

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة ابوبكر بلقايد-تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعية والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

ELHOMRI Riheb

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Nutrition et Pathologie

Thème

Screening phyto-chimique , activité antioxydante et antiradicalaire des polyphenols de l'écorce de la clémentine

Soutenu le 29/06/2022, devant le jury composé de

- Encadrant Mme BEKHTI SARI Fadia Maitre de conférences Université de Tlemcen
- Président Malti Nassima Maitre de conférences Université de Tlemcen
- Examinatrice HADJ MERABET Djahida Maitre de conférences Université de Tlemcen

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Tout d'abord, Je tiens tiendrais à remercier dieu tout puissant de m'avoir données la force, le courage, la patience et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à ma promotrice Bekhti Sari Fadia.

Je vous remercie d'avoir acceptée de diriger ce mémoire. Merci pour votre disponibilité, conseils, aide et surtout pour votre patience pendant la rédaction de ce travail. Je vous en suis sincèrement reconnaissantes.

J'exprimons mes profondes gratitudees à Madame la professeur Malti Nassima d'avoir acceptée la présidence du jury de cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de nos profonds respects. Mes remerciements s'adressent également au professeur Hadj Merabet Djahida qui a acceptée d'examiner ce travail et de participer à ce jury.

Mes remerciements vont également à l'adresse de toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Ainsi que toute ma familles qui m'a soutenus, encouragée et motivée tout au long de mes études...

Dédicaces

C'est avec un grand honneur que je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui se sont sacrifiées pour que je grandisse avec un savoir-faire et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

A mon cher grand-père et ma très chère mère , pour votre affection et tous les efforts que vous avez déployé durant toute ma vie, j'espère que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

A mon oncle DJAWED et sa femme ZOULIKHA pour leurs présence, soutien et encouragement

A la mémoire de ma grand-mère MAALACHE Z paix à son âme.

A mes très cher cousins que je concidère comme frères RAOUNEK, ANES et ABDELMALEK. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance pour tout ce qu'ils m'ont offert.

A mon cher frère amine En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour lui et le soutien qu'il m'a procuré.

A toute la famille MAALACHE dont je suis fière d'être un membre.

A l'ensemble de mes ami (es) en souvenir de notre sincère et profonde relation et des moments agréables que nous avons passé ensemble surtout Fatima.

RIHEB .

SOMMAIRE

Partie I : Synthèse bibliographique

Généralité	1
I. La Clémentine:	3
I. Généralités	3
I.2. Histoire et origine	3
I.3. Production mondiale et nationale	4
I.4. Structure de la clémentine	4
I.5. Systématique et description botanique	5
I.5.1. Systématique	5
I.5.2. Description botanique	6
I.5.3. Variétés de la clémentine	6
I.6. Composition chimique et valeur nutritionnelle	7
I.7 Les bienfaits de la clémentine	7
II LES POLYPHENOLS	8
II. Généralités	8
II. 1. Structure et la classification des polyphénols	9
II.2. Les acides phénoliques	11
II.3. Les flavonoïdes	11
II.3.1. Structure des flavonoïdes	11
II.3.2. Les différentes classes de flavonoïdes	12
II.3.3. Les flavonoïdes d'agrumes	17
II.4. Les tanins	18
II.5. Les lignanes	19
III LE STRESS OXYDATIF	19
III. Définition	19
III. 1. Les Antioxydants de clémentine	20
III. 1.1. Acides phénoliques	20

III.	1.2.Flavonoïdes	21
III. 1.3.	Tanins.....	22

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I.	MATERIEL VEGETAL	24
I.	1.Collecte de l'échantillon	24
I.	2.Séchage et broyage	24
II.	SREENING PHYTOCHIMIQUE	24
II.	1.Préparation des extrais	24
II.	2.Extraction éthanolique à chaud	25
II.	3.Macération à froid	25
III.	LES TESTS PHYTOCHIMIQUES	26
1	Les alcaloïdes	26
2	Stérols et triterpènes	26
3	Les saponosides	26
4	Les quinones libres	26
5	Les coumarines	26
6	Tannins	26
7	Flavonoïdes	26
8	Composés réducteurs.....	27
9	Mucilages.....	27
10	L'amidon.....	27
11	Protéines.....	27
12	Anthraquinones	27
IV.	Extractions hydro-alcooliques.....	27
V.	Test de l'inhibition de la peroxydation lipidique	28
1	Mode opératoire	28
VI.	Test de l'activité anti radicalaire	30
1	Principe	30
2	Mode opératoire	30

Chapitre III : Résultats et Discussion

Résultats et interprétation

I. TESTS PHYTOCHIMIQUES	32/38
II. TEST DE L'INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE	38
III. TEST DE L'ACTIVITE ANTI RADICALEIRE	40
Discussion	42/43
Conclusion.....	45
Références bibliographiques	46/53

Liste Des Figures

Figure n°01 : Photo du fruit <i>Citrus clémentina</i>	3
Figure n°02 : Coupe transversale d'une clémentine.	5
Figure n°03 : Structure du noyau phénolique	9
Figure n°04 : Diagramme de classification des polyphénols	10
Figure n°05 : Structure de base des flavonoïdes	12
Figure n°06 : Structure de base des tanins condensés	18
Figure n°07 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants.	20
Figure n°08 : Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol.	21
Figure n°09 : Sites possibles de la fixation de Fe ³⁺ aux cycles A et C des flavonoles.....	21
Figure n°10 : Poudre d'écorces de clémentine séchée.	25
Figure n°11 : Extraction méthanolique par Soxhlet.	25
Figure n°12 : Macération a froid des écorces d'oranges	25
Figure n°13 : Evaporation du méthanol et éthanol par rotavapeur.	28
Figure n°14 : Tubes à essaies après 1h d'incubation	29
Figure n°15 : Réduction du radical DPPH.	30
Figure n°16 : Mise en évidence des Alcaloïdes	32
Figure n° 17 : Mise en évidence des Sterols et Tri-Terpènes	33
Figure n° 18 : Mise en évidence des Saponosides	33
Figure n°19 : Mise en évidence des Quinones Libres	34
Figure n°20 : Mise en évidence des Coumarines	34

Figure n°21 : Mise en évidence des des Tanins .	35
Figure n°22 : Mise en évidence des Flavonoides .	35
Figure n°23 : Mise en évidence des Sucres Réducteurs .	36
Figure n°24 : Mise en évidence des Mucilages .	36
Figure n° 25 : Mise en évidence de l'Amidon .	37
Figure n° 26 : Mise en évidence des Protéines .	37
Figure n°27 : Mise en évidence des Anthraquinones.	38
Figure n°28 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanoïque .	39
Figure n°29 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique.	39
Figure n°30 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps.	40

Listes Des Tableaux

Tableau n° 01 : Classification botanique de clémentine	5
Tableau n° 02 : Description botanique de la clémentine .	6
Tableau n°03 : Valeur nutritionnelle et chimique de la clémentine	7
Tableau n°04 : Les principales classes des flavonoïdes.	15/16

Liste des abréviations

CH₂ : Méthylène

ArOH : phénols

BHA : Hydroxyanisole butylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

k-cal : kilos calories

ADN : acide désoxyribonucléique

UV : ultraviolet

HCA : l'acide hydroxycinnamique

PMF : les flavones polyméthoxylées

PHF : flavonoïdes polyhydroxylés

ROS : espèces réactives oxygénées

ERO : espèces réactives oxygénées

FL-OH : Flavonoides

R* : radical libre

FL-O : flavonoxy

Fe³⁺ : fer

HCl : Chlorure d'hydrogène

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

FeCl₃ : Chlorure de fer

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

KI : Iodure de potassium

I₂ : diiode

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

CHCl₂ : Dichlorométhane

KOH : hydroxyde de potassium

v/v : volume/volume

TBARS : l'acide thiobarbiturique-substances réactives

p/v : poids/volume

KCl : Chlorure de potassium

nm : nanometre

TBA : Alcool butylique tertiaire

SDS : dedodécylsulfate de sodium.

AT : absorbance du test

AC : absorbance du contrôle

DPPH : Diphénylpicrylhydrazyle

DO : densité optique

Résumé/Abstract/ملخص

Résumé :

La clémentine (*citrus clémentina*) est un agrume de famille des rutacées du bassin méditerranéen. Ce fruit est recouvert par une écorce souple très riche en composés bioactifs connus par leurs activités antioxydantes. Ce travail a pour but de mettre en évidence les composants de l'écorce de la clémentine par un screening phyto-chimique mais aussi la mise en évidence de l'activité anti-radicalaire et anti-oxydante *in vitro* des extraits de l'écorce étudiée par le biais test de DPPH et le test de l'inhibition de la peroxydation lipidique. Le screening phyto-chimique a montré la présence de flavonoïde, tanins, coumarines et sucres réducteurs. Nos résultats ont aussi démontré que la concentration **1 mg/ml** en extrait d'écorce a une très bonne activité contre la peroxydation lipidique. Concernant le DPPH, l'extrait présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée à des concentrations de **(0,5 et 1) mg/ml**. Ces résultats démontrent l'intérêt de l'utilisation des extraits de l'écorce de la clémentine dans différents domaines en tant qu'antioxydants.

Mots clés : Clémentine, écorce, antioxydants, polyphénols.

Abstract :

The clementine (*citrus clementina*) is a citrus fruit family's Rutaceae from the Mediterranean basin. This fruit is covered by a soft bark very rich in bioactive compounds known for their antioxidant activities. The aim of this work is to highlight the components of the clementine bark's by a phytochemical screening but also the anti-radical and antioxidant *activity in vitro* of the bark extracts' studied by the DPPH test and the inhibition of the lipid peroxidation test's. The phytochemical screening showed the presence of flavonoids, tannins, coumarins and reducing sugars. The results also showed that the concentration of **1 mg/ml** of bark extract has a very good activity against lipid peroxidation. Concerning DPPH, the extract presents the highest anti-free radical activity at concentrations of **(0.5 and 1) mg/ml**. These results demonstrate the interest of use extracts clementine bark in different fields as antioxidants.

Keys words: Clementine, bark, antioxidants, polyphenols.

ملخص

الكليمنتين (*Citrus Clémentina*) هي فاكهة حمضيات من عائلة روتاسيا المتواجدة في حوض البحر الأبيض المتوسط. هذه الفاكهة مغطاة بلحاء ناعم غني جدا بالمركبات النشطة بيولوجيا المعروفة بأنشطتها المضادة للأكسدة.

يهدف هذا العمل إلى تسليط الضوء على مكونات لحاء الكليمنتين عن طريق الفحص الفيتو كيميائي و أيضا إظهار النشاط المضاد ومضاد للأكسدة للحاء التي تمت دراستها من خلال اختبار DPPH واختبار تثبيط بيروكسيد الدهون.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود مركبات الفلافونويد و التانين والكومارين و السكريات الاختزالية. أظهرت نتائجنا أن تركيز **1 ملغ / مل** من مستخلص اللحاء له نشاط جيد ضد بيروكسيد الدهون. أما بالنسبة ل DPPH ، فإنه يظهر أعلى نشاط مضاد بتركيزات (**0.5 و 1 ملغم / مل**).

توضح هذه النتائج قيمة استخدام مستخلصات لحاء الكليمنتين في مجالات مختلفة كمضادات للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: كليمنتين ، لحاء ، مضادات أكسدة ، بولي فينول.

Introduction

L'être humain s'intéresse depuis longtemps au pouvoir de guérison des plantes, principalement pour des raisons médicinales. Les plantes constituent la base de la médecine traditionnelle et sont riches en métabolites secondaires utilisés comme composés bioactifs, constituant ainsi une grande source de médecine (**Ramful et al., 2010 ; Ladah et al., 2014**).

Parmi ces plantes riches en métabolites secondaires, toutes les variétés d'agrumes (orange, pamplemousse, mandarine, clémentine, citron, pamplemousse, citron vert, etc.) qui représentent une source précieuse de composés bioactifs (**Abbobatta., 2019**). Selon (**FAO 2006**), il est intéressant de souligner que les agrumes sont les fruits les plus consommés au monde, avec une production mondiale d'environ 108 millions de tonnes. Parmi les agrumes, l'orange est l'agrumes le plus populaire et le plus consommé au monde. Connu pour sa valeur nutritive et ses propriétés médicinales. L'orange est une source importante de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les vitamines, les fibres et les minéraux (**Benamerouch et al., 2016**). Ces composés possèdent de nombreuses activités biologiques telles que antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antidiabétique, antihypertensive, antivirale (**Milind & Dev, 2012**) L'activité biologique de ces composés permet de protéger contre l'athérosclérose les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Manarche et al., 2004 ; Etebu et al., 2014**).

Ces composés bioactifs comme les polyphénols et les flavonoïdes se trouvent en grande proportion dans l'écorce d'orange et jouent un rôle protecteur et inhibiteur des effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain (**Sultana et al., 2015**). Les polyphénols présentent une activité antioxydante très puissante parce qu'ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par l'organisme et ils renforcent aussi nos défenses naturelles contre le stress oxydatif. Les flavonoïdes préviennent efficacement de la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (**Hadi, 2004**).

Habituellement, les polyphénols agissent en rompant la chaîne d'oxydation en remplaçant un radical porteur de chaîne par un radical plus stable et qui ne participe pas à

cette chaîne. Ainsi, on peut interpréter les propriétés antioxydantes d'un donneur d'hydrogène (comme le sont de nombreux phénols) (**Hadi,2004**) .

Ils peuvent également agir comme chélateurs d'ions métalliques pro-oxydants comme le fer, le cuivre, le zinc et inhibent la production des radicaux libres. Les polyphénols empêchent l'oxydation des lipoprotéines de faibles densités et ils peuvent ainsi aussi protéger l'organisme contre l'infarctus du myocarde ou l'athérosclérose coronarienne (**Cook & Smman, 1996**).

Les flavonoïdes suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires. Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques, buthylhydroxyanisol (BHA) et buthylhydroxytoluène (BHT), qui ont montré des effets nuisibles (effet carcinogène) (**Brand-Williams W et al., 1995**)

En conséquence, des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de nouvelles molécules telles que les polyphénols, à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les sous-produits agroalimentaires, parmi eux l'écorce d'orange. Ce déchet (l'écorce) est-il réellement une source de substances bioactives telles que les polyphénols qui seraient capables d'exercer une activité antioxydante efficace ?

Pour répondre à cette problématique, nous avons étudié les extraits aqueux et organiques (éthanolique) d'écorce de *Citrus clémentina* cultivé de la région de Tlemcen .. Pour la réalisation de cette étude nous avons procéder comme suit :

- ❖ Extraction des polyphénols par deux solvants (eau et éthanol)
- ❖ Un screening phytochimique .
- ❖ Révélation et évaluation des activités antioxydante sur la peroxydation lipidique et antiradicalaire .

I. La clémentine

I. 1. Généralités:

La clémentine est un agrume fruit du clémentinier (*Citrus clémentina*), un arbre hybride de la famille des rutacées, issue du croisement entre un mandarinier (*Citrus reticulata*) et un oranger (*Citrus sinensis*). La peau est brillante, de couleur orange à rougeâtre, finement granulée, ayant une épaisseur qui varie selon les clones de 2.5 à 4.5 mm. La pulpe est riche en jus, tendre et parfumée. Les fruits sont d'un poids moyen de 60g. Le bassin méditerranéen est la principale zone de production de clémentine ; l'Espagne, le Maroc, l'Algérie, la Turquie et l'Égypte sont les grands pays producteurs (Giove, R. M., & Abis, S. 2007)



Figure n° 01 : Photo du fruit *Citrus clémentina*.

II.2. Histoire et origine :

La clémentine est un agrume apparu à la fin du 20ème siècle et porte le nom des frères Clément (Vital Rodier, 1839-1904). C'est le vénérable père Clément qui l'a découvert au niveau de la crèche de l'orphelinat agricole de Misserghin près d'Oran en Algérie. 1902, docteur **Trabut**, botaniste et médecin français, a identifié des plantes dans des semis de mandarine qui semblent être d'origine hybride. Certaines d'entre elles produisent des fruits nouveaux au goût agréable (**Trabut, 1926**).

A cette époque, la clémentine était considérée comme un hybride naturel de mandarine et d'orange amère. Or, grâce à une étude de son patrimoine génétique menée

par des chercheurs de la station INRA de Corse en 2002, il est clair que la clémentine est en fait un accouplement naturel entre la mandarine et l'orange **douce (Jacquemond *et al.*, 2013)**.

II.3. Production mondiale et nationale :

La production mondiale de clémentine est d'environ 24 millions de tonnes. Les principaux pays producteurs sont le Brésil avec 36,6 millions de tonnes, les États-Unis avec 15,7 millions de tonnes, la Chine avec 14,4 millions de tonnes, suivis de l'Espagne et du Japon (**FOA, 2018**).

Selon un communiqué du ministère de l'Agriculture, de la Forêt et du Développement rural, l'Algérie a produit 52 millions de quintaux de clémentine en 2018.

II.4. Structure de la clémentine :

Tous les agrumes ont la même anatomie (**Ramful *et al.*, 2010**). Ce sont des baies charnues composées de deux parties, la peau, également appelée péricarpe, et la chair, également appelée péricarpe interne (**Figure n° 02**).

Le péricarpe est divisé en deux parties.

1-Glande du péricarpe supérieur riche en huiles essentielles.

2-Le mésocarpe est également divisé en deux parties. Le péricarpe externe forme le "flavedo" et le péricarpe interne forme "l'albedo". Il s'agit d'une couche spongieuse blanchâtre plus ou moins épaisse et pouvant porter de 12 à 30 % de fruits.

Le péricarpe interne ou "chair" est la partie comestible du fruit et se compose de segments ou "quartiers" dont le nombre varie de 5 à 18. Le sac de jus est intégré autour de l'axe central et sa vacuole est remplie de jus pendant le développement

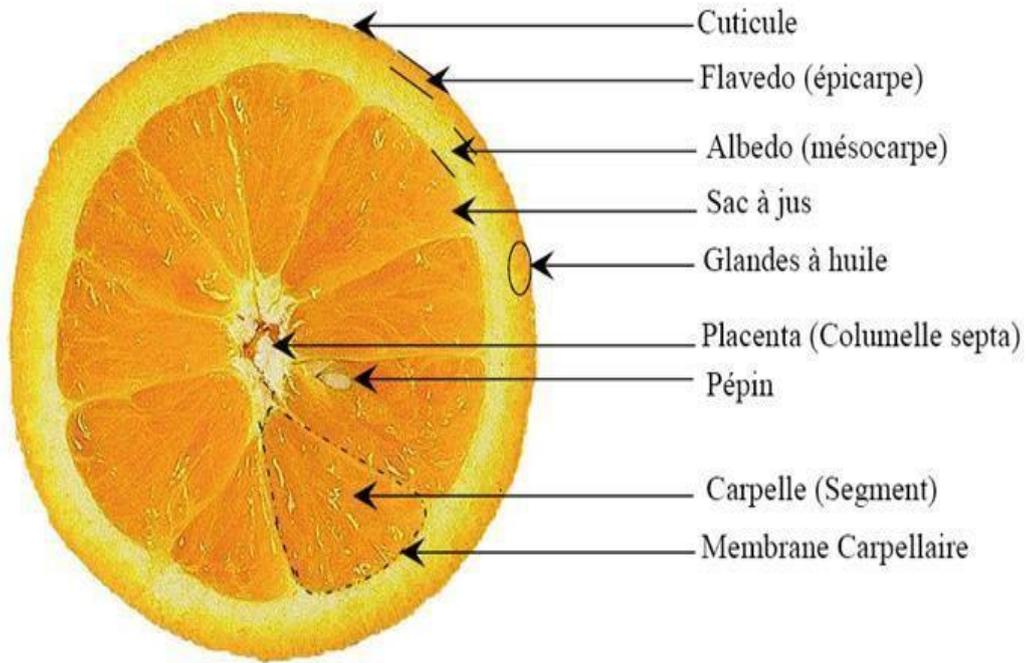


Figure n° 02 : Coupe transversale d'une clémentine (Milind, 2008)

II. 5. Systématique et description botanique :

II.5.1. Systématique :

La clémentine appartient à la famille des rutacées selon le tableau suivant :

Tableau n° 01: Classification botanique de clémentine . (Milind &Dev, 2012)

Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapinales
Famille	Rutaceae
Genre	Citrus
Espèces	Clementina

II.5.2. Description botanique :

Le tableau n°02 ci-dessous présente les principaux caractères botaniques de la clémentine:

Tableau n° 02: Description botanique de la clémentine . (**trabut, 1926**).

Nom latin	<i>Citrus clémentina</i> ou <i>Citrus réticulata</i>
Origine	Croisement entre un mandarinier et un bigaradier
Couleur des fleurs	Blanc
Types de plantes	Arbre fruitier, agrume
Types de végétation	Vivace
Type de feuillage	Plus ample et plus foncé persistant
Période de floraison	De mars à juillet
Hauteur	8 m en plein terre

II.5.3. Variétés de la clémentine :

Les principales variétés de la clémentine sont (**Jacquemond et al., 2013**) :

- ❖ **Clémentine Caffin** : Il est issu de la sélection commune de Clémentine trouvée au Maroc (**Caffinen, 1968**).
- ❖ **Clémentine Ragheb** : Elle est issue d'une sélection commune de clémentines découverte par Kuneyl en Algérie dans la région d'Annaba à la fin des années 1950.

❖ **Clémentine commune** : c'est le résultat d'hybridation du père clément.

I.6. Composition chimique et valeur nutritionnelle :

La clémentine est un fruit d'hiver exceptionnel et contient des composés naturels tels que des vitamines, des oligo-éléments et des fibres. La composition chimique de Clémentine est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°03 : Valeur nutritionnelle et chimique de la clémentine. (Abobatta, 2019).

Composants	Quantités	Composants	Quantités
Energie (k-cal)	46	Cuivre(mg)	0.035
Protéine(g)	0.8	Magnésium(mg)	12.3
Glucides(g)	11.9	Zinc(mg)	0.059
Fibrs(g)	1.7	Iode(µg)	13
Lipides(g)	0.19	Potassium(mg)	147
Eau(g)	86.6	Vitamine A (µg)	9.67
Sucre(g)	9.18	Vitamine E (mg)	0.2
Fer(g)	0.09	Vitamine C (mg)	18.7
Calcium (mg)	17.9	Vitamine B9 (µg)	10

I. 7. Les bienfaits de la clémentine :

la clémentine est le fruit de l'hiver et très apprécié notamment grâce à son fort apport en vitamine c qui permet de lutter contre la fatigue et bien d'autres maladies dont voici quelque unes (Etebu *et al.*, 2014 ; Abobatta, 2019). :

❖ **Propriétés-anti cancérigènes** : Les flavonoïdes peuvent prévenir le cancer grâce à une cytotoxicité sélective et à des effets antiprolifératifs et apoptotiques. Parce que les flavonoïdes sont antimutagènes, ils protègent l'ADN des dommages grâce à leur capacité à absorber la lumière UV. Ils neutralisent les radicaux libres qui favorisent les mutations.

❖ **Protection cardiovasculaire** : Les flavonoïdes contenus dans la clémentine aident à prévenir le risque de maladies cardiovasculaires en équilibrant l'équilibre lipidique.

❖ **Anti-inflammatoire** : Les flavonoïdes contenus dans les clémentines tels que l'hespéridine, la diosmine et la quercétine présentent des effets anti-inflammatoires dose-dépendants en affectant le métabolisme de l'acide arachidonique et de l'histamine.

❖ **Anti-hyperglycémie** : Les flavonoïdes contenus dans la clémentine jouent un rôle important dans la prévention des taux élevés de glucose sanguin en se liant à l'amidon, en augmentant la glycolyse hépatique et en réduisant la gluconéogenèse hépatique.

❖ **Anti-obésité** : La clémentine est faible en calories, exempte de graisses saturées et de cholestérol, riche en fibres, la pectine est très efficace pour les personnes en surpoids.

❖ **Antivieillessement de la peau** : la clémentine est riche en vitamine E, un puissant antioxydant qui aide à régénérer les cellules de la peau et soulage les crampes menstruelles.

❖ **Antidépresseur** : On pense que les huiles essentielles de clémentine réduisent la tension nerveuse et l'anxiété profonde, calment le système nerveux central et combattent l'anxiété et le stress.

❖ **Maintenir la vue** : La vitamine A contenue dans la clémentine maintient la vue et protège les yeux.

❖ **Santé des os** : une grande quantité de caroténoïdes dans la clémentine protège et renforce les os de l'ostéoporose.

❖ **Anticonvulsivants** : La grande quantité de potassium contenue dans Clémentine protège l'organisme des convulsions et de l'arthropathie.

II. Les polyphénols

II. Généralités

Les polyphénols sont un composant essentiel de l'alimentation humaine car ce sont des composants traces de plantes qui sont abondants dans nos aliments (**Arabbi et al., 2004** ;

Dai et Mumper, 2010). Ils sont abondants dans la plupart des fruits et légumes, des olives, des céréales, du chocolat et des boissons comme la bière, le vin, le café et le thé. (**D'archivio et al., 2007 ; Mojzer et al., 2010 ; Dai et Mumper, 2010 ; Keerthi et al., 2014**).

Il s'agit d'un groupe important et diversifié de métabolites secondaires des végétaux . Ils se sont avérés avoir une forte activité biologique, qui se transforme en une large gamme de propriétés biologiques au niveau biologique. (**Pavithra et al., 2013 ; Morand et Milenkovic, 2014 ; Mraih et al., 2015 ; Hegde et al., 2016 ; Li et al., 2016**).

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

II. 1. Structure et classification des polyphénols :

Les polyphénols sont un grand groupe d'au moins 10 000 composés différents caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupes phénol (cycles aromatiques) auxquels un ou plusieurs groupes hydroxyle sont attachés, des molécules de phénol simples aux composés hautement polymérisés. (**Barboni., 2006 ; Ajila et al., 2010 ; Dai Et Mumper, 2010 ; Polinati et al., 2010 ; Sun et al., 2011 ; Albuquerque et al., 2013 ; KEERTHI et al., 2014**). La structure du noyau phénolique est représentée dans la figure suivante.

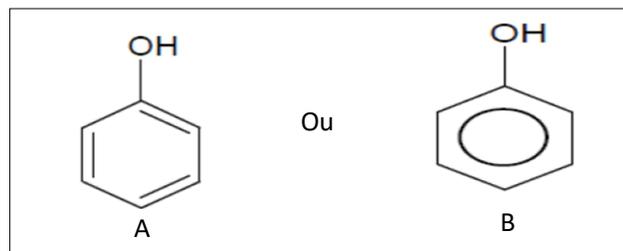


Figure n°03: Structure du noyau phénolique (**Albuquerque et al., 2013**).

Les polyphénols sont classés en fonction du nombre de noyaux phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structurels qui relient ces noyaux. (**Kumar et al., 2015**). Cette classification est représentée dans la **figure n°04**.

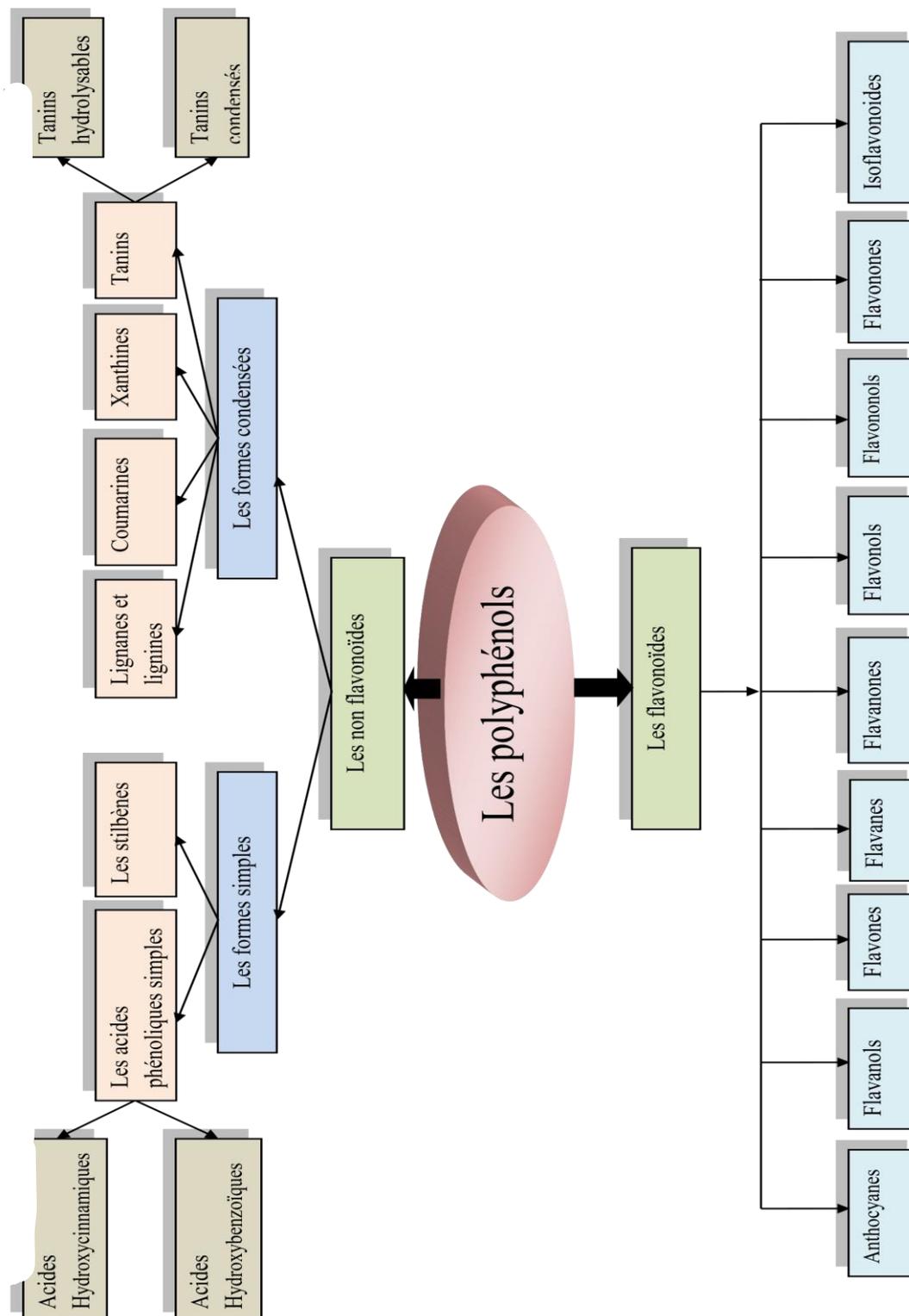


Figure n°04 : Diagramme de classification des polyphénols (Macheix *et al.*, 2005 ; Stalikas, 2007 ; Kumar *et al.*, 2015).

La plupart des composés phénoliques naturels se présentent le plus généralement sous forme de glycosides, qui sont des monosaccharides 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 une forme libre appelée aglycone (Ajila *et al.*, 2010 ; Morand Et Milenkovic, 2014).

II.2. Les acides phénoliques

L'acide phénolique est un métabolite secondaire aromatique, largement présent dans les plantes, mais particulièrement abondant dans les fruits acides. Le terme acide phénolique fait généralement référence au phénol avec une seule fonction acide-carboxyle en combinaison avec d'autres molécules organiques. (Stalikas, 2007 ; Macheix *et al.*, 2005 Ajila *et al.*, 2010 ; Wissam *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2014). Ces acides phénoliques naturels contiennent deux structures carbonées caractéristiques typiques, l'acide hydroxycinnamique et l'acide hydroxybenzoïque. La structure de base reste la même, mais le nombre et la position des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique font une différence, expliquant les différentes structures et composés. (Stalikas, 2007 ; Ajila *et al.*, 2010 ; Kumar *et al.*, 2014).

II.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes forment un grand groupe de composés phénoliques végétaux bioactifs. Il est le plus important en termes de composés phénoliques (Dallas *et al.*, 2008) et le plus abondant dans les aliments naturels tels que les herbes, les fruits, les céréales, les graines et les aliments qui en sont dérivés. Jus, vin, huile, etc. (Liu *et al.*, 2008 ; Sousa *et al.*, 2013). Avec la chlorophylle et les caroténoïdes, ce sont les pigments les plus courants (Stalikas, 2007 ; Pavithra *et al.*, 2013 ; Sousa *et al.*, 2013 ; Arrabi *et al.*, 2004 ; Teh *et al.*, 2014 ; Mraih *et al.*, 2015).

Ils sont souvent plus concentrés sur les zones extérieures des fruits et légumes. Ils interviennent dans la couleur soit sous leur forme naturelle (anthocyanes et flavonols) soit après oxydation due au phénomène de brunissement enzymatique. (Ajila *et al.*, 2010 ; Morand Et Milenkovic, 2014).

II.3.1. Structure des flavonoïdes

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

La structure de base des flavonoïdes est le cycle flavane , qui est composé de 15 atomes de carbone disposés dans la structure caractéristique C6-C3-C6. (**Pietta *et al.*, 2000 ; Ajila *et al.*, 2010 ; Dai Et Mumper, 2010 ; Pavithra *et al.*, 2013 ; Engidaa *et al.*, 2013 ; Mraih *et al.*, 2015**).

Cette structure est représentée par deux cycles benzéniques (C6) repérés A et B, liés par une chaîne droite de trois atomes de carbone (C3) sous la forme d'un hétérocycle oxygéné. (**Ajila *et al.*, 2010 ; Wissam *et al.*, 2012 ; Teh *et al.*, 2014 ; Kumar *et al.*, 2014 ; Rariq *et al.*, 2016**).

Le premier cycle benzénique (A) est fusionné au sixième carbone du troisième cycle (C), qui a un groupe phényle (B) comme substituant en position 2. (**Nakajima *et al.*, 2014**).

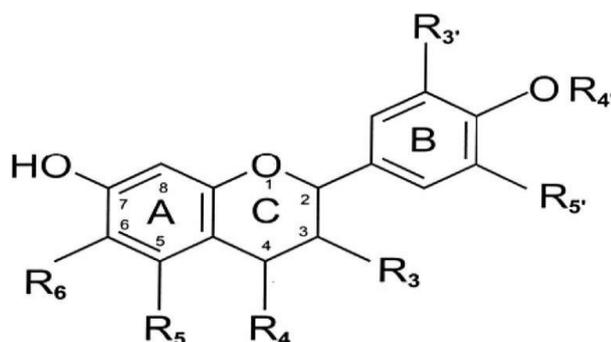


Figure n°05: Structure de base des flavonoïdes (**Damian-Rayna *et al.*, 2016**).

II.3.2. Les différentes classes de flavonoïdes :

Selon la structure et l'état oxydatif du noyau central C, les flavonoïdes comprennent les classes suivantes : flavanones, flavones, flavanols (catéchines), flavonols, flavanonols, isoflavones, anthocyanines. (**Arrabi *et al.*, 2004 ; Dai Et Pumper, 2010**).

Les flavonoïdes appartiennent à différentes classes en fonction de la position des anneaux B et C, du degré de saturation et de l'oxydation et de l'hydroxylation de l'anneau C, mais le type de substitution des anneaux A et B produit différents composés de la même classe. Sera. Flavonoïdes (**Pietta, 2000 ; Dallas *et al.*, 2008 ; Atrouz, 2009 ; Ajila *et al.*, 2010**).

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

Tableau n°04: Les principales classes des flavonoïdes.

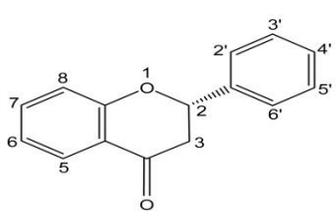
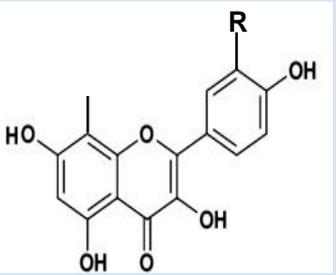
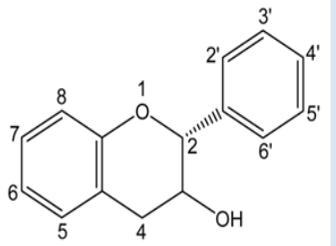
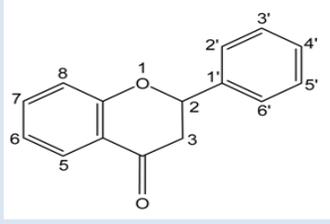
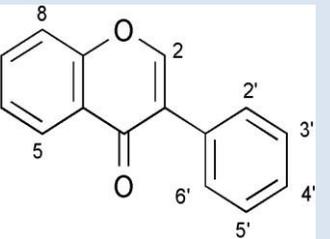
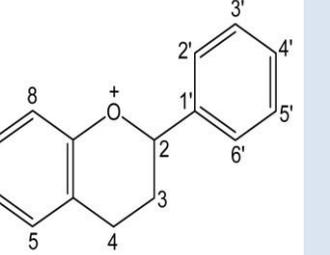
Structure chimique	Caractéristiques	exemple	Source principale	Références
<p>Les flavanones</p> 	<p>Absence de la double liaison entre C2 et C3, Ils sont glycosylés soit par du rutinose (6-O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) soit par de la néohespéridose (2-O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) liés en position 7</p>	<p>-Naringénine; -Naringine; -Hesperitine; -Hesperidine; -Eriodictyol;</p>	<p>Ecorce d'agrumes Agrumes, raisin</p>	<p>Pietta, 2000 ; Ono <i>et al.</i>, 2006 ; Pincemail <i>et al.</i>, 2007 ; Stalkas, 2007 Morand Et Milenkovic, 2014 ; Perez-Cano <i>et al.</i>, 2014 ; Yang <i>et al.</i>, 2014 ; Marin <i>et al.</i>, 2015 ; Omoba <i>Et Al.</i>, 2015.</p>
<p>Flavonols</p> 	<p>Les plus répandus et les plus diversifiés structurellement, se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double-liaison entre C2-C3, Ils existent sous forme d'aglycones ou d'hétérosides, structure similaire à celle des flavones avec un hydroxyle en position C3 du noyau pyrone C, s'accumulent dans les tissus extérieurs et aériens (peau et feuilles)</p>	<p>-Quercétine ; -Kaempferol ; -Galangine ; -Fisetine ; -Myricétine ; -Sorhamnetine.</p>	<p>brocoli, thé, tomate, oignon, épinard, chou, brocoli, baies laitue, pomme, raisin et peaux des fruits.</p>	<p>Pietta, 2000 ; Ajila <i>et al.</i>, 2010 ; Saewan Et Jimtaisong, 2013 ; Morand Et Milenkovic, 2014 ; Perez-Cano <i>et al.</i>, 2014 ; Tuszyńska, 2014 ; Marin <i>et al.</i>, 2015 ; Omoba <i>et al.</i>, 2015 ; Teleszko <i>Et Al.</i>, 2016.</p>
<p>Flavan 3 ols ou Flavonols</p> 	<p>flavonoïdes les plus complexes, souvent appelés catéchines. Leurs structures diffèrent de la plupart des flavonoïdes : il n'y a pas de double liaison entre C2 et C3, et pas de carbonyle C4 dans le cycle C de f L'hydroxylation en C3 permet aux flavanols d'avoir deux centres chiraux sur la molécule (sur C2 et C3), donc quatre diastéréoisomères possibles.</p>	<p>-(+) Catéchine ; -(-) Catéchine ; -(+) Epicatechine ; -(-) Epicatechine</p>	<p>Chocolat, thé vert, vin rouge et fruits</p>	<p>Tsao, 2010 ; Haytowits <i>et al.</i>, 2013 ; Saewan Et Jimtaisong, 2013 ; Morand Et Milenkovic, 2014 ; Perezcano <i>et al.</i>, 2014 ; Marin <i>et al.</i>, 2015 ; Mraihi <i>et al.</i>, 2015 ; Teleszko <i>et al.</i>, 2016).</p>

Tableau n°04 Les principales classes des flavonoïdes (suite).

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

II.3.3. Les flavonoïdes d'agrumes :

Les écorces et les graines d'agrumes sont très riches en composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Les pelures d'agrumes sont plus riches en flavonoïdes que les graines (**Maruti et al., 2011 ; Omoba et al., 2015 ; Castro-Vazquez, 2016 ; Mojzer et al., 2016**).

La plupart des composés phénoliques présents dans les oranges et le jus d'orange sont l'acide hydroxycinnamique (HCA) et les flavonoïdes, dont les flavanones, les flavones, les flavonols et les anthocyanines sont les plus abondants. (**Bibao et al., 2007 ; Klimczak et al., 2007 ; Polinati et al., 2010 ; Hegazy et Ibrahim, 2012 ; Evans et al., 2012 ; Chanet et al., 2013 ; Nakajima et al., 2014**).

L'utilisation et la valorisations des écorces d'agrumes ont fait l'objet de diverses études et constituent une source potentielle d'antioxydants naturels. Ils sont riches en composés phénoliques tels que les flavanones, les glycosides de flavanone et les flavones polyméthoxylées (PMF) et sont hautement physiologiquement actifs. Ces FPM sont représentés par la nobilétine, la tangerétine, la cinésétine, la 3,5,6,7,8,3', 4'-heptaméthoxyflavone et la 3,5,6,7,3', 4'-hexaméthoxyflavone. L'écorce d'agrumes est également une source de flavonoïdes polyhydroxylés (PHF) tels que les néohespéridine et naringine qui sont des glycosides de flavanone hespéridine. (**Evans et al., 2012 ; Karsheva et al., 2013 ; Dong et al., 2014 ; Gosslau et al., 2014 ; Nakajima, 2014 ; Rawson et al., 2014 ; Rafiq et al., 2016**).

Les glycosides de de flavanone et les FPM ne se trouvent que dans les écorces d'agrumes, en particulier les écorces d'orange douce (*Citrus sinensis*) et de mandarine, et sont relativement rares dans d'autres plantes. (**EVANS et al., 2012 ; Karsheva et al., 2013 ; Castro-Vazquez, 2016 ; Magwaza et al., 2016**) . Selon **Morand et Milenkovic (2014)**, les flavanones aglycones dépendent du type d'agrumes. L'hespéridine est prédominante dans l'orange et la clémentine, la naringénine est prédominante dans le pamplemousse et l'ériodictiol dans le citron.

II.4. Les tanins :

Les tanins sont le troisième groupe majeur de composés phénoliques et ont un poids moléculaire relativement élevé. Structurellement, ils peuvent être divisés en tanins hydrolysables et en tanins condensés. (Macheix *et al.*, 2005).

Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique, et ces substances sont facilement hydrolysées par des moyens chimiques ou enzymatiques. (Macheix *et al.*, 2005).

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 (Scholfield *et al.*, 2001 ; Ajila *et al.*, 2010 ; Achat, 2014). La figure n°06 ci-après représente la structure de base des tanins condensés.

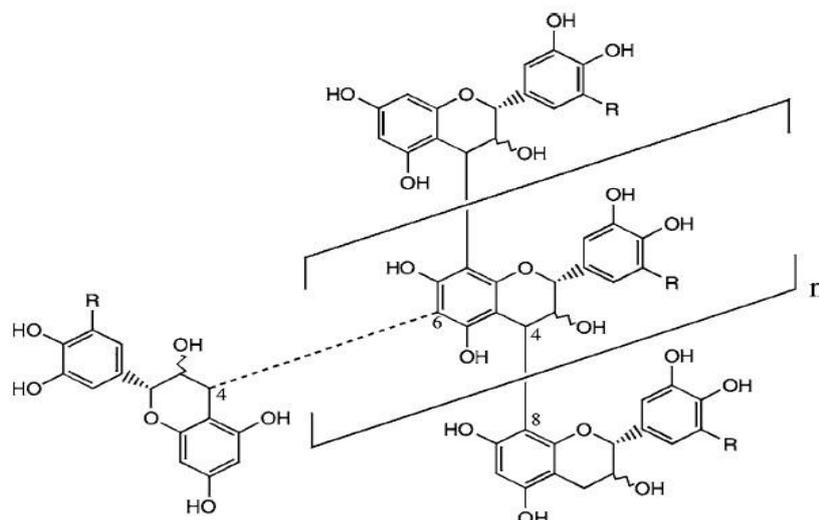


Figure n°06 : Structure de base des tanins condensés. (Scholfield *et al.*, 2001).

Les tanins condensés se combinent aux protéines de la salive pour former l'astringence caractéristique des fruits prémûris (raisin, pêche, pomme, poire, etc.) et de certaines boissons chocolatées-amères (vin, cidre, thé, etc.). (Macheix *et al.*, 2005 ; Achat, 2014).

Le troisième sous-groupe, le phloroglucinol, entièrement composé de phloroglucinol, a été isolé de plusieurs genres d'algues brunes. (Ajila *et al.*, 2010).

Selon (Macheix *et al.*, 2005 ; Ajila *et al.*, 2010), Les tanins sont des polyphénols qui se lient aux protéines, des composés comme les alcaloïdes, ions de métaux lourds en solution pour les rendre insolubles et provoquer des précipitations.

II.5. Les lignanes :

Les lignanes sont un groupe de diphénols (deux unités de phenylpropane), relativement simples, ayant une structure de 2,3-dibenzylbutane, qui est formée par la dimérisation de deux résidus d'acide cinnamique (**Keerthi et al., 2014 ; Kumar et al., 2014**). Ils sont principalement produits dans une grande variété d'aliments à base de végétaux tels que les graines oléagineuses, les céréales, les légumes, les fruits et les légumineuses. Le lin, le sésame et le thé sont une riche source de lignanes (**Ajila et al., 2010 ; Peterson et al., 2011 ; Keerthi et al., 2014**).

III. stress oxydatif :

III. Définition :

Le stress oxydatif, également appelé stress oxydant, est défini comme un grave déséquilibre entre le système oxydatif de l'organisme et sa capacité antioxydante favorable, entraînant des dommages cellulaires irréversibles. Le stress oxydatif est une fonction normale de l'organisme, sauf si certaines limites sont dépassées. En fait, tous les organismes qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres. C'est un petit produit chimique fortement oxydé au contact de l'oxygène, et nos cellules sont généralement très efficaces pour l'éliminer. Le stress oxydatif devient anormal si les cellules sont submergées par la quantité de radicaux libres à éliminer, ou s'il n'y a pas assez de ressources antioxydantes (vitamines, oligo-éléments, enzymes) pour éliminer les cellules. (**Chu, W L et al., 2010**).

Les ROS sont présentes intracellulairement à des doses appropriées et leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur vitesse de formation et leur vitesse d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, au repos, antioxydants et pro-oxydants sont bien équilibrés. (**Migdal C & Serres M ,2011**).

Cependant, cette homéostasie redox peut être perturbée. Autrement dit, soit une production excessive d'ERO, soit une diminution de la capacité antioxydante, fait que l'oxydation dépasse le système antioxydant (Figure 07). on parle alors de stress oxydatif. (**Rahman, T et al., 2012 ; Barhe A & Tchouya G.R.F, 2016**).

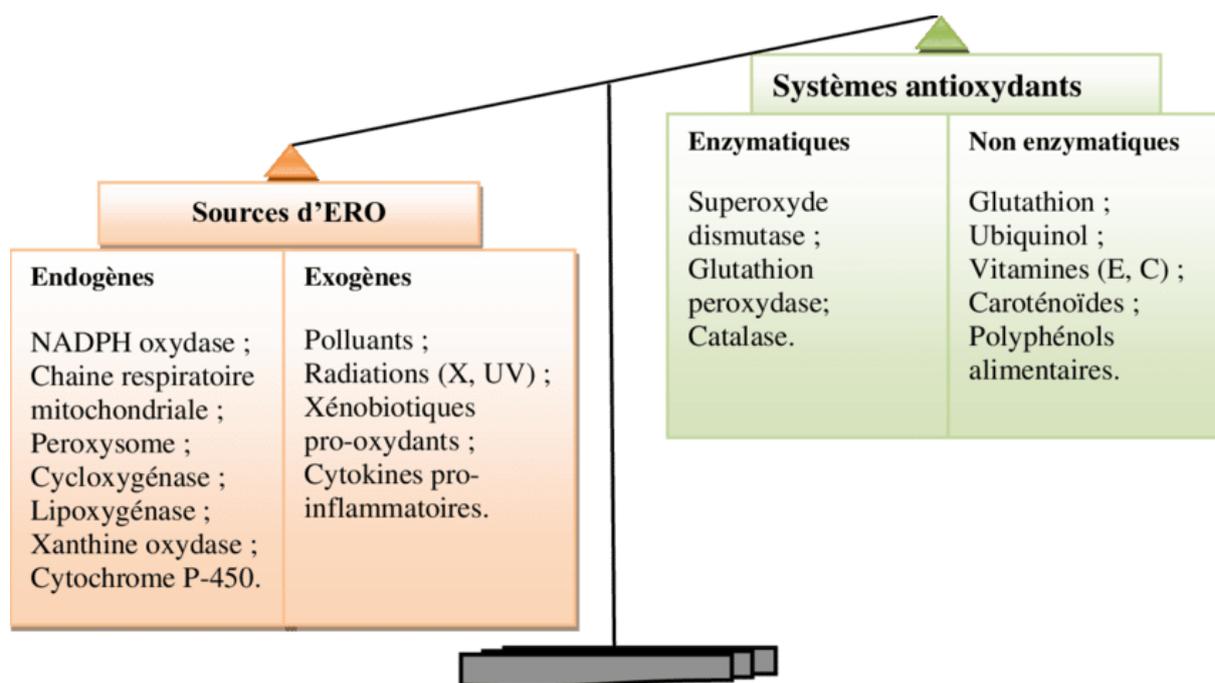


Figure n°7 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants. (Rahman, T *et al.*, 2012).

III.1. Les Antioxydants de la clémentine :

Puisque les antioxydants ont montré des effets protecteurs dans différentes maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer et le vieillissement, dont les plus connus sont les caroténoïdes (surtout le β -carotène), l'acide ascorbique, les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols. Ces derniers incluent les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques. Qui sont classés selon leurs origines (naturelles ou synthétiques), leurs natures (hydrosolubles ou liposolubles) et leurs modes d'actions (primaires ou secondaires).

III.1.1. Acides phénoliques :

Les acides phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et chélatent les métaux de transition (Blokhina *et al.*, 2003). L'emplacement et l'étendue de l'hydroxylation et de la méthylation des cycles aromatiques sont des facteurs importants dans la détermination de l'activité antioxydante de l'acide cinnamique et de ses dérivés. (Robards, K *et al.*, 1999). L'activité antioxydante de l'acide cinnamique suit l'ordre décroissant suivant : acide chlorogénique > acide caféique > acide férulique > acide coumarique. (Soobrattee, A *et al.*, 2005) (figure n° 08).

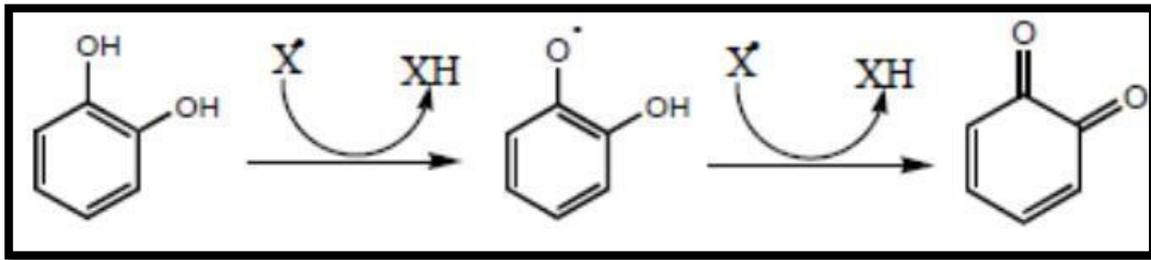


Figure n°08 : Piégeage des ERO (X^\bullet) par un noyau catéchol (Achat S, 2014).

III.1.2. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques, dues en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes peuvent réagir avec la plupart des espèces réactives de l'oxygène (Fuhrman, B *et al.*, 1995).

Les effets antioxydants de ces phytonutriments s'exercent non seulement par l'inhibition et l'inactivation des radicaux libres, mais également par la chélation des ions métalliques traces impliqués dans la neutralisation des oxydases et la production de ROS. (Cotelle N, 2001). En raison du faible potentiel redox, les flavonoïdes (FL-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxyle (FL-O \cdot) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Jovanovic, S *et al.*, 1998) (figure 09).

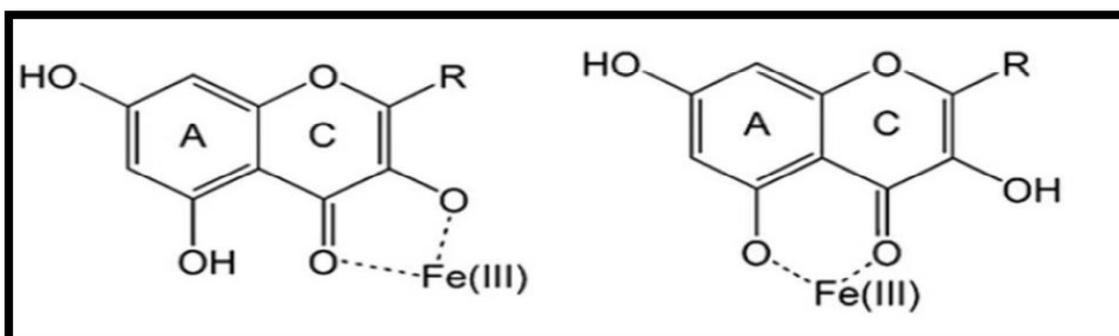


Figure n°09 : Sites possibles de la fixation de Fe^{3+} aux cycles A et C des flavonoles. Le métal peut se fixer à la position 3-hydroxy-4-céto (gauche) ou la position 5-hydroxy-4-céto (droite) (Verdan, A *et al.*, 2011).

III.1.3. Tanins :

La nature polyphénolique de l'acide tannique hydrophobe est responsable de son activité antioxydante, et son mécanisme antioxydant n'est pas encore entièrement compris. En présence de cuivre métallique, l'acide tannique agit comme antioxydant ou antioxydant et supprime les radicaux hydroxyles. **(Gulçin, I *et al.*, 2010).**

Affinité pour les protéines sur lesquelles ces molécules se lient de manière réversible ou irréversible et les dénaturent (inactivation des protéines de surface des microorganismes et inhibition de leur métabolisme par modification enzymatique, et donc effets antibactériens ; antimutagénicité Inhibition des enzymes virales de transcription inverse, et donc effets antiviraux, stimulation des la synthèse d'enzymes qui produisent des espèces réactives inhibitrices de l'oxygène, ou enzymes antioxydantes, et donc des effets antioxydants.

CHAPITRE II :

MATERIEL ET

METHODES

I. Matériel Végétal :

Le travail réalisé dans le laboratoire PPBABIONUT de l'Université de Tlemcen a porté d'abord sur un screening phytochimique ensuite sur l'étude de l'effet antioxydant des polyphénols présents dans les écorces de clémentine..

I.1. Collecte des échantillons :

L'échantillon, a été choisi sur la base de critères établis ; le fruit sélectionné est mûr et sain. Le fruit est bien lavé à l'eau courante puis l'écorce est séparée.

I.2. Séchage Et Broyage:

La peau fraîche a été séchée à température ambiante pendant plusieurs jours. Ces peaux séchées ont été broyées finement à l'aide d'un mixeur électrique afin d'obtenir des poudres granulométriques fines. Ces dernières sont placées dans des flacons fermés, fumés, étiquetés et conservés à température ambiante jusqu'au moment de l'extraction.

II. Screening phytochimiques :

Les tests phytochimiques (screening) sont des tests qualitatifs qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physico-chimiques qui permettent d'identifier la présence de la substance chimique.

II.1. Préparation des extraits :

Deux types d'extraction ont été mises en place pour extraire les différents composants présents dans les écorces de clémentine qui sont :

- L'extraction méthanolique à chaud
- Macération à froid

II.2. Extraction éthanolique à chaud :



Figure n° 10 : Poudre d'écorce de clémentine séchée.

Le matériel végétal est séchée puis broyé pour obtenir une poudre fine. Il consiste à mettre 10 g de chaque échantillons plus 60 ml d'éthanol



Figure n°11: Extraction méthanolique par Soxhlet.

L'ensemble est mis dans un chauffe ballon à température d'ébullition stable pendant 1 heure.

II.3- Macération à froid :

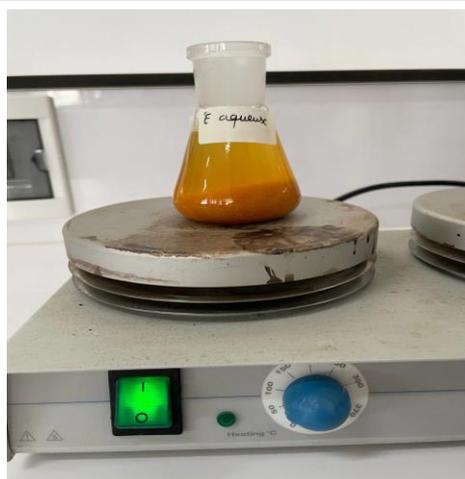


Figure n°12 : Macération à froid des écorces d'oranges.

Macération sous agitation, à température ambiante, pendant 48 heures. 10 g de matériels végétale est mélangé avec 100 ml d'eau distillée.

III. LES TESTS PHYTOCHIMIQUES :

1. Les alcaloïdes : Dans deux tubes à essai, on place 1ml d'extrait éthanolique et on ajoute 5ml HCl à 1%. L'extrait est divisé en deux volumes : on ajoute 5ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 5ml de réactif de Wagner dans le deuxième tube. L'apparition d'un blanc ou brun indique la présence des alcaloïdes (**Majob ,2003**) .

2. Stérols et triterpènes : 10 ml de l'extrait éthanolique est placée dans un erlenmeyer ; après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme. Ensuite mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique . Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré sont ajoutées sous agitation. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (**Trease et Evans, 1987**).

3. Les saponosides : 1 ml pour chaque extrait est ajouté à 2 ml d'eau chaude, après agitation de 2 minutes l'apparition d'une mousse persistante, indique la présence des saponines (**Trease et Evans, 1987**).

4. Les quinones libres : Sur 1 ml volume de chacun de nos extraits, quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libre (**Oloyede ; 2005**).

5. Les coumarines : Dans un erlenmeyer, on met 5ml d'extrait éthanolique. Après évaporation, on ajoute 2ml de H₂O chaude au résidu. La solution obtenue est divisée en deux parties égales. La première représente le témoin ; la deuxième est traitée avec 0,5ml NH₄OH à 25%. L'apparition d'une fluorescence intense sous la lumière UV indique un résultat positif (**Benmahdi, 2000**). Placer deux points sur le papier filtre et inspecter sous une lumière ultraviolette de 366 nm.

6. Tanins : Dans le tube à essai, contenant 1 ml de l'extrait à analyser, 0,25 ml de solution aqueuse de FeCl₃ (1%) puis incubé à température ambiante pendant 15 min. La présence de tanin est indiquée par vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

7. Flavonoïdes : La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 2,5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml d'HCl et 0,25g de magnésium. La présence des flavonoïdes est

mise en évidence si une couleur rose, rouge ou jaune se développe après 3 min (**Earnsworth, 1974**).

8. Composés réducteurs : Leur détection consiste à introduire 2ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 2ml de la liqueur de Fehling sont ajoutés. Ensuite, l'ensemble est porté au bain-marie bouillant durant 8 min. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (**El-haoud, 2018**).

9. Mucilages : Introduire 1 ml de décocté dans un tube à essai, puis 5 ml d'alcool absolu est ajouté. L'obtention d'un précipité floconneux après agitation indique la présence de mucilages. (**El-haoud, 2018**). Dans un tube à essai, 1ml d'extrait aqueux est dilué par 9ml H₂O₂, puis mélangé à 5ml d'éthanol. Une apparition floconneuse indique la présence de mucilage.

10. L'amidon : 1ml d'extrait aqueux est ajouté à 1ml de réaction d'amidon (réactif de Vagner, 1g KI dans 50ml d'eau distillé, chauffer ,0.5g d'I₂, compléter à 50ml d'eau distillé). L'apparition d'une couleur mauve après 24 h indique la présence d'amidon (**Ghanemi, 2012**).

11. Protéines : 1g de poudre végétal est ajouté à 2 ml NaOH a 20% plus 2 à 3 gouttes de CuSO₄ à 2% .L'apparition d'une coloration violette par fois teinté en rouge indique la présence des protéines (**Belfekih et al., 2017**).

12. Anthraquinones : 1g de poudre végétal est ajouté à 10ml de CHCl₂ ,le mélange est chauffé au bain marie sous agitation 3 minutes /55°C , ensuite on filtre la solution en plus ajouté 1ml KOH à10% (v/v), après agitation l'apparition d'une coloration rouge indique la présence des anthraquinones (**Darine, 2007**).

IV. Extractions hydro-alcooliques

Les tests biologiques sont réalisés sur des extraits hydro-méthanoliques et hydro-éthanoliques.

Dans deux Erlenmeyers, mettre 5g du matériel avec 100 ml de mélanges ; méthanol-eau et/ou éthanol-eau v/v (80/20), Laisser les mélanges macérer pendant 24 heures à l'obscurité, et à une température ambiante. Puis Filtrer sur papier filtre. Le filtrat placé dans un rotavapeur à 40 °C (**figure n° 13**) pour assurer l'évaporation du solvant.



Figure n°13 : Evaporation du méthanol et éthanol par rotavapeur.

V. Test de l'inhibition de la peroxydation lipidique :

L'inhibition de la peroxydation des lipides a été déterminée par dosage de l'acide thiobarbiturique-substances réactives (TBARS) en utilisant le jaune d'œuf comme une source riche en lipides selon la méthode de **Wong *et al.* , en1995**.

V.1.Mode opératoire :

Le protocole expérimental nécessite d'abord la préparation suivante

- Le jaune d'œuf à une concentration de 10% (p/v) dans un KCl (1.15% p/v), en diluant 5g de jaune d'œuf dans 50 ml eau physiologique, et 0.56g de KCl dans 50 ml eau distillée, cette homogénéisation se fait pendant 30s, suivie par traitement aux ultrasons pendant 5 min.
- Les solutions-extraits à différentes concentrations (**4µg/ml. 2µg/m. 1µg/ml . 0.5µg/ml**) pour chaque extrait.
- L'acide acétique à 20% (pH =3.5)
- La solution TBA en mélangeant 0.8g de TBA thiobabaturic avec 1g de dodécylsulfate de sodium (SDS) dans 100 ml eau distillée.

- Les étapes expérimentales restantes ont été complétées comme suit :
 - Cinq cents microlitres de 10% (p/v) et 100 µL d'extraits avec différentes concentrations solubilisés dans méthanol, sont mis dans un tube à essai et complétés à 1 ml avec de l'eau distillée, suivi par
 - L'addition de 1.5 ml d'acide acétique à 20% (pH = 3.5) et 1.5 ml de solution (TBA)
- L'extrait a été remplacé par le jaune d'œuf correspondant à 100% de peroxydation lipidique.

Les tubes ont été agités dans un vortex, et chauffés à 95°C pendant 1 h (**figure 14**)

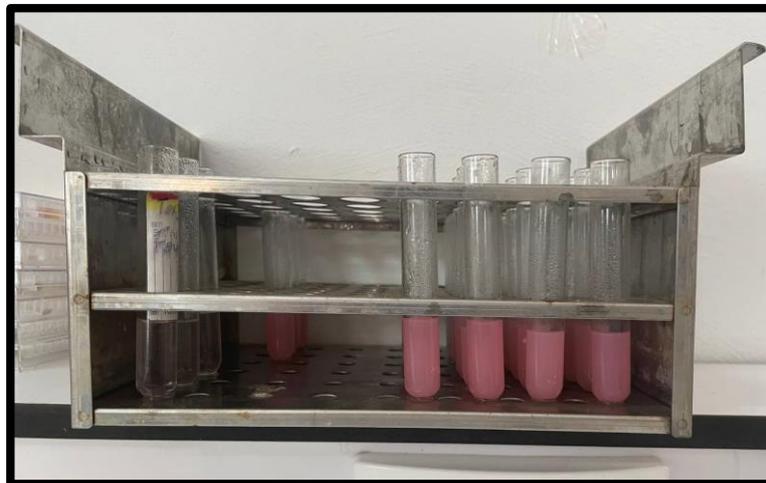


Figure n°14 : Tubes a essaies après 1h d'incubation .

Après refroidissement à température ambiante, 5 ml de butanol a été ajouté à chaque tube, agité et centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min.

L'absorbance du surnageant a été mesurée à 490 nm en utilisant un spectrophotomètre.

Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé comme suit

$$\% \text{ d'inhibition} = (1 - AT/AC) .100$$

Où : **Ac = Absorbance du contrôle, At = Absorbance du test**

VI. Test de l'activité anti radicalaire :

1. Principe :

Le radical DPPH présente une bande d'absorption maximale à 515 nm dans le méthanol. Cette bande disparaît lors de la réduction du DPPH (en hydrazine correspondant) par composé donneur d'atomes d'hydrogènes (**Figure n°15**). Ce traduit par une décoloration. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance. Plus les valeurs d'absorbances sont faibles, plus que les capacités anti-oxydantes du composé considéré sont élevées (**Sanchez-Moreno *et al.*, 1998**).

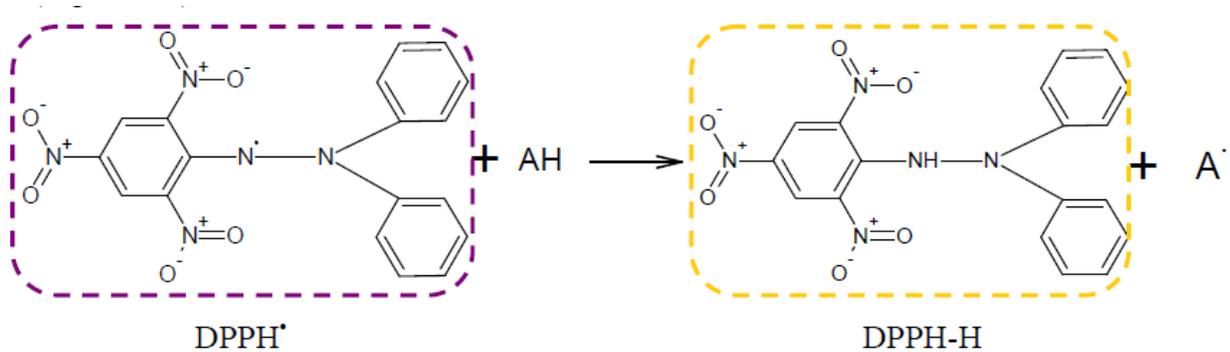


Figure n°15 : Réduction du radical DPPH.

2.Mode opératoire :

Le milieu réactionnel contenant 50µl de l'échantillon à différentes concentrations (**0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml**) introduits dans des cuves (dilué dans le méthanol), mélangé avec **1.95 ml** de DPPH (**0.025g/l** de méthanol).

L'absorbance est mesurée à 515 nm par un spectrophotomètre pendant 30 min.

CHAPITRE III :

Résultats et interprétation

I.RESULTAT DES TESTS PHYTOCHIMIQUES :

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité : la méthode d'extraction, la granulométrie des particules, la durée d'extraction, la nature et le volume du solvant utilisé

La méthode d'extraction par macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction et l'eau en parallèle de l'échantillon des écorces de clémentine , ont permis d'identifier la présence de substance chimique comme suit :

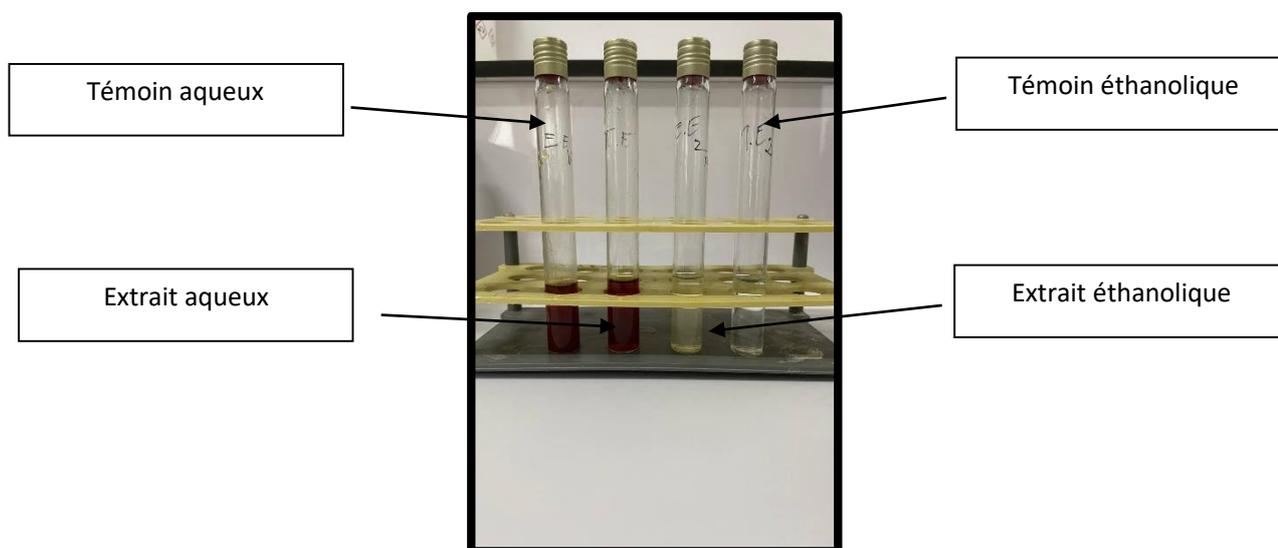


Figure n°16 : Mise en évidence des Alcaloïdes .

(de la gauche vers la droite : témoin aqueux , extrait aqueux, témoin éthanolique , extrait éthanolique)

On peut constater qu'il n'y a eu aucun précipité blanc ou brun donc le résultat est négatif .



Témoin éthanolique

Figure n° 17 : Mise en évidence des Sterols et Tri-Terpènes .

(à gauche l'extrait éthanolique à droite le témoin éthanolique)

La réaction est négative en raison de l'absence d'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert.



Extrait aqueux

Témoin aqueux

Figure n° 18 : Mise en évidence des Saponosides .

(de la gauche vers la droite témoin éthanolique , extrait éthanolique , témoin aqueux , extrait aqueux,)

En dépit de l'absence d'apparition d'une mousse persistante, on peut dire que les deux extraits ne contiennent pas de saponosides .

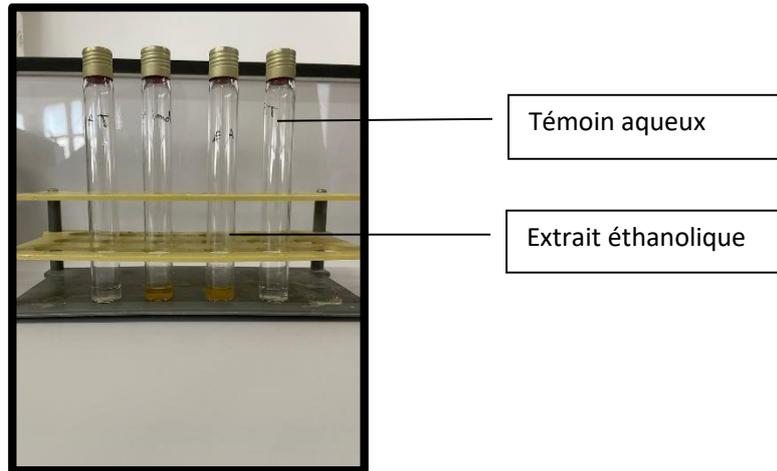


Figure n°19 : Mise en évidence des Quinones Libres .

(de la gauche vers la droite ,témoin éthanolique , extrait éthanolique , témoin aqueux , extrait aqueux)

En ce qui concerne les quinones libres, comme il n'y a eu aucune apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique on peut en conclure que la réaction est négative.

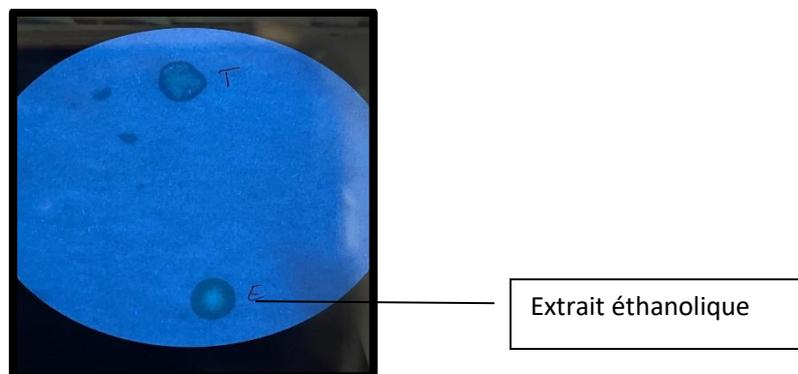


Figure n°20 : Mise en évidence des Coumarines .

(en haut le témoin éthanolique , en bas l'extrait éthanolique).

On peut observer l'apparition d'une fluorescence intense sous la lumière UV ce qui indique un résultat positif.

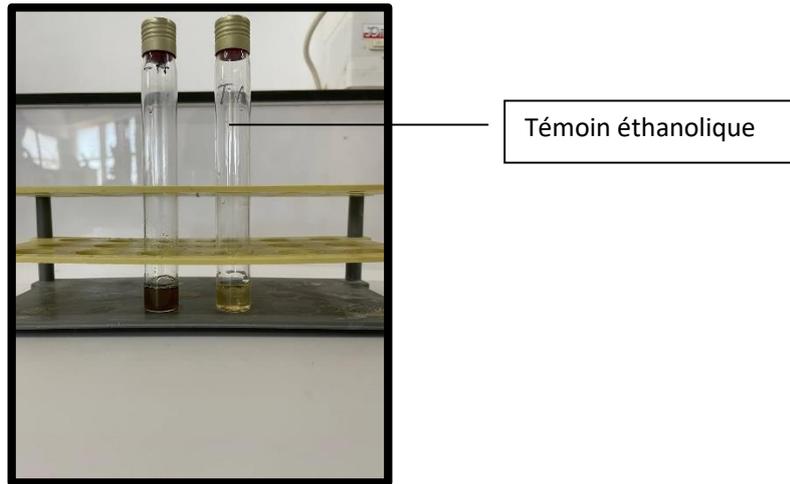


Figure n°21 : Mise en évidence des Tanins .

(à gauche l'extrait éthanologique , à droite le témoin éthanologique)

La présence de tanin est indiquée par vert foncée et donc le test est considéré comme positif.

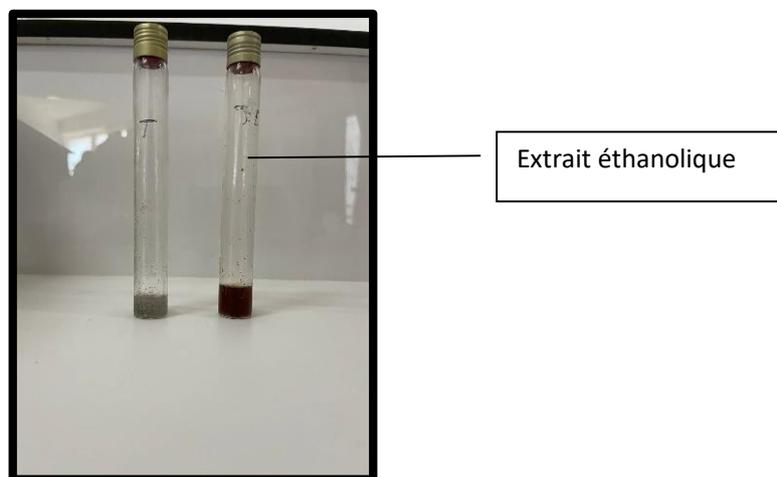


Figure n°22 :Mise en évidence des Flavonoïdes .

(à gauche le témoin éthanologique , à droite l'extrait éthanologique)

Après 3 min une couleur rouge a été mise en évidence ce qui indique la présence des flavonoïdes.

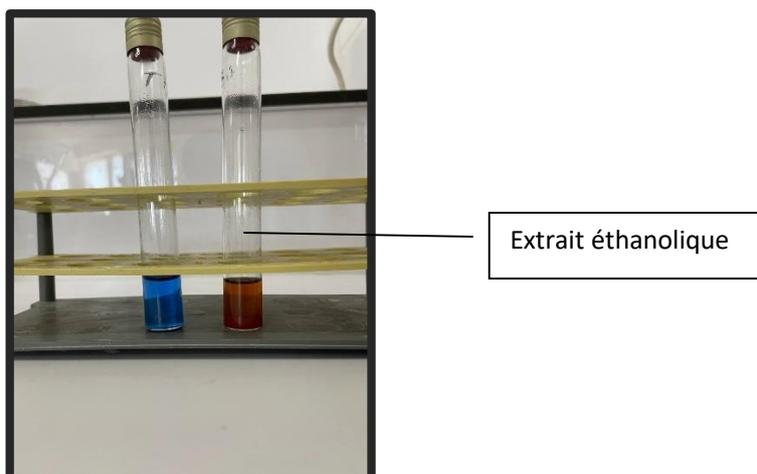


Figure n°23 : Mise en évidence des sucres réducteurs .

(à gauche le témoin éthanologique , à droite l'extrait éthanologique).

Nous remarquons qu'un précipité rouge brique a été obtenu à la fin de réaction ce qui indique la présence des composés réducteurs.

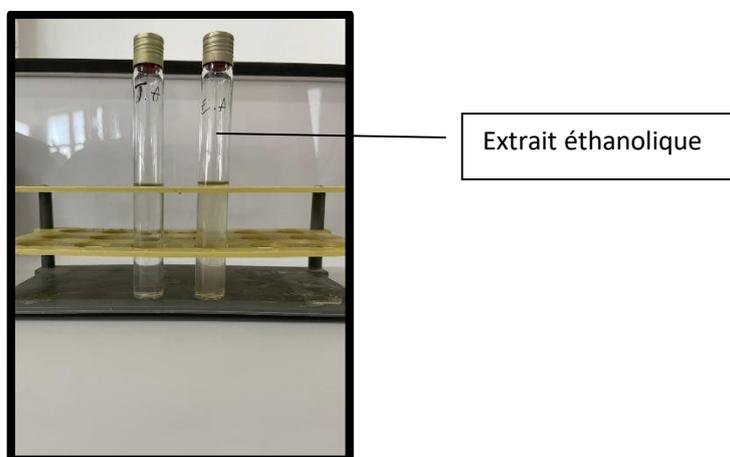


Figure n°24 : Dosage des Mucilages .

(à gauche le témoin éthanologique , à droite l'extrait éthanologique).

Nous constatons qu'il n'y a eu aucune apparition floconneuse qui indique l'absence de mucilage.

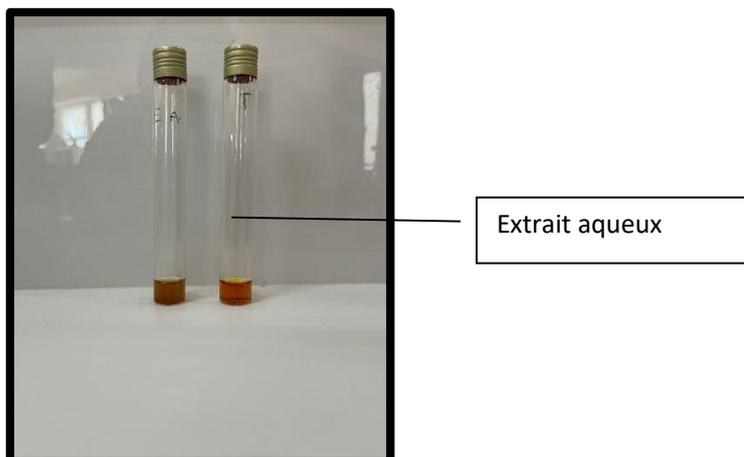


Figure n° 25 : Mise en évidence de l'Amidon .

(à gauche le témoin aqueux , à droite l'extrait aqueux)

Après toute une nuit, aucune apparition de couleur mauve n'a été observée, nous en concluons que le test est négatif et que les écorces de clémentine ne contiennent pas d'amidon .

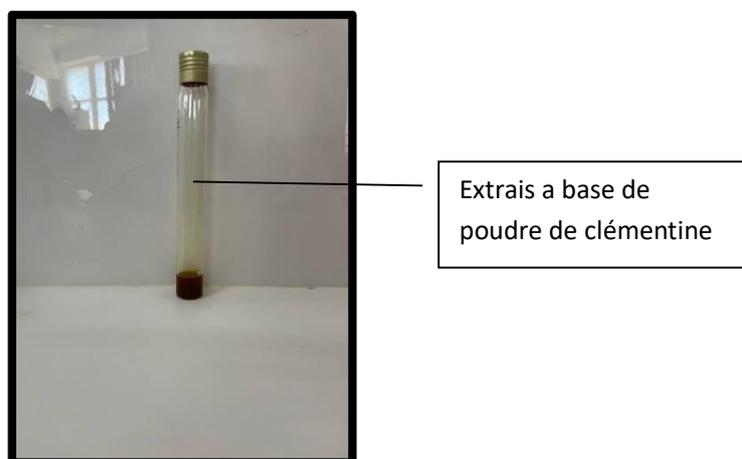


Figure n° 26: Mise en évidence des protéines.

Le résultat est noté négatif car il n'y a eu aucune apparition de coloration violette ce qui témoigne de l'absence des protéines .

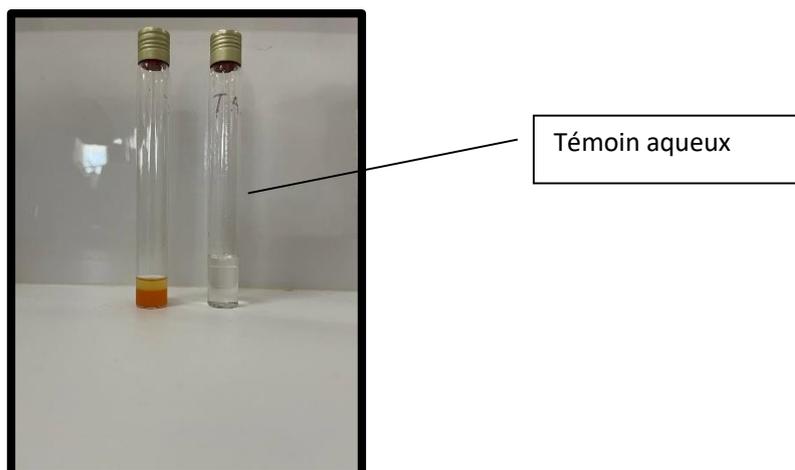


Figure n°27 : Mise en évidence des anthraquinones.

(à gauche extrait à base de poudre végétale, à droite témoin aqueux).

Après agitation aucune coloration rouge n'est observée ce qui témoigne de l'absence des anthraquinones dans les écorces de clémentine.

En résumé les résultats du screening phytochimique révèlent la présence des composés phénoliques (tanins, flavonoïdes et coumarines), dans les écorces du citrus clémentine étudiées ainsi que des sucres (sucres réducteurs) . Pour les autres constituants : terpénoïdes (stéroïdes et tri-terpènes) l'amidon, les mucilages, les saponosides et alcaloïdes, l'étude ne détecte pas leur existence.

II. TEST DE L'INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE :

Lors de notre étude, l'effet anti-oxydant de l'extrait a été évalué *in vitro* par le test d'inhibition de la peroxydation lipidique induite par un traitement thermique. L'étude a été conçue pour évaluer l'effet protecteur de la dénaturation des radicaux libres par l'extrait. Les résultats sont représentés dans les figures suivant :

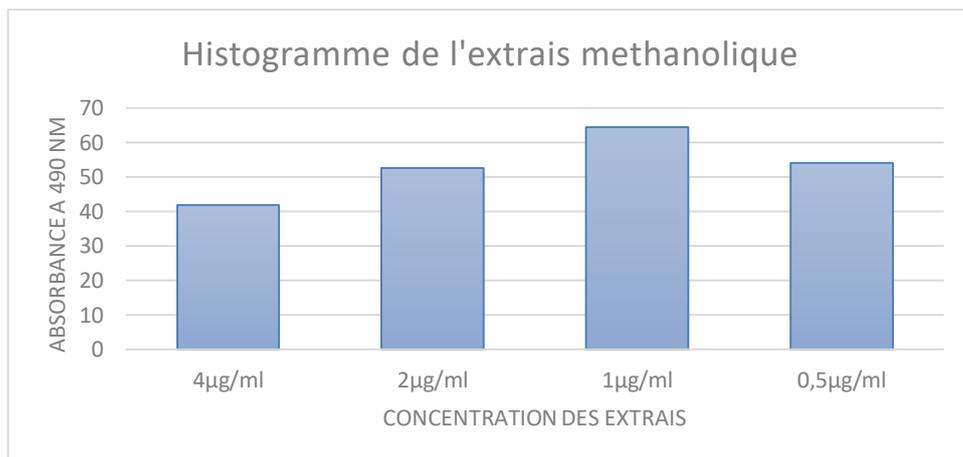


Figure n°28 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique .

Nous remarquons dans l'histogramme illustrés dans la **figure n°28** que la capacité à réduction de la peroxydation lipidique de l'extrait méthanoliques est plus importante à la concentration de 1µg/ml.

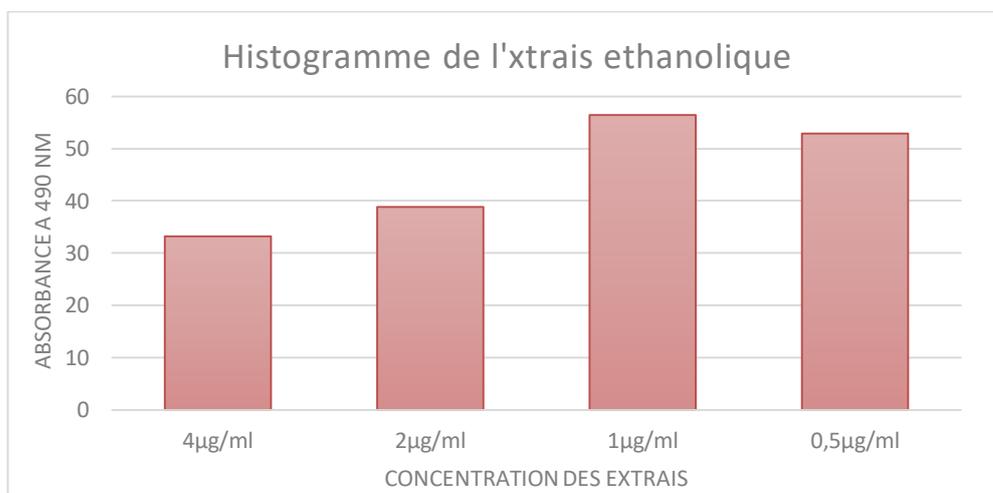


Figure n°29 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique.

A noter que dans l'histogramme représenté sur la **figure n°29** la capacité de l'extrait éthanolique de réduction de la peroxydation lipidique est maximale à 1 µg/ml.

III. TEST DE L'ACTIVITE ANTI RADICALEIRE :

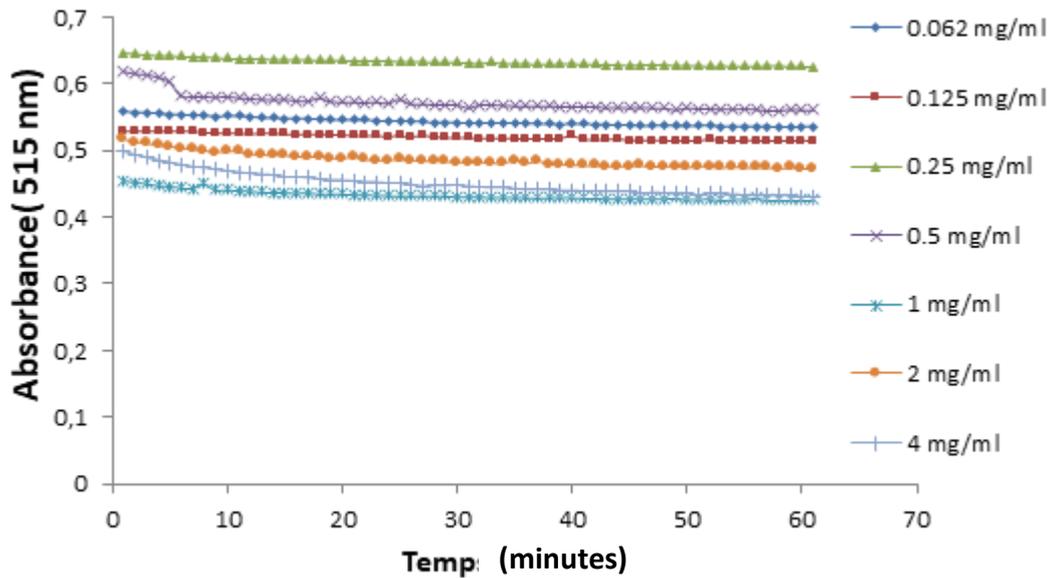


Figure n°30 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps

Les résultats présentés sur la figure 30 montrent que l'activité anti-radicalaire de l'extrait est la plus élevée aux plus faibles absorbances (0,5 mg/ml) et (1 mg/ml) par rapport aux autres concentrations. Aux deux concentrations précédentes, l'activité anti-radicalaire est la même à la 30 eme minutes.

Discussion

Les polyphénols ont de nombreuses activités biologiques qui ont des effets bénéfiques sur la santé humaine telles que des effets antioxydants, anti-radicalaire, anti-inflammatoires, antibactériens et anticancéreux (**Galati et al., 2002**). L'activité antioxydante des polyphénols est due à leur capacité d'éliminer directement les radicaux libres par transfert d'électrons, de chélater les ions métalliques et d'inhiber certaines enzymes pro-oxydantes (**Mira et al., 2002**).

L'objectif de notre travail est d'étudier *in vitro* l'activité antioxydante et anti-radicalaire des extraits de l'écorce de clémentine.

Les résultats des tests Phytochimiques des écorces de clémentine ont montré la présence des flavonoïdes, des tanins, des coumarines et des sucres réducteurs. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ashok Kumar et al., 2011** pour les écorces de clémentine. Ces derniers ont révélé la présence des composés phénoliques (tanins et flavonoïdes), avec une différence qui est celle que nous avons pu constater la présence des coumarines. tandis que **He et al., 2011** affirment également la présence des alcaloïdes des terpénoïdes dans le *Citrus Clémentina*. A l'inverse nos résultats ont montré l'absence de ces composés sauf pour les et des composés réducteurs qui y sont présent. Ceci peut être expliquée par la différence des méthodes et des solvants d'extraction utilisés, par des facteurs génétiques, climatiques et édaphiques de la région de la récolte.

Concernant l'effets anti-oxydants, les lipides sont la principale cible des radicaux libres, en particulier les acides gras polyinsaturés (**Kada, 2018**). L'oxydation des lipides par les radicaux libres, en particulier OH, se produit en entraînant l'hydrogène sur le carbone entre les deux doubles liaisons. Cette oxydation modifie la fluidité membranaire (**Favier, 2003**). Le test de peroxydation lipidique à partir des extraits de l'écorce de clémentines ont montré une protection contre la peroxydation lipidique. Cette protection de peroxydation lipidique est maximale à **1 µg/ml** pour les deux extraits (éthanolique et méthanolique).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols dépendent de leur structure chimique. La localisation et l'étendue de l'hydroxylation jouent un rôle important dans l'activité antioxydante des polyphénols (**Darvesh et al., 2010**). Les polyphénols stoechiométriques

ont la capacité importante d'éliminer les radicaux libres par le mouvement de plusieurs atomes H ou électrons du phénol parent et de certains de ses produits d'oxydation (**Goupy et al., 2009**).

Le profil d'activité anti-radicalaire obtenu a été testé par la méthode DPPH. C'est un radical organique stable qui réagit avec les polyphénols par le mouvement des électrons et des atomes d'hydrogène. Les antioxydants réagissent avec le DPPH pour neutraliser les radicaux. La couleur du mélange réactionnel passe du violet au jaune. L'intensité de la coloration mesure l'intensité de l'activité de capture antioxydante (**Vladimir-Knežević et al., 2011**).

Le pouvoir antioxydant est inversement proportionnel à l'IC50, donc plus ce dernier est petit, plus le pouvoir antioxydant est fort. Ceci est également lié à l'activité de piégeage des radicaux libres du DPPH (**Hebi & Eddouks, 2015**). Nos résultats montrent que l'effet anti-radicalaire de l'extrait est le plus important à de faibles concentrations (0,5 mg/ml) et (1 mg/ml) par rapport aux autres concentrations de polyphénols extraits.

Des études ont montré que les peaux d'agrumes sont très riches en composés phénoliques, notamment en acides phénoliques et en flavonoïdes, connus pour leurs puissantes propriétés antioxydantes (**Gormat et al., 2015**).

D'après **Chérif et al., 2005** la réaction a cinétique lente, les polyphénols seraient les contribuant de manière significative à l'activité antioxydante globale. Contrairement à la vitamine C, qui a un effet anti-radicalaire très rapide.

Le test DPPH n'est pas quantitatif et permet de comparer différents extraits quant à leur capacité à éliminer ce radical et d'apprécier la variation qualitative des composés phénoliques.

Conclusion

L'écorce d'orange est riches en composés bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes les vitamines...etc. Qui ont divers activités tel que l'activité antioxydante, anti-radicalaire.

Les résultats de cette étude montrent que les écorces de *Citrus Clémentina* contiennent des polyphénols y compris les flavonoïdes, tanins et coumarines et ce pour les deux types d'extraction aqueuse et éthanolique.

Concernant l'activité anti-oxydante mise en évidence par le test de peroxydation lipique, montre que l'extrait méthanolique ainsi que l'extrait éthanolique ont des effets anti-oxydants important à la concentration (1mg/ml) .

Pour ce qu'il en est de l'activité anti-radicalaire, on a pu en constater t que l'extrait a un effet anti-radicalaire important à la concentration (0.5mg/ml) et (1mg/ml).

Les résultats de cette étude révèlent que les écorces étudiées, généralement jetables, renferment des composés phénoliques susceptibles d'être exploités dans plusieurs domaines tel que le domaine alimentaire et pharmaceutique.

Tous ces résultats *in vitro* ne sont que la première étape pour démontrer l'activité antioxydante. Il serait intéressant de connaitre avec précision les molécules qui sont à l'origine de cette activité.

Références bibliographiques

- **Aarabi A., Honarvar M., Mizani M., Faghihian H. et Gerami A. (2016).**
Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Italian Journal of Food Science*. 28: 362-375.
- **ACHAT S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia. Algérie.
- **Albuquerque A.J.R., Silva P.M.F., Cavalcant A.L.F.A. Et Sampaio F.C. (2013).** Polyphenols as a source of antimicrobial Agents against Human Pathogens. *Nova Science Publishers*. 276-293.
 - **Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Godbout S. et Valero J.R. (2016).** Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1-22.
- **Arabbi P.R., Genovese M.I.S. Et Lajolo F.M. (2004).** Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J. Agric. Food Chemistry*. 52: 1124-1131.
- **Ashok kumar K., Narayani M., Subanthini A. et Jayakumar M, (2011)** Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels -Utilization of Fruit Waste, Inter. J. Eng. Sci. Technol., 3 5417-5421.
- **Atrouz O.M. (2009).** The Antioxidant activity and polyphenol contents of different plants seeds extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12(15): 1063- 1068.
- **Barboni T. (2006).** Contribution des méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. *Molécules*.10 :125-146.
- **Barhe A. et Tchouya G.R.F. (2016).** Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from Hibiscus Sabdariffa L., Glycine max L., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian. Journal of Chemistry*. 9: 1-8.

- **Benamrouch L.S, Addar L, Boudeham H, Tani S et Madani K, (2016).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology Journal. Vol. B : Agronomic & Biological Sciences*, 18 (2017) 01-08.
- **Blokhina O, Virolainen E et Fagerstedt K V (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91**, 179-194.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M.E. et Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*. 28: 25-30.
- **Castro-Vasquez L., Alanon M.E., Rodriguez-Robledo V., Perezcoello M.S., Hermonsin-Gutierrez I., Diaz-Maroto M.C., Jordan J.,Galindo M.F. et Arroyo-Jiminez M.M. (2016).** Bioactive flavonoids, Antioxidant behavior, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-12.
- **Chanet A., Milenkovic D., Claude S., Mater J.A.M., Khan M.K., Rakotomanomana N., Shinkaruk S., Berard A.M., Bennetau-Pelissero C., Mazur A. et Morand C. (2013).** Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF- α -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. *British Journal of Nutrition*. 110: 587-598.
- **Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8.
- **Cook NC, Samman S, (1996)** Flavonoids – chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. *Nutrition Biochemistry*. 7:66–76.
- **Cotelle, N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, **1**: 569-590.
- **Dai J et Mumper R.J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- **Dallas C., Gerbib A., Tencac G., Juchaux F. et Bernard F-X. (2008).** Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine*. 15: 783-792.

- **Damian-Reyna A.A., Gonzalez-Hernandez J.C et Chavez-Parga M.C. (2016).** Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoids current extraction of citrus. *Revue of Colombia. Biotechnology.* 18(1): 135-147.
- **Darvesh A , Carroll R , Bishayee A , Geldenhuy W et Schyf C (2010).** Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents, *Expert Rev. Neurother.* 10(5), 729–745.
- **Dong H., Chen H-D., Zhao Y-J et Li H-M. (2014).** Polymethoxy flavones do not exert an inducing effect on the biosynthesis and secretion of insulin by pancreatic β -cells. *Biomedical Reports.* 2: 287-291.
- **D'archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., C. Giovannini et Masella R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist super Sanità.* 43(4): 348-361.
- **Engidaa A.M., Kasima N.S., Tsigie Y.A., Ismadjib S., Huynhc L.H et Ju Y-H. (2013).** Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Industrial Crops and Products.* 41: 392-396.
- **Etebu E et Nwausoma A B (2014).** A review on sweet orange (*Citrus sinensis* LOsbeck): Health diseases and management. *American Journal of Research Communication.* 2(2): 33-70.
- **Evans M., Sharma P. et Guthrie N. (2012).** Bioavailability of Citrus polymethoxylated flavones and their biological role in metabolic syndrome and hyperlipidemia, readings in advanced pharmacokinetics-theory, methods and Applications.
- **Franco D., Sineiro J., Rubilar M., Sanchez M., Jere M., Pinelo M., Costoya N. et Munez M.J. (2008).** Polyphenols from plant materials extraction and antioxidant power. *Electronic journal of agriculture and food chemistry.* 7(8) : 3210-3216.
- **Fuhrman, B., Lavy, A. et Aviram, M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 549-554.
- **Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., et O'Brien, P. J.,(2002).** Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology,* 177(1), 91-104.
-

- **Gosslau A., Kuang Y.C., Chi-Tang H et Shiming L. (2014).** Anti-inflammatory effects of characterized orange peel extract enriched with bioactive polymethoxyflavones. *Food Science and Human Wellness*. 3: 26–35.
 - **Goupy P., Bautista-Ortin A., Fulcrand H. et Dangles A. (2009).** Antioxidant Activity of Wine Pigments Derived from Anthocyanins: Hydrogen Transfer Reactions to the DPPH Radical and Inhibition of the Heme-Induced Peroxidation of Linoleic Acid, *J. Agric. Food Chem*, 57, 5762–5770.
- **Gulçin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y. et Aboul-Eein,D. (2010).** Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*.3 : 43-53.
 - **Hadi, M. (2004).** La quercétine et ses dérives: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. These en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
- **Haytowitz D.B., Bhagwat S et Holden J.M. (2013).** Sources of variability in the flavonoid content of foods. *Procedia Food Science*. 2 : 46–51.
- **He D., Shan Y., Wu Y.,Liu G., Chen B. et Yao S. (2011)** , Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD–ESI/MS., *Food Chem.*, 127 880–885
- **Hebi M. et Eddouks M (2015).** Évaluation de l'activité antioxydante de Stevia rebaudiana Evaluation of the antioxidant activity of Stevia rebaudiana, *Phytothérapie* p 1-6.
- **Hegazy A.E et Ibrahim M.I. (2012).** Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*. 18(5): 684-688.
- **Hegde P., Agrawal P. et Gupta P. K. (2016).** Polyphenols - a useful biomaterial. *Journal of Environmental Research and Development*. 10(3): 547-554.
- **Jacquemond C, Curk F, and Heuzet M (2013).** Les clémentiniers et autres petits agrumes, Editions Quae: 32-53.
- **Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y. (1998).** Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*, 7: 137-161.

- **Karsheva M., Kiroval E., Alexandrova S. et Georgieva S. (2013).** Comparison of *Citrus* peels as source of valuable components: polyphenols and antioxidants. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48(5): 475-478.
 - **Keerthi M., Lakshmi L.P.J., Santhosh A.M. et Rama R.N. (2014).** Review on polyphenols as nature's gift. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(4): 445-455.
 - **Klimczak I., Malecka M., Slachta M. et Gliszczynska-Swiglo A. (2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10: 313-323.
 - **Kumar H., Choudhary N., Varsha. Kumar N, Suma N. et Seth R. (2014).** Phenolic compounds and their health benefits: A review. *Journal of Food Research and Technology*. 2(2): 46-59.
 - **Ladoh Y, Dibong, Nyegue, Djembissi T, Lenta N, Mpondo, Yinyang et Wansi (2014).** Activité antioxydant des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *J. Appl Biosci*, 84:7636– 7643.
 - **Li Y., Lai P., Chen J., Shen H., Tang B., Wu L. et Weng M. (2016).** Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl. *Food Science and Technology*. 36(3): 520-525.
 - **Liu E-H., Qi L-W., Cao J., Li P., Li C-Y et Peng Y-B. (2008).** Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*. 13: 2521-2544
- Louis Trabut (1853-1929), publié en 1926.** Louis Version numérisée du livre La Clémentine. Les hybrides du "citrus nobilis" par le Docteur.
- **Macheix J-J., Fleuriot A. Et Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Les Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lousane*. p 1-14.
 - **Magwaza L.S., Opara U.L., Cronje P.J.R., Landah S., Ortiz J.O. et Terry L. A. (2016).** Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds. *Food Science and Nutrition*. 4(1): 4-10.
 - **Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, and Jimenez L (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727– 47.

- **Marin L., Miguelez E., Villar C.J. et Lombo F. (2015).** Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International.* 1-10.
- **Migdal C et Serres M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medecine Science.* 27 : 405-412.
- **Milind P and Dev C, (2012).** Orange: range of benefits. *Int Res J Pharm,* 3(7): 59-63.
- **Mojzer E.B., Hrcic M.K., Skerget M., Knez Z., Et Bren U. (2016).** Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules.* 21(901): 1-38.
- **Morand C. et Milenkovic D. (2014).** Polyphénols et santé vasculaire : mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques.* 42: 47-62.
- **Mraihi F., Hidalgo M, Pascual-Teresa S., Trabelsi-Ayadi M et Cherif J-K. (2015).** Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry.* 8: 570-578.
- **Omoba O.S., Obafaye R.O., Salawu S.O., Bolignon A.A. et Athayde M.L. (2015).** HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants.* 4: 498-512.
- **Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanab R., Yonekura- Sakakibara K., Fukuchi-Miutani M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T. et Nakayama T. (2006).** Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *The Plant Journal.* 45: 133-143.
- **Pavithra G.M., Saba S., Abhishiktha S.N et Prashith K.T.R. (2013).**
- **Perez-Cano F.J., Massot-Cladera M., Rodriguez-Lagunas M.J. et Castell M. (2014).** Flavonoids affect host-microbiota cros talk through TLR modulation. *Antioxidants.* 3: 649-670.
- **Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P et Cullough M.L.M. (2010).** Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews.* 68(10): 571-603.
- **Pietta P-G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products.* 63: 10351042.

- **Polinati R.M., Faller A.L.K. et Fialho E. (2010).** The effect of freezing at 18 °C and 70 °C with and without ascorbic acid on the stability of antioxidant in extracts of apple and orange fruits. *International Journal of Food Science and Technology*. 45: 1814-1820.
- **Rafiq S., Kaul R, Sofi S.A., Bashir N., Nazir F. et Naik G.A. (2016).** Citrus peel as a source of functional ingredient. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 30 : 1-8.
- **Rahman T., Hosen I., Towhidul Islam M. M. et Uddin Shekhar H. (2012).** Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3 :997-1019.
- **Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus et Aruoma O I, (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*
- **Rawson N.E., Chi-Tang H. et Shiming L. (2014).** Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *Food Science and Human Wellness*. 3: 104-109.
- **Renard C.M.G.C., Caris-Veyrat C., Dufour C. et Bouvellec C. (2014).** Le devenir des polyphénols et caroténoïdes dans les fruits et légumes traités thermiquement. *Innovations Agronomiques*. 42: 125-137.
- **Robards E ,1999.** Composés phénoliques et leur rôle dans les processus oxydatifs dans les fruits. *Food Chem.* (66): 401-436.
- **Saewan N. et Jimtaisong A. (2013).** Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3(9): 129-141.
- **Scholfield P., Mbugua D.M. et Pell A.N. (2001).** Analysis of condensed tannins. *Animal food Science and Technology*. 91: 21-40.
- **Sousa M.C., Braga R.C., Cintra B.A.S. et Andrade V.O.C.H. (2013).** In silico metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Research International*. 50: 102-110.
- **Stalikas D. (2007).** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30: 3268-3295.
- **Sultana B, Anwar F, Mushtaq M and Alim M, (2015).** Citrus residues: A potential source of phenolics with high antioxidant values.

- **Sun L. Zhang J. Lu X. et Zhang Y. (2011).** Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food Chemistry and Toxicology*. 49: 2689-2696.
- **Teh S-S., Bekhit A.E. Et Birch J. (2014).** Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants*. 3: 67-80.
- **Teleszko R., Nowickab P. et Wojdylo A. (2016).** Effect of cultivar and storage temperature on identification and stability of polyphenols in strawberry cloudy juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 54:10-19.
- **Tsao R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2: 12311246.
- **Tuszynska M. (2014).** Validation of the analytical method for the determination of flavonoids in broccoli. *Journal of Horticultural Research*. 22(1): 131-140.
- **Verdan A M, Wang H C, García C R, Henry W P et 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**, 1314-1322.
- **Wissam Z, Ghada B., Wassim A. et Warid K. (2012).** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3): 675-682.
- **Yang Z, Liu Y., Deng W., Dai J., Li F., Yuan Y., Wu Q., Zhou H., Bian Z et Tang Q.(2014).** Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes. *Molecular medicine reports*. 9 : 19411946.

Résumé :

La clémentine (*Citrus clémentina*) est un agrume de famille des rutacées du bassin méditerranéen. Ce fruit est recouvert par une écorce souple très riche en composés bioactifs connus par leurs activités antioxydantes. Ce travail a pour but de mettre en évidence les composants de l'écorce de la clémentine par un screening phyto-chimique mais aussi la mise en évidence de l'activité anti-radicalaire et anti-oxydante *in vitro* des extraits de l'écorce étudiée par le biais test de DPPH et le test de l'inhibition de la peroxydation lipidique. Le screening phyto-chimique a montré la présence de flavonoïde, tanins, coumarines et sucres réducteurs. Nos résultats ont aussi démontré que la concentration **1 mg/ml** en extrait d'écorce a une très bonne activité contre la peroxydation lipidique. Concernant le DPPH, l'extrait présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée à des concentrations de **(0,5 et 1) mg/ml**. Ces résultats démontrent l'intérêt de l'utilisation des extraits de l'écorce de la clémentine dans différents domaines en tant qu'antioxydants.

Mots clés : Clémentine, écorce, antioxydants, polyphénols.

Abstract :

The clementine (*Citrus clementina*) is a citrus fruit family's Rutaceae from the Mediterranean basin. This fruit is covered by a soft bark very rich in bioactives compounds known for their antioxidant activities. The aim of this work is to highlight the components of the clementine bark's by a phytochemical screening but also the anti-radical and antioxidant *activity in vitro* of the bark extracts' studied by the DPPH test and the inhibition of the lipid peroxidation test's. The phytochemical screening showed the presence of flavonoids, tannins, coumarins and reducing sugars. The results also showed that the concentration of **1 mg/ml** of bark extract has a very good activity against lipid peroxidation. Concerning DPPH, the extract presents the highest anti-free radical activity at concentrations of **(0.5 and 1) mg/ml**. These results demonstrate the interest of use extracts clementine bark in different fields as antioxidants.

Keys words: Clementine, bark, antioxidants, polyphenols.

ملخص

الكليمنتين (*Citrus Clémentina*) هي فاكهة حمضيات من عائلة روتاسيا المتواجدة في حوض البحر الأبيض المتوسط. هذه الفاكهة مغطاة بلحاء ناعم غني جدا بالمركبات النشطة بيولوجيا المعروفة بأنشطتها المضادة للأكسدة. يهدف هذا العمل إلى تسليط الضوء على مكونات لحاء الكليمنتين عن طريق الفحص الفيتو كيميائي و أيضا إظهار النشاط المضاد ومضاد للأكسدة للحاء التي تمت دراستها من خلال اختبار DPPH واختبار تثبيط بيروكسيد الدهون. أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود مركبات الفلافونويد و التانين والكومارين و السكريات الاختزالية. أظهرت نتائجنا أن تركيز **1 ملغ / مل** من مستخلص اللحاء له نشاط جيد جدا ضد بيروكسيد الدهون. أما بالنسبة ل DPPH ، فإنه يظهر أعلى نشاط مضاد بتركيزات **(0.5 و 1) ملغم / مل**.

توضح هذه النتائج قيمة استخدام مستخلصات لحاء الكليمنتين في مجالات مختلفة كمضادات للأكسدة. الكلمات المفتاحية: كليمنتين ، لحاء ، مضادات أكسدة ، بوليفينول.