



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire

Présenté par

Mlle Lakhal Samira

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En biochimie

**Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des feuilles de
« *Citrus reticulata blanco* » (Mandarine)**

Devant le jury suivant :

Président	Mr AZZI Rachid	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	Mr RAHMOUN Mohammed Nadjib	Professeur	Université de Tlemcen
Promotrice	Mlle MEZOUAR Dounia	Maître de conférences B	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019 – 2020

DÉDICACE

Je dédie ce travail à ma petite famille qui m'a doté son soutien et qui m'ont toujours poussé dans mes études :

A mon papa « Mouhammed »

Pour toutes les efforts que vous avait suscité en moi concernant mes études, pour l'encouragement et beaucoup plus, pour la confiance qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui

J'ai vraiment souhaité que vous soyez avec moi à ce moment inoubliable de ma vie. Allah yerhmek.

A ma jolie mère

Ma vie et ma source d'affection qui m'a donné tout ce qu'elle a et m'a encouragé durant ces années.

A ma grande mère et mon bonheur « Aicha »

A mes chers frères et sœurs « Fethi, Ismail, Amina, Wafaa et Meriem »

- Je dédie aussi ce travail à mes chères copines : « Hafsa, Ahlem, Wafaa, Imene et Bouchra » pour les meilleurs moments que j'ai passés avec eux et leur présence avec moi.



Remerciements



Tout d'abord et avant tout, je tiens le merci, la gratitude et l'appréciation à ALLAH le tout-puissant et miséricordieux, qui m'a donné la santé du corps et de l'esprit et surtout le désir jusqu'à ce que je puisse mener ce travail.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont donné leur soutien pendant cette période :

*A ma promotrice **Mlle Mezouar Dounia**, Maitre de conférences au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen qui m'a orienté et guidé dans tous les moments et pour tous ses conseils.*

*A **Mlle ABBOU Fayza** doctorante au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen pour sa présence et son aide.*

*A tous les membres de jury : **Mr AZZI Rachid** et **Mr RAHMOUN Mohammed Nadjib**, Professeurs au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, qui ont accepté de discuter et juger ce modeste travail.*

Aux techniciennes de Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAP SAB), pour leurs disponibilités.

الملخص

اليوسفي أو *Citrus reticulata blanco*، هو نبات ينتمي إلى عائلة الحمضيات، ويستخدم في علاج العديد من الأمراض.

دراستنا هذه، هي جزء من المساهمة في دراسة تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر لأوراق اليوسفي، التي تم جمعها في منطقة حناية، ولاية تلمسان-الجزائر.

في البداية، قمنا بعملية الاستخلاص بالنقع لأوراق اليوسفي باستخدام نظامين مختلفين للمذيبات: الماء/الميثانول (70/30) (ح/ح) والماء/الأسيتون (30/70) (ح/ح). أظهرت نتائج المردود فرقا

بين المستخلصين الخامين، حيث أعطى مستخلص الهيدروأسيون عائدا أفضل بنسبة % 12.095.

تم اختبار النشاط المضاد للأكسدة عن طريق تقنية ارجاع الحديد وتثبيط الجذر الحر *DPPH*. أظهرت النتائج التجريبية أن مستخلص الهيدروأسيون يمتلك أفضل نشاط لإرجاع الحديد مقارنة

بمستخلص الهيدرووميثانول، حيث أن قيمة التركيز 50 الفعال يساوي 2.906 ± 0.099 ملغ/ملل. بالإضافة إلى ذلك، أظهر نفس المستخلص نشاط تثبيط الجذور الحرة، حيث تبلغ قيمة

التركيز المثبط ل 50% قيمة 49.501 ميكروغرام/ملل.

تشير هذه النتائج الى أن أوراق اليوسفي يمكن أن يمثل مصدرا مثيرا للاهتمام كمضادات للأكسدة الطبيعية.

الكلمات المفتاحية : *Citrus reticulata blanco*، المستخلصات الخامة، النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé

Citrus reticulata blanco, connu sous le nom de la mandarine, est une plante appartenant à la famille des Rutacées et utilisée dans le traitement de plusieurs maladies.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la contribution à l'étude de l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des feuilles de la mandarine, récoltées dans la région de Hennaya, wilaya de Tlemcen –Algérie.

En premier temps, nous avons réalisé une extraction par macération avec deux systèmes de solvants différents : eau/méthanol (30/70) (v/v) et eau/acétone (30/70) (v/v). Les résultats de rendements montrent une différence entre les deux extraits bruts, où, l'extrait hydroacétonique donne un meilleur rendement avec 12,095 %.

L'activité antioxydante est testée par la technique de réduction du fer (FRAP) et par le piégeage du radical libre DPPH. Les résultats expérimentaux montrent que le pouvoir antioxydant (pouvoir chélateur du fer) de l'extrait hydroacétonique est meilleur par rapport à l'extrait hydrométhanolique avec une $CE50 = 2,906 \pm 0.099$ mg/ml. Par ailleurs le même extrait a présenté une meilleure activité antiradicalaire avec une $CI50 = 49,501$ µg/ml.

Ces résultats nous suggèrent que les feuilles de *Citrus reticulata blanco* pourraient représenter une source intéressante comme antioxydants naturels.

Mots clés : *Citrus reticulata blanco*, extraits bruts, activité antioxydante.

Abstract

Citrus reticulata blanco, known as tangerine, is a plant belonging to the Rutaceae family and used in the treatment of several diseases.

Our work is part of the contribution to the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of tangerine leaves, collected in the region of Hennaya, wilaya of Tlemcen - Algeria.

First, we performed an extraction by maceration with two different solvent systems : water / methanol (30/70) (v/v) and water / acetone (30/70) (v/v). The yield results showed a difference between the two crude extracts, where the hydroacetone extract gave a better yield with 12.095%.

Antioxidant activity was performed by the iron reduction method FRAP and the DPPH free radical scavenging method. The experimental results showed that the antioxidant power (iron chelating power) of the hydroacetic extract was better compared to the hydromethanolic extract with an EC₅₀ equal to 2.906 ± 0.099 mg/ml. Furthermore, the same extract exhibited better scavenging activity with an IC₅₀ equal to 49.501 µg/ml.

Key words : *Citrus reticulata blanco*, crude extracts, antioxidant activity

Liste des figures

Figure 1 : <i>Illustration d'une tranche de fruit orange coupée en deux moitiés</i>	4
Figure 2 : <i>Fruits et feuilles de la Mandarine</i>	5
Figure 3 : <i>Origines des ERO et EAR</i>	10
Figure 4 : <i>Le stress oxydant</i>	11
Figure 5 : <i>Réduction d'un radical libre par un antioxydant</i>	11
Figure 6 : <i>Feuilles après séchage de « Citrus reticulata blanco »</i>	15
Figure 7 : <i>Filtration de l'extrait hydroacétonique</i>	16
Figure 8 : <i>Filtration de l'extrait hydrométhanolique</i>	16
Figure 9 : <i>Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhényl-1-Picryl-Hydrazyle)</i>	18
Figure 10 : <i>Rendement des deux extraits des feuilles de la mandarine</i>	20
Figure 11 : <i>Représentation graphique des absorbances des deux extraits de la mandarine et l'acide ascorbique par rapport aux différentes concentrations</i>	21
Figure 12 : <i>Pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits (A) et (B) et l'acide ascorbique (C)</i>	23

Liste des TABLEAUX

Tableau 1 : <i>Propriétés thérapeutiques des différentes parties de fruit de la mandarine.....</i>	7
Tableau 2 : <i>Rendement, masses, aspects et couleurs résultants des deux extraits....</i>	20
Tableau 3 : <i>CE50 de la technique FRAP des extraits de Citrus reticulata blanco et de l'acide ascorbique.....</i>	22
Tableau 4 : <i>Les CI50 des deux extraits étudiés de Citrus reticulata blanco et de l'acide ascorbique.....</i>	24

Liste des ABREVIATIONS

- $\bullet\text{NO}$: Monoxyde d'azote
- $^1\text{O}_2$: Oxygène singulet
- CH_3OH : Méthanol
- CI_{50} : Concentration inhibitrice
- DO : Densité Optique
- DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
- EAR : Les espèces réactives de l'azote
- ERO : Espèces réactives de l'oxygène
- FeCl_3 : Chlorure de fer
- FRAP : Ferric reducing antioxidant power
- GPx : Glutathion Peroxidase
- H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
- $\text{HO}_2\bullet$: Radical perhydroxyle
- NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- NO : Oxyde d'azote
- O_2 : Oxygène moléculaire
- $\text{O}_2\bullet^-$: Superoxyde
- $\text{OH}\bullet$: Radical hydroxyle
- $-\text{OONO}$: Peroxynitrite
- PI : Pourcentage d'inhibition
- $\text{RO}\bullet$: Radicaux alkoxyde
- $\text{ROO}\bullet$: Radical peroxyde
- RSA : Radical Scavenging Activity
- SOD : Superoxyde dismutase
- TCA : Acide trichloroacétique
- v/v : Rapport volume par volume

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	2
<i>Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes</i>	4
I. <i>Agrumes (Genre Citrus)</i>	4
1. <i>Origine</i>	4
2. <i>Morphologie</i>	4
3. <i>Taxonomie</i>	4
II. <i>Mandarine</i>	5
1. <i>Classification botanique (Kimball, 1999)</i>	6
2. <i>Composition de Mandarine</i>	6
3. <i>Propriétés et usages thérapeutiques</i>	7
<i>Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants</i>	8
I. <i>Radicaux libres</i>	8
1. <i>Types des radicaux libres</i>	8
<i>Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)</i>	8
<i>Les espèces réactives de l'azote (EAR)</i>	8
<i>Origines intracellulaire</i>	8
<i>Origines extracellulaire</i>	9
II. <i>Stress oxydatif et antioxydants</i>	10
1. <i>Stress oxydatif</i>	10
2. <i>Antioxydants</i>	11
3. <i>Différents types d'antioxydants</i>	12
<i>Les antioxydants enzymatiques</i>	12
<i>Les antioxydants non enzymatiques</i>	12
4. <i>Mécanisme d'action des antioxydants</i>	12
<i>Les antioxydants enzymatiques</i>	12
<i>Les antioxydants non enzymatiques</i>	12
<i>Partie expérimentale</i>	15
I. <i>Matériel végétal</i>	15
1. <i>Lieu et période de la récolte</i>	15
2. <i>Préparation des feuilles</i>	15
3. <i>Extraction des feuilles</i>	15

4.	<i>Rendement des extraits</i>	16
II.	<i>Évaluation du pouvoir antioxydant de la plante</i>	17
1.	<i>Réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)</i>	17
2.	<i>Technique de piégeage du radical libre DPPH</i>	18
	<i>Résultats et discussion</i>	20
I.	<i>Rendement des extraits</i>	20
II.	<i>Evaluation de l'activité antioxydante</i>	21
1.	<i>Technique de réduction de fer FRAP</i>	21
2.	<i>Piégeage du radical libre DPPH</i>	22
	<i>Conclusion générale</i>	27
	<i>Références bibliographiques</i>	29

Introduction générale

Introduction générale

Introduction générale

Depuis longtemps, l'être vivant exploite la nature pour avoir tout ce qu'il a besoin, dont les médicaments, sont les plus importants pour faire guérir plusieurs pathologies. Plus particulièrement, les plantes qui ont constitué la base des systèmes sophistiqués de la médecine traditionnelle (Cragg et Newman, 2013).

Le tabac, l'alcool et l'obésité ainsi que les habitudes erronées de l'alimentation permet une élévation inhabituelle de la formation des radicaux libres (espèces oxygénées activées EOA). Au cours du temps, ces facteurs permettent à l'émergence de plusieurs maladies associées au vieillissement telle que les cancers et les maladies cardiaques (Haleng et al., 2007).

Dans le monde végétal, les plantes contiennent de nombreuses molécules bioactives qui jouent un rôle anti radicalaire (Mezouar et al., 2014). Ces dernières se manifestent dans plusieurs domaines dont le domaine médical (Mezouar et al., 2014). De plus, ils favorisent le renforcement de l'immunité de l'homme (Sharangi, 2017).

Parmi ces plantes, les agrumes, qui sont caractérisés par leurs effets curatifs tels que les effets anti-tumoraux et anti-inflammatoires. Ils sont aussi évalués pour leurs caractéristiques nutritionnelles et anti-radicalaires qu'ils possèdent (Selvamuthukumar et al., 2017).

Dans ce contexte, nous allons évaluer l'activité antioxydante des feuilles de « Citrus reticulata blanco » (la Mandarine cultivée à Tlemcen en Algérie), qui est l'une des espèces les plus populaires des agrumes (Mukhtar et al., 2005) par l'étude de leur effet anti radicalaire. Le présent travail se divisé comme suit :

- Une partie bibliographique qui englobe deux chapitres, l'un pour présenter la plante à étudier « Citrus reticulata blanco » avec une idée générale sur les agrumes, et l'autre partie présente les radicaux libres et le stress oxydatif.
- Une partie expérimentale avec le mode d'extraction (macération eau/acétone et eau/méthanol), puis, l'évaluation de l'activité antioxydante par la technique de réduction de fer (FRAP) et la technique de piégeage du radical libre DPPH.
- A la fin de cette étude, une dernière partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus, une discussion et pour terminer avec une conclusion.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

I. Agrumes (Genre *Citrus*) :

1. Origine :

Les zones tropicales et subtropicales du continent asiatique et de l'archipel malaisien sont à l'origine des agrumes il y a au moins 4000 ans. Au cours du temps, les agrumes sont aussi cultivés dans les régions méditerranéennes (Dugo et Di Giacomo, 2002).

2. Morphologie :

- Les fruits (**figure 1**) sont constitués généralement de trois parties structurellement différentes : Une couche externe colorée (exocarpe) nommée flavedo, des couches internes (mésocarpe) connues sous le nom d'un albedo (couleur blanche, spongieux) et la pulpe qui contient des poches incluant le jus et enveloppées dans une couche mince blanche (endocarpe) (El-Otmani et Ait-Oubahou, 2011).
- Plus souvent, les feuilles sont simples, pour les espèces primitives, elles sont trifoliées et le pétiole est ailé et articulé (Dupont et Guignard, 2007).
- Les fleurs sont constituées de 4 ou 5 sépales et 4 ou 5 pétales blanches. L'androcée et le gynécée sont méristémones : les étamines, maints, se réunissent par un filet en faisceaux englobant un nombre instable de parties : les carpelles sont de nombre non précisé (6 – 12) et totalement réunis (Dupont et Guignard, 2007).

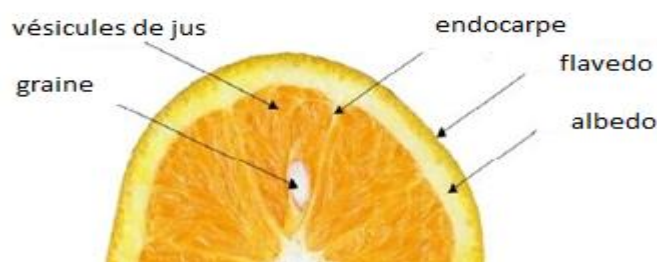


Figure 1 : Illustration d'une tranche de fruit orange coupée en deux moitiés (Tasic et al., 2016)

3. Taxonomie :

C'est un arbre à fleur appartenant à la famille des Rutaceae, la sous famille des Aurantioideae et la tribu des Citreae (Dorji et Yapwattanaphun, 2011).

Il existe des complexités dans la classification des *Citrus* basée sur la morphologie et la géographie (Jannati et al., 2009). Cela montre un grand problème de controverse sur la

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

systematique des espèces du sous-genre *Citrus* (Moore, 2001). Il y a deux systèmes distincts de taxonomie, l'un qui identifie 16 espèces, reconnue sous le nom de système Swingle (swingle et Reece, 1967), l'autre sectionne et reconnaît 162 espèces, c'est la taxonomie Tanaka (Tanaka, 1977).

Avec le déroulement des études basées sur les paramètres biochimique et morphologique, elles montrent l'existence d'un triplet de vraies espèces, Citron (*C. medica* L.), mandarine (*C. reticulata* Blanco), et pummélo (*C. maxima* L. Osbeck) (Abedinpour et al., 2014).

II. Mandarine

La mandarine appartient à la famille des Rutacées et du genre *Citrus*. Sa culture est notamment dans les régions Méditerranéennes, au Japon, au Brésil, en Argentine, aux États-Unis et en Australie (Mazza, 1987).



Figure 2 : Fruits et feuilles de la Mandarine (Lim, 2012)

C'est un arbre de petite taille avec plusieurs ramifications épineuses, des feuilles persistantes (figure 2) qui sont unifoliées de 6 à 8 cm de longueur et des fleurs blanches (Lim, 2012). Les feuilles ont une taille oblate plutôt que sphérique avec une pelure moins épaisse et un albédo blanc peu amer, contrairement à l'orange qui a une saveur moins acide (Ye et al., 2017).

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

1. Classification botanique (Kimball, 1999)

- Règne : Plante
- Ordre : Géraniales
- Sous ordre : Geraniineae
- Classe : Dicotyledoneae
- Sous classe : Archichalmydeae
- Division : Embryophyta
- Sous division : Angiospermae
- Famille : Rutaceae
- Sous famille : Aurantiodeae
- Tribu : Citreae
- Sous tribu : Citrinae
- Genre : Citrus L.
- Sous genre : Citrus
- Espèce : Citrus reticulata Blanco.

2. Composition de Mandarine

Les agrumes et leurs jus constituent une provenance notable des substances anti-radicalaire telles que l'acide ascorbique, les flavonoïdes, les composés phénoliques et les pectines, qui sont considérés comme étant essentiels pour l'alimentation et la santé de l'homme (Lim, 2012).

La mandarine inclue les composants chimiques suivants :

- Protéines, lipides, glucides.
- **Eléments minéraux** : Calcium (Ca), phosphore (P), fer (Fe), sodium (Na), potassium (K).
- **Vitamines** : Thiamine (B1), riboflavine (B2), vitamine A, acides ascorbique (C), niacine (Acide nicotinique) (Ortiz, 2002).
- **Métabolites secondaires** : Flavonoïdes (flavanones, flavones, flavonols (Gattuso et al., 2007), hespéridine (Lim, 2012)), Limonène (Lim, 2012), Acides phénoliques (Tripoli et al., 2007 ; Oboh et Ademosun, 2012 ; Singanusong et al., 2015)

Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes

III. Propriétés et usages thérapeutiques

En chine, la peau de la mandarine mûr et asséchée, est considérée comme étant une phytothérapie essentielle et elle est adaptée à des fins thérapeutiques selon la pharmacopée chinoise (Sun et al., 2010).

De plus, plusieurs parties de fruit sont employées dans le traitement de diverses maladies (Yeung, 1985 ; Chopra et al., 1986 ; Lu, 2005). Le tableau 2 suivant montre quelques propriétés thérapeutiques des parties de fruits de la mandarine.

Tableau 1 : Propriétés thérapeutiques des différentes parties de fruit de la mandarine (Lim, 2012)

Partie de fruit	Propriétés
<i>Péricarpe</i>	- Analgésique, antiasthmatique, anti-inflammatoire, antiscorbutique, anti septique, antitussif, carminatif, expectorant, stomachique et permet de baissée le cholestérol
<i>Peau (pelure)</i>	- Stomachique, expectorant, diurétique, réfrigérant
<i>Endocarpe</i>	- Carminatif et expectorant
<i>Flavedo</i>	- Carminatif et stomachique
<i>Graine</i>	- Carminatif et analgésique

Dans le cas d'une dyspepsie, d'un inconfort gastro-intestinal, d'une toux avec flegme et des vomissements, le péricarpe, l'endocarpe et la peau sont employés pour traiter ces cas, alors que la peau est également employée en cas d'une perte d'appétit et d'une mammite aiguë (Lim, 2012).

Le flavedo vert et immature est appliqué en cas de l'enflure du foie, de la rate et de la cirrhose du foie et est aussi appliqué pour traiter la hernie et d'autres maladies (Lim, 2012).

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

I. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes et des substances inconstantes et très réactifs vis-à-vis aux ions identiques et sont caractérisés par la présence des électrons non appariés (**Vikram et al., 2010**). Ces radicaux servent à un rôle essentiel dans beaucoup de mécanismes biologiques tels que les voies métaboliques, la signalisation cellulaire, la réponse immunitaire et une variété de conditions physiopathologiques (**Ansari, 1997**).

1. Types des radicaux libres

Dans le cas général les modèles radicalaires responsables au stress oxydant sont dérivées de l'oxygène et de l'azote (**Rochette, 2008**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Ce type d'espèces englobe les espèces radicalaires et les espèces non radicalaires dont les premiers contiennent le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le radical perhydroxyle (HO_2^{\bullet}), le radical peroxy (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxy (RO^{\bullet}) (**Jelen et Wasowicz, 2011**). Les deuxièmes contiennent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3) (**Choe et Min, 2006**).

Les espèces réactives de l'azote (EAR)

Ils incluent le monoxyde d'azote ($\bullet NO$) comme une espèce radicalaire (**Vamecq et al., 2004**) et la peroxy-nitrite ($-OONO$) comme une espèce non radicalaire, cette dernière issue de la réaction de $\bullet NO$ avec $O_2^{\bullet-}$ (**Beckman et Koppenol, 1996**).

2. Origines des radicaux libres

Origines intracellulaire

Les radicaux libres ou les espèces responsables du stress oxydatif sont produits à partir de plusieurs sources : les mitochondries, les NAD(P)H oxydases (NOX) (**Beaudeau et al., 2006**), les cytochromes P450 (CYP450), les peroxysomes, les xanthines déshydrogénases (XDH), les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénases, cyclo-oxygénases) (**Beaudeau et Vasson, 2005**) et les NO synthases (NOS) (**Landmesser et al., 2002**).

- **Les mitochondries**, sont des organites qui produisent l'énergie nécessaire pour l'organisme et elles sont aussi considérées comme la principale source des radicaux

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

libres (Cadenase et Boveris, 2005). Elles permettent la génération de $O_2^{\circ-}$ qui joue le rôle d'un précurseur de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Boveris et Cadenas, 1975 ; Dionisi et al., 1975) et la production de NO (Ghafourifar et Richter, 1997 ; Giulivi et al., 1998). Par la réaction au fenton, l' H_2O_2 est capable de se convertir en $OH\bullet$ (Dar et al., 2017).

- **Les NADPH oxydases (NOX)** sont des protéines qui apportent une contribution au transfert des électrons entre les bicouches membranaires. Ils forment à partir du transfert d'électron, l' $O_2^{\circ-}$ (l'accepteur d'électrons est l'oxygène (O_2)) qui représente un précurseur des ERO (Guichard et al., 2006).
- **La xanthine déshydrogénase (XDH)**, enzyme oxydoréductase qui utilise le NADPH comme cofacteur et qui permet la formation de la xanthine à partir de l'hypoxanthine et l'acide urique à partir de la xanthine elle-même (Descamps et al., 2006). Elle peut aussi former le radical $O_2^{\circ-}$ et/ou H_2O_2 dans le cas d'une pathologie (Nishino, 1994).
- **La xanthine oxydoréductase (XOR)**, elle peut aussi être considérée comme une origine des NO° et des $-OONO$ (Godber et al., 2000).
- **Le NO synthase (NOS)** permet la synthèse des NO à partir de l'arginine et se déroule en deux étapes : la conversion de l'arginine en ω -hydroxyarginine, puis, l'oxydation de l' ω -hydroxyarginine elle-même en citrulline et NO (Descamps et al., 2006). Cette enzyme permet aussi la formation de $O_2^{\circ-}$ ou le H_2O_2 (Tsai et al., 2005), ainsi que la formation de $-OONO$ par l'association de $O_2^{\circ-}$ et NO (Descamps et al., 2006).
- **Le cytochrome P450 (CYP450)**, joue un rôle suffisant dans la naissance du stress oxydatif (Descamps et al., 2006) et génère l' $O_2\bullet-$ et/ou H_2O_2 grâce à la réduction d' O_2 (Migdal et Serres, 2011).
- Les enzymes responsables de la voie de l'acide arachidonique peuvent aussi former l' $O_2\bullet-$ (Delattre et al., 2005).

Origines extracellulaire

Il existe aussi d'autres origines des radicaux libres représentés par les facteurs physiques ou chimiques comme la lumière, les radiations ionisantes (rayons X), le tabac,... etc (figure 3) (Leverve, 2009).

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

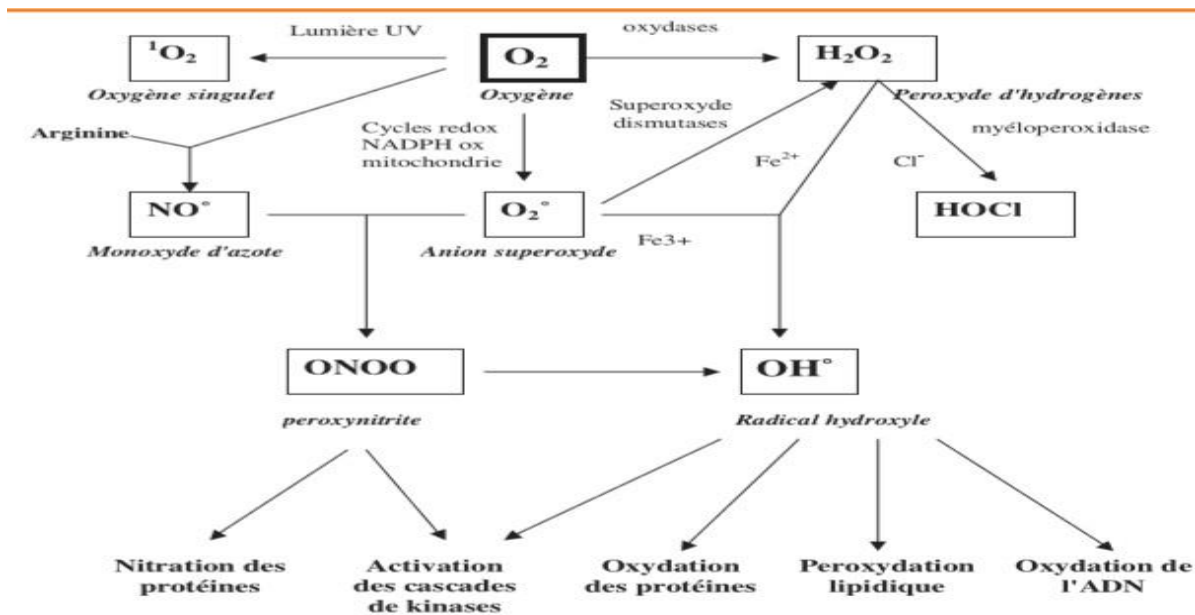


Figure 3 : Origines des ERO et EAR (Favier, 2003)

II. Stress oxydatif et antioxydants

1. Stress oxydatif

La synthèse des radicaux libres oxygénés se fait par les deux voies endogène et exogène dans l'organisme et lorsqu'elle dépasse la capacité antioxydante des cellules, ces radicaux libres synthétisés génèrent ce qu'on appelle « le stress oxydant » (figure 4) (Sies, 1991).

Le stress oxydant joue un rôle important dans le déclenchement de plusieurs pathologies (Bidie et al., 2011). Ces pathologies apparaissent lors du vieillissement, car avec l'âge, la multiplication mitochondriale des radicaux libres va augmenter et les défenses antioxydantes de l'organisme vont diminuer (Girodon et al., 1997 ; Sohal et al., 2002).

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

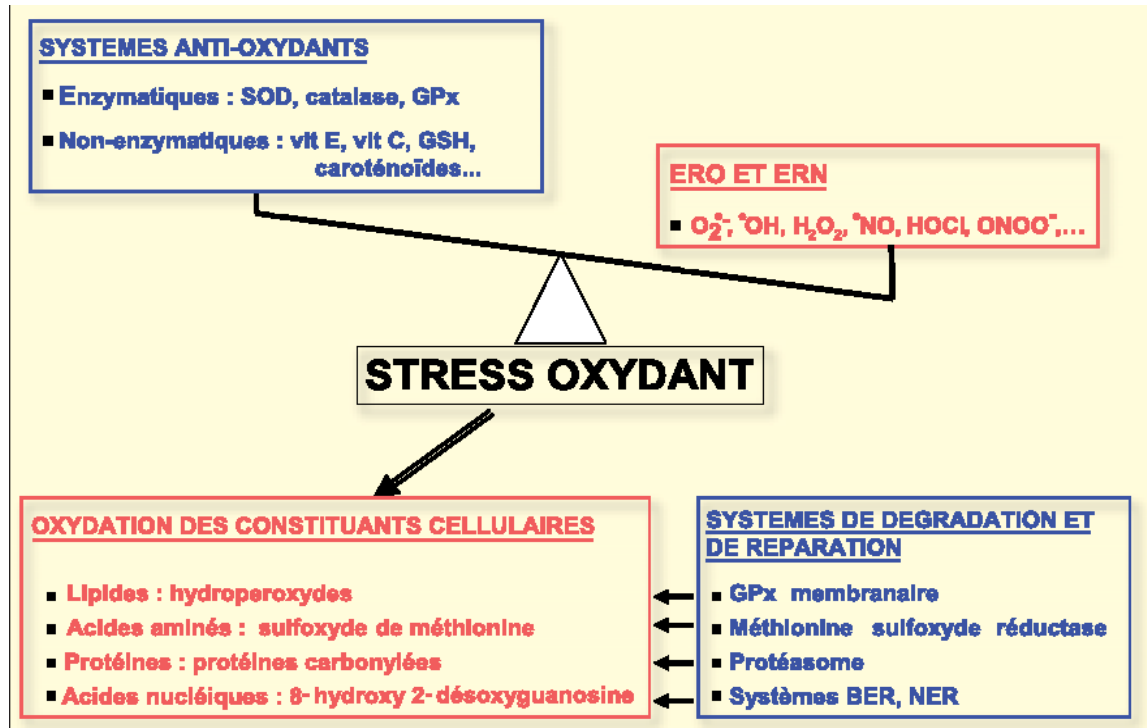


Figure 4 : Le stress oxydant (Bonfont-Rousselot, 2007)

2. Antioxydants

Les antioxydants (figure 5) sont définis comme étant un groupe de molécules capables de bloquer, de réduire et d'éliminer la formation des radicaux libres (Sies, 1997) et agissent de manière à diminuer ces derniers en les piégeant afin de produire des molécules plus stables (Favier, 2003).

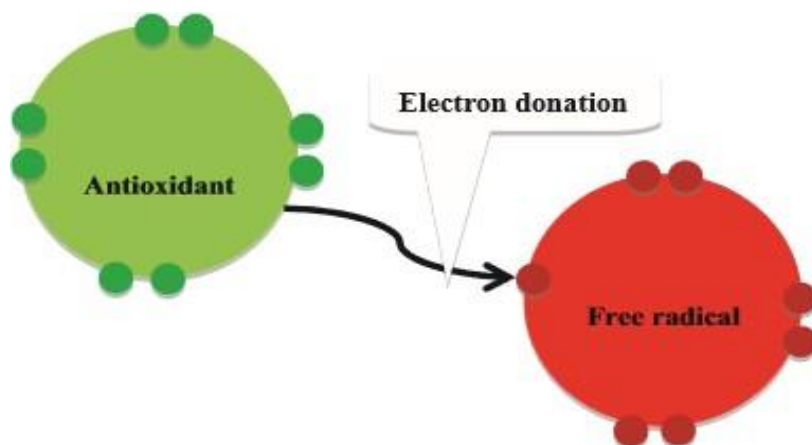


Figure 5 : Réduction d'un radical libre par un antioxydant (Murevanhema et al., 2018)

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

3. Différents types d'antioxydants

L'action des ERO et EAR est balancé par deux type d'antioxydants : enzymatiques et non enzymatiques (Valco et al., 2006).

Les antioxydants enzymatiques

Les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les glutathions peroxydases (GPx) sont considérés parmi les antioxydants enzymatiques les plus performants (Mates et al., 1999).

Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques incluent : vitamines A, vitamines E, caroténoïdes, phénols, glutathion réduit (GSH), proline et flavonoïdes (Gill et Tuteja, 2010 ; Miller et al., 2010 ; Gill et al., 2011).

4. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants enzymatiques

- **Les SOD** : permet la formation de l' O_2 et l' H_2O_2 par la dimustation de l' $O_2^{\circ-}$ (Valko et al., 2006).
- **La catalase** : enzyme qui facilite la formation de H_2O et O_2 à partir de la décomposition de H_2O_2 (Valko et al., 2006). Elle est présente chez les cellules des plantes, les cellules animales et chez les bactéries aérobies (Mates et al., 1999).
- **La GPx** : une sélénoprotéine, dont son principal rôle est d'éliminer les peroxydes lipidiques issues de l'effet de stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Haleng et al., 2007).

Les antioxydants non enzymatiques :

- **Vitamine C (ou Acide ascorbique AA)** : un anti-radicalaire qui exerce un rôle primordial de défense contre l'oxydation des molécules par sa susceptibilité d'offrir des électrons à plusieurs réactions (Smirnoff, 2005 ; Gill et Tuteja , 2010). Elle assure en réagissant avec H_2O_2 , $OH\cdot$ et O_2 la défense contre les dégâts d'oxydations sur les membranes et la production de vitamine E (Shao et al., 2005).
- **Vitamine E (ou les tocophérols)** : assure le blocage de la peroxydation lipidique, permet de tromper les radicaux libres ainsi que la réduction des $RO\cdot$ et $ROO\cdot$ (Igamberdiev et al., 2004).

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

- **Caroténoïdes** : réagissent avec l' $O_2\bullet$, $\bullet OH$, $ROO\bullet$ et permettent d'éliminer l' 1O_2 (Valco et al., 2006)
- **Polyphénols** : Ils ont un effet anti-radicalaire et antiathérogène et sont capables d'empêcher l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Violi et Cangemi, 2005). Ils sont considérés comme étant des super-chélateurs des métaux de transition (le fer et le cuivre) (Haleng et al., 2007).
- **Proline** : Peut jouer le rôle d'un chélateur métallique (Dar et al., 2016), et permet le blocage de lipo-péroxydation et l'élimination de $OH\bullet$ et 1O_2 (Dar et al., 2017).
- **GSH** : Lutte contre certains radicaux libres (H_2O_2 , 1O_2 , $OH\bullet$ et $O_2\bullet$) (Dar et al., 2017).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

I. Matériel végétal

1. Lieu et période de la récolte

Notre étude a porté sur une plante à usage médicinale « *Citrus reticulata* Blanco », connue sous le nom de la mandarine. Les feuilles ont été récoltées au mois de Novembre 2019 dans la région de Hennaya, la wilaya de Tlemcen (Algérie).

2. Préparation des feuilles

Après la récolte, les feuilles (**figure 6**) de la mandarine (une partie aérienne) ont été séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et à température ambiante (pour éviter la destruction de certains composants). Après trois à quatre semaines les feuilles sont prêtes pour notre étude.



Figure 6 : Feuilles après séchage de « *Citrus reticulata* blanco »

3. Extraction des feuilles

Dans cette étape, nous avons utilisé un mélange entre deux solvants à polarité différente dans chaque extraction, eau / acétone dans le but d'obtenir le premier extrait et eau/méthanol pour le deuxième extrait en réalisant la méthode de macération.

A la fin de cette étape, nous avons obtenu deux extraits bruts après une évaporation (pour éliminer les solvants organiques) et un séchage.

Matériel et méthodes

Une fois les feuilles sèches sont obtenues, elles sont réduites en poudre, puis extraite par macération pendant 24 heures à température ambiante et sous agitation, selon les étapes du protocole suivant :

20 g de la poudre
végétale



200 ml du mélange
eau/acétone ou eau /méthanol
(V/V : 30/70)

Les extraits bruts obtenus sont filtrés sur papier filtre, puis, évaporés au rotavapeur à 40 °C pour éliminer la phase organique. Ensuite, la phase aqueuse est éliminée par séchage dans l'étuve à 35°C. La conservation de résidu obtenu est réalisée à + 4°C.



Figure 7 : Filtration de
l'extrait
hydroacétonique



Figure 8 : Filtration de
l'extrait
hydrométhanolique

4. Rendement des extraits

Le rendement en pourcentage des deux extraits eau/acétone et eau/ méthanol, est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = M/M0 \times 100$$

Avec :

- $R (\%)$: Rendement en pourcentage ;
- M : Masse de l'extrait sec obtenue après évaporation en grammes ;
- $M0$: Masse du matériel végétal à extraire en grammes.

II. Évaluation du pouvoir antioxydant de la plante

1. Réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

La capacité réductrice d'une substance est liée à sa capacité de transfert des électrons et qui peut jouer un rôle d'un indicateur qui signifie son activité antioxydante (Zovko Koncic et al., 2010).

La coloration jaune dans cette méthode vire vers le vert et le bleu selon la capacité réductrice de l'échantillon à tester et la forte capacité réductrice est exprimée par une absorbance élevée mesurée à une absorbance de 700 nm (Zovko Koncic et al., 2010).

Le protocole utilisé dans cette méthode est celui de Yen et Chen, 1995 :

a) Solutions utilisées

- Tampon phosphate 0.2M (pH6.6).
- Ferricyanure de potassium 1%.
- Acide trichloroacétique (TCA) 10%.
- Chlorure de fer ($FeCl_3$) 0.1%.

b) Préparation des extraits à différentes concentrations

Les extraits bruts hydroacétonique et hydrométhanolique sont préparés dans l'eau distillée à des concentrations de 1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml.

c) Protocole

L'extrait à tester 1 ml est mélangé avec 2.5 ml de tampon phosphate pH 6.6 et 2.5 ml de ferricyanure de potassium. Après une incubation à 50°C pendant 20 minutes, les tubes sont refroidis. Ensuite, 2.5ml de l'acide trichloroacétique TCA sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes.

Le surnageant 2.5ml de chaque tube est mélangé avec 2.5ml d'eau distillé et 0.5 ml de chlorure de fer $FeCl_3$.

Les absorbances sont mesurées à 700 nm par un spectrophotomètre UV-visible contre un blanc.

L'acide ascorbique est utilisé comme un témoin positif et est testé avec des concentrations et dans les mêmes conditions expérimentales.

Ces tests sont réalisés en triplicate pour les extraits bruts et le témoin positif.

Matériel et méthodes

2. Technique de piégeage du radical libre DPPH :

En présence des piègeurs de radicaux libres, le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl ou DPPH, de couleur violette se réduit en 2,2-Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui et al., 2006).

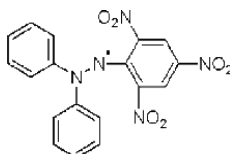


Figure 9 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle) (Popovici et al., 2009)

Dans cette technique, nous avons préparé la solution méthanolique de DPPH à une concentration de 6.34×10^{-5} M.

Les extraits bruts des feuilles de la mandarine sont préparés à différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml).

L'évaluation de l'activité antioxydante est réalisée comme suit, selon le protocole de Atoui et al., 2005 :

La solution méthanolique de DPPH 1950 μ l est mélangée avec 50 μ l de l'extrait à tester. Le blanc de chaque concentration est préparé par un mélange de 1950 μ l de méthanol et 50 μ l de l'extrait.

Le contrôle positif contient 50 μ l de méthanol et 1950 μ l de la solution méthanolique de DPPH. Son tube blanc contient 2 ml de méthanol.

L'incubation se fait à l'abri de la lumière et à une température ambiante durant 30 minutes et la lecture se fait par la mesure de l'absorbance à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- visible. L'acide ascorbique est testé dans les mêmes conditions expérimentales mais à des concentrations plus inférieures par rapport aux extraits de la plante.

Cette technique est réalisé en triplicate pour les deux extraits et l'acide ascorbique.

Les résultats sont exprimés par un pourcentage, dit le pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$PI \% = (Ac - AE / Ac) \times 100 \text{ (Atoui et al., 2005)}$$

□ Ac : absorbance du contrôle ; AE : absorbance de l'extrait.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Rendement des extraits :

Le rendement d'extraction dépend du solvant dont la polarité, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition qui varient (Do et al., 2014).

Nous avons utilisé dans cette étude deux systèmes de solvants à polarité différente avec une masse de 20 g de la matière sèche des feuilles employées.

Le **tableau 2** montre les rendements des deux extraits avec la masse résultante, l'aspect et la couleur de chaque extrait brut. L'extraction par macération du système eau/acétone (30/70 : v/v) a donné le rendement le plus important avec 12,09 %. Il est suivi par l'extrait brut macéré hydrométhanolique qui donne un rendement légèrement inférieur que le premier extrait, avec 11,38%. La **figure 10** montre bien la différence des rendements entre les 2 méthodes.

Tableau 2 : Rendement, masses, aspects et couleurs résultants des deux extraits

Méthode	Extrait	Aspect et couleur	Masse (g)	Rendement (%)
	Eau/acétone (v/v) (30/70)	Vert foncé/ cristaux	2,419	12,095
Macération	Eau/méthanol (v/v) (30/70)	Vert clair / cristaux	2.2775	11,3875

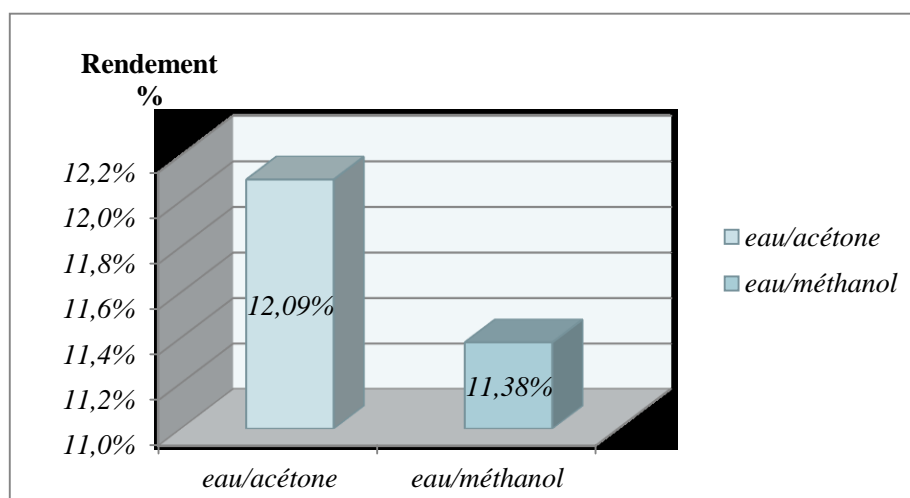


Figure 10 : Rendement des deux extraits des feuilles de la mandarine

II. Evaluation de l'activité antioxydante

1. Technique de réduction de fer FRAP

Le pouvoir réducteur d'une substance peut jouer le rôle d'un informateur qui signifie son potentiel activité antioxydante (Gülçin, 2006).

Notre travail consiste à évaluer l'activité antioxydante des deux extraits bruts hydroacétonique et hydrométhanolique à différentes concentrations par l'utilisation de la technique FRAP.

La **figure 11** suivante illustre les valeurs des absorbances obtenus pour chaque extrait et à chaque concentration en utilisant l'acide ascorbique comme témoin.

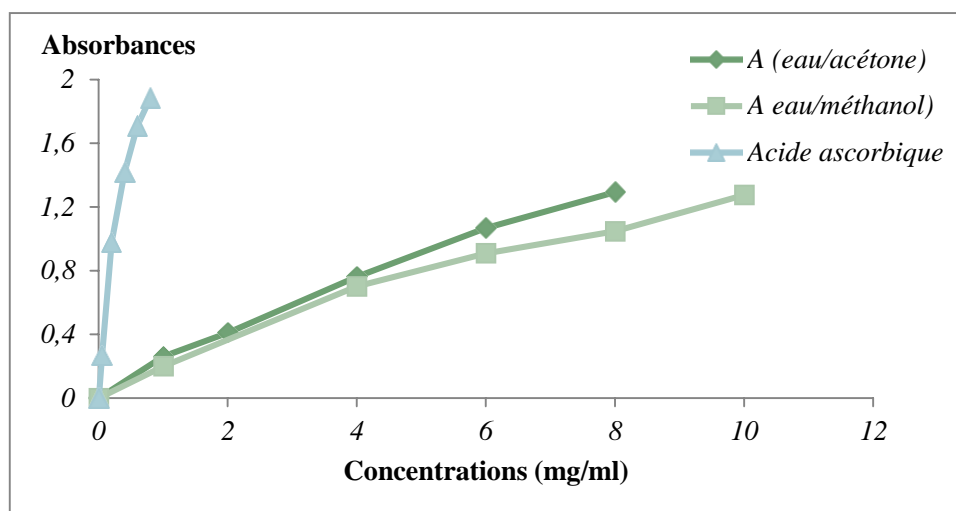


Figure 11 : Représentation graphique des absorbances des deux extraits de la mandarine et l'acide ascorbique par rapport aux différentes concentrations

D'après les graphes de la **Figure 11**, la réduction du fer augmente proportionnellement avec les concentrations croissantes des extraits.

Dans cette méthode les absorbances obtenues sont converties en courbes linéaires correspondant à chaque extrait étudié pour bien montrer la capacité réductrice de celles-ci par rapport aux différentes concentrations des échantillons afin de calculer les concentrations efficaces CE50 (**tableau 3**).

Résultats et discussion

Les CE50 correspondent à des concentrations de l'échantillon ou de l'étalon qui montrent 50% du pouvoir de FRAP (correspond à une absorbance de 0.5), où les minimums CE50 montrent le pouvoir antioxydant le plus important (Fidrianny et al., 2014).

Tableau 3 : CE50 de la technique FRAP des extraits de *Citrus reticulata* blanco et de l'acide ascorbique

Echantillons	CE50 (mg/ml)
Extrait eau/acétone	2,906 ± 0.099
Extrait eau/méthanol	3,676 ± 0.17
Acide ascorbique	0,181 ± 0.073

Les résultats mentionnés dans la **figure 11** et le **tableau 3** montrent que l'extrait hydro-acétonique possède une capacité réductrice de fer légèrement supérieure par rapport à l'extrait hydrométhanolique, dont les CE50 sont de 2,906 ± 0.099 et 3,676 ± 0.17 mg/ml, respectivement. En comparant ces résultats avec ceux de l'acide ascorbique, les deux extraits ont un pouvoir réducteur de fer inférieur au témoin positif, avec une CE50 de 0,181 ± 0.073 mg/ml.

Dans l'étude de **Djenidi et al., 2020** sur les fruits de *C. reticulata* blanco, l'extrait hydrométhanolique (20/80 : v/v) a montré une CE50 de 52.07±0.02 mg/ml, ce qui indique une faible activité antioxydante en comparaison avec nos résultats.

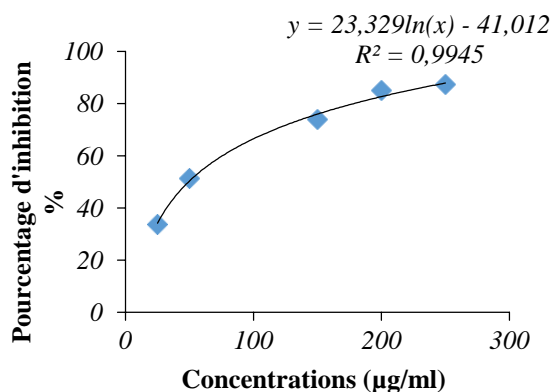
Cette disparité des résultats peut être expliquée principalement par la différence dans la composition des différentes parties de la plante et de la région de la récolte.

2. Piégeage du radical libre DPPH

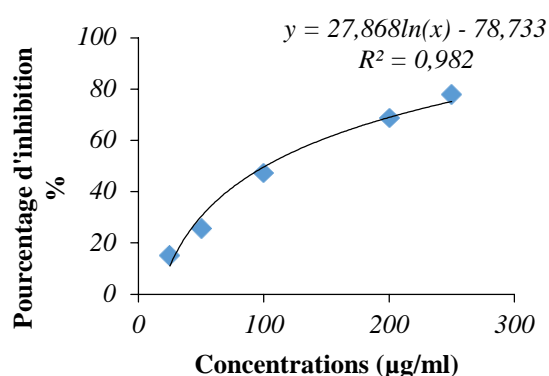
Dans cette méthode, nous avons remarqué un virage de la couleur violette de la solution méthanolique de DPPH vers le jaune en présence des agents antioxydants mesuré par un spectrophotomètre à 515 nm.

Les absorbances résultantes sont converties en courbes logarithmiques en passant premièrement par le calcul des pourcentages dite les pourcentages d'inhibition (PI) : PI (%) = f (concentrations) (**figure 12**).

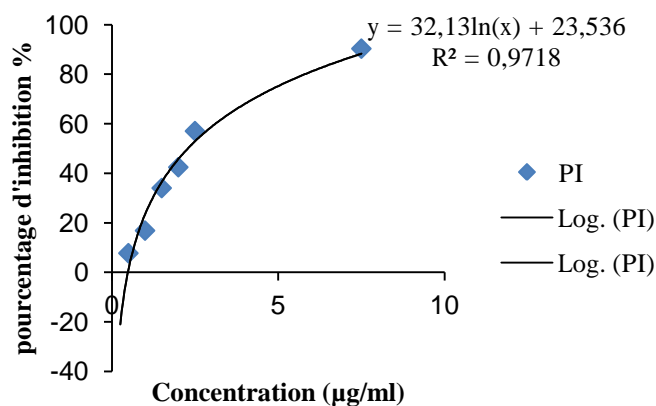
Résultats et discussion



*Evaluation de l'activité antioxydante
de l'extrait hydroacétonique (A)*



*Evaluation de l'activité antioxydante
de l'extrait hydrométhanolique (B)*



*Evaluation de l'activité antioxydante de
l'acide ascorbique (C)*

Figure 12 : *Pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits (A) et (B) et l'acide ascorbique (C)*

Résultats et discussion

D'après les courbes logarithmiques, nous avons calculé les CI50 qui correspondent à la concentration qui peut inhiber 50% du radical DPPH.

Tableau 4 : Les CI50 des deux extraits étudiés de *Citrus reticulata blanco* et de l'acide ascorbique

Echantillons	CI50 (µg/ml)
Extrait eau/acétone	49,501
Extrait eau/méthanol	101,47
Acide ascorbique	2,277

D'après les résultats mentionnés dans le **tableau 4** et les courbes de la **Figure 12**, nous avons remarqué une importante activité antioxydante par l'extrait hydro-acétonique avec une CI50 de 49,501 µg/ml dont l'intervalle de pourcentage d'inhibition varie entre 33,7 % ± 0,054 et 87,08% ± 0,028, suivie par l'extrait hydrométhanolique qui présente presque la moitié de l'activité de celle du premier extrait brut, avec une CI50 de 101,47 µg/ml et dont l'intervalle de pourcentage d'inhibition varie entre 15,13% ± 0,04 et 78,04% ± 0,03. Les deux extraits présentent un pouvoir antiradicalaire plus faible par rapport à celui de l'acide ascorbique qui a exhibé une CI50 de 2,277 µg/ml.

D'après l'étude de **Nasri et al., 2017**, en utilisant le méthanol et l'eau comme des solvants d'extractions des feuilles de *Citrus reticulata blanco* ont obtenu des valeurs de CI50 de 128.20 µg/ml ± 1,10 et 107.33 µg/ml ± 0,97, respectivement. Nos résultats des concentrations inhibitrices CI50 sont inférieurs à ceux obtenus par ces auteurs.

D'après **Fadhllillah et al., 2019**, l'extrait d'éthanol qui a été préparé par la méthode de macération présente une CI50 de 42.925 µg/ml qui montre une meilleure activité antioxydante de *Citrus reticulata blanco* par rapport à nos extraits.

Résultats et discussion

Cette différence de résultats obtenus par certains auteurs par rapport à notre étude peut être expliquée par la différence dans la méthode d'extraction, les solvants d'extractions, la région et le mois de la récolte.

Conclusion générale

Conclusion

Conclusion générale

Les chercheurs dans le domaine de santé sont attirés de plus en plus ces dernières années à étudier les plantes médicinales qui contiennent plusieurs substances à grande utilité à l'être humain et qui prennent une place importante dans la santé traditionnelle. Ces plantes restent aussi nécessaires dans le domaine phytothérapeutique.

Le présent travail a pour objectif d'évaluer une des activités biologiques *in vitro*, c'est l'activité antioxydante des feuilles de « *Citrus reticulata blanco* », une des espèces les plus populaires des agrumes, récoltée de la wilaya de Tlemcen.

Nous avons commencé notre étude par l'extraction, deux extraits bruts ont été obtenus par la méthode de macération à la température ambiante par utilisation de deux systèmes de solvants avec une polarité différente : eau/ acétone ou eau/ méthanol (30/70 : v/v). L'extrait hydro- acétonique a présenté le meilleur rendement par rapport à celui de l'extrait hydrométhanolique.

Pour l'activité antioxydante des feuilles de la mandarine, elle est mise en évidence par les deux méthodes suivantes :

- Réduction de fer FRAP ;
- Piégeage du radical libre DPPH.

La plante a présenté un meilleur pouvoir réducteur de fer et donc une meilleure activité antioxydante par l'extrait hydro-acétonique avec une CE50 de $2,906 \pm 0,099$ mg/ml.

Elle montre aussi une bonne activité antiradicalaire avec une CI50 de $49,501 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait hydro-acétonique dans un intervalle de pourcentage d'inhibition qui varie entre $33,7\% \pm 0,054$ et $87,08\% \pm 0,028$.

Ce travail montre l'importance de « *Citrus reticulata blanco* » dans le domaine de la santé par la contenance des substances qui peuvent exercer la capacité antioxydante, et donc, l'existence d'une activité antioxydante dans cette plante qui est capable d'être utilisée pour traiter certaines maladies liées au stress oxydatif tel que le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer et de parkinson, etc.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abedinpour, H., Ranjbar, G. A., Jelodar, N. B., & Golein, B. (2014). *Evaluation of genetic diversity in Citrus genotypes by IRAP molecular marker. Int J Farm Alli Sci, 3, 230-234.*

Ansari, K. N. (1997). *The free radicals--the hidden culprits--an update. Indian journal of medical sciences, 51(9), 319-336.*

Arab, K., Bouchenak, O., & Yahiaoui, K. (2013). *Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie, 9(3), 159-166.*

Beaudeau, J. L., & Vasson, M. P. (2005). *Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris: Lavoisier, 45-86.*

Beaudeau, J. L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., & Legrand, A. (2006, November). *Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote: Implication dans la transcription et la régulation des gènes. In Annales pharmaceutiques françaises (Vol. 64, No. 6, pp. 373-381). Elsevier Masson.*

Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 271(5), C1424-C1437.*

Bidie, A. P., N'Guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011). *Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature, 8(1-2), 1-12.*

Bonnefont-Rousselot, D. (2007). *Stress oxydant et vieillissement. Spectra biologie, 157, 23.*

Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). *Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'Euphorbia helioscopia. Journal of New Sciences, 28.*

Boveris, A., & Cadenas, E. (1975). *Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. FEBS letters, 54(3), 311-314.*

Cadenas, E., & Boveris, A. (2005). *Mitochondrial free radical production, antioxidant defenses and cell signaling. In Reactions, Processes (pp. 219-234). Springer, Berlin, Heidelberg.*

Références bibliographiques

Choe, E., & Min, D. B. (2006). *Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. Critical reviews in food science and nutrition*, 46(1), 1-22.

Chopra, R. N., Nayar, S. L., & Chopra, I. C. (1986). *Glossary of Indian medicinal plants (including the supplement), Council Sci. Ind. Res., New Delhi, India.*

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). *Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.

Dar, M. I., Naikoo, M. I., Khan, F. A., Rehman, F., Green, I. D., Naushin, F., & Ansari, A. A. (2017). *An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants. In Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: Role and regulation under abiotic stress (pp. 25-52). Springer, Singapore.*

Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., & Khan, F. A. (2016). *Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies (pp. 155-166). Springer, New Delhi.*

Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques).*

Descamps, E., Gelé, P., Bordet, R., & Vamecq, J. (2006). *Modulation pharmacologique du stress oxydatif. Stratégies thérapeutiques. La Lettre du Pharmacologue*, 20.

Dionisi, O., Galeotti, T., Terranova, T., & Azzi, A. (1975). *Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 403(2), 292-300.

Djenidi, H., Khennouf, S., & Bouaziz, A. (2020). *Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. PROGRESS IN NUTRITION*, 22(1), 224-235.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & 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(3), 296-302.

Références bibliographiques

- Dorji, K., & Yapwattanaphun, C. (2011).** *Assessment of morphological diversity for local mandarin (Citrus reticulata Blanco) accessions in Bhutan. Journal of Agricultural Technology, 7(2), 485-95.*
- Dugo, G., & Di Giacomo, A. (Eds.). (2002).** *Citrus: the genus citrus. CRC Press.*
- Dupont, F., & Guignard, J. L. (2007).** *Botanique: systématique moléculaire. Elsevier Health Sciences.*
- El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., & Zacarías, L. (2011).** *Citrus spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. In Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits (pp. 437-516e). Woodhead Publishing.*
- Fadhllillah, F. M., Oktaviani, W., & Mariani, R. (2019, December).** *Antioxidant activity of Ethanol Extract, n-Hexane fraction, Ethyl Acetate fraction and Water fraction of Garut Orange Leaves (Citrus reticulata Blanco). In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 1402, No. 5, p. 055083). IOP Publishing.*
- Favier, A. (2003).** *Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108.*
- Fidrianny, I. R. D. A., Harnovi, M., & Insanu, M. (2014).** *Evaluation of antioxidant activities from various extracts of sweet orange peels using DPPH, FRAP assays and correlation with phenolic, flavonoid, carotenoid content. Asian J. Pharmaceutical & Clinical Res, 7, 186-190.*
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007).** *Flavonoid composition of citrus juices. Molecules, 12(8), 1641-1673.*
- Ghafourifar, P., & Richter, C. (1997).** *Nitric oxide synthase activity in mitochondria. FEBS letters, 418(3), 291-296.*
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010).** *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry, 48(12), 909-930.*
- Gill, S. S., Khan, N. A., Anjum, N. A., & Tuteja, N. (2011).** *Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. Plant Stress, 5(1), 1-23.*
- Girodon, F., Blache, D., Monget, A. L., Lombart, M., Brunet-Lecompte, P., Arnaud, J., ... & Galan, P. (1997).** *Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense*

Références bibliographiques

parameters. Journal of the American College of Nutrition, 16(4), 357-365.

Références bibliographiques

- Giulivi, C., Poderoso, J. J., & Boveris, A. (1998).** *Production of nitric oxide by mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 273(18), 11038-11043.*
- Godber, B. L., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R., & Harrison, R. (2000).** *Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. Journal of Biological Chemistry, 275(11), 7757-7763.*
- Guichard, C., Pedruzzi, E., Fay, M., Mkaddem, S. B., Coant, N., Daniel, F., & Ogier-Denis, E. (2006).** *Les Nox/Duox. MEDECINE/SCIENCES, 22, 953-9.*
- Gülcin, İ. (2006).** *Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life sciences, 78(8), 803-811.*
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** *Le stress oxydant. Revue médicale de Liège, 62(10), 628-38.*
- Igamberdiev, A. U., Seregelyes, C., Manac, N., & Hill, R. D. (2004).** *NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. Planta, 219(1), 95-102.*
- Jannati, M., Fotouhi, R., Abad, A. P., & Salehi, Z. (2009).** *Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. Journal of Horticulture and Forestry, 1(7), 120-125.*
- Jelen, H., & Wasowicz, E. (2011).** *Lipid-Derived Flavor (pp. 65-93). CRC Press: Boca Raton, FL.*
- Kimball, D. A. (2012).** *Citrus processing: a complete guide. Springer Science & Business Media.*
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., ... & Harrison, D. G. (2002).** *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. The Journal of clinical investigation, 111(8), 1201-1209.*
- Leverve, X. (2009).** *Stress oxydant et antioxydants?. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 44(5), 219-224.*
- Lim, T. K. (2012).** *Citrus reticulata. In Edible medicinal and non-medicinal plants (pp. 695-720). Springer, Dordrecht.*

Références bibliographiques

- Lu, H. C. (2006).** *Chinese natural cures. Black Dog & Leventhal. New York, p 512.*
- Matés, J. M., & Pérez-Gómez, C. (1999).** *Castro INd. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem, 32(8), 595-603.*
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999).** *Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical biochemistry, 32(8), 595-603.*
- Mazza, G. (1987).** *Etude de la composition aromatique de l'huile essentielle de mandarine par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse. Sciences des aliments, 7(3), 459-479.*
- Mezouar, D., Lahfa, F. B., Djaziri, R., & Boucherit-Otmani, Z. (2014).** *Évaluation de l'activité antioxydante de Berberis vulgaris L. Phytothérapie, 12(5), 297-301.*
- Migdal, C., & Serres, M. (2011).** *Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. médecine/sciences, 27(4), 405-412.*
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci- Yilmaz, S. U. L. T. A. N., & Mittler, R. O. N. (2010).** *Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant, cell & environment, 33(4), 453-467.*
- Moore, G. A. (2001).** *Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. TRENDS in Genetics, 17(9), 536-540.*
- Mukhtar, R. A. S. H. I. D., Khan, M. M., Fatima, B., Abbas, M., & Shahid, A. D. N. A. N. (2005).** *In vitro regeneration and multiple shoots induction in Citrus reticulata (Blanco). Int. J. Agri. Biol, 7(3), 414-416.*
- Murevanhema, Y. Y., Jideani, V. A., & Oguntibeju, O. O. (2018).** *Review on Potential of Seeds and Value-Added Products of Bambara Groundnut (Vigna subterranea): Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Oxidative Stress. In Bioactive Compounds of Medicinal Plants (pp. 141-188). Apple Academic Press.*
- Nasri, M., Bedjou, F., Porras, D., & Martínez-Flórez, S. (2017).** *Antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities of Citrus reticulata blanco leaves extracts: an in vivo and in vitro study. Phytothérapie, 1-13.*
- Negre-Salvayre, A., & Salvayre, R. (2005).** *Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif: Implication en physiopathologie vasculaire. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 12(5-6), 433-438.*

Références bibliographiques

Nishino, T. (1994). *The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. The Journal of Biochemistry, 116(1), 1-6.*

Oboh, G., & Ademosun, A. O. (2012). *Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. Journal of food science and technology, 49(6), 729-736.*

Ortiz, J. M. (2002). *Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. In Citrus (pp. 30-49). CRC Press.*

Rochette, L. (2008). *Stress oxydant et sepsis. Réanimation, 17(6), 1-4.*

Selvamuthukumar, M., Boobalan, M. S., & Shi, J. (2017). *Bioactive Components in Citrus Fruits and Their Health Benefits. Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods.*

Shao, H. B., Liang, Z. S., Shao, M. A., & Sun, Q. (2005). *Dynamic changes of anti-oxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 42(3-4), 187-195.*

Sharangi, A. B. (2017). *Secondary Metabolites in Spices and Medicinal Plants: An Overview. In Plant Secondary Metabolites, Three-Volume Set (pp. 163-188). Apple Academic Press.*

Sies, H. (1991). *Oxidative stress: from basic research to clinical application. The American journal of medicine, 91(3), S31-S38.*

Sies, H. (1997). *Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology: Translation and Integration, 82(2), 291-295.*

Singanusong, R., Nipornram, S., Tochampa, W., & Rattanatraiwong, P. (2015). *Low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (Citrus reticulata Blanco cv. Sainampuang) and lime (Citrus aurantifolia) peels and the antioxidant. Food Analytical Methods, 8(5), 1112-1123.*

Smirnoff, N. (2005). *Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. Antioxidants and reactive oxygen species in plants, 53-86.*

Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002). *Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biology and Medicine, 33(5), 575-586.*

Références bibliographiques

- Sun, Y., Wang, J., Gu, S., Liu, Z., Zhang, Y., & Zhang, X. (2010). *Simultaneous determination of flavonoids in different parts of Citrus reticulata 'Chachi' fruit by high performance liquid chromatography—photodiode array detection. Molecules, 15(8), 5378-5388.*
- SWINGLE, W., & REECE, P. (1967). *The Citrus Industry, VOL 1, REUTHER, W., WEBBER, HJ and BATCHELAR, LD ed. Centennial Pub. Univ. Calif, 389.*
- Tanaka, T. (1977). *Fundamental discussion of Citrus classification. Studia Citrologica, 14, 1-6.*
- Tasic, L., Mandic, B., Barros, C. H. N., Cypriano, D. Z., Stanisic, D., Schultz, L. G., ... & Queiroz, V. L. (2016). *Exploring bioactivity of hesperidin, naturally occurring flavanone glycoside, isolated from oranges. Citrus Fruits, Nova Science Publishers, Inc.*
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). *Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food chemistry, 104(2), 466-479.*
- Tsai, P., Weaver, J., Cao, G. L., Pou, S., Roman, L. J., Starkov, A. A., & Rosen, G. M. (2005). *L-arginine regulates neuronal nitric oxide synthase production of superoxide and hydrogen peroxide. Biochemical pharmacology, 69(6), 971-979.*
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions, 160(1), 1-40.*
- Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004). *Les acteurs immédiats du stress oxydatif. La lettre du pharmacologue, 18, 16-23.*
- Vikram, D. S., Rivera, B. K., & Kuppusamy, P. (2010). *In vivo imaging of free radicals and oxygen. In Free Radicals and Antioxidant Protocols (pp. 3-27). Humana Press.*
- Violi, F., & Cangemi, R. (2005). *Antioxidants and cardiovascular disease. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000), 6(9), 895-900.*
- Ye, X., Chen, J., Xu, J., & Chen, J. (2017). *1 Citrus Fruits, Varieties, Chemical Properties, and Products in the Processing Industry. Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods.*

Références bibliographiques

Yeung, H. C. Handbook of Chinese Herbs and Formulas, vol. 1, 1985 *Institute of Chinese Medicine. Los Angeles, CA.*