

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان  
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM  
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département de biologie



MÉMOIRE

Présenté par

**AISSA MADAOUI Zineb Wiem**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER en Biologie**

Option : Biologie de la nutrition

**Thème :**

**Evaluation de l'activité antioxydant de l'écorce d'orange.**

Soutenu le 30 juin 2022, devant le jury composé de :

|           |                    |                       |                              |
|-----------|--------------------|-----------------------|------------------------------|
| Président | Dr MALTI Nassima   | Maitre de conférences | Université de Tlemcen        |
| Encadrant | Dr DIDI Amel       | Maitre de conférences | Université de Tlemcen        |
| Examineur | Dr BOUDGHENE Amina | Maitre de conférences | Université de Ain Temouchent |

**Année universitaire 2021/2022**

## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Je tiens à saisir cette occasion et adresser mes profonds remerciements et mes profondes reconnaissances :*

*A ma directrice de recherche **Dr DIDI BENKALFAT Amel**, pour la qualité de son encadrement, ses orientations, ses conseils précieux et sa disponibilité tout au long de ma recherche.*

*Aux membres de jury **Dr MALTI Nassima** et **Dr BOUDGHENE-GUERRICHE Amina** pour l'intérêt qu'elles ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*A monsieur **Mohamed Amine DIDI** directeur de laboratoire des technologies de séparation et de purification qui m'a permis d'élaborer mes recherches dans les meilleures conditions possible.*

*A toute l'équipe de laboratoires de technologies de séparation et purification, particulièrement les ingénieurs **Wafaa** et **Samira** pour nous avoir bien accueilli, et pour leur soutien pédagogique à tout moment.*

*A mes chers amis : **Bilal, Amine, Chakib, Hadjer, Wissem, Kenza** et **Ahlem** pour leurs disponibilités, leurs dévouements, et leurs conseils de tous les jours.*

*Merci à tous ceux qui m'ont apporté de l'aide de près ou de loin.*

## Dédicaces

*Je dédie ce travail de recherche :*

*A mes chers parents pour leurs soutiens incontestables, encouragements, sacrifices et tout l'amour qu'ils m'ont toujours donné,*

*A mes deux frères, ma sœur et ma chère cousine pour l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études,*

*A mon fiancé et toute ma belle-famille,*

*A tous les membres de ma famille pour leurs encouragements,*

*A mes meilleurs amis, à qui je souhaite le succès et le bonheur.*

## الملخص

يتم استهلاك البرتقال على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم. بعد تحولها إلى صناعة، تعتبر جلودها نفايات تلوث البيئة وتتطلب تكلفة عالية لدعمها.

الهدف من عملنا هو تعزيز القيمة الغذائية لبقايا لحاء البرتقال (EO) للحمضيات من مجموعة Thomson Navel وتقييم القوة المضادة للأكسدة لنواتجه الأيضية.

تم الاستخراج بمذيبات مختلفة (الهكسان والميثانول وأستات الإيثيل والبيوتانول). تم تحديد إجمالي البوليفينول والفلافونويد وتقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة اختبار الجذور الحرة واختبار تقليل الحديد (FRAP) وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) على مستخلصات EO المختلفة.

وتبين النتائج التي تم الحصول عليها من التحليل الكمي لمجموع البوليفينول لمختلف المستخلصات السداسية والميثانول وأستات الإيثيل والبيوتانوليك من EO، المحتوى قدر ب  $0,01 \pm 2,27$  ;  $0,005 \pm 1,35$  ;  $0,02 \pm 7,72$  و  $0,005 \pm 4,45$  ملغ من EAG/غم من المادة الجافة، على التوالي. وبالتالي، فإن محتوى الفلافونويد  $1,48 \pm 0,01$  ;  $0,12 \pm 0,006$  ;  $1,13 \pm 0,04$  ;  $0,43 \pm 0,01$  ملغ EC/g المادة الجافة، على التوالي.

قوة مضادات الأكسدة لمستخلص الميثانول هي الأفضل مقارنة بالمستخلصات الأخرى في اختبارات DPPH و FRAP.

يشير CCM إلى وجود أحماض الفينوليك والعديد من فئات الفلافونويد وعلاج صفيحة CCM بواسطة DPPH أظهر أن فئة الفلافون وجليكوسيدات الفلافانول لديها أفضل نشاط مضاد للأكسدة. لديها أفضل نشاط مضاد للأكسدة.

بناءً على النتائج التي تم الحصول عليها، يظل EO مصدرًا واعدًا للغاية لنواتج الأيض الثانوية النشطة بيولوجيًا للاستخدام في مختلف المجالات الصناعية.

**الكلمات المفتاحية:** *Citrus sinensis*، القشور، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

## Résumé

L'orange est un fruit largement consommé à l'échelle mondiale. Après sa transformation en industrie, ses pelures sont considérées comme un déchet qui pollue l'environnement et qui demande un coût élevé pour sa prise en charge.

L'objectif de notre travail est la valorisation en tant que source nutritionnelle de ce résidu qu'est l'écorce d'orange (EO) de *Citrus sinensis* de la variété Thomson Navel et l'évaluation du pouvoir antioxydant de ses métabolites secondaires.

L'extraction a été réalisée avec différents solvants (hexane, méthanol, acétate éthyle et n-butanol). Le dosage de polyphénols totaux, des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante par test de piégeage du radical libre DPPH et test de la réduction du fer (FRAP) ainsi que la chromatographie sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur les différents extraits de EO.

Les résultats obtenus d'analyse quantitative des polyphénols totaux des différents extraits hexanique, méthanolique, acétate éthyle et butanolique de EO, montrent une teneur de  $2,27 \pm 0,01$  ;  $1,35 \pm 0,005$  ;  $7,72 \pm 0,02$  et  $4,45 \pm 0,005$  mg EAG/g de matière sèche, respectivement. Ainsi, une teneur en flavonoïdes de  $1,13 \pm 0,04$  ;  $0,12 \pm 0,006$  ;  $1,48 \pm 0,01$  ;  $0,43 \pm 0,01$  mg EC/g de matière sèche, respectivement.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique est le meilleur par rapport aux autres extraits dans les tests de DPPH et de FRAP.

La CCM indique la présence des acides phénoliques et de nombreuses classes de flavonoïdes et le traitement de la plaque CCM par le DPPH a montré que la classe des flavones et flavanols glycosides présente la meilleure activité antioxydante.

Vue les résultats obtenues, l'EO reste une source de métabolites secondaires bioactifs très prometteur pour son utilisation dans différents domaines industriels.

**Mots clés :** *Citrus sinensis*, écorce, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, CCM.

## Abstract

Orange is widely consumed worldwide. After its transformation into industry, its skins are considered as a waste that pollutes the environment and that requires a high cost for it supported.

The objective of our work is to enhance the nutritional value of the orange peels (OP) residue of *Citrus sinensis* of the Thomson Navel variety and to evaluate the antioxidant power of its secondary metabolites.

The extraction was carried out with different solvents (hexane, methanol, ethyl acetate and n-butanol). Determination of total polyphenols, flavonoids, evaluation of antioxidant activity by DPPH free radical entrapment and iron reduction test (FRAP) and thin-layer chromatography (TLC) were carried out on the different OP extracts.

The results obtained from quantitative analysis of the total polyphenols of the various hexanic, methanolic, ethyl acetate and butanolic extracts of OP, show a content of  $2,27 \pm 0,01$ ;  $1,35 \pm 0,005$ ;  $7,72 \pm 0,02$  et  $4,45 \pm 0,005$  mg GAE/g dry matter, respectively. Thus, flavonoid content of  $1,13 \pm 0,04$ ;  $0,12 \pm 0,006$ ;  $1,48 \pm 0,01$ ;  $0,43 \pm 0,01$  mg CE/g dry matter, respectively.

The antioxidant power of the methanol extract was the best compared to the other extracts in the DPPH and FRAP tests.

The CCM indicates the presence of phenolic acids and many classes of flavonoids and the treatment of the CCM plate by DPPH has shown that the flavones and flavanols glycosides class has the best antioxidant activity.

Based on the results obtained, OP remains a very promising source of bioactive secondary metabolites for use in various industrial fields.

**Keywords:** *Citrus sinensis*, peels, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, TLC

# Table de matières

|  |    |
|--|----|
| <i>Introduction</i> .....  | 1  |
| <i>Synthèse bibliographique</i> .....                              | 1  |
| <i>Chapitre 1 : L'orange</i>                                       |    |
| 1. L'orange .....  | 3  |
| 1.1. Généralités .....   | 3  |
| 1.2. Description botanique, morphologique et physiologique .....   | 3  |
| 1.3. Classification.....   | 5  |
| 1.4. Composition chimique globale des écorces d'agrumes.....       | 6  |
| 1.5. Domaine de l'utilisation de <i>Citrus sinensis</i> .....      | 6  |
| 1.5.1 Utilisation traditionnelle de <i>Citrus sinensis</i> .....   | 6  |
| 1.5.2 Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques ..... | 6  |
| 1.5.3 Utilisation alimentaire .....                                | 7  |
| <i>Chapitre 2 : Métabolites secondaires</i>                        |    |
| 2 Métabolites secondaires .....                                    | 8  |
| 2.1. Polyphénols.....  | 8  |
| 2.1.1. Structure des polyphénols .....                             | 8  |
| 2.2. Flavonoïdes .....   | 10 |
| 2.2.1. Structure .....   | 10 |
| 2.3. Les acides phénoliques .....                                  | 11 |
| 2.3.1. Structure .....   | 11 |
| 2.4. Intérêt des composées phénoliques .....                       | 12 |
| 2.5. Propriétés biologiques .....                                  | 12 |
| <i>Chapitre 3 : Stress oxydant</i>                                 |    |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3      | Stress oxydant.....                       | 14 |
| 3.1.   | Origine de stress oxydative.....          | 14 |
| 3.2.   | Les dommages des radicaux libres.....     | 15 |
| 3.2.1. | L'ADN .....                               | 15 |
| 3.2.2. | Protéines .....                           | 16 |
| 3.2.3. | Lipides.....                              | 16 |
| 3.3.   | Antioxydants .....                        | 16 |
| 3.3.1. | Type des antioxydants.....                | 17 |
| 3.3.2. | Mécanisme d'action des antioxydants ..... | 20 |

### *Matériel et méthodes*

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Matériel végétal .....   | 22 |
| 2.   | Préparations des extraits.....   | 23 |
| 2.1. | Extraction à chaud.....  | 23 |
| 2.2. | Extraction liquide-liquide : Fractionnement .....                                    | 24 |
| 3.   | Analyse quantitative.....  | 25 |
| 3.1. | Dosage de polyphénols.....   | 25 |
| 3.2. | Dosage de flavonoïdes.....   | 25 |
| 4.   | Test d'activité antioxydantes.....   | 26 |
| 4.1. | Test de DPPH Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) .....    | 26 |
| 4.2. | Test de la réduction du fer FRAP ( <i>ferric reducing antioxidant power</i> ) :..... | 27 |
| 5.   | Chromatographie sur couche mince.....  | 27 |
| 6.   | Etudes statistiques.....   | 29 |

### *Résultats et discussion*

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Rendement des extraits d'écorce de <i>Citrus Sinensis</i> ..... | 30 |
|----|---|----|

|  |    |
|--|----|
| 2. Teneur en polyphénols totaux .....  | 31 |
| 3. Teneur en flavonoïdes .....   | 33 |
| 4. Analyse de l'activité antioxydante.....   | 34 |
| 4.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) .....                      | 34 |
| 4.2. Corrélacion entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes et l'activité antioxydante :..... | 36 |
| 4.3. Test FRAP.....  | 37 |
| 5. Chromatographie sur couche mince.....   | 38 |
| <i>Conclusion</i> .....  | 43 |
| <i>Références bibliographiques</i> .....   | 45 |

## Liste des abréviations

**mg EAG/g** : Milligramme équivalent de l'acide gallique par gramme

**mg EC/g** : Milligramme équivalent de catéchine par gramme

**mg EQ/g** : Milligramme équivalent de quercétine par gramme

**Abs** : Absorbance

**ADN**: acide désoxyribonucléique

**AG** : acide gallique

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium

**DO**: densité optique

**DPPH** : diphénylpicrylhydrazyl

**EOR**: espèces oxygénées réactives

**FAO**: Food and Agriculture Organization of the United Nations

**Fe<sup>3+</sup>** : fer ferrique

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure ferrique

**H** : Hydrogène

**H<sub>2</sub>O** : Eau

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peroxyde d'hydrogène

**IC<sub>50</sub>** : concentration efficace à 50%

**LDL** : lipoprotéines de basse densité

**MeOH** : Méthanol

**NADPH**: nicotinamide adéninediphosphate

**NO•** : monoxyde d'azote

**O<sup>2-•</sup>**: anion superoxide

**OH•** : Radical hydroxyl

**ONOO-**: peroxydinitrite

**R•**: radical libre

**Rf**: Rapport frontal

**ROO•**: Radical peroxyde lipidique

**rpm**: Rotation par minutes

**UV**: ultra-violet

## Listes des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1:</b> Schéma détaillant la structure de péricarpe d'orange .....  | 4  |
| <b>Figure 2:</b> Structure du noyau phénolique.....  | 9  |
| <b>Figure 3 :</b> Classification des polyphénols .....   | 9  |
| <b>Figure 4 :</b> Structure de base des flavonoïdes .....  | 10 |
| <b>Figure 5:</b> Structure chimique de quelques acides phénoliques .....   | 12 |
| <b>Figure 6 :</b> Carte représentant l'occupation des sols de la ferme EPE BELAIDOINI MED.....   | 22 |
| <b>Figure 7 :</b> Montage de l'appareil de soxhlet (à gauche) et d'évaporateur (à droite).....   | 24 |
| <b>Figure 8 :</b> Rendements des extraits de l'écorce d'orange citrus sinensis .....   | 30 |
| <b>Figure 9 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux. ....  | 31 |
| <b>Figure 10:</b> Teneurs en polyphénols totaux pour l'écorce de Citrus Sinensis Thomson Navel. ....   | 32 |
| <b>Figure 11 :</b> Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes. ....  | 33 |
| <b>Figure 12 :</b> Teneurs en flavonoïdes pour l'écorce de Citrus Sinensis Thomson Navel. ....   | 33 |
| <b>Figure 13 :</b> Pouvoir anti-radicalaire des extraits de l'écorce de Citrus sinensis.....   | 35 |
| <b>Figure 14 :</b> Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante. ....  | 36 |
| <b>Figure 15 :</b> Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante. ....  | 36 |
| <b>Figure 16 :</b> Pouvoir de réduction du fer en fonction des différentes concentrations des extraits de l'écorce de Citrus sinensis et du standard. .... | 37 |
| <b>Figure 17:</b> Pouvoir antioxydant des extraits de l'écorce de Citrus sinensis.....   | 38 |
| <b>Figure 18:</b> Photographie de la chromatographie sur couche mince de différents extraits de l'écorce de citrus Thomson Navel à 254nm. ....             | 40 |
| <b>Figure 19 :</b> Révélation par DPPH de la chromatographie sur couche mince de différents extraits de l'écorce de citrus Thomson Navel à 365nm. ....     | 42 |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1 :</b> Caractéristiques générales de <i>Citrus sinensis</i> .....   | 5  |
| <b>Tableau 2:</b> Systématique de l'orange douce ( <i>Citrus sinensis</i> L.) .....   | 5  |
| <b>Tableau 3 :</b> Classification et distribution nutritionnelle des flavonoïdes.....   | 11 |
| <b>Tableau 4 :</b> Composés phénoliques avec leurs propriétés biologiques.....  | 13 |
| <b>Tableau 5 :</b> Principales espèces réactives de l'oxygène.....  | 14 |
| <b>Tableau 6 :</b> Sources du stress oxydant .....  | 15 |
| <b>Tableau 7:</b> Mécanisme d'action de quelques antioxydants.....  | 21 |
| <b>Tableau 8 :</b> Rendement des extraits d'écorce d'orange. ....   | 30 |
| <b>Tableau 9 :</b> Résultat CCM : Résultats CCM : Gel de silice, ACETATE D'ETHYL/ACIDE<br>FORMIQUE/EAU (65 :1,5 :09), <i>Citrus sinensis</i> . .... | 39 |
| <b>Tableau 10 :</b> Identification des composés phénoliques. ....   | 41 |

# *Introduction*

Les plantes génèrent une diversité de métabolites secondaires dans le cadre de leur système de défense et d'adaptation pendant leur croissance. Nombreuse recherche épidémiologique suggèrent qu'une consommation importante de fruits peut réduire et prévenir le risque de certains cancers, maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives ainsi que certains déclin fonctionnels associés au vieillissement. Cela pourrait expliquer leurs diverses bio-activités, tels que les activités anticancéreuses, antibactériennes, antifongiques et antioxydantes (**Mutahar et al., 2012**).

Selon (**FAO, 2020**), les agrumes représentent une des cultures fruitières les plus abondantes à l'échelle mondiale, ces derniers comprennent plusieurs variétés telles que les citrons, les oranges et les pamplemousses. La production mondiale annuelle des agrumes dépasse les 140 millions de tonnes dont l'orange seulement représente plus que la moitié de cette production.

En Algérie, la production d'orange est estimée à 1,5 millions de tonnes (**FAO, 2020**). En effet, les agrumes contiennent des composés phyto-chimiques bénéfiques précieux (**Hou et al., 2019**).

L'oranger de la famille des *Rutaceae* est souvent utilisé dans la médecine traditionnelle pour leur grande importance dans les pays méditerranéens et en Asie (**Etebu et Nwauzoma, 2014**).

Lors de la transformation industrielle des agrumes, environ 50 % du poids des fruits est gaspillé sous forme de pulpe et d'écorce (**Siddiqui et al., 2022**). Sur ce principe, une démarche sur ces résidus offre plusieurs avantages, tant économiques qu'environnementales. Ainsi, l'utilisation de ces pelures riches en composés bioactifs peut constituer une plateforme efficace pour la production des composés nutraceutiques (**Rafiq et al., 2018**).

De nombreuses études ont démontré que l'écorce d'orange représente une source importante de composés phénoliques (**Teh et al., 2014**). Elles contiennent des quantités appréciables de pectine, de fibres alimentaires de flavonoïdes, acides phénoliques, huiles essentielles et (**Ademosun et al., 2018**).

C'est dans ce cadre que notre travail vise à valoriser écologiquement et économiquement ces résidus industriels et à déterminer leur valeur nutritionnelle et le pouvoir antioxydant de ses

métabolites secondaires (Polyphénols, flavonoïdes) et pour cela nous avons réalisé ce manuscrit qui se subdivise en :

- ✓ Une partie de synthèse bibliographique contenant des informations sur l'écorce d'orange suivi par des données relatives aux métabolites secondaires et des données concernant le stress oxydatif ;
- ✓ Une partie qui comporte le matériel et méthodes utilisées et qui englobe les procédures d'extraction, le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes, les techniques pour l'évaluation de l'activité antioxydante et enfin une analyse sur chromatographie sur couche mince ;
- ✓ Une partie qui porte sur les résultats et leur discussion ;
- ✓ Et pour conclure, nous avons résumés les principaux résultats et perspectives.

# *Synthèse bibliographique*

# *Chapitre 1 : L'orange*

# 1. L'orange

## 1.1. Généralités

Les oranges sont des agrumes, fruits très demandés au niveau mondial et c'est de retour à leurs propriétés bénéfiques comme : la teneur élevée en vitamines, le faible apport calorique et un important potentiel antioxydant. Ils ont beaucoup d'avantages sur la santé et ont été reconnus par plusieurs études scientifiques (**Parle et Chaturvedi, 2012**).

Les agrumes sont l'une des cultures fruitières les plus importantes dans le monde. Ils sont énormément cultivés dans les régions tropicales et subtropicales du monde et aussi dans les régions tempérées et chaudes, comme les pays méditerranéens (**Milind et Dev, 2012 ; Mehl et al., 2014**).

L'orange a une forme sphérique à ovale à la peau orangée rougeâtre, épaisse et assez rugueuse contenant une huile essentielle d'odeur particulière. Leur utilisation est possible dans les salades de fruits, les confitures, ou pour consommer son jus puisque c'est un fruit juteux et sucré. Ce fruit est une combinaison entre le pamplemousse et la mandarine.

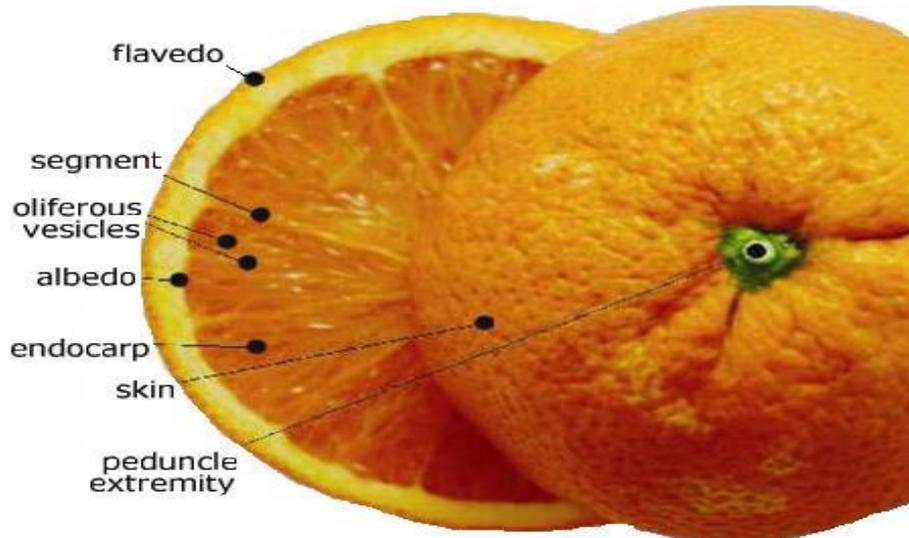
## 1.2. Description botanique, morphologique et physiologique

Les espèces de genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur phase de maturité. Tous les fruits des *Citrus cultivés* ont la même structure anatomique présentée dans la **figure 1 (Ramful et al., 2010)**.

*Citrus sinensis* est d'origine d'Asie, maintenant elle est répandue dans tout le pacifique et les régions chaudes du monde. *Citrus sinensis* est un arbre à fleurs à feuillage persistant. La hauteur de ce type d'orange est généralement de 9-10 m, avec de grandes épines sur les branches. Les feuilles sont alternes, avec des pétioles à ailettes étroites (3-5 mm de large, 6,5-15 cm de long) ; la forme des feuilles va de l'ellipse à l'oblongue. Ils ont une forte odeur caractéristique d'agrumes due à la présence d'huile abondante (**Goldhamer et al., 2012**). Les fleurs sont axillaires, simples ou en verticilles de 6 (5 cm de large), avec cinq pétales blancs et 20-25 étamines jaunes. Le fruit peut être globulaire ou ovale (6,5 à 9,5 cm de large) (**tableau1**), et il atteint son état de maturation quand il devient orange ou jaune (**Han ., 2008 ; Goudeau et al., 2008**).

D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé : flavédo, le mésocarpe appelé : albédo et l'endocarpe (pulpe).

L'épicarpe est la surface extérieure du fruit. Il est coloré par des pigments caroténoïdes et représente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont disposés de façon désordonnée.



**Figure 1:** Schéma détaillant la structure de péricarpe d'orange (Ouldyerou *et al.*, 2016).

Ces glandes sont des vésicules entourées de plusieurs couches de cellules sécrétoires dont la formation implique des cellules méristèmes superficielles et des nodules.

Le mésocarpe est la couche interne blanche, dont la structure est plus ou moins dense par rapport à la taille du fruit, il peut constituer 12 à 30 % du fruit. C'est intimement associé à la croûte qu'on l'appelle le zeste d'agrumes (l'écorce).

L'endocarpe est la partie comestible de fruit. Il consiste en une membrane lisse située entre les chambres cellulaires. Sur la face interne, cette membrane porte des poils succulents, ensemble formant la partie comestible ou pulpe ou pépins (Bennici *et al.*, 2004 ; Ramful *et al.*, 2010).

**Tableau 1 :** Caractéristiques générales de *Citrus sinensis* (Bénédicte et Michel, 2011).

| Genre                                    | Caractéristiques  |
|--|---|
| <i>Citrus sinensis</i><br>Taille 7 à 8 m | <p><b>-Aspect général :</b> arbre au port harmonieux<br/>Taille (7 à 8m)</p> <p><b>-Fleurs :</b> blanches et immaculées, très parfumées.</p> <p><b>- Feuilles :</b> vert profond, légèrement ailées.</p> <p><b>- Fruits :</b> forme variable, coloration variable</p> <p>-La pulpe juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés.</p> |

### 1.3. Classification

Selon le **tableau n°2** ci-dessous, les agrumes appartiennent à la famille des *Rutaceae*, sous famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous tribu des *Citrinae*. Il existe plusieurs genres des agrumes tels que *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* qu'ils sont les genres les plus cultivés. Chacun de ses genres se regroupe en des espèces. Le genre *Citrus* est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées : les oranges (*Citrus sinensis*) ; les mandarines (*Citrus reticulata*); les clémentines (*Citrus clementina*); les citronniers (*Citrus limon*); et les pomelos (*Citrus paradisi*) (M'hiri, 2015).

**Tableau 2:** Systématique de l'orange douce (*Citrus sinensis* L.) (Pena et al., 2007).

|                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| <b>Règne</b>         | <b>Végétale</b>         |
| <b>Ordre</b>         | <i>Géraniales</i>       |
| <b>Sous ordre</b>    | <i>Géraniineae,</i>     |
| <b>Classe</b>        | <i>Dicotyledoneae,</i>  |
| <b>Sous classe</b>   | <i>Archichalmydeae,</i> |
| <b>Division</b>      | <i>Embryophyta</i>      |
| <b>Sous-division</b> | <i>Angiospermes</i>     |
| <b>Famille</b>       | <i>Rutaceae,</i>        |
| <b>Sous-famille</b>  | <i>Aurantiodeae</i>     |
| <b>Tribu</b>         | <i>Citreae</i>          |
| <b>Sous-tribu</b>    | <i>Citrinae</i>         |
| <b>Genre</b>         | <i>Citrus</i>           |
| <b>Espèce</b>        | <i>Citrus sinensis</i>  |

#### 1.4. Composition chimique globale des écorces d'agrumes

Le fruit d'orange a de nombreuses utilisations et plusieurs effets bénéfiques pour la santé. Notre étude est fondée plus sur l'écorce de *citrus sinensis* de variété Thomson Navel et c'est pour cette raison qu'on va donner plus de détails sur leur composition et leurs utilisations.

Ce coproduit est riche en eau (60% à 75%), sucres solubles et insolubles, protéines et en quelques minéraux tels que Ca, Mg, K, Na, Zn, Fe et Cu (M'hiri., 2015), alors que très pauvre en lipide. Leurs teneurs en ces composés se varient selon la variété considérée d'agrumes (Kammoun et al., 2011).

L'écorce d'orange est composée essentiellement de glucose, fructose et saccharose (sucre soluble) (Bicu et Mustata, 2011), fibres alimentaires (sucre insoluble) comme la cellulose, de l'hémicellulose, des pectines, des pigments et des huiles essentielles (Lu et al., 2009), avec un rapport bien équilibré entre les fractions solubles et insolubles (Kuljarachanan et al., 2009).

L'écorce d'orange est riche en composés phénoliques tels que les flavonoïdes (Ma et al., 2009) et aussi en acides phénoliques (Abd El-aal et Halaweish, 2010). Concernant les flavonoïdes, *citrus sinensis* contiennent plus de 60, regroupés selon leurs structures moléculaires en quatre classes principales : flavanones, flavones, flavonols et anthocyanines (Salas et al., 2011).

Elle contient essentiellement des acides chlorogéniques, caféïques, *p*-coumariques, sinapique, férulliques (hydroxycinamiques) (Wang et al., 2008).

#### 1.5. Domaine de l'utilisation de *Citrus sinensis*

##### 1.5.1 Utilisation traditionnelle de *Citrus sinensis*

Ce genre est une source de vitamine C, qui est un antioxydant naturel permet de renforcer notre système immunitaire (Etebu et Nwauzoma, 2014).

Il était traditionnellement utilisé pour traiter quelques maladies : constipation, crampes, coliques, bronchite, diarrhée, tuberculose, rhume, toux, obésité, troubles menstruels, angines, stress, dépression, hypertension et l'anxiété (Milind et Dev.,2012).

##### 1.5.2 Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques

L'extrait naturel d'écorce est également l'un des intrants de fabrication des médicaments, des savons, des parfums et des produits cosmétiques. De plus, les écorces d'agrumes sont riches en limonène, peuvent être transformées comme un solvant industriel ou également un solvant biologique (Lohrasbi., 2010). Linalol et les extraits de citral de pamplemousse et d'orange douce sont

antibactériens contre *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *monocytogenes* et *Bacillus cereus*.

Le citral est un composé actif contre *Penicillium* et *Aspergillus niger*. Pour ces raisons, les huiles essentielles peuvent être utilisées alternativement aux fongicides synthétiques (**Tian., 2001**).

### **1.5.3 Utilisation alimentaire**

Dans la cuisine algérienne, l'écorce fraîche ou en poudre de *Citrus sinensis* est utilisée pour aromatiser le thé et préparer certaines confiseries traditionnelles.

Les fibres d'écorces d'agrumes sont naturellement liées à des composés bioactifs qui leur confèrent leurs propriétés fonctionnelles.

Plusieurs études sont concentrées sur l'extraction de fibres d'agrumes pour une utilisation aux formulations alimentaires (**Fernandez-Lopez et al., 2004**). La pectine commerciale est extraite de la plupart des agrumes et également des pommes (**Wang et al., 2008**).

Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire pour ses capacités épaississantes et texturants mais aussi pour sa capacité de gélification stable. Elle est aussi utilisée dans plusieurs formulations à savoir : les produits laitiers, préparations à base de fruits, crèmes glacés, produits à base émulsionnée, confiture et gelées (**Hawthorne et al., 2000**).

De la part de leur capacité à absorber l'eau, les fibres consommées gonflent dans l'estomac et les intestins et agissent comme coupe-faim en procurant une sensation de satiété. Les fibres insolubles favorisent le transit intestinal, tandis que les fibres solubles favorisent la croissance de la flore intestinale, ce qui améliore la digestion. L'apport en fibres réduit le risque de maladies cardiovasculaires, de cancer du côlon et d'obésité. Les fibres d'écorce d'agrumes bénéficient ainsi de tous les avantages des probiotiques et ont des applications potentielles dans les aliments fonctionnels (**Chau et al., 2004 ; Wang et al., 2008**).

## ***Chapitre 2 : Métabolites secondaires***

## 2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules non participantes au fonctionnement général des cellules végétales, contrairement aux métabolites primaires qui interviennent dans le métabolisme basal. Ils ont un faible poids moléculaire et aussi on les trouve en très faibles concentrations (**Bourgaud, 2013**). Ils sont produits dans différentes régions de la plante à des périodes de développement spécifique (**Raven *et al.* 2013**).

Les métabolites secondaires n'ont pas un rôle fondamental pour la plante tels que les métabolites primaires, mais ils aident à l'adaptation des plantes à leur environnement (**Naik *et al-Khayri* 2016**).

Dans notre travail on s'intéresse aux métabolites secondaires présents dans l'écorce d'orange, et plus particulièrement des polyphénols, des flavonoïdes et des acides phénoliques.

### 2.1. Polyphénols

Les polyphénols sont des composés végétaux présents en quantité importante dans nos aliments, donc ils font partie inclusive de l'alimentation humaine (**Dai *et Mumper*, 2010**). Ces micro-constituants sont abondants dans de nombreux fruits et légumes, olives, céréales, chocolat, et boissons telles que le café et le thé (**Mojzer *et al.*, 2016**). Les polyphénols les plus abondants dans nos assiettes sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (**Renard *et al.*, 2014**).

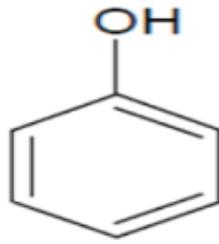
Ce groupe de métabolites secondaires a une forte bioactivité qui se traduit dans notre organisme par une large gamme de propriétés biologiques (**Mraihi *et al.*, 2015**). Ils sont des antioxydants qui assurent une protection aux plantes contre les agressions extérieures et les phénomènes d'oxydation (**Menat, 2006**). Ils protègent aussi l'être humain contre diverses maladies associées au stress oxydatif telles que : le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose, les maladies inflammatoires et neurodégénératives (**Keerthi *et al.*, 2014**).

On trouve les polyphénols dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) (**Middleton., 2000**).

#### 2.1.1. Structure des polyphénols

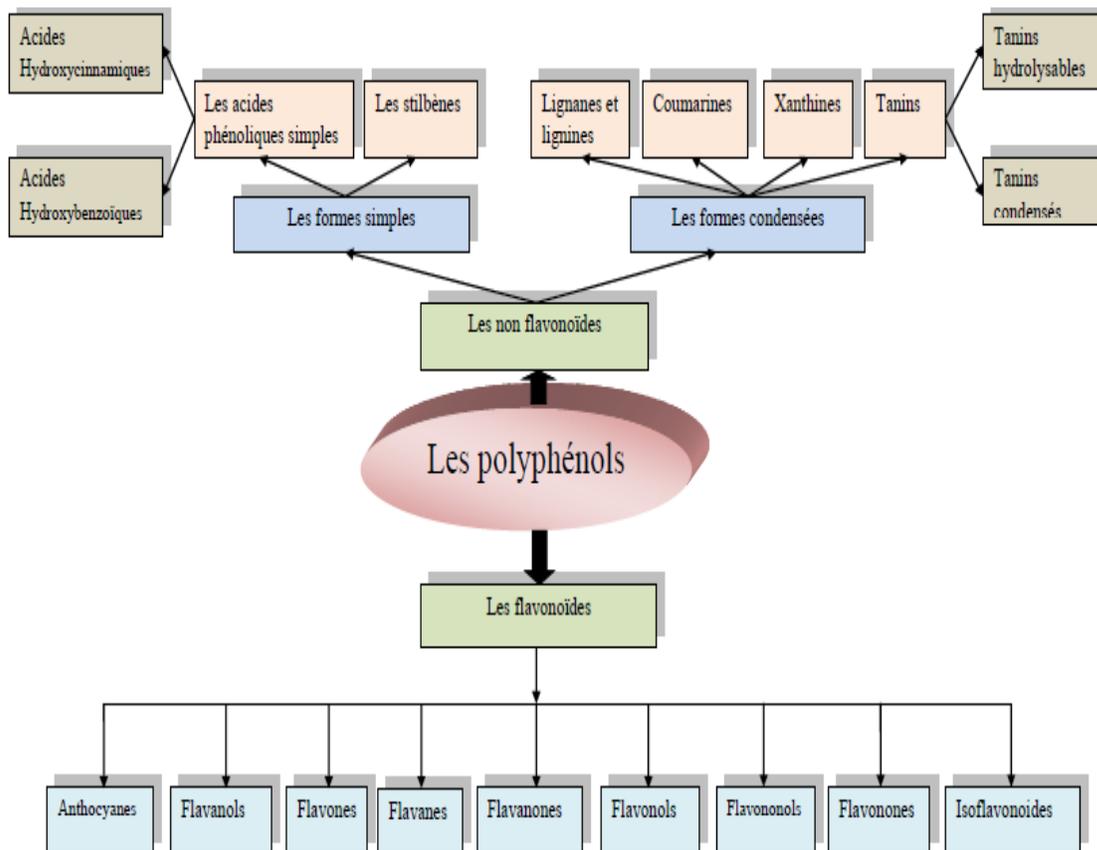
Les polyphénols comprennent plus que 10 000 molécules, qui sont divisés en différentes classes chimiques (**Albuquerque *et al.*, 2013**). Ces derniers ont un point commun qui est la présence d'un cycle aromatique (**figure 2**) à 6 carbones ou plus d'un cycle comportant un nombre variable de fonctions hydroxyles (**Hennebelle *et al.*, 2004**). Leur classement est basé sur le nombre de noyaux

phénoliques qu'ils contiennent, et aussi sur des éléments structurants responsable à la liaison de ses noyaux (Kumar *et al.*, 2015) (figure3).



**Figure 2:** Structure du noyau phénolique (Albuquerque *et al.*, 2013).

La majorité des composés phénoliques naturels sont présents sous forme de glycosides (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 appelé aglycone (Morand *et Milenkovic*, 2014).



**Figure 3 :** Classification des polyphénols (Kumar *et al.*, 2015).

## 2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent un grand groupe de composés phénoliques bioactifs. Ils sont les plus importants et les plus répandus dans les produits naturels diététiques. Ils sont des pigments plus concentrés dans les zones externes du fruit ou du légume. Ils interviennent dans la couleur soit sous forme native (anthocyanes et flavonols), soit après oxydation par le phénomène de brunissement enzymatique. Ils sont responsables de la coloration jaune, orange et rouge (Ajila *et al.*, 2011).

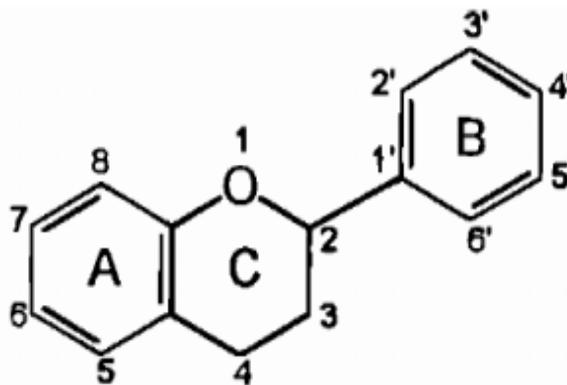
Ces pigments sont souvent trouvés dans les agrumes types *citrus* et aussi dans les légumes, boissons tels que : le thé et le café en quantité importantes (Derbel *et Ghedira*, 2005).

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, dues en parts aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels (Rodriguez *et al.*, 2014).

Les effets antioxydants de ces phyto-nutriments se manifestent non seulement par l'inhibition et l'inactivation des radicaux libres, mais également par la neutralisation des oxydases et la chélation des ions métalliques traces responsables de la production d'espèces oxygénés réactives (Lillo, 2008).

### 2.2.1. Structure

Tous les flavonoïdes ont la même structure de base (Ghedira, 2005). Avec un squelette à quinze atomes de carbones, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes telles que l'activité antimicrobienne (Rijke *et al.*, 2006), antifongique (Schijlen *et al.*, 2004), anti inflammatoire et antioxydante (Ghedira, 2005). Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes selon le degré d'oxydation du cycle C : flavanols, flavonols, flavones, flavanones, isoflavones et anthocyanidines, (Rodriguez *et al.*, 2014) (Tableau 3).



**Figure 4** : Structure de base des flavonoïdes (wang *et al.*, 2018).

**Tableau 3** : Classification et distribution nutritionnelle des flavonoïdes (**Rodriguez et al.,2014**).

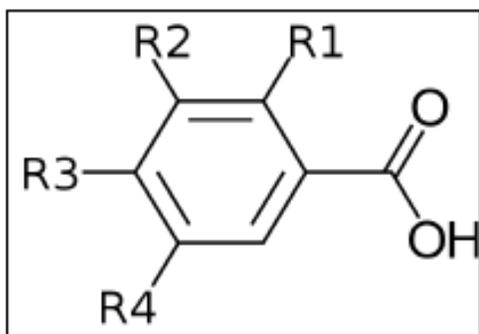
| <b>Flavonoïdes</b> | <b>Aliment</b>                      | <b>Caractéristiques</b>  |
|--------------------|-------------------------------------|--|
| <b>Flavanols</b>   | Fruit<br>Cacao<br>Thé               | Impliqué dans la biosynthèse de pro anthocyanidines.               |
| <b>Flavonols</b>   | Oignon<br>Brocolis<br>Tomate<br>Thé | Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.               |
| <b>Flavones</b>    | Tisanes<br>Plantes aromatiques      | Les groupes le plus abondants des composés phénoliques.            |
| <b>Flavanones</b>  | Agrumes                             | Les plus abondants dans les écorces de citrus.                     |
| <b>Isoflavones</b> | Soja<br>Légumineuse                 | Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée. |
| <b>Anthocyanes</b> | Baies<br>Fruits rouges              | Représentent le groupe le plus important des substances colorées.  |

### 2.3. Les acides phénoliques

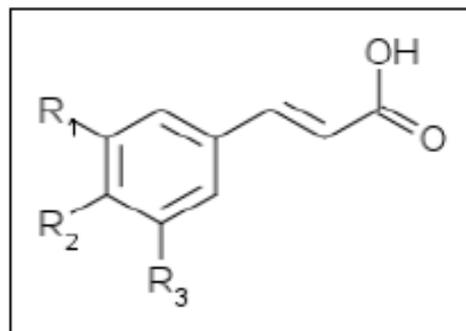
Ce sont des phénols possédant une seule fonction carboxylique, très abondants dans les aliments et plus particulièrement les fruits acides. (**Wissam et al., 2012**).

#### 2.3.1. Structure

Ils ont un ou plusieurs carboxyles et un groupe hydroxy-phénolique. Les acides phénoliques englobent les formes les plus simples des composés phénoliques, on distingue deux grands groupes distincts : les acides hydroxybenzoïques qui sont des dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1), ils sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'ester ou d'hétérosides ; et les acides hydroxycinnamiques qui dérivent de l'acide cinnamique (C6- C3) (**Wang et al .,2002, Bozinet al.,2008**).



Acide hydroxybenzoïque



Acide hydroxycinnamique

**R =H, OH ou OCH<sub>3</sub>.**

**Figure 5:** Structure chimique de quelques acides phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

#### 2.4. Intérêt des composées phénoliques

Les polyphénols sont des constituants principaux actifs de nombreuses plantes. Ils ont une capacité modulatrice d'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. Ils interviennent dans plusieurs phénomènes physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits et ils assurent la protection des végétaux contre les agressions biotique et abiotique. Ces métabolites sont connus aussi pour leur capacité antioxydante, ils neutralisent les radicaux libres et limitent quelques dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies (Boizot *et* Charpentier., 2006 ; (Bourgaud, 2013). Les flavonoïdes ont une grande importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation et dans la croissance et la reproduction des plantes et dans la défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes (Ignat *et al.*, 2011).

Nombreux polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses (Epifano *et al.*,2007). Ils contribuent ainsi comme des molécules actives dans la production du médicament, additif alimentaire, arômes et dans la parfumerie, et aussi à la formation des propriétés organoleptiques des plantes (odeurs et couleurs) (Murthy *et al.* 2014). Aujourd'hui, dans le marché minimum 1/3 des médicaments contiennent une telle molécule végétale (Bourgaud, 2013).

#### 2.5. Propriétés biologiques

Chaque groupe de polyphénols présente de multiples propriétés biologiques qui sont résumé dans le tableau ci-dessous (tableau 4).

**Tableau 4 : Composés phénoliques avec leurs propriétés biologiques (François Nsemi Muanda,**

| <b>Polyphénols</b>         | <b>Activités biologiques</b>   |
|----------------------------|--|
| <b>Acides phénols</b>      | Anti-bactériennes ; anti-ulcéreuses ;anti-parasitaires ;antifongiques ;<br>Antioxydantes   |
| <b>Coumarines</b>          | Protectrices vasculaires ; anti-inflammatoires ;anti-parasitaires<br>;analgésiques ;anti-œdémateuses   |
| <b>Flavonoïdes</b>         | Anti-tumorales ; anti-parasitaires ; vasodilatation ;anti-bactériennes<br>Anti-carcinogènes ; anti-inflammatoires ; analgésiques ; antivirales<br>Diurétiques ; ostéogénèses ; antioxydantes ; anti-athérogéniques<br>anti-thrombotique ;anti-allergique |
| <b>Anthocyanes</b>         | Protectrices capillaro-veineux ; antioxydante  |
| <b>Pro anthocyanidines</b> | Effets stabilisants sur le collagène ; anti-tumorale ; antifongiques<br>Anti-inflammatoires ; antioxydantes  |
| <b>Tannins</b>             | Antioxydantes  |
| <b>Lignanes</b>            | Anti-inflammatoires ; analgésiques   |
| <b>Saponines</b>           | Anti tumorale ; Anti cancérigène   |
| <b>Phytostérols</b>        | Agent de protection face à l'apparition ou développement de<br>certains cancers hormono-dependant  |

## *Chapitre 3 : Stress oxydant*

### 3 Stress oxydant

La production de radicaux libres (RL) est un phénomène naturel régulé par notre organisme. Ces RL sont contrôlées par un système de défense équilibré (antioxydant/pro-oxydant), mais dans le cas de carence ou absence des antioxydants, ou si nous avons une synthèse excessive de RL, cela provoque ce qu'on appelle stress oxydatif.

Afin de réduire les conséquences du stress oxydatif, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydants/antioxydants pour maintenir les propriétés physiologiques de l'organisme (Sies *et al.*, 2017).

#### 3.1. Origine de stress oxydative

L'oxygène est un élément essentiel dans le processus d'oxydation cellulaire mais qui peut provoquer aussi l'apparition de molécules nocives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le rôle de ces dernières est complexe car elles peuvent avoir des effets physiologiques ou toxiques selon leur concentration. Dans des conditions normales, ils sont produits en petites quantités et sont impliqués dans la fonction de certaines enzymes, la signalisation cellulaire, la défense immunitaire, la différenciation cellulaire et la régulation des gènes (Haleng *et al.*, 2007).

Le tableau suivant montre les principales réactives de l'oxygène (tableau 5).

**Tableau 5 :** Principales espèces réactives de l'oxygène (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

| Espèces radicalaires dérivées de l'oxygène |          | Espèces non radicalaires dérivés de l'oxygène |          |
|--|----------|---|----------|
| Anion superoxyde                           | $O_2^-$  | Peroxyde d'hydrogène                          | $H_2O_2$ |
| Radical hydroxyle                          | OH       | Acide hypochloreux                            | HOCL     |
| Radical hydroperoxyde                      | $HO_2^-$ | Ozone   | $O_3$    |
| Radical peroxyde                           | $RO_2^-$ | Oxygène singulet                              | $^1O_2$  |
| Radical alcoxyde                           | $RO^-$   | Peroxynitrite                                 | $ONOO^-$ |

Les sources du stress oxydant se répartissent en deux catégories : les sources endogènes où les RL sont des produits des réactions de l'organisme, et les sources exogènes, telles que le tabagisme, les rayons UV, les médicaments, les agents chimiques, les solvants industriels et la pollution (Pastre, 2005). Le tableau ci-dessous englobe quelques sources de stress oxydant (tableau 6).

**Tableau 6 : Sources du stress oxydant (Haleng *et al.*, 2007).**

| Mode de vie   | Environnement   | Mécanisme biochimique   |
|---|---|---|
| -Tabagisme<br>-Faible consommation de fruits et légumes<br>-Alcool<br>-Médicaments `<br>-Pilule contraceptive<br>-Exposition au soleil<br>-Exercice intense ou mal géré | -Pollution<br>-Ozone<br>-Amiante<br>-Radiations<br>-Contacts avec des substances cancérogènes | -Xanthine-oxydase<br>- Inflammation<br>-Surcharge en fer<br>-Oxydation de l'hémoglobine<br>-Altérations mitochondriales<br>-Interventions chirurgicales |

### 3.2. Les dommages des radicaux libres

Les radicaux libres sont des substances chimiques, des atomes ou des molécules qui ont un ou plusieurs électrons non appariés (électrons uniques). Ces électrons non appariés interagissent avec d'autres molécules ou atomes adjacents, formant des liaisons covalentes, conférants à celles-ci une immense instabilité (Zahir., 2018).

Si les radicaux libres viennent au-delà de la capacité de l'organisme à les neutraliser, ils attaquent tous les constituants cellulaires en provoquant des dommages qui se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN, des protéines et la peroxydation lipidique. Et comme conséquence un dysfonctionnement cellulaire cause par suite des problèmes inflammatoires, immunologiques, neurologiques, génétique et aussi des troubles liés au vieillissement (Poortmans *et Boisseau*, 2003 ; Migdal *et Serres.*, 2011).

#### 3.2.1. L'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'action des radicaux libres. Ces derniers peuvent provoquer des effets mutagènes sur l'ADN ou même l'arrêt des réplifications. Ils interviennent en provoquant des pontages ADN-protéines, des ruptures de brins ou des détériorations des bases.

En effet, les bases azotées, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe en engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8-oxoguanine, 8-nitroguanine, formamidopyrimidine, 8-oxoadénine, formimidouracile, 5-hydroxy-cytosine, 5-hydroxyméthyl-uracile, thymine diol, oxazolone (Favier, 2003). Ces altérations sont dues aux radicaux OH<sup>·</sup> issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN (Milane, 2004). Ces lésions sont impliquées dans de nombreux

processus pathologiques (létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et dans le vieillissement cellulaire (**Favier, 2003**).

### **3.2.2. Protéines**

Les acides aminés les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute agression radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains autres résidus et cela a des conséquences tels que : l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréversibles et peuvent appliquer des modifications fonctionnelles importantes. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et le compartiment extracellulaire (**Favier, 2003 ; Haleng et al., 2007**).

### **3.2.3. Lipides**

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Ce phénomène se définit par l'ensemble de réactions entre les radicaux libres et les acides gras polyinsaturés.

Les acides gras polyinsaturés sont les principaux constituants de la membrane cellulaire (30 à 50 %) (Présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipines). La lipoperoxydation des membranes va perturber et altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). L'oxydation des cardiolipines de la mitochondrie est un facteur qui signifie le déclenchement de l'apoptose des cellules (**Nakagawa ,2004**). Les lipoprotéines telles que les LDL, riches en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Les LDL oxydées sont fortement introduit dans l'athérogenèse. De nombreuses autres pathologies sont associées à la peroxydation des lipides, c'est le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), du diabète, des cancers, des maladies inflammatoires, du vieillissement... (**Cillard et Cillard 2006**).

### **3.3. Antioxydants**

À l'origine ce terme est utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène (**Grigoraş, 2012**).

Les antioxydants sont des substances qui préviennent, réduisent ou réparent les dommages causés par les radicaux libres. Ils atténuent l'oxydation cellulaire. Une bonne santé découle d'un bon

équilibre entre la production inévitable de radicaux libres et l'action des antioxydants. Chaque antioxydant ne peut réagir qu'avec un seul radical libre (**Camilleri et Snoussi, 2012**).

### **3.3.1. Type des antioxydants**

#### **a. Antioxydants primaires (endogènes)**

Ils sont produits par notre corps : ils peuvent s'agir de facteurs spécifiques tels que le glutathion (un puissant détoxifiant cellulaire), l'acide alpha-lipoïque, l'acide urique, le coenzyme Q10, mais ce sont aussi des enzymes (catalase, glutathion réductase, superoxyde dismutase) qu'il faut activer au contact des minéraux provenant des aliments tels que ; le fer pour la catalase, zinc et cuivre pour la super-oxyde dismutase (SOD), sélénium pour la glutathion-peroxydase (**Causse, 2005**).

- **Les superoxydes dismutases (SOD)**

C'est la première ligne de défense et prévention contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. Ils ont un rôle de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène par l'empêchement de la coexistence de ces deux espèces radicalaires et par conséquent la génération du radical hydroxyle. Il existe trois types de SOD les plus répandus chez les vertébrés ayant une localisation différente :

- Une Cu-Zn-superoxydedismutase localisé dans le cytoplasme.
- Une superoxyde-dismutase extracellulaire qui fonctionne avec le  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , elle est présente dans le plasma sanguin et les fluides extracellulaires.
- Une SOD à manganèse (MnSOD) et au Fer (Fe SOD) localisée dans l'espace intra membranaire des mitochondries, Il existe une autre moins réponde la SOD au nickel (**Soares, 2005**). L'action de la SOD doit être régulée avec des enzymes qui dégradent le peroxyde d'hydrogène comme une catalase ou une glutathion peroxydase, pour éviter l'augmentation en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui peut entraîner la formation du radical hydroxyle en présence de fer par la réaction de Fenton (**Souchard et al., 2002**).

- **Les glutathions peroxydases (GPx)**

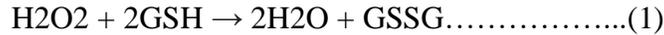
C'est une séléno-protéine (cinq iso-formes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH) (**Haleng ,2007**).

Ils ont une structure tétramérique commune, chacune possédant un atome de sélénium dans son site actif. Il existe plusieurs isoformes de cette enzyme (plasmatique, membranaire, et gastro-

intestinale), ils sont localisés dans le foie et le colon et protégeant directement le tractus gastro-intestinal contre les agressions des dérivés actifs de l'oxygène) (Milane, 2004).

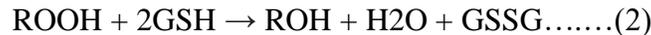
GSH-Px détoxifie 2 substrats :

- Peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau par le couple de glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) (réaction1) :



Ce système n'est efficace que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, c'est-à-dire assurée par le glutathion réductase en présence du cofacteur NADPH (Souchard *et al.*, 2002 ; Marfak, 2003).

- GPx peut également limiter la propagation des réactions radicalaires en réduire des hydroperoxydes organiques instables en alcool (Souchard *et al.*, 2002), (réaction2) :



• **Les catalases**

Cette enzyme agit en synergie avec la SOD car son rôle est d'accélérer la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et l'eau. Les enzymes catalase ne sont localisées qu'à l'intérieur des peroxysomes, ce qui limite leur action liée à d'autres enzymes dans d'autres régions. (Souchard *et al.* 2002). On trouve de nombreuses autres enzymes antioxydants comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases (Favier, 2003).

**b. Antioxydants secondaires (exogènes)**

Ils sont présents dans nos assiettes comme certaines vitamines : C, E et B2 (riboflavine), des oligo-éléments : zinc, cuivre, sélénium, fers nécessaires à l'activation des enzymes protectrices ; des composés de fruits et légumes : caroténoïdes, polyphénols, isothiocyanates (dans le chou et les crucifères) ; composés d'épices et d'herbes : terpènes (Causse, 2005).

Par conséquent, la consommation d'aliments à base de plantes est fortement recommandée, c'est aujourd'hui l'une des principales recommandations diététiques en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols sont considérés comme les plus efficaces grâce à eux effets protecteurs sur le corps (Gee *et Johnson*, 2001).

- **Vitamine C**

La vitamine C ou acide L-ascorbique est apportée par l'alimentation, est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires (compartiments hydrophiles) (**Vertuani et al., 2004**).

L'acide ascorbique est souvent considéré comme l'antioxydant le plus efficace. Il empêche l'oxydation des LDL de divers systèmes générateurs de RL (**Soares, 2005**).

Une utilisation combinée de la vitamine C et d'autres antioxydants (caroténoïdes, tels que le bêta-carotène, formes alpha et gamma du lycopène et de la lutéine, acide ascorbique, tocophérols, flavonoïdes, extraits de thé vert, de myrtille et de raisin) montrent un effet synergique efficace contre le stress oxydatif et ses effets néfastes (empêche le vieillissement accéléré, de nombreuses conditions dégénératives liées à l'âge et oxydatifs des pathologies aiguës : infectieuses, traumatiques, Inflammatoire et allergique ) (**Curtay et Robin, 2000**).

- **La vitamine E**

C'est toute molécule identique à l' $\alpha$ -tocophérol (l' $\alpha$ -T). Ce dernier est une molécule active antioxydant puissant grâce à son caractère lipophile qui lui permet d'agir sur la peroxydation lipidique membranaire (**Souchard et al., 2002**). Ainsi, leur effet antioxydant est plus efficace quand elle est administrée à des faibles doses et sur des périodes courtes cela permet l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydants.

La vitamine E a un rôle important permettant la détoxification des lipoperoxydes. En phase lipidique, l' $\alpha$ -T protège les acides gras polyinsaturés membranaires. Après le piégeage des RL, la vitamine E doit être régénérée. En effet, étant donné que les autres systèmes de protection contre les radicaux libres se situent dans divers compartiments cellulaires, notamment le cytosol, les interactions entre les phases lipidiques et liquides sont probablement plus élaborées, sont principalement impliquée la vitamine C, le glutathion ainsi que la GPx, la CAT, les SOD et d'autres enzymes (**Hajiani et al.,2008 ; Rouaki et Kanane.,2019**).

- **Caroténoïdes**

Ce sont des pigments naturels souvent présents en quantité importante dans les fruits et légumes. Parmi les caroténoïdes les plus courants, nous énumérerons l'alpha et le bêta-carotène et le lycopène. Ces pigments préviennent et même contrôlent la production des RL notamment par piégeage de l'oxygène singulier (**Hininger et Favier, 2004**).

- **Tanins**

Ce sont des polyphénols présents dans de nombreuses plantes, comme l'écorce des arbres, fruits et le thé. Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et les solvants polaires (**Hagerman, 2002**). Les tanins ont des propriétés tannantes, c'est-à-dire à une capacité contre fermentation, altération et pourrissement, cette propriété est liée à leur capacité à se lier à des macromolécules (protéines, polysaccharides, etc.) (**Ghestem et al., 2001**). Nous distinguons habituellement, chez les plantes supérieures, des deux groupes de tanins en différente structure, ce sont des tanins hydrolysables et des tanins condensés (**Macheix et al., 2005**).

- **Les tanins hydrosolubles**

Il s'agit d'esters de glucose (ou de molécules apparentées) et d'acides phénoliques, qui sont : l'acide gallique et l'acide ellagique, qui est un dimère de l'acide gallique.

Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique ou plusieurs molécules d'acide ellagique (**Ghestem et al., 2001**).

- **Les tanins condensés**

Les tanins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères de monomères de polyhydroxyflavan-3-ol, reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (**Ajila et al., 2011**).

### 3.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers et comprennent la capture d'oxygène singulier, l'inactivation des radicaux libres via des réactions d'addition covalentes, la réduction des radicaux libres ou des peroxydes et la complexation des ions et des métaux de transition (**Alam et al., 2016**). De ce fait, les antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention de maladies telles que le cancer et même les maladies cardiovasculaires (**Diallo, 2005**).

Les principaux mécanismes gérés par les antioxydants sont :

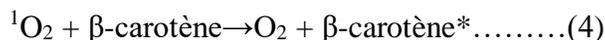
- **Capture de l'oxygène singulier**

Des antioxydants ont des concentrations élevées dans les systèmes biologiques et contribuent avec les caroténoïdes à la désactivation de  $^1\text{O}_2$ .

Ces composés peuvent agir par désactivation chimique (Fixation sur une molécule telle qu'un acide gras) pour donner un hydroperoxyde (réaction 3) :



Ou aussi par désactivation physique (élimination d'énergie d'excitation sans changement chimique) (réaction 4) :



Ainsi, un acide aminé comme l'histidine est aussi un bon « quencher » de  ${}^1\text{O}_2$  (Cillard *et Cillard*, 2006).

• **La chélation des métaux de transition**

Des métaux lourds comme le fer et le cuivre sont impliqués dans la création de radicaux libres, les antioxydants peuvent prévenir les oxydations par la formation d'un complexe de coordination avec les métaux lourds (Delattre *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes sont de bons chélateurs de fer ce qui est un des mécanismes de leur activité antioxydante (Verdan *et al.*, 2011).

• **Piégeage des radicaux libres**

Les composés phénoliques ont un effet anti-radicalaire grâce à leur structure. En effet, ils ont une capacité à piéger les radicaux libres et les ERO tels que le radical superoxyde, hydroxyle, alcoxyle et peroxyde, par transfert d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres (Rafiq *et al.*, 2018).

Le tableau ci-dessous résume les mécanismes d'action de quelques antioxydants (tableau 7).

**Tableau 7:** Mécanisme d'action de quelques antioxydants.

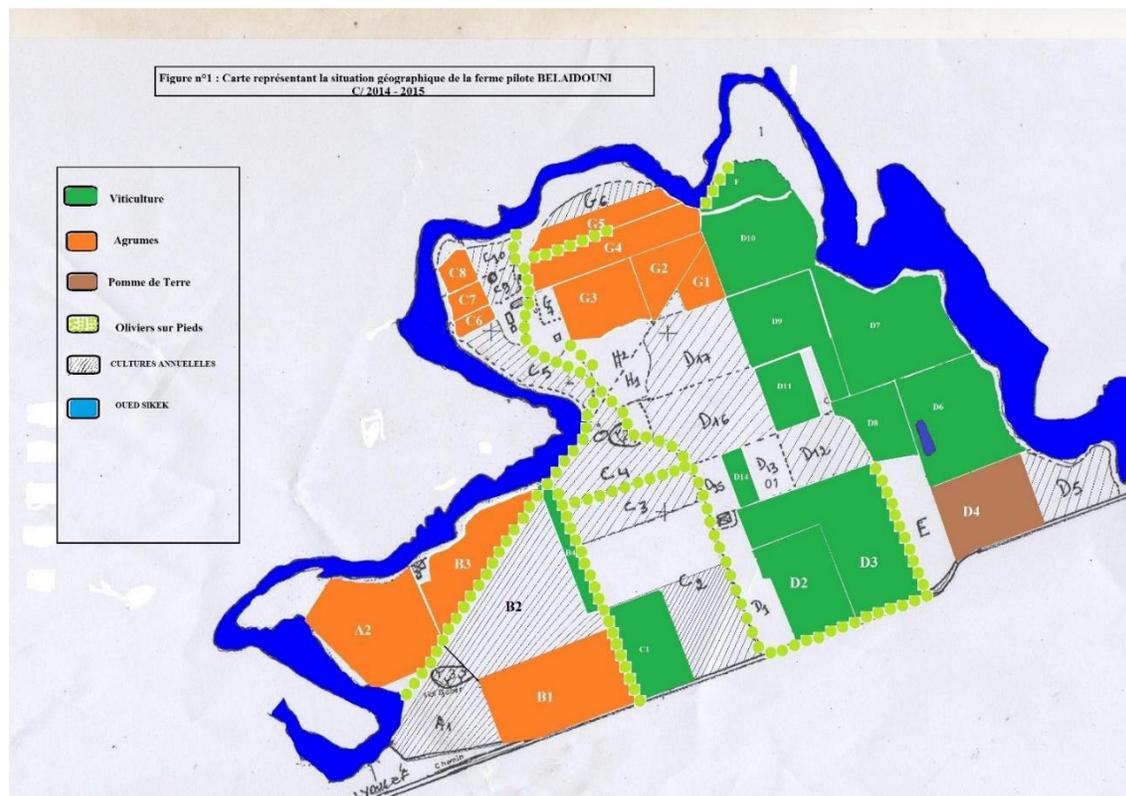
|                                      | <b>Nature</b>   | <b>Mode d'action</b>   |
|--------------------------------------|---|--|
| <b>Antioxydants non enzymatiques</b> | Vitamine E<br>Vitamine C<br>Beta carotène                 | Inhibition de la peroxydation lipidique<br>Participe à la réaction d'oxydoréduction<br>Fixation des métaux de transition   |
| <b>Antioxydants enzymatiques</b>     | Superoxyde dismutase<br>Catalase<br>Glutathion peroxydase | Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde<br>Métabolise H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>Action réductrice sur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et les hydroperoxydes |

## *Matériel et méthodes*

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire des technologies de séparation et de purification de la faculté des sciences.

## 1. Matériel végétal

Nous avons choisi pour ce travail une espèce d'agrumes du genre : *Citrus sinensis*, d'une variété Thomson navel. Le fruit utilisé a été récolté le mois de décembre 2021 à partir d'une ferme pilote spécialisé en Agrumes et céréales de BELAIDOUNI Med à EL FEHOUL, Tlemcen-Algérie (figure 6).



**Figure 6** : Carte représentant l'occupation des sols de la ferme EPE BELAIDOINI MED.

Les oranges sont choisies selon la taille et l'état de maturité. Ces derniers sont nettoyés avec de l'eau courante et leur séchage est réalisé à l'air libre et à l'abri de la lumière.

Après séparation des différentes parties d'oranges, on a récupéré les écorces qu'on a séchées et broyées finement à l'aide d'un mixeur électrique pour obtenir une poudre à granulométrie fines.

Nos échantillons sont placés dans des flacons fermés, fumés, étiquetés et conservés à une température ambiante jusqu'au moment de l'extraction.

Tous les solvants et réactifs utilisés dans notre étude sont de haute pureté.

## **2. Préparations des extraits**

### **2.1. Extraction à chaud**

Pour extraire des produits naturels, l'extraction type solide-liquide est souvent utilisée. Elle consiste à mélanger la poudre matière végétale (solide) avec le solvant d'extraction (liquide). Ainsi, la macération, l'épuisement au moyen d'un Soxhlet, l'hydrodistillation, ou encore l'extraction par reflux sont toutes des méthodes de ce type.

L'appareil de Soxhlet est un extracteur en verre permettant d'extraire un échantillon à l'aide d'un solvant (**figure 7**). Lors de ce type d'extraction, l'échantillon est placé à l'intérieur d'une cartouche puis transféré dans le corps principal en verre de l'extracteur. Le solvant est placé dans le ballon. Au-dessus de l'extracteur se trouve un réfrigérant facilitant la condensation des vapeurs de solvant et leur recyclage. L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans le réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ainsi, le cycle d'extraction se répète continuellement (**Cseke *et al.*,2006 ; Djabou., 2006**).

Notre choix est basé sur l'utilisation de cette méthode afin d'extraire les principaux composants contenus dans l'écorce d'orange par des solvants organiques à savoir : l'hexane et le méthanol aqueux.

#### **a. Mode opératoire**

- 50 g de poudre broyée pesé dans une cartouche d'extraction.
- Mise en place de la cartouche dans l'appareil d'extraction.
- Versement d'une quantité suffisante du solvant pour l'extraction.
- Extraction pendant 4h à une température 60°C.
- L'extrait récupéré est placé dans un évaporateur à 65°C afin d'éliminer le solvant organique.
- L'extrait brut est enfin récupéré dans 10ml du méthanol (**figure 7**) (**Bekkara *et al.*, 1998**).



**Figure 7 :** Montage de l'appareil de soxhlet (à gauche) et d'évaporateur (à droite).

### b. 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 matière soumise à l'extraction.

### c. Expression des résultats

$$\text{Rendement (\%)} = [(m_f / m_i) \times 100]$$

$m_f$  : masse finale de l'extrait brut en gramme.

$m_i$  : masse initiale de l'échantillon en gramme.

### 2.2. Extraction liquide-liquide : Fractionnement

- L'extrait brut méthanolique/aqueux sec est dissout dans 20 ml d'eau distillé chauffé à 50°C,
- 20 ml d'acétate d'éthyle est ajouté au mélange précédent dans une ampoule à décanter,
- La préparation est laissée pendant une nuit à l'abri de la lumière,
- Après que les 2 phases seront bien séparées, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée,
- L'extrait aqueux récupéré est mélangé avec 20 ml de n-butanol dans l'ampoule à décanter.
- Après agitation, le mélange est laissé à l'abri de la lumière pendant une nuit (**Didi, 2009**).

### **3. Analyse quantitative**

#### **3.1. Dosage de polyphénols**

Cette méthode est considérée parmi les méthodes les plus utilisées pour l'évaluation quantitative des composés phénoliques dans les échantillons végétaux. Elle est basée sur leurs capacités de réduire le mélange d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) du réactif de Folin-Ciocalteu, avec la formation d'un complexe bleu (**Boizot et Charpentier, 2006**), qui peut être déterminé colorimétriquement à 750 nm.

##### **a. Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et Nicholson, 2008**.

2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparé est mélangé avec 100  $\mu$ l de l'extrait brut, le mélange a été agité par vortex et laisser incubé pendant 5min, après 100 $\mu$ l du réactif de Folin- Ciocalteu a 1N sont ajoutés au mélange. Après une incubation de mélange à l'obscurité pendant 30 min à une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 750 nm à la spectrophotométrie contre un blanc, dont l'absorption est mesurée est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal (**Bonnaillie et al., 2012**). Une courbe d'étalonnage a été réalisée en même conditions par l'acide gallique.

#### **3.2. Dosage de flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

##### **a. Mode opératoire**

La quantification des flavonoïdes de nos extraits est réalisée par la méthode colorimétrique décrite par (**El-haci et Atik, 2016**)

500  $\mu$ l de chaque extrait sont ajoutés à 2ml d'eau distillée et puis à 150  $\mu$ l d'une solution de nitrite à sodium fraîchement préparé à 15%. Après 6min, 150  $\mu$ l d'une solution de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) à 10% sont additionnés au mélange précédant, laisser pendant 6min, et ajouter 2ml d'une solution d'hydroxyde de sodium NaOH à 4% au mélange. Compléter avec 200  $\mu$ l de l'eau distillée pour ajuster à 7ml de volume total.

Après 15min l'absorbance est mesurée à 510nm contre un blanc par spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en mêmes conditions par catéchine.

#### **4. Test d'activité antioxydantes**

##### **4.1. Test de DPPH Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)**

###### **a. Principe**

C'est la méthode la plus utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) est caractérisé par une grande capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH est observée par une coloration violet foncé de la solution. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une dégradation de couleur de la solution (**Mezouar, 2013**).

###### **b. Protocole**

50 µl de l'échantillon à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml d'une solution de DPPH fraîchement préparé dans le méthanol à  $6,34 \cdot 10^{-5}M$ .

-La lecture de l'absorbance est effectuée à 515nm contre un blanc qui contient 50 µl de l'échantillon avec 1,95ml de méthanol pur.

-Le contrôle négatif contient de 50 µl de méthanol avec 1,95 ml d'une solution de DPPH.

Une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique ce fait en parallèle comme un standard (**Benhammou et al., 2007**).

###### **c. Expression des résultats**

- **Pourcentages d'inhibition**

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

$A_C$  : Absorbance du contrôle.

$A_T$  : Absorbance du test effectué

- **Calcul des IC<sub>50</sub>**

IC<sub>50</sub> ou concentration inhibitrice 50, permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Ces dernières sont calculées graphiquement

par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées (Scherer *et al.*, 2009 ; Fabri *et al.*, 2009).

#### **4.2. Test de la réduction du fer FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) :**

##### **a. Principe**

L'activité antioxydante est mesurée par l'activité réductrice de nos extraits. Dans cette méthode l'activité est représentée par la réduction de la capacité de réduire le fer (III) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) en Fe (II) (Santo *et al.*, 2013).

L'absorbance est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés. La lecture s'effectue à 700 nm sur un appareil UV-Visible (Karoui *et al.*, 2013).

##### **b. Protocole**

Le protocole expérimental suivi est celui de Karagözler *et al.*, 2008.

-1ml de l'échantillon à différentes concentrations sont mélangés avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2M et pH à 6,6 et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. Les tubes sont incubés pendant 20 min à 50°C. Après refroidissement à une température ambiante, ajouter 2,5ml d'une solution de l'acide trichloracétique à 10% et mettre les tubes dans une centrifugeuse à 3000 rpm pendant 10 min.

-2,5ml de chaque surnageant est mélangé avec 2,5ml d'eau distillée et 500  $\mu$ l d'une solution de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  à 0,1%. L'absorbance est mesurée à 700nm contre un blanc. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard dans les mêmes conditions opératoires.

##### **c. Expression des résultats**

$EC_{50}$  (*efficiency concentration*) permet de calculer la concentrations efficace en antioxydants pour la réduction de 50% de  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  (Fidrianny *et al.*, 2016) . Les résultats obtenus sont exprimés dans des histogrammes en fonction de l' $EC_{50}$  de chaque extrait et calculé à partir de l'équation de régression linéaire  $y = ax+b$ .

## **5. Chromatographie sur couche mince**

### **a. Principe**

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle est principalement basée sur des phénomènes d'adsorption.

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui diffuse par capillarité le long d'une phase stationnaire immobilisée sur une plaque de verre ou de plastique semi-rigide ou d'aluminium. Après dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, la mobilité de l'espèce dépend de sa nature et de la nature du solvant (**Kanoun, 2011**).

Lorsque vous placez la plaque sur laquelle l'échantillon est placé dans la cuvette, l'éluât migre à travers la phase stationnaire, principalement par capillarité. De plus, chacun des composants de l'échantillon se déplace à leur propre vitesse vers le front de solvant.

Cette vitesse dépend d'une part des forces électrostatiques maintenues le composant sur la couche mince. D'autre part, sa solubilité dans la phase mobile permet son mouvement en alternant de la phase stationnaire à la phase mobile.

La phase stationnaire est principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Typiquement, en chromatographie sur couche mince, les substances à faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (**Benayad, 2013**).

## **b. Mode opératoire**

Pour notre travail une plaque de gel de silice a été utilisée comme phase stationnaire, sur un support d'aluminium (20×20 cm) sur lequel est fixée la fine couche de silice), nous avons réalisé la séparation des fractions (héxanique, méthanol/eau, butanolique ; acétate éthyle) avec un seul système de solvant approprié : acétate d'éthyle, acide formique, eau : (65 : 1,5 : 9) (V /V).

Après le développement du chromatogramme, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV à la longueur d'onde 254 nm.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son Rf (*rate factor* ou rapport frontal), qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être comprise entre 0 et 1 (**Hennebelle, 2004**).

## **c. Essais d'identification des composés phénoliques par la CCM**

Après cette étape, une solution de DPPH diluée dans le méthanol a été pulvérisée sur la surface des plaques de CCM préalablement développées et incubé pendant 10 min à température ambiante. Les constituants antioxydants actifs de nos extraits ont été détectés comme des spots jaunâtres ou blancs créés par la décoloration du DPPH sur les plaques CCM. Après la comparaison visuelle avec l'intensité de cette décoloration des bandes sur la CCM contre un standard positif, l'activité

antioxydante des composants de l'écorce d'orange ont été provisoirement classés comme activités fortes, moyenne et faibles. Tous les constituants antioxydants actifs détectés ont été notés en fonction de leurs Rf.

## **6. Etudes statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard et le coefficient de corrélation est calculé en utilisant la corrélation de *Pearson* (logiciel : *Microsoft Excel*).

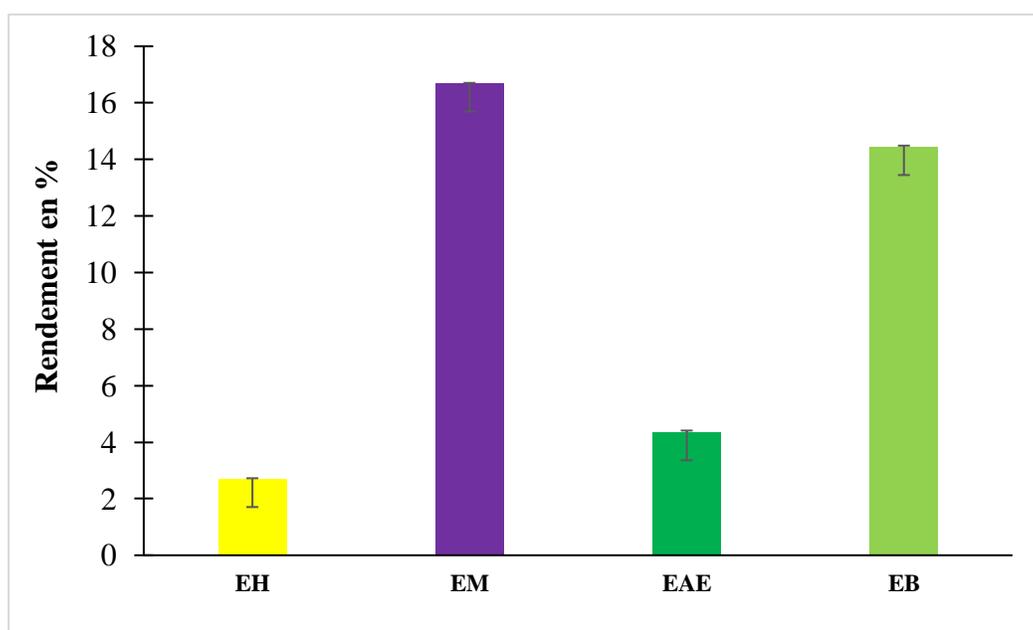
## *Résultats et discussion*

Dans cette partie on se focalise sur la présentation des résultats ainsi que leurs interprétations.

### 1. Rendement des extraits d'écorce de *Citrus Sinensis*

**Tableau 8 :** Rendement des extraits d'écorce d'orange.

| Echantillons               | Masse d'extraits brut (g) | Masse de poudre sèche initiale (g) | Rendement (%) |
|----------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------|
| Extrait hexanique          | 1,41 ± 0,01               | 52,14 ± 0,01                       | 2,70 ± 0,02   |
| Extrait méthanol/eau       | 8,24 ± 0,01               | 49,39 ± 0,01                       | 16,69 ± 0,05  |
| Extrait d'acétate d'éthyle | 0,54 ± 0,01               | 12,42 ± 0,01                       | 4,36 ± 0,01   |
| Extrait butanolique        | 1,79 ± 0,01               | 11,88 ± 0,01                       | 15,06 ± 0,04  |



**EH :** extrait hexanique ; **EM :** extrait méthanolique ; **EAE :** extrait d'acétate éthyle ; **EB :** extrait butanolique.

**Figure 8 :** Rendements des extraits de l'écorce d'orange *citrus sinensis*.

Les valeurs du rendement d'extraction des 4 échantillons sont dissemblables bien que le matériel végétal est le même. En effet, chaque solvant extrait des molécules selon sa polarité (Ncube *et al*, 2008). Le rendement des 2 extraits MeOH et butanolique sont proches, le rendement de l'extrait MeOH est le plus élevé avec un pourcentage de 16,69 % ± 0,05. L'extrait butanolique a donné une valeur moindre de 15,06% ± 0,04. Par contre, l'extrait hexanique et l'extrait d'acétate d'éthyle sont totalement différents que les autres, on a remarqué des valeurs faibles : 4,35% ± 0,01 pour l'extrait d'acétate éthyle

et en dernier  $2,7\% \pm 0,02$  pour l'extrait hexanique (**figure 8**). Donc l'extrait MeOH a donné le meilleur rendement et cela est confirmé par **Telli *et al.*,2010**.

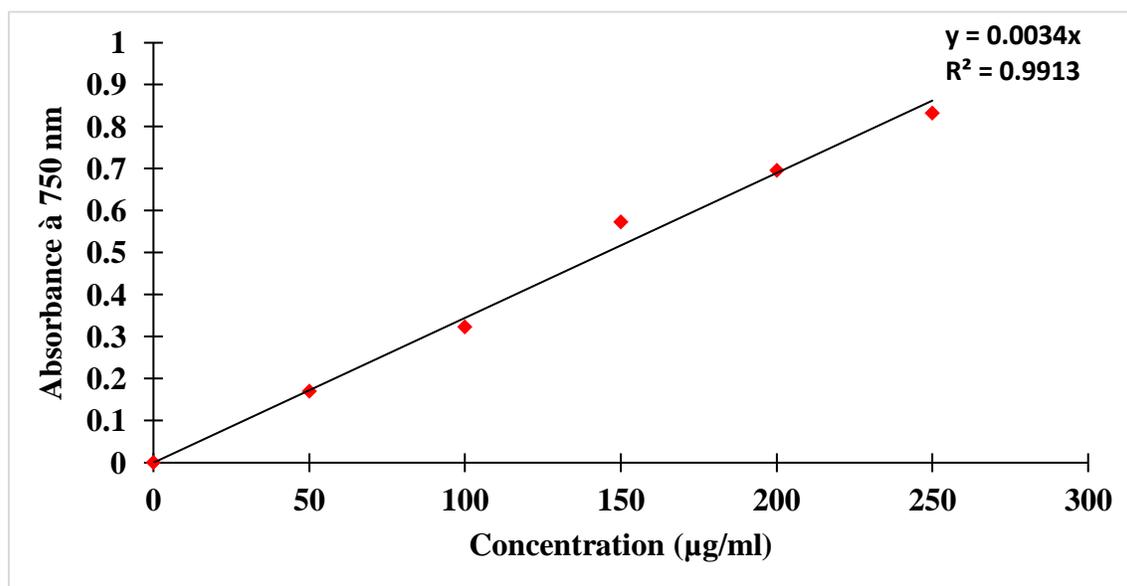
Selon (**Bourkhiss.,2011**) et ces collaborateurs nombreux facteurs peuvent influencer le rendement tels que : les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique et aussi les conditions environnementales, la technique d'extraction, le séchage, la période et le milieu de récolte, les pratiques agricoles et l'âge du matériel végétal.

## 2. Teneur en polyphénols totaux

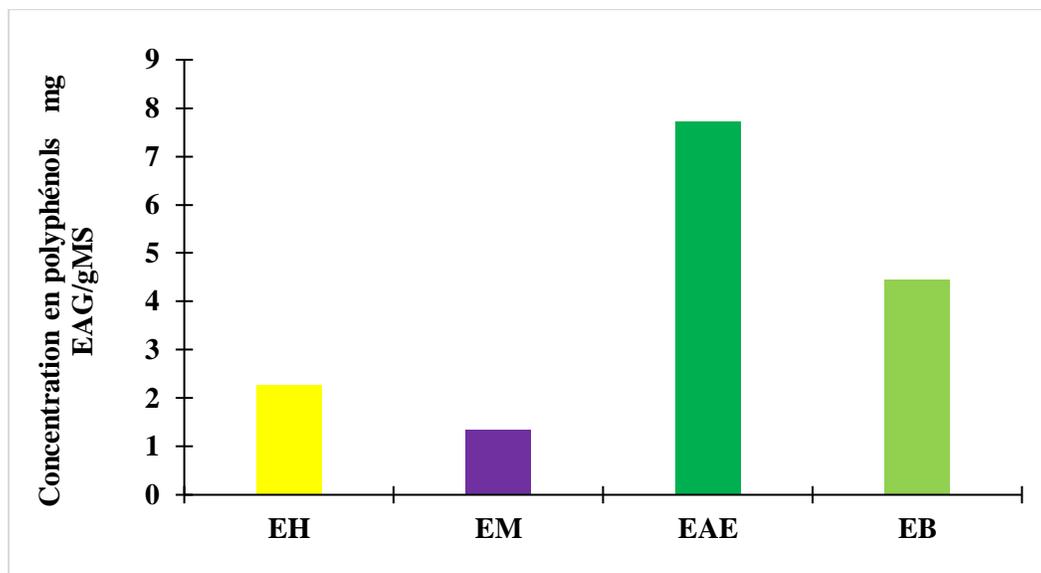
L'analyse quantitative des polyphénols totaux a été effectuée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et l'acide gallique a été utilisé comme standard.

L'analyse est basée sur les valeurs d'absorbance des solutions d'extraits, ayant réagis avec le réactif de Folin-Ciocalteu et comparées à la solution étalon d'acide gallique, donc la teneur est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un standard de référence « l'acide gallique » à des concentrations variantes de 0 à 250 $\mu\text{g/ml}$  (**figure 9**).

La teneur en polyphénols est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS), en utilisant l'équation de la régression linéaire de l'acide gallique.



**Figure 9** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.



**EH** : extrait hexanique ; **EM** : extrait méthanolique ; **EAE** : extrait d'acétate éthyle ; **EB** : extrait butanolique.

**Figure 10:** Teneurs en polyphénols totaux pour l'écorce de *Citrus Sinensis* Thomson Navel.

La **figure 10** représente les teneurs en polyphénols totaux des extraits des écorces de *Citrus Sinensis* Thomson Navel obtenus par l'extraction à chaud.

On a remarqué qu'il y a une variabilité des teneurs en polyphénols dans les 4 extraits, l'extrait avec la teneur la plus haute est celle de l'acétate d'éthyle ( $7,72 \pm 0,02$  mg EAG/g MS), ensuite l'extrait butanolique arrive en 2<sup>ème</sup> position avec une teneur de ( $4,45 \pm 0,005$  mg EAG/g MS), le 3<sup>ème</sup> extrait est celle de l'hexane avec une faible teneur de ( $2,27 \pm 0,01$  mg EAG/g MS) et en dernier l'extrait méthanolique avec une teneur très faible ( $1,35 \pm 0,05$  mg EAG/g MS).

La teneur en polyphénols, que nous avons obtenus dans nos extraits est très basse à celle de Lagha-benamrouche *et* Madani, (2013)  $25,60 \pm 0,23$  mg EAG/g MS de Thomson Navel et de Molan *et al.*, (2016) extrait éthanolique ( $25,90 \pm 1,70$  mg EAG/g MS) et pour les extraits aqueux ( $15,10 \pm 1,70$  mg EAG/g) pour l'écorce de *C.sinensis* et aussi à celle de Ousmer *et* Tahri., (2017) extrait aqueux  $36,97 \pm 0,14$  mg EAG/g ,extrait éthanolique  $26,77 \pm 0,02$  mg EAG/g pour *C.Sinensis*.

La différence de teneurs en polyphénols totaux est due à la complication de l'extraction des polyphénols. Ces derniers sont susceptibles de subir une dégradation, une oxydation, ou une hydrolyse. Aussi, d'autres paramètres peuvent affecter la quantification de ces polyphénols telle 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).

### 3. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de différents extraits (méthanolique, butanolique, d'acétate d'éthyle et de l'hexane) est exprimée en milligrammes équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS), la teneur est estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un standard de référence « la catéchine » à des concentrations variantes de 0 à 50 µg/ml (**figure11**).

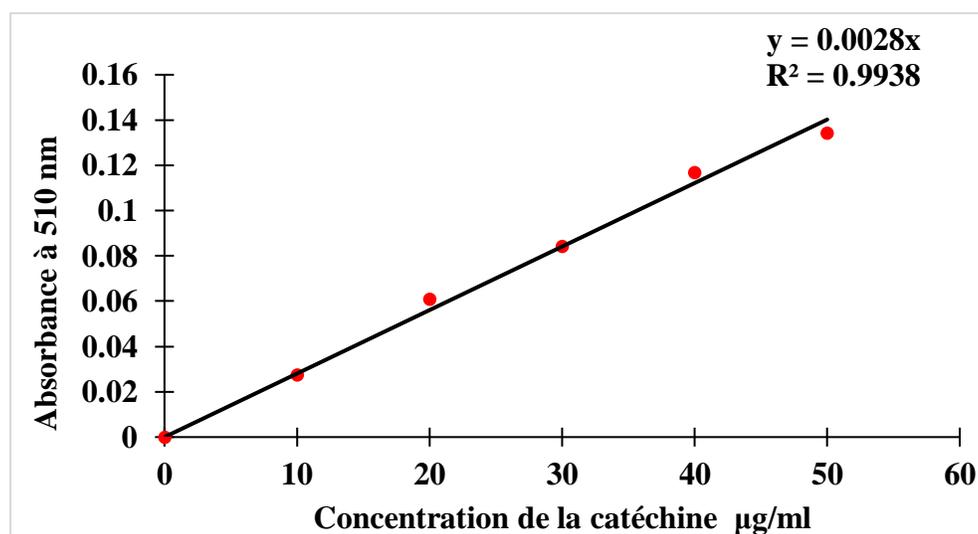
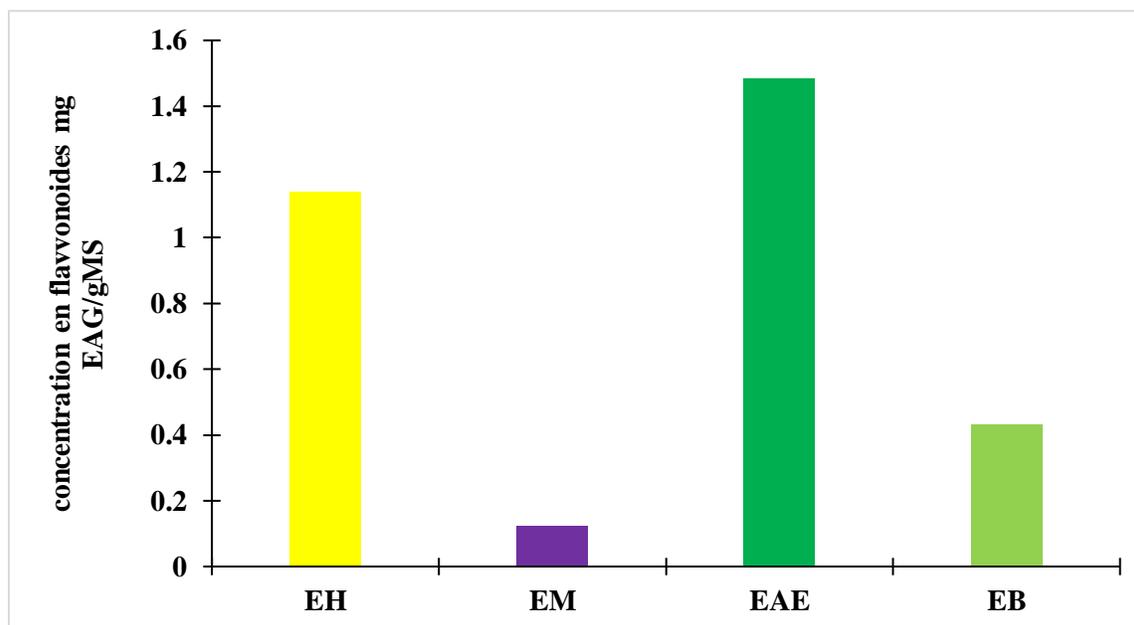


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.



**EH** : extrait hexanique ; **EM** : extrait méthanolique ; **EAE** : extrait d'acétate éthyle ; **EB** : extrait butanolique.

Figure 12 : Teneurs en flavonoïdes pour l'écorce de *Citrus Sinensis* Thomson Navel.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait d'acétate d'éthyle d'écorce de *Citrus Sinensis* ( $1,48 \pm 0,01$  mg EC/g MS) est plus élevée que celle de l'extrait hexanique ( $1,13 \pm 0,04$  mg EC/g MS) par contre les extraits butanolique et méthanolique donnent des teneurs faibles en flavonoïdes qui sont de ( $0,43 \pm 0,01$  mg EC/g MS) et ( $0,12 \pm 0,0064$  mg EC/g MS) respectivement (**figure 12**).

Le résultat obtenu dans l'extrait d'acétate d'éthyle  $1,48 \pm 0,01$  mg EC/g MS est un peu élevé à celui de Lagha-benamrouche *et* Madani, **2013**  $1,28 \pm 0,03$  mg EQ/g MS de Thomson Navel.

La teneur en flavonoïdes obtenus dans les extraits (d'acétate éthyle, butanolique et d'hexane) est supérieure au résultat de Singh *et* Immanuel (**2014**) qui ont trouvé une teneur de 0,3 mg EQ/g MS. En comparaison avec d'autres espèces du genre *Citrus aurantium*, on a obtenu dans les extraits (d'acétate éthyle, hexanique et butanolique) un résultat supérieur à celui de Dorcas *et al.*, **2016**, qui ont obtenu une teneur de 0,32 mg EQ/g MS.

Selon Al-anbari *et* Hasan (**2015**), la différence des teneurs obtenus 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.

#### **4. Analyse de l'activité antioxydante**

L'activité antioxydante est mesurée par une large gamme de dosages spectrophotométriques. La plupart des analyses antioxydantes utilisent le même principe :

- la génération ou le piégeage d'un composé radicalaire synthétique coloré ou d'un composé actif redox.
- la capacité d'un extrait biologique à réduire (empêche l'oxydation) du radical.

Les tests qu'on a choisis sont basés sur la réaction de transfert d'électrons unique, apparue par un changement de couleur quand l'oxydant est réduit tels que (DPPH et FRAP).

##### **4.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)**

C'est un radical libre stable de couleur violette foncée qui s'éclaircit en présence d'un composé antioxydant. Le pouvoir ou l'efficacité antioxydante d'un composé est mesuré par sa capacité à décolorer le DPPH en jaune. Ce pouvoir est proportionnel à l'intensité de la décoloration.

Après la lecture à 517 nm, on a exprimé les DO obtenus en pourcentage d'inhibition %. Nous avons tracé à partir de ces pourcentages des courbes en fonction de différentes concentrations pour l'antioxydant standard et nos extraits.

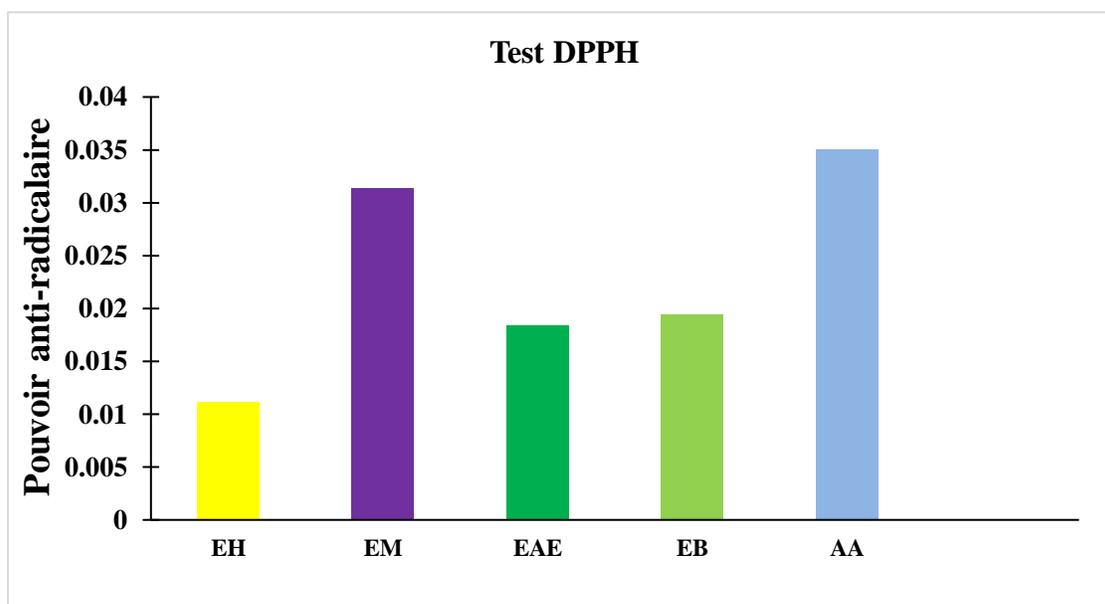
Chaque courbe, nous donne une équation de régression linéaires de type  $Y=ax+b$ . Ces équations nous ont permis de calculer l'IC<sub>50</sub> pour chaque extrait et le standard. La valeur d'IC<sub>50</sub> a été obtenue comme précédemment décrit à partir de laquelle on a calculé l'activité anti-radicalaire (1/IC<sub>50</sub>), donc un faible IC<sub>50</sub> signifie une haute activité anti-radicalaire (**Fidrianny *et al.*, 2016**).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait hexanique, d'acétate éthyle, butanolique et méthanolique donnent des valeurs d'IC<sub>50</sub> égale à (90,06 ; 54,45 ; 51,57 ; 31,86 µg/ml), respectivement. Ces valeurs sont supérieures de celle de l'acide ascorbique (28,562 µg/ml).

D'après ces résultats (**figure 13**) l'extrait méthanolique à une forte activité anti-radicalaire relativement égale à celle de l'acide ascorbique (standard). Contrairement, les autres extraits acétate d'éthyle ; butanolique et hexanique montrent des valeurs inférieures de celle du standard.

Notre extrait d'écorce d'orange *Citrus Sinensis* de la variété Thomson Navel présente une activité anti-radicalaire supérieure de celle trouvée par Ousmer *et Tahri* (2017) et par Syakirah-Zulkifli *et al.*, (2012) avec un IC<sub>50</sub>=102,57 µg/ml et 564 µg/ml sur la même variété, respectivement.

On conclut que l'extrait méthanolique a la meilleure activité anti-radicalaire que les autres extraits. Cela est confirmé par Mezouar, (2013).

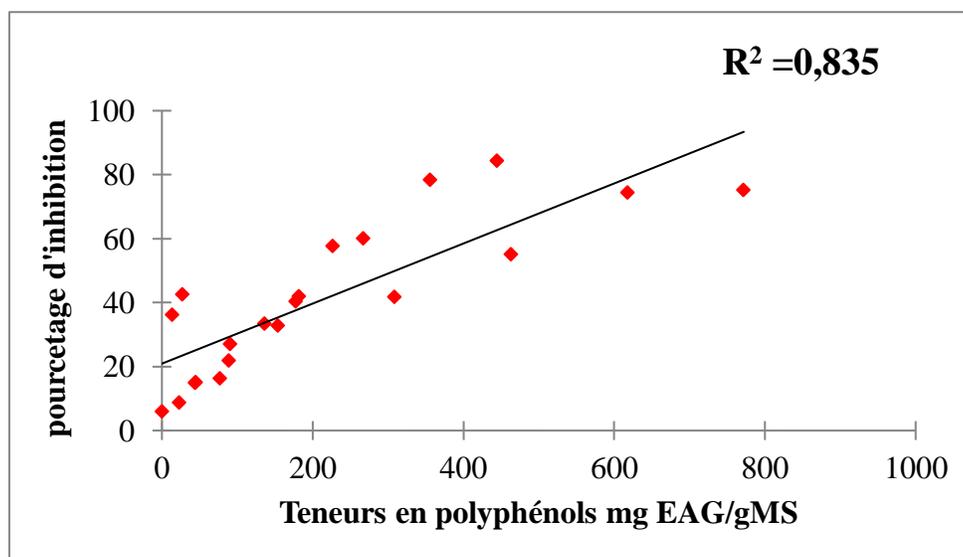


**EH** : extrait hexanique ; **EM** : extrait méthanolique ; **EAE** : extrait d'acétate éthyle ; **EB** : extrait butanolique ; **AA** : acide ascorbique.

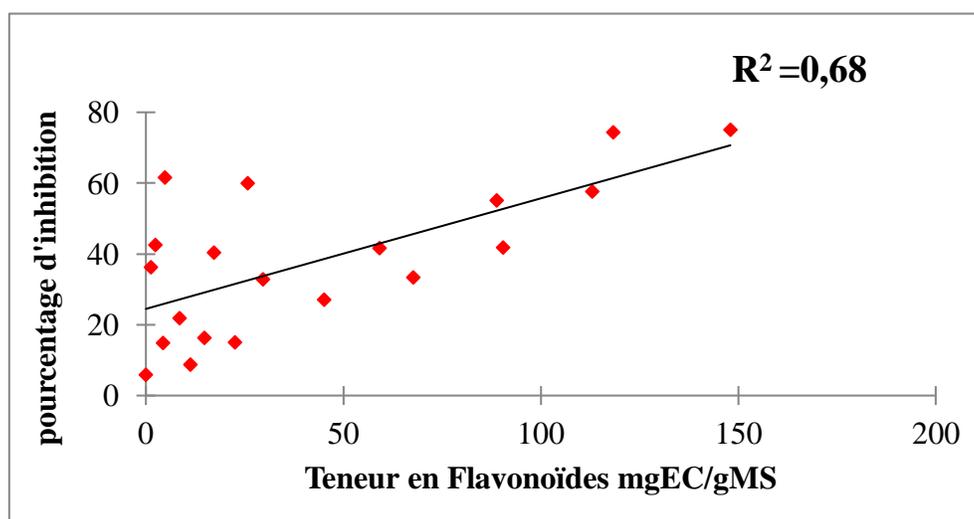
**Figure 13** : Pouvoir anti-radicalaire des extraits de l'écorce de *Citrus sinensis*.

#### 4.2. Corrélation entre la teneur en polyphénols, flavonoïdes et l'activité antioxydante :

Nos résultats montrent la présence d'une corrélation hautement significative entre l'activité de piégeage de radical DPPH et la teneur en polyphénols totaux d'écorces avec un coefficient de corrélation de Pearson égale à 0,835 (**figure14**) et montrent aussi une faible corrélation entre l'activité de piégeage et la teneur en flavonoïdes ( $R^2 = 0,680$ ) (**figure15**), qui est en accord avec les travaux de Pichaiyongvongdee *et al.* (2014).



**Figure 14** : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante.

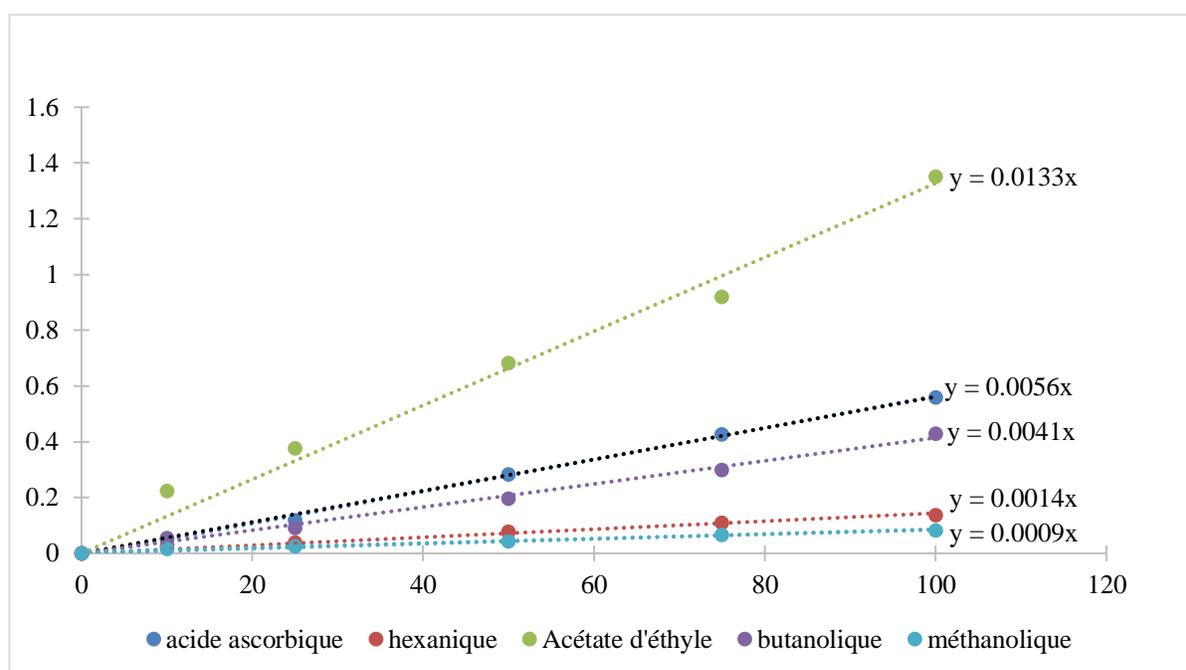


**Figure 15** : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante.

### 4.3. Test FRAP

L'activité antioxydante de nos échantillons a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette méthode est un essai rapide et reproductible. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$ / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Donc,  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung et al., 2002**).

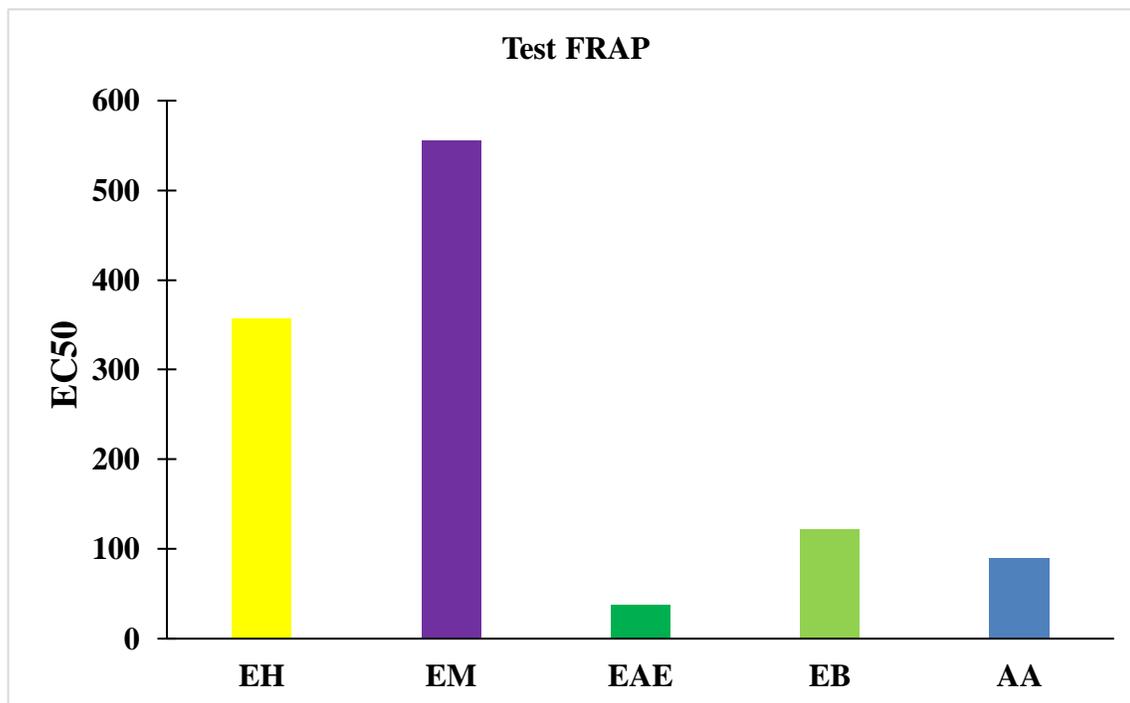
Après la lecture des DO par spectrophotométrie à 700 nm, des courbes de régressions ont été réalisées à différentes concentrations pour le standard et les différents extraits (**Figure 16**). A partir des équations de chaque courbe on a calculé la valeur  $\text{EC}_{50}$ .



**Figure 16 :** Pouvoir de réduction du fer en fonction des différentes concentrations des extraits de l'écorce de *Citrus sinensis* et du standard.

Selon la **figure 17**, les résultats obtenus montrent que l'extrait hexanique, méthanolique, d'acétate éthyle et butanolique ont donnés des valeurs d' $\text{EC}_{50}$  égale à (357,14 ; 555,55 ; 37,59 ; 121,95  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivement. L'acide ascorbique a donné une valeur d' $\text{EC}_{50}$  égale à 89,28  $\mu\text{g/ml}$ .

D'après ces résultats, on a remarqué que l'extrait hexanique, méthanolique et butanolique ont une activité antioxydante supérieurs à celle de l'acide ascorbique, par contre l'extrait d'acétate d'éthyle représente une faible activité antioxydante par rapport au standard et aux autres extraits.



**EH** : extrait hexanique ; **EM** : extrait méthanolique ; **EAE** : extrait d'acétate éthyle ; **EB** : extrait butanolique ; **AA** : acide ascorbique.

**Figure 17:** Pouvoir antioxydant des extraits de l'écorce de *Citrus sinensis*.

Nos extraits méthanolique et hexanique ont une activité antioxydante supérieure à celle de Ousmer *et* Tahri ,(2017) avec un  $EC_{50}$  de 249,76 et 354,3  $\mu\text{g/ml}$  pour différent extraits.

## 5. Chromatographie sur couche mince

Après l'extraction effectuée par divers solvants, nous avons fait une analyse phyto-chimique semi-quantitative par chromatographie sur couche mince (CCM). Elle a permis de :

- Faire un criblage chimique de composés contenus dans nos échantillons.
- Connaître leur abondance.
- Evaluer le pouvoir anti-radicalaire après la pulvérisation de la plaque par le radical de DPPH.

**Tableau 9** : Résultat CCM : Résultats CCM : gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :1,5 :09), *citrus sinensis*.

| N° de spot | EME              | Rf    | EB               | Rf    | EAE              | Rf    | EH               | Rf    | AG           | C            | Q          |
|------------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|--------------|--------------|------------|
| 01         | Bleu ***         | 0,041 | Violet clair *** | 0,041 | Bleu             | 0,041 | Violet           | 0,641 | Violet 0,823 | Violet 0,788 | Rose 0,882 |
| 02         | Violet *         | 0,105 | Bleu **          | 0,111 | Violet clair **  | 0,111 | Blanc            | 0,741 |              |              |            |
| 03         | Bleu *           | 0,152 | Bleu **          | 0,147 | Bleu **          | 0,158 | Violet clair *** | 0,8   |              |              |            |
| 04         | Violet *         | 0,205 | Violet **        | 0,194 | Violet           | 0,205 | Bleu foncé       | 0,864 |              |              |            |
| 05         | Blanc            | 0,723 | Violet           | 0,205 | Bleu             | 0,341 | Rose ***         | 0,905 |              |              |            |
| 06         | Violet clair *** | 0,788 | Violet           | 0,564 | Violet           | 0,441 |                  |       |              |              |            |
| 07         | Violet foncé     | 0,882 | Blanc            | 0,747 | Violet clair     | 0,564 |                  |       |              |              |            |
| 08         | Après DPPH       | 0,911 | Violet clair     | 0,8   | Violet Clair     | 0,623 |                  |       |              |              |            |
| 09         |                  |       |                  |       | Blanc ***        | 0,723 |                  |       |              |              |            |
| 10         |                  |       |                  |       | Violet Clair *** | 0,788 |                  |       |              |              |            |
| 11         |                  |       |                  |       | Violet ***       | 0,870 |                  |       |              |              |            |

**Rf** : rapport frontal ; **C** : catéchine ; **Q** : quercétine ; **AG** : acide gallique ; **EME** : extrait méthanolique ; **EB** : extrait butanolique ; **EAE** : extrait acétate éthyle ; **EH** : extrait hexanique.

\* : activité antioxydante. (\***Faible** \*\* **moyenne** \*\*\***forte**).

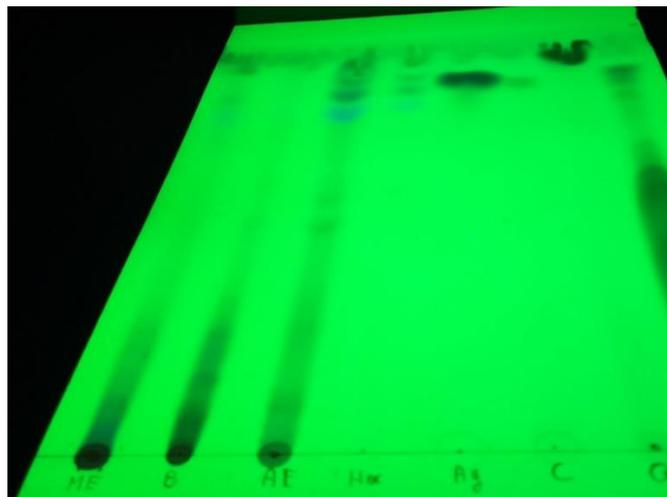
L'analyse chromatographique de nos quatre différents extraits a donné des résultats dissemblables par rapport au nombre de spots et aux couleurs appariées (**figure 18**).

L'extrait d'acétate d'éthyle a révélé le plus grand nombre de spots (11 spots par fraction). Ils sont colorés en violet, bleu et blanc avec un Rf de 0,041 à 0,870.

On a noté que les deux extraits méthanoliques et butanoliques ont marqué le même nombre de spots (8 spots par fraction) avec les mêmes couleurs violet foncé et clair, bleu et blanc, et leurs Rf ont donné des valeurs de 0,041 à 0,911 pour l'échantillon méthanolique et de 0,041 à 0,8

pour l'échantillon butanolique, sachant que le 8ème spot de l'extrait méthanolique était apparu qu'après pulvérisation du DPPH. L'extrait hexanique a révélé que 5spots avec des couleurs allant du bleu, blanc, rose au violet et les valeurs de Rf comprise entre 0,641 à 0,905.

On a remarqué que le Rf des premiers spots de chaque extrait (méthanolique, butanolique et d'acétate d'éthyle) a donné la même valeur Rf = 0,041.



**ME** : extrait méthanolique ; **B** : extrait butanolique ; **AE** : extrait d'acétate éthyle ; **Hx** : extrait hexanique ; **AG** : acide gallique ; **C** : catéchine ; **Q** : quercétine.

**Figure 18:** Photographie de la chromatographie sur couche mince de différents extraits de l'écorce de *citrus* Thomson Navel à 254nm.

On a comparé les Rf de nos résultats de les 4 extraits (méthanolique , butanolique ,d'acétate éthyle et hexanique) avec les Rf des standards utilisés dans ce travail (acide gallique, quercétine et catéchine) qui donnent des couleurs violet ,violet, rose et des Rf égale 0,823 ; 0.882 et 0,788 respectivement et on a remarqué que la catéchine a le même Rf = 0 ,788 et la même couleur violette comme celui de spot n°10 de l'extrait d'acétate éthyle et de spot n°6 de l'extrait méthanolique. On a observé, qu'il existe une similarité dans le spot n°7 de l'extrait méthanolique et le spot de standard quercétine (Rf = 0,882).

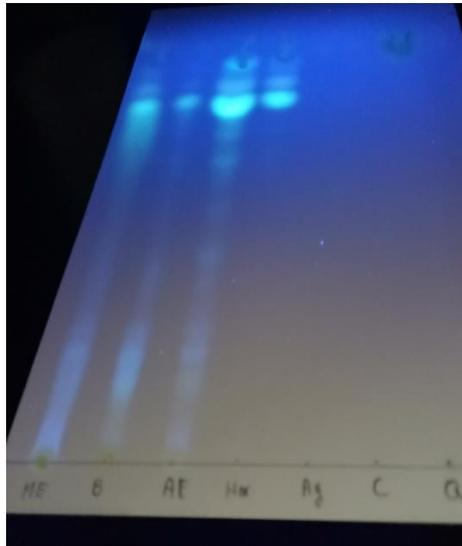
On a comparé nos résultats avec les observations de **Markham (1982)**, qui nous indiquent la classe de chaque molécule présente selon chaque fluorescence (couleur) apparié dans notre analyse. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 10** : Identification des composés phénolique.

| Couleurs      | Composés                         | Echantillons |
|---------------|----------------------------------|--------------|
| <b>Violet</b> | Flavones et flavanols glycosides | Méthanolique |
|               |                                  | Butanolique  |
|               |                                  | Acétate      |
|               |                                  | d'éthyle     |
|               |                                  | Héxanique    |
| <b>Bleu</b>   | Les acides phénoliques           | Méthanolique |
|               |                                  | Butanolique  |
|               |                                  | Acétate      |
|               |                                  | d'éthyle     |
|               |                                  | Héxanique    |
| <b>Rose</b>   | Anthocyanine 3-5 di glycosides   | Héxanique    |
| <b>Blanc</b>  | Des isoflavones                  | Méthanolique |
|               |                                  | Butanolique  |
|               |                                  | Acétate      |
|               |                                  | d'éthyle     |
|               |                                  | Héxanique    |

D'après le **tableau 10**, la plupart de nos extraits contiennent différentes classes d'acides phénoliques et des flavonoïdes à savoir ; les flavones, flavonols glycosides ainsi que des isoflavones. Des études menées par (**Ma et al, 2009** ; **Abd El-aal et Halaweish, 2010** ; **Salas et al., 2011**) ont pu mettre en évidence la présence de ses différents composés, ce qui confirme nos résultats.

Après la pulvérisation de la plaque chromatographique par DPPH (**figure19**), une couleur jaune a apparue dans quelques spots. Cette couleur indique la présence des antioxydants dans nos échantillons utilisés. L'extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle nous ont donné le plus gros nombre de composés bioactifs (5spots/fraction) avec différents niveaux de capacité antioxydante (faible, moyenne, forte). On a observé 4 spots de composés antioxydants dans l'analyse d'extrait butanolique (trois donnent une moyenne activité antioxydante et un seul spot donnant une forte activité). Pour l'extrait hexanique, on a remarqué seulement la présence de deux spots bioactifs avec une forte capacité antioxydante.



**ME** : extrait méthanolique ; **B** : extrait butanolique ; **AE** : extrait d'acétate éthyle ; **Hx** : extrait hexanique ; **AG** : acide gallique ; **C** : catéchine ; **Q** : quercétine.

**Figure 19** : Révélation par DPPH de la chromatographie sur couche mince de différents extraits de l'écorce de citrus Thomson Navel à 365nm.

D'après les résultats, on a observé que la classe des flavones et flavanols glycosides présente la meilleure activité antioxydante que les autres composés phénoliques détectés, et cela a été mentionné par Panche *et al* ,(2016) ce qui confirme nos résultats.

## *Conclusion*

L'utilisation de l'écorce après transformation industrielle de l'orange, permet de réduire les dangers écologiques et économiques causés sur l'environnement.

Le présent travail a pour objectif, l'étude quantitative des composés phénoliques des écorces d'orange de *Citrus sinensis* de variété Thomson Navel, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante sur différents extraits.

Dans un premier temps, les rendements d'extraction obtenus sont variables selon le solvant, l'extrait méthanolique a montré le meilleur rendement et ensuite l'extrait butanolique, tandis que les extraits hexanique et acétate d'éthyle ont présentés des rendements plus faibles.

L'analyse quantitative des extraits représentés par le dosage de polyphénols révélant une meilleure concentration dans l'extrait d'acétate éthyle estimés par  $7,72 \pm 0,02$  mg EAG/g et  $4,45 \pm 0,005$  mg EAG/g pour l'extrait butanolique par contre l'extrait hexanique et méthanolique représentent des taux moins importants.

L'analyse quantitative des flavonoïdes nous révèle une concentration de  $1,48 \pm 0,01$  mg EC/g MS pour l'extrait d'acétate éthyle et de  $1,13 \pm 0,04$  mg EC/g MS pour l'extrait hexanique, tandis que l'extrait butanolique et méthanolique nous révèle une concentration très faible de  $0,43 \pm 0,04$  mg EC/g MS et  $0,12 \pm 0,01$  mg EC/g MS, respectivement.

L'activité antioxydante des écorces d'orange de *Citrus sinensis* a été évaluée par deux techniques, le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer par le teste FRAP.

L'extrait méthanolique a montré une activité anti-radicalaire supérieure à celle des autres extraits avec une  $IC_{50}$  de  $31,86 \mu\text{g/ml}$ . Aussi, l'extrait méthanolique a montré une activité antioxydante très forte avec un  $EC_{50}$  de  $555,55 \mu\text{g/ml}$ , sachant que l'activité réductrice de l'extrait hexanique, d'acétate éthyle et butanolique a donné des valeurs d' $EC_{50}$  égale à  $357,14$  ;  $37,59$  ;  $121,95 \mu\text{g/ml}$ , respectivement.

La présence d'une corrélation hautement significative entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante dans les différents extraits suggère que cette activité de l'écorce est due à la présence de ces composés.

L'analyse chromatographique sur couche mince nous révèle la présence de plusieurs spots. Chaque extrait représente un nombre de spot différent à l'autre, avec une fluorescence violette représentant les classes des flavones et flavanols glycosides, une fluorescence bleue représentant les acides phénoliques et une fluorescence blanche représentant les isoflavones, dont l'une des taches de fluorescence rose pourrait représenter anthocyanine 3-5 di glycosides. Après traitement de la plaque chromatographique par du DPPH, l'extrait méthanolique et d'acétate éthyle montrent

une activité antioxydantes meilleur à celle de l'extrait hexanique et butanolique et à différents niveaux de capacité antioxydantes (faible, moyenne, forte) et que la classe des flavones et flavanols glycoside possède la meilleure activité antioxydante.

Vue les résultats obtenues, l'EO reste une source de métabolites secondaires bioactifs très prometteur pour son utilisation dans différents domaines industriels.

En fin, ces résultats préliminaires sont juste une brève étape dans la recherche sur les molécules bioactives d'écorce d'orange et leur activité antioxydante.

Sur la base de ces résultats, de nouvelles études approfondies sur l'écorce sont nécessaires, notamment en termes de perspectives pour :

- L'identification des métabolites secondaires de cet écorce par des techniques plus performante,
- L'évaluation de l'activité antioxydante par d'autres méthodes complémentaires,
- L'application industrielle des molécules naturelles extraites de l'écorce dans de nombreux secteurs comme l'agroalimentaire, en pharmaceutique, en cosmétique et en parfumerie.

## *Références bibliographiques*

- Abd El-aal, H., & Halaweish, F. (2010). Food preservative activity of phenolic compounds in orange peel extracts (*Citrus sinensis* L.). *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie*, 53(15), 233-240.
- Ademosun, A. O., Oboh, G., Olasehinde, T. A., & Adeoyo, O. O. (2018). From folk medicine to functional food: a *review* on the bioactive components and pharmacological properties of citrus peels. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18(1), 9-20.
- Ajila, C., Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Godbout, S., & Valéro, J. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.
- 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.
- Al-Anbari, A. K. H., & Hasan, M. A. (2015). Antioxidant activity in some citrus leaves and seeds ethanolic extracts. *AABES London UK*, 93-97.
- Albuquerque, A., Silva, P., Cavalcante, A., & Sampaio, F. (2013). Polyphenols as a source of antimicrobial agents against human pathogens. *Plant Extracts*, 275, 293.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M. R., & Rome, S. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*, 203(1), 27-36.
- Benayad, N. (2013). Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes marocaines et activité anticancéreuse.
- Bénédicte et Michel, B. (2011). Agrumes comment les choisir ET cultiver facilement. Les éditions eugen ulmer, 8 rue Blanche, Paris, N° d'édition: 440-01.p.127.
- Benhammou, N., Bekkara, F. A., & Panovska, T. K. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. AND *Pistacia atlantica* desf. *Advances in Food Sciences*, 29(3), 155-161.
- Bennici, A., & Tani, C. (2004). Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(6), 464-475.
- Bicu, I., & Mustata, F. (2011). Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource technology*, 102(21), 10013-10019.
- Boizot, N., & Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.

- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., & 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.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., & Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie Pathologique. Aspects Moléculaires et Cellulaires*, 59-81.
- Bourgaud, F. (2013). Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filière; exemple de l'apport des sciences cognitives à la production/valorisation des métabolites secondaires d'intérêt.
- Bourkhiss, M., Hnach, M., Lakhli, T., Boughdad, A., Farah, A., & Satrani, B. (2011). Effect of age and vegetative stage on essential oil content and chemical composition of *Thuya articulata*. *Les technologies de laboratoire*, 6(23), 64-68.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igić, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901.
- Camilleri, J.P. ; Snoussi, A. (2012): *L'éternelle jeunesse : L'art de bien vieillir*, Ed, Le Harmattan, p137.
- Causse, C. (2005). *Les secrets de santé des antioxydants: C'est naturel, c'est ma santé*. Alpen éditions sam, 30
- Chau, C.-F., Huang, Y.-L., & Lin, C.-Y. (2004). Investigation of the cholesterol-lowering action of insoluble fibre derived from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. *Food chemistry*, 87(3), 361-366.
- Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T. (2002) Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2454–2458.
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- Curtay, J., & Robin, J. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie INFOS*, 1-5.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Udo, A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.

- Delattre, J., Beaudoux, J.-L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques).
- Derbel, S., & Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 3(1), 28-34.
- Diallo, A. (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae). PhD. of the University Bamako, Mali, 38-47.
- Djabou, N. (2006). *Sambucus Nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord-africaine. Mémoire de Magistère, Université Abou Bekr Belkaid, Algérie.
- Dorcas, F., John, S., & Priyadarshini, S. (2016). Phytochemical activity of Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel powder. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(4), 1711-1719.
- El-haci, I. A., & Atik Bekkara, F. (2016). Estimation du pouvoir antioxydant des différents extraits organiques d'*Ecballium elaterium* (L.). *Revue des Substances Naturelles et Innovation Thérapeutique*, 2(1), 1-12.
- Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., & Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68(7), 939-953.
- Etebu, E., & Nwauzoma, A. (2014). A review on sweet orange (*Citrus sinensis* L Osbeck): health, diseases and management. *American Journal of Research Communication*, 2(2), 33-70.
- Fabri, R., Nogueira, M., Braga, F., Coimbra, E., & Scio, E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100(1), 428-433.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- FAO: Food and Agriculture Organization. Statistical Databasesm (2020).
- Fernández-Lóp, J., Fernández-Ginés, J., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 176-185. ez
- Fidrianny, I., Puspitaningrum, D. A., & Ruslan, K. (2016). Antioxidant capacities of various grains extracts of three kinds of rice grown in Central Java-Indonesia. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 8(6), 997-1002.
- Gee, J., & Johnson, I. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current medicinal chemistry*, 8(11), 1245-1255.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.

Ghestem A, Seguin E, Paris M, Orecchioni A. M. (2001). *Le préparateur en pharmacie*. Ed. Médicales Internationales. Paris. 108-119.

Goldhamer, D.A.; Intrigliolo, D.S.; Castel, J.R.; Fereres, E. (2012) :Citrus. In *Crop Yield response to Water: FAO Irrigation and Drainage Paper 66*, 1st ed.; Pasquale Steduto, P., Theodore, C., Hsiao, T.C., Elias Fereres, E., Dirk Raes, D., Eds.; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2012; Volume 49, pp. 300–315.

Goudeau, D., Uratsu, S. L., Inoue, K., Goes daSilva, F., Leslie, A., Cook, D., Reagan, R. L., & Dandekar, A. M. (2008). Tuning the orchestra: Selective gene regulation and orange fruit quality. *Plant Science*, 174(3), 310-320.

Grigoraş, C. G. (2012). *Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).

Hagerman A.E. (2002). *Tannin Handbook*. 2nd Edition. Miami University. Oxford. USA.116p.

Hajiani M., Golestani A., Sharifabrizi A., Rastegar R., Payabvash S., Salmasi A.H., Dehpour A.R. and Pasalar P. (2008). Dose-dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. *Redox Rep.*, 13: 60 – 66.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., & Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-638.

Han, S.T.(2008) : *Medicinal plants in the South Pacific*, 1st ed.;World Health Organization (WHO) Regional Publications, Western Pacific Series: Manila, Philippines; pp. 49–50.

Hawthorne, S. B., Grabanski, C. B., Martin, E., & Miller, D. J. (2000). Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of chromatography A*, 892(1-2), 421-433.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.

Hininger-Favier I. (2004). *Le stress oxydant*. Laboratoire du stress oxydant. Faculté de pharmacie. Grenoble.

Hou, H. S., Bonku, E. M., Zhai, R., Zeng, R., Hou, Y. L., Yang, Z. H., &Quan, C. (2019). Extraction of essential oil from Citrus reticulate Blanco peel and its antibacterial activity against Cutibacterium acnes (formerly Propionibacterium acnes). *Heliyon*, 5(12), e02947..

- Ignat I., Volf I., Popa V., (2011). A critical *review* of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4): 1821-1835.
- Kammoun Bejar, A., Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaou, N., Boudhrioua Mihoubi, N., (2011). Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. *Journal of Food Engineering*. 7, 5, 1-25.
- Kanoun, K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire magister, Université Aboubekr Belkaid–Tlemcen, 2, 95.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food chemistry*, 111(2), 400-407.
- Keerthi, M., Lakshmi Prasanna, J., Santhosh Aruna, M., & Rama Rao, N. (2014). *Review* on Polyphenols as nature gift. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. *Review* article, 3(4), 445-455.
- Kuljarachanan, T., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food chemistry*, 113(4), 944-949.
- Kumar H., Choudhary N., Varsha. Kumar N, Suma N. & Seth R. (2014). Phenolic compounds and their health benefits: A *review*. *Journal of Food Research and Technology*. 2(2): 46-59.
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.
- Lillo, C., Lea, U. S., & Ruoff, P. (2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, cell & environment*, 31(5), 587-601.
- Lohrasbi, M., Pourbafrani, M., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2010). Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource technology*, 101(19), 7382-7388.
- Lu, D., Cao, Q., Li, X., Cao, X., Luo, F., & Shao, W. (2009). Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, 95(1-2), 145-152.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*(9), 35.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Université de LIMOGES.
- Markham, K.R. (1982) *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- Karoui, I.J. and Marzouk, B. (2013) Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *Biomedical Research International*
- Ma Y. Q., Chen J. C., Liu D. H., Ye X. Q., (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1): 57-62.
- Mehl, F., Marti, G., Boccard, J., Debrus, B., Merle, P., Delort, E., Baroux, L., Raymo, V., Velazco, M. I., & Sommer, H. (2014). Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach. *Food chemistry*, 143, 325-335.
- Menat, É. (2006). Les polyphénols de thé, du vin et du cacao. *Phytothérapie*, 4(1), hs40-hs45.
- Mezouar, D. (2013) .Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris* ( memoire de magister, Université de tlemcen)
- M'Hiri, N. (2015). Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques Université Louis Pasteur (Strasbourg)(1971-2008)].
- Milind, P., & Dev, C. (2012). Orange: range of benefits. *International research journal of pharmacy*, 3(7), 59-63.
- Morand, C., & 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. *Carrefours de l'Innovation Agronomique CIAG: Phytomicronutriments de la plante au consommateur*.(42) 2014;

Carrefours de l'Innovation Agronomique CIAG: Phytomicronutriments de la plante au consommateur, Avignon, FRA, 2014-12-16-2014-12-16, 11-26.

Mraihi, F., Hidalgo, M., de Pascual-Teresa, S., Trabelsi-Ayadi, M., & Cherif, J.-K. (2015). Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(4), 570-578.

Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Université Paul Verlaine-Metz, 238.

Murthy, H. N., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 1-16.

Mutahar S, S., Mutlag M, A. O., & Najeed S, A. Z. (2012). Antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum L.*) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*.

Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Impact of abiotic elicitors on in vitro production of plant secondary metabolites: a review. *Journal of advanced Research in Biotechnology*, 1(2), 1-7.

Nakagawa, Y. (2004). Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. In *Mitochondrial Pathogenesis* (pp. 177-184). Springer.

Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).

Nicolosi, E. (2007). Origin and taxonomy. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, 19-43.

Oulderyou 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.

Ousmer, L., & Tahri, S. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* Université Mouloud Mammeri].

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.

Parle, M., & Chaturvedi, D. (2012). Orange: Range of benefits. *International research journal of pharmacy*, 3(7), 59-63.

Pastre, J. (2005). Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques

- Pena, L., Cervera, M., Fagoaga, C., Romero, J., Juárez, J., Pina, J., & Navarro, L. (2007). Citrus. V: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Pua EC, Davey MR. In: Berlin, Heidelberg, Springer.
- Pichaiyongvongdee, S., Rattanapun, B., & Haruenkit, R. (2014). Total polyphenol content and antioxidant properties in different tissues of seven pomelo (*Citrus grandis* (L.) osbeck) cultivars. *Agriculture and Natural Resources*, 48(6), 989-996.
- Poortmans, J. R., & Boisseau, N. (2003). *Biochimie des activités physiques*. De Boeck Supérieur.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
- Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1), 75-87.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. 2013. *Biologie végétale*.
- Renard, C., Caris-Veyrat, C., Dufour, C., & Le Bourvellec-Samour, C. (2014). Le devenir des polyphénols et caroténoïdes dans les fruits et légumes traités thermiquement. *Innovations Agronomiques*, 42, 125-137.
- Reuben, S., Cseke, L. J., Bhinu, V., Narasimhan, K., Jeyakumar, M., Swarup, S., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., & Duke, J. (2006). *Molecular biology of plant natural products*. Natural Products from Plants, LJ Cseke, A. Kirakosyan, PB Kaufman, SL Warber, JA Duke, and HL Briellmann, eds (Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis), 165-202.
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., & Crozier, A. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of toxicology*, 88(10), 1803-1853.
- Rouaki, F., & Kanane, A. (2019). Modifications biochimiques et histologiques du foie de rat soumis a un régime contenant une huile oxydée et supplémenté en vitamine e. *agrobiologia*, 9(1), 1188-1199.
- Salas, M. P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., & Resnik, S. L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food chemistry*, 124(4), 1411-1415.
- Santo, M., Nunez, C. V., & 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. *Adv Biol Chem*, 3, 525-535.

- Scherer, R., Godoy, H.T. (2009). Antioxydant Activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, 112 : 654-658.
- Schijlen, E. G., De Vos, C. R., van Tunen, A. J., & Bovy, A. G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65(19), 2631-2648.
- Siddiqui, S. A., Pahmeyer, M. J., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2022). Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances. *Industrial Crops and Products*, 177, 114484.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Singh, S., & Immanuel, G. (2014). Extraction of antioxidants from fruit peels and its utilization in paneer. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(7), 1.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soares, A. F. (2005). Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes: adiponectine et prostaglandines Lyon, [INSA].
- Souchard, J. P., Arnal, J. F., & Rochette, L. (2002). Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire. *Techniques en biologie*, (23), 245-257.
- Teh, S. S., Bekhit, A. E. D., & Birch, J. (2014). Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: effect of solvents. *Antioxidants*, 3(1), 67-80.
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O. E. K., & Moulti-Mati, F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des sciences et technologie*, 2(2), 107-114.
- Tian, Q., Miller, E. G., Ahmad, H., Tang, L., & Patil, B. S. (2001). Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and cancer*, 40(2), 180-184.
- Verdan, A. M., Wang, H. C., García, C. R., Henry, W. P., & Brumaghim, J. L. (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(10), 1314-1322.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2008). Isolation and identification of phenolic compounds. In *Phenolic compound biochemistry* (pp. 151-196). Springer.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1677-1694.

Wang, S.-Y., Wu, J.-H., Shyur, L.-F., Kuo, Y.-H., & Chang, S.-T. (2002). Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata.

Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12-23.

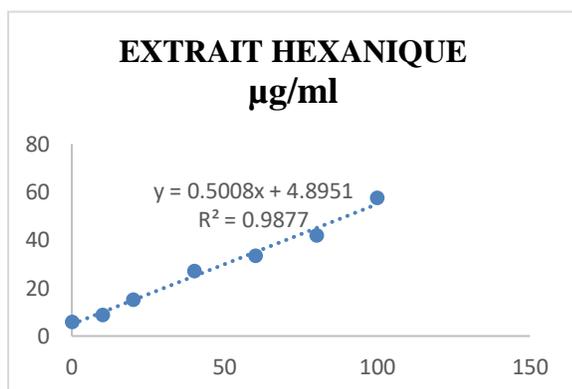
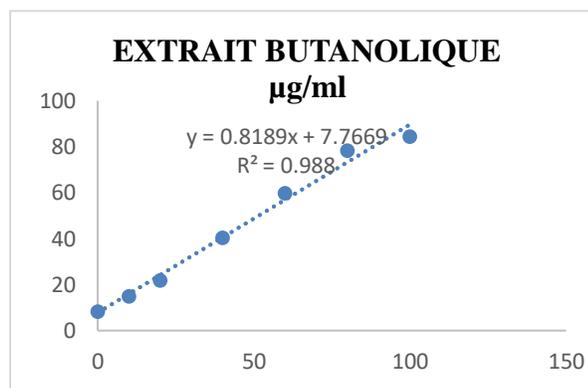
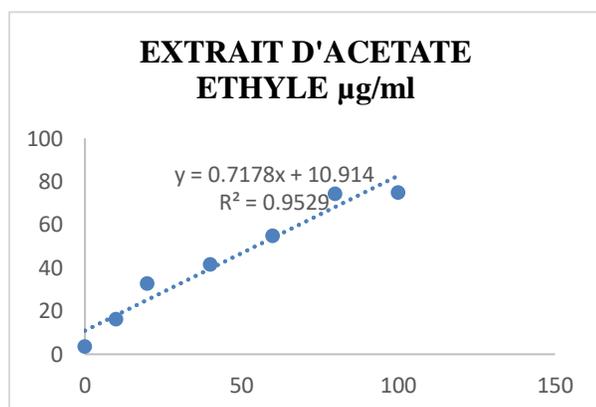
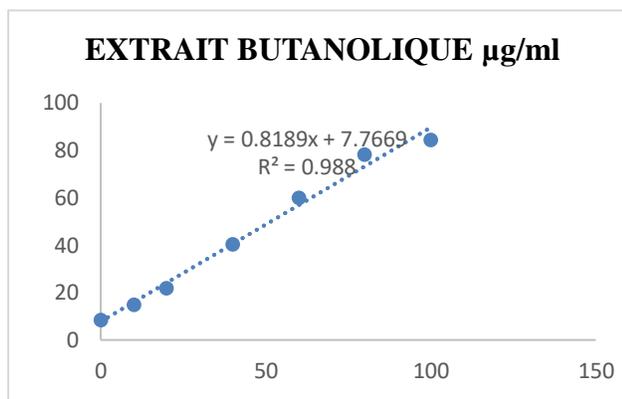
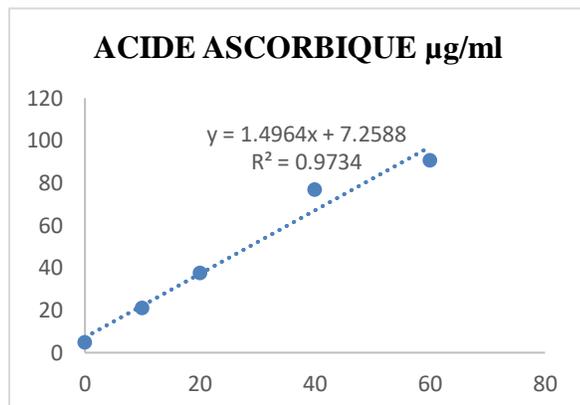
Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., & Hsu, H.-W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food chemistry*, 106(1), 277-284.

Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(Suppl 3), 675-682.

Zahir, A. (2018). Nutrition et vieillissement cérébral

Zulkifli, K. S., Abdullah, N., Abdullah, A., Aziman, N., & Kamarudin, W. S. S. W. (2012). Bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of selected fruit peels. In *International Conference on Environment, Chemistry and Biology* (Vol. 49, No. 14, pp. 66-70).

# *Annexes*



## الملخص:

يتم استهلاك البرتقال على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم. بعد تحولها إلى صناعة، تعتبر جلودها نفايات تلوث البيئة وتتطلب تكلفة عالية لدعمها. الهدف من عملنا هو تعزيز القيمة الغذائية لبقايا لحاء البرتقال (EO) للحمضيات من مجموعة Thomson Navel وتقييم القوة المضادة للأكسدة لنواتجه الأيضية. تم استخراج بمذيبات مختلفة (الهكسان والميثانول وأستات الإيثيل والبيوتانول). تم تحديد إجمالي البوليفينول والفلافونويد وتقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة اختبار الجذور الحرة واختبار تقليل الحديد (FRAP) وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) على مستخلصات EO المختلفة. وتبين النتائج التي تم الحصول عليها من التحليل الكمي لمجموع البوليفينول لمختلف المستخلصات السداسية والميثانول وأستات الإيثيل والبيوتانوليك من EO، المحتوى قدر ب  $2,27 \pm 0,01$ ;  $1,35 \pm 0,005$ ;  $7,72 \pm 0,02$  و  $4,45 \pm 0,005$  ملغ من EAG/غم من المادة الجافة، على التوالي. وبالتالي، فإن محتوى الفلافونويد  $0,43 \pm 0,01$ ;  $1,48 \pm 0,01$ ;  $0,12 \pm 0,006$ ;  $1,13 \pm 0,04$  ملغ EC/g المادة الجافة، على التوالي. قوة مضادات الأكسدة لمستخلص الميثانول هي الأفضل مقارنة بالمستخلصات الأخرى في اختبارات DPPH و FRAP. يشير CCM إلى وجود أحماض الفينوليك والعديد من فئات الفلافونويد وعلاج صفيحة CCM بواسطة DPPH أظهر أن فئة الفلافون وجليكوسيدات الفلافانول لديها أفضل نشاط مضاد للأكسدة. لديها أفضل نشاط مضاد للأكسدة. بناءً على النتائج التي تم الحصول عليها، يظل EO مصدرًا واعدًا للغاية لنواتج الأيض الثانوية النشطة بيولوجيًا للاستخدام في مختلف المجالات الصناعية.

**الكلمات المفتاحية:** *Citrus sinensis*، القشور، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

## Résumé

L'orange est un fruit largement consommé à l'échelle mondiale. Après sa transformation en industrie, ses pelures sont considérées comme un déchet qui pollue l'environnement et qui demande un coût élevé pour sa prise en charge.

L'objectif de notre travail est la valorisation en tant que source nutritionnelle de ce résidu qu'est l'écorce d'orange (EO) de *Citrus sinensis* de la variété Thomson Navel et l'évaluation du pouvoir antioxydant de ses métabolites secondaires.

L'extraction a été réalisée avec différents solvants (hexane, méthanol, acétate éthylique et n-butanol). Le dosage de polyphénols totaux, des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante par test de piégeage du radical libre DPPH et test de la réduction du fer (FRAP) ainsi que la chromatographie sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur les différents extraits de EO.

Les résultats obtenus d'analyse quantitative des polyphénols totaux des différents extraits hexanique, méthanolique, acétate éthylique et butanolique de EO, montrent une teneur de  $2,27 \pm 0,01$ ;  $1,35 \pm 0,005$ ;  $7,72 \pm 0,02$  et  $4,45 \pm 0,005$  mg EAG/g de matière sèche, respectivement. Ainsi, une teneur en flavonoïdes de  $1,13 \pm 0,04$ ;  $0,12 \pm 0,006$ ;  $1,48 \pm 0,01$ ;  $0,43 \pm 0,01$  mg EC/g de matière sèche, respectivement.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique est le meilleur par rapport aux autres extraits dans les tests de DPPH et de FRAP.

La CCM indique la présence des acides phénoliques et de nombreuses classes de flavonoïdes et le traitement de la plaque CCM par le DPPH a montré que la classe des flavones et flavanols glycosides présente la meilleure activité antioxydante.

Vue les résultats obtenues, l'EO reste une source de métabolites secondaires bioactifs très prometteur pour son utilisation dans différents domaines industriels.

**Mots clés :** *Citrus sinensis*, écorce, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, CCM.

## Abstract

Orange is widely consumed worldwide. After its transformation into industry, its skins are considered as a waste that pollutes the environment and that requires a high cost for it supported.

The objective of our work is to enhance the nutritional value of the orange peels (OP) residue of *Citrus sinensis* of the Thomson Navel variety and to evaluate the antioxidant power of its secondary metabolites.

The extraction was carried out with different solvents (hexane, methanol, ethyl acetate and n-butanol). Determination of total polyphenols, flavonoids, evaluation of antioxidant activity by DPPH free radical entrapment and iron reduction test (FRAP) and thin-layer chromatography (TLC) were carried out on the different OP extracts.

The results obtained from quantitative analysis of the total polyphenols of the various hexanic, methanolic, ethyl acetate and butanolic extracts of OP, show a content of  $2,27 \pm 0,01$ ;  $1,35 \pm 0,005$ ;  $7,72 \pm 0,02$  et  $4,45 \pm 0,005$  mg GAE/g dry matter, respectively. Thus, flavonoid content of  $1,13 \pm 0,04$ ;  $0,12 \pm 0,006$ ;  $1,48 \pm 0,01$ ;  $0,43 \pm 0,01$  mg CE/g dry matter, respectively.

The antioxidant power of the methanol extract was the best compared to the other extracts in the DPPH and FRAP tests.

The CCM indicates the presence of phenolic acids and many classes of flavonoids and the treatment of the CCM plate by DPPH has shown that the flavones and flavanols glycosides class has the best antioxidant activity.

Based on the results obtained, OP remains a very promising source of bioactive secondary metabolites for use in various industrial fields.

**Keywords:** *Citrus sinensis*, peels, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, TLC.