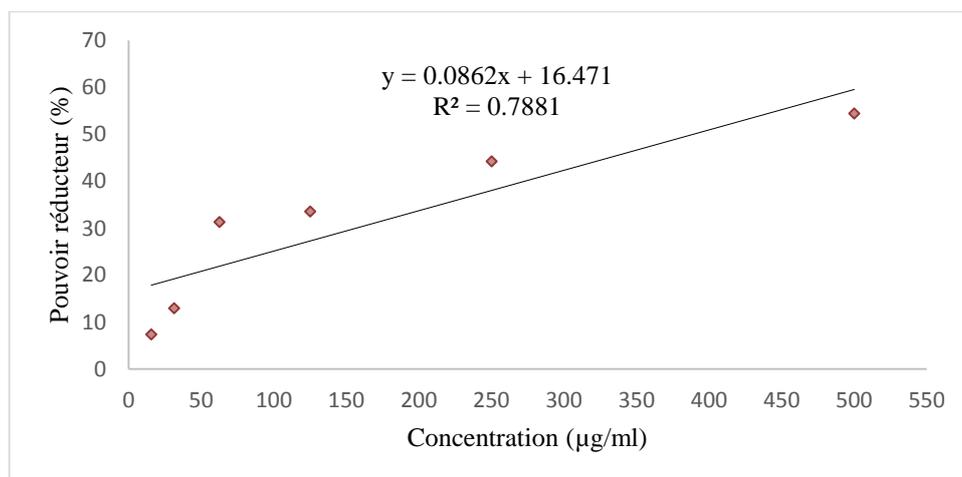


Figure 3 : Activité antioxydante (FRAP) de l'extrait aqueux de *C.sinensis* (écorce)

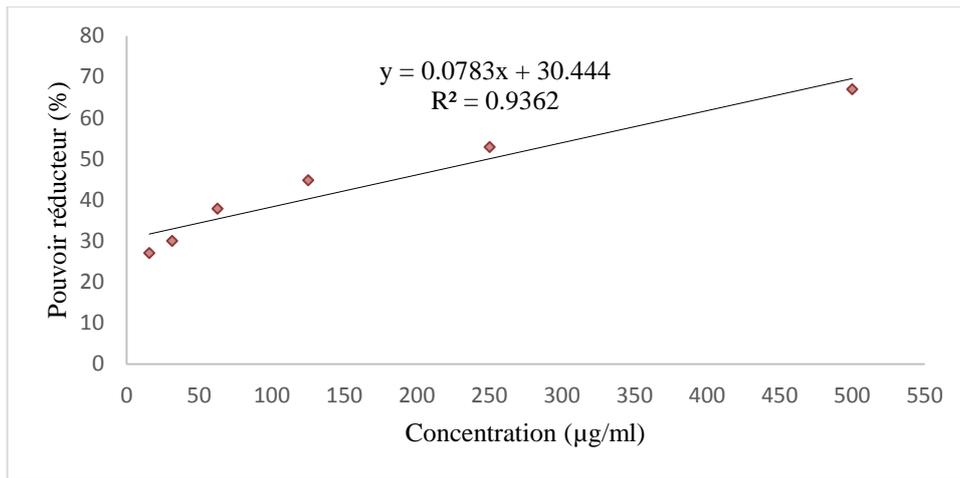


Figure 4 : Activité antioxydante (FRAP) à de l'extrait aqueux de *C.aurantium* (pépins)

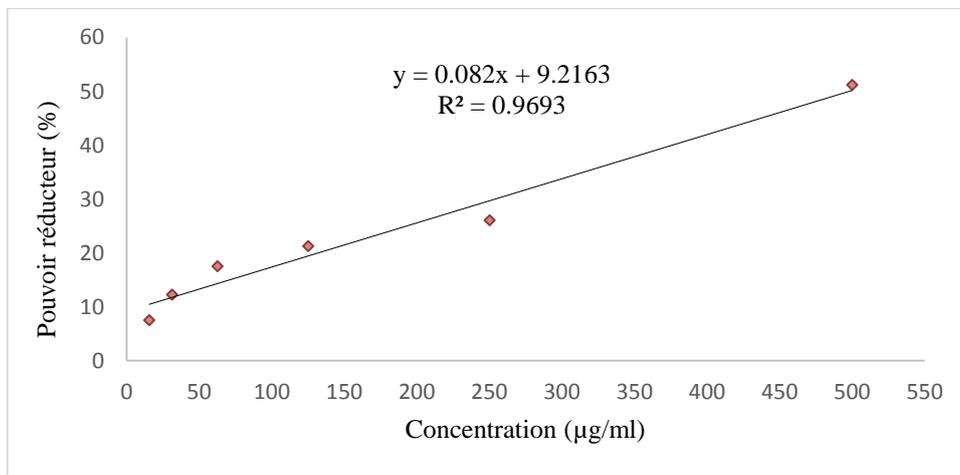


Figure 5 : Activité antioxydante (FRAP) de l'extrait aqueux de *C.sinensis* (pépins)

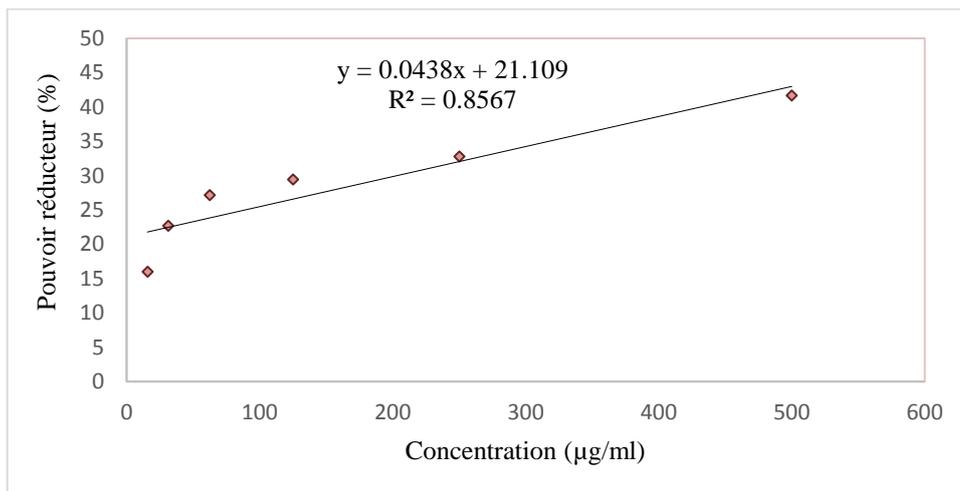


Figure 6 : Activité antioxydante (FRAP) de l'extrait éthanolique de *C.sinensis* (pépins)

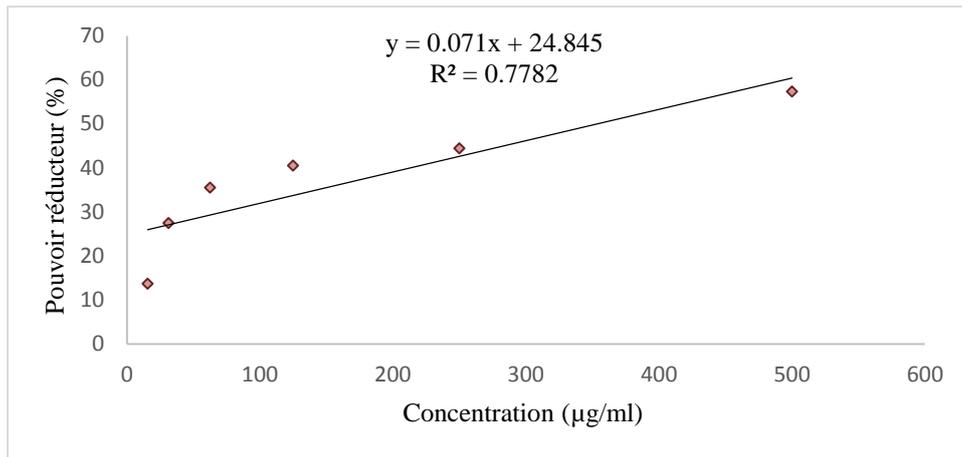


Figure 7 : Activité antioxydante (FRAP) de l'extrait éthanolique de *C. sinensis* (écorce)

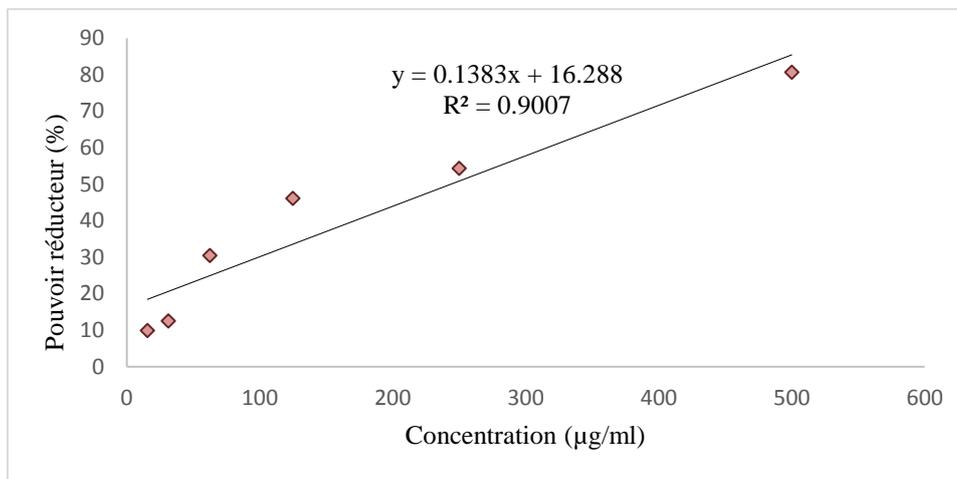


Figure 8 : Activité antioxydante (FRAP) de l'extrait éthanolique de *C. aurantium* (écorce)

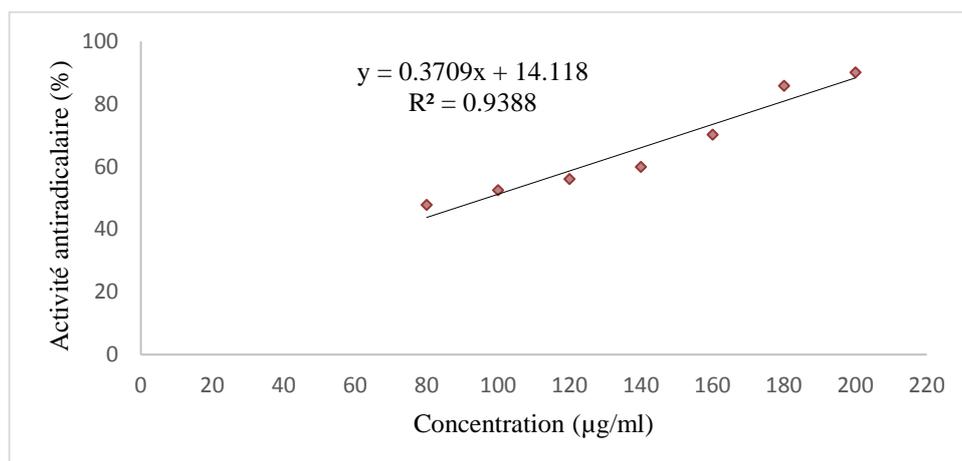


Figure 9 : Activité antioxydante (DPPH) du standard (l'acide ascorbique)

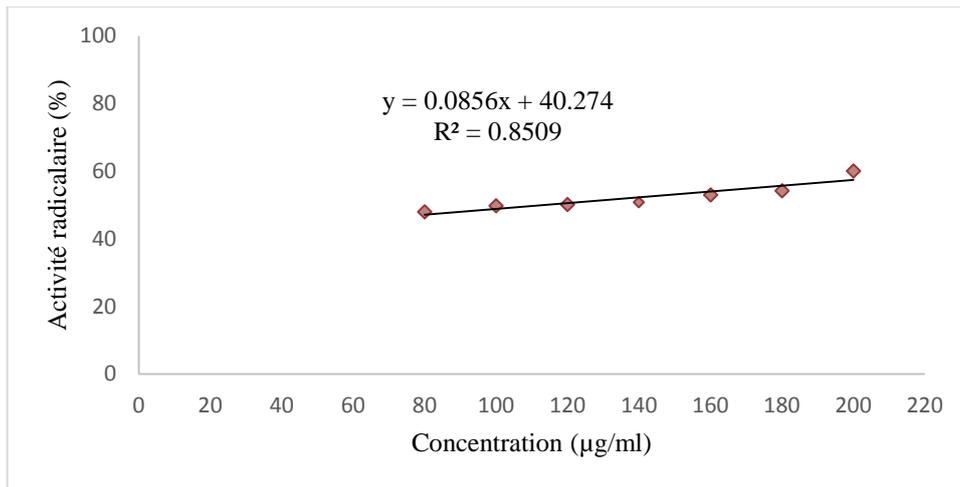


Figure 10 : Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait aqueux de *C.sinensis* (pépins)

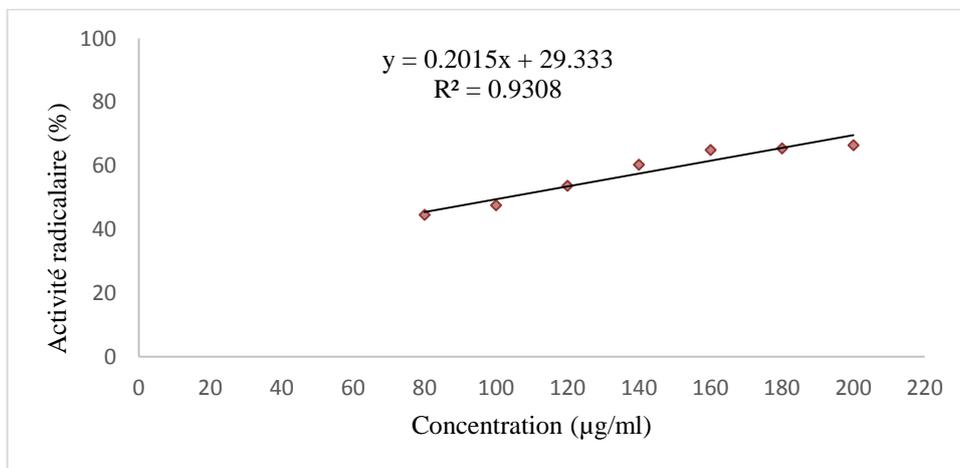


Figure 11 : Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait aqueux de *C.sinensis* (écorce)

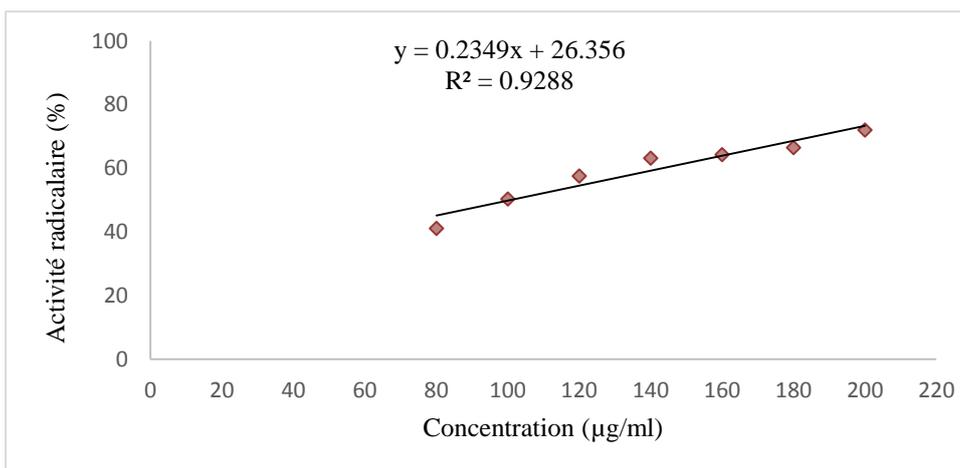


Figure 12 : Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait aqueux de *C.aurantium* (pépins)

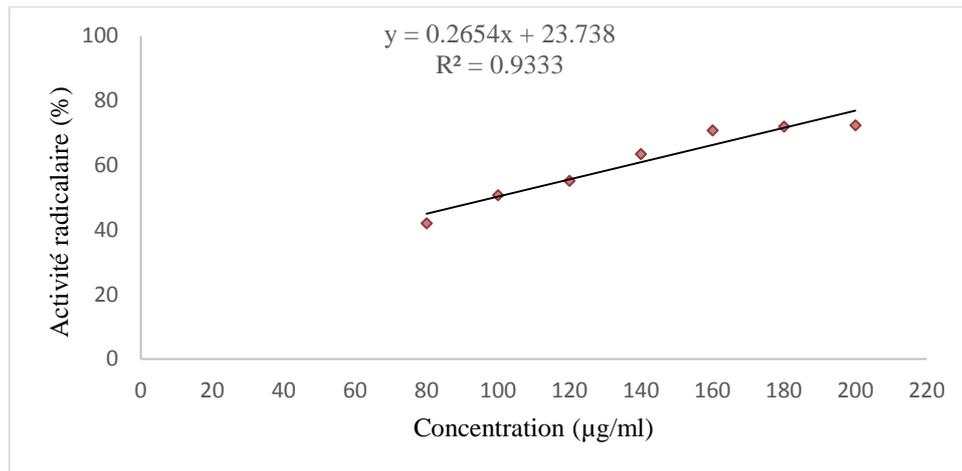


Figure 13 : Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait aqueux de *C.aurantium* (écorce)

ANNEXE 03 : Résultats des tests statistiques

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Rendement en PPT (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	911.5871	1	911.5871	1297.598	0.000000
solvant	220.2793	7	31.4685	44.794	0.000009
Erreur	5.6201	8	0.7025		

Figure 1 : Table de l'ANOVA pour les résultats du rendement d'extraction des polyphénols (le type de solvant est la variable qualitative).

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Rendement en PPT (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	911.5871	1	911.5871	75.24364	0.000001
Espèce du fruit	56.2875	1	56.2875	4.64605	0.049015
Erreur	169.6119	14	12.1151		

Figure 2 : Table de l'ANOVA pour les résultats du rendement d'extraction des polyphénols (l'espèce du fruit est la variable qualitative).

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Teneur en PPT (mgEAG / gMS) (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	9834.193	1	9834.193	406897.0	0.000000
solvant	1877.979	7	268.283	11100.4	0.000000
Erreur	0.193	8	0.024		

Figure 3 : Table de l'ANOVA pour les résultats de la teneur en polyphénols totaux (le type de solvant est la variable qualitative).

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Teneur en FT (mgEQ / gMS) (Feuille.sta) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	134212.3	1	134212.3	471996.9	0.00
solvant	124160.2	7	17737.2	62377.9	0.00
Erreur	2.3	8	0.3		

Figure 1 : Table de l'ANOVA pour les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux (le type de solvant est la variable qualitative).