



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID -TLEMCEEN-**

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

**Laboratoire des « Produits Naturels » (LAPRONA)**

**Mémoire de fin d'étude  
En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Bioactivités, Analyses et Contrôle des Huiles Essentielles et Végétales**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> Boukli Hacene Merwa**

**Thème**

**Caractérisation et activités biologiques de l'huile  
essentielle de *Citrus reticulata* (mandarine)**

**Soutenu le :23 /06 /2024, devant le jury composé de :**

<b>Présidente :</b>	Pr. CHAUCHE Farah	Université de TLEMCEEN
<b>Examinatrice :</b>	Dr. BERRAHOU Samira	Université de TLEMCEEN
<b>Encadrant :</b>	Pr. BEKHECHI Chahrazed	Université de TLEMCEEN
<b>Co-encadrant :</b>	Pr. HASSANI Imane	E.S.S.A. de TLEMCEEN

**Année universitaire : 2023/2024**



## **Dédicace**

*J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail à toute personne qui m'a encourager et qui m'a donner de l'espoir, à toute personne chère à mon cœur.*

## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à notre Dieu, le Tout-Puissant pour m'avoir donné le courage, la volonté, la santé et surtout la patience nécessaire pour accomplir ces cinq années d'étude et achever ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement M<sup>me</sup> **BEKHECHI Chahrazed**, Professeur à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie), pour avoir accepté de superviser et de diriger ce travail avec excellence. Je suis reconnaissante pour ses conseils avisés et sa disponibilité tout au long de ce projet d'étude.

J'adresse également mes remerciements les plus profondes à Monsieur le Professeur **TOMI Félix**, directeur de l'équipe « Chimie & Biomasse », à l'université de Corse, pour la caractérisation des huiles essentielles par CPG-Ir et par RMN <sup>13</sup>C.

J'adresse également mes remerciements à M<sup>me</sup> **HASSANI Imane**, Professeur à l'Université de Tlemcen (Ecole Supérieure en Sciences Appliquées), pour son aide à la réalisation de l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in silico*.

Mes sincères remerciements vont également à M<sup>me</sup> **CHAOUCHE Farah**, Professeur à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie), pour l'honneur qu'elle m'a porté en présidant ce jury.

J'adresse également mes remerciements à M<sup>me</sup> **BERRAHOUI Samira**, Maître de Conférences « classe B » à l'Université de Tlemcen (Département de Biologie), pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux propriétaires des vergers : M. **HOUTI Nasredine**, M. **HADEF Ahmed**, M. **BERROUGAT** et M. **BENNACER**, pour leur précieuse aide et pour m'avoir autorisé de faire la récolte de mandarines dans leurs vergers.

Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude envers mes parents pour leur soutien incontournable, envers toute ma famille, ainsi que toutes les personnes qui me sont chères.

## Résumé

Les agrumes offrent une gamme variée de bienfaits pour la santé grâce à leur richesse en composés bioactifs. L'objectif de ce travail est la valorisation de l'huile essentielle (HE) extraite de l'écorce de mandarine (*Citrus reticulata*) récoltée dans trois stations (Aïn El Hout, Aïn Youcef et Hennaya) de la wilaya de Tlemcen, en déterminant : les rendements en HE, la composition chimique et les activités biologiques (antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro* et *in silico*).

Nous avons prélevé 25 échantillons sur des pieds individuels. L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation. Les rendements sont très variables, allant de 0,15 à 1,36%. Cependant, les échantillons prélevés dans la station d'Aïn Youcef sont les plus riches en huile essentielle (0,84 - 1,36%). L'analyse de l'HE par combinaison de la CPG et la RMN <sup>13</sup>C nous a permis d'identifier 14 composés, représentant entre 93,5 et 94,5% de la composition totale. Cette HE est très riche en monoterpènes hydrocarbonés, dont un composé nettement majoritaire, le limonène qui représente entre 62,7 et 63,1%, suivi de :  $\gamma$ -terpinène (7,5 - 14,9%), *p*-cymène (4,1 - 5,9%) et N-méthyl-anthranilate de méthyle (3,4 - 4,3%). Nous remarquons une variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants : le limonène (31,3 - 74,3%), le N-méthyl-anthranilate de méthyle (0,1 - 16,7%) et l' $\alpha$ -terpinéol (0,6 - 10,2%).

La deuxième partie a été consacrée à l'étude des activités antioxydante et anti-inflammatoire de six échantillons. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical DPPH a montré que l'échantillon E5.V3 présente la plus importante activité antioxydante, avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre 9,4 ± 0,6 mg/ml. En revanche, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé, l'acide ascorbique, avec une CI<sub>50</sub> de 0,026 ± 0,01 mg/ml. Par ailleurs, l'échantillon E4.V3 a montré une capacité à inhiber la lipoxygénase la plus importante, avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre 6,6 ± 0,4  $\mu$ g/ml, suivi par l'échantillon communelle EC1.V1, avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre de 9,3 ± 7,6  $\mu$ g/ml. Ces valeurs sont très proches à la CI<sub>50</sub> de l'ordre de 4,9 ± 1,1  $\mu$ /ml du composé de référence utilisé, l'acide nordihydroguaiarétique.

Enfin, Les résultats d'amarrage moléculaire ont confirmé l'affinité favorable entre les composés majoritaires (en particulier le  $\gamma$ -terpinène) et la protéine cible LOX-B (2iuj), suggérant leur potentiel en tant qu'anti-inflammatoires naturels.

**Mots clés :** *Citrus reticulata*, huile essentielle, composition chimique, CPG, RMN <sup>13</sup>C, pouvoir antioxydant, DPPH, activité anti-inflammatoire, LOX, docking moléculaire.

## Abstract

*Citrus* fruits offer a diverse range of health benefits due to their abundance of bioactive compounds. The aim of this study is to valorize the essential oil (EO) extracted from mandarin peel (*Citrus reticulata*) collected from three locations (Ain El Hout, Hennaya and Ain Youcef) in Tlemcen province, by determining EO yields, chemical composition, and biological activities (antioxidant and anti-inflammatory properties; *in vitro* and *in silico*).

We collected 25 samples from individual trees. EO extraction was carried out using hydrodistillation. The yields were varied significantly from 0.15% to 1.36%. However, samples from Ain Youcef station exhibited the highest EO content (0.84 - 1.36%). Gas Chromatography (GC) combined with <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis identified 14 compounds, comprising 93.5% to 94.5% of the total composition. This EO is particularly rich in hydrocarbon monoterpenes, which limonene (62.7% to 63.1%) was the major compound, followed by  $\gamma$ -terpinene (7.5% to 14.9%), *p*-cymene (4.1% to 5.9%), and methyl N-methyl-anthranilate (3.4% to 4.3%). Notably, significant quantitative chemical variability was observed for limonene (31.3% to 74.3%), methyl N-methyl-anthranilate (0.1% to 16.7%), and  $\alpha$ -terpineol (0.6% to 10.2%).

The second part focused on studying the antioxidant and anti-inflammatory activities of six samples. Evaluation of antioxidant activity using the DPPH radical scavenging method revealed that sample E5.V3 exhibited the highest antioxidant activity, with an IC<sub>50</sub> of approximately  $9.36 \pm 0.59$  mg/ml. However, these activities were lower compared to the reference antioxidant used, ascorbic acid, with an IC<sub>50</sub> of  $0.026 \pm 0.01$  mg/ml. Conversely, sample E4.V3 showed the highest inhibition of lipoxygenase, with an IC<sub>50</sub> of approximately  $6.6 \pm 0.4$   $\mu$ g/ml, followed by communal sample EC1.V1, with an IC<sub>50</sub> of about  $9.3 \pm 7.6$   $\mu$ g/ml. These values were close to the IC<sub>50</sub> of approximately  $4.9 \pm 1.1$   $\mu$ g/ml for the reference compound used, nordihydroguaiaretic acid.

Molecular docking results confirmed favorable affinity between major compounds of EO (especially  $\gamma$ -terpinene) and the target protein LOX-B (2iuj), suggesting their potential as natural anti-inflammatory agents.

**Keywords:** *Citrus reticulata*, essential oil, chemical composition, GC, <sup>13</sup>C NMR, antioxidant capacity, DPPH, anti-inflammatory activity, LOX, molecular docking.

## الملخص

تقدم ثمار الحمضيات مجموعة متنوعة من الفوائد الصحية بفضل ثرائها بالمركبات النشطة بيولوجيا. الهدف من هذا العمل هو تمييز الزيت الأساسي (HE) المستخرج من قشر المندرين (*Citrus reticulata*) المحصول في ثلاث محطات (عين الحوت، عين يوسف والحناية) بولاية تلمسان، من خلال تحديد: المرودود من الزيت، التركيبية الكيميائية والأنشطة البيولوجية (مضادات الأكسدة ومضادات الالتهاب في المختبر وفي الحاسوب).

أخذنا 25 عينة من الأقدام الفردية. تم استخلاص الزيوت العطرية عن طريق التقطير المائي. تختلف العوائد على نطاق واسع، حيث تتراوح من 0.15 إلى 1.36%. إلا أن العينات المأخوذة من محطة عين يوسف هي الأغنى بالزيت العطري (0.84 - 1.36%). إن تحليل الزيت العطري من خلال مزيج من  $^{13}C$  RMN و CPG جعل من الممكن تحديد 14 مركبًا، تمثل ما بين 93.5 و 94.5% من التركيب الإجمالي. هذا HE غني جدًا بالمركبات الهيدروكربونية الأحادية، بما في ذلك المركب الغالب هو الليمونين الذي يمثل ما بين 62.7 و 63.1%، يليه:  $\gamma$ -terpinène (7.5 - 14.9%)، *p*-cymène (4.1 - 5.9%) وميثيل-N-ميثيلانثرائينات (3.4 - 4.3%). نلاحظ التباين الكيميائي الكمي خاصة بالنسبة للمركبات التالية: الليمونين (31.3 - 74.3%)، ميثيل-N-ميثيلانثرائينات (0.1 - 16.7%) وتيربينول ألفا (0.6 - 10.2%).

أما الجزء الثاني فقد خصص لدراسة الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات لستة عينات. أظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة بواسطة طريقة الاصطياد الجذري DPPH أن عينة E5.V3 تقدم أكبر نشاط مضاد للأكسدة، مع  $IC_{50}$  في حدود  $0.6 \pm 9.4$  مجم/مل، من ناحية أخرى، يظل هذا النشاط منخفضًا مقارنة بمضاد الأكسدة المرجعي المستخدم، وهو حمض الأسكوربيك، مع  $IC_{50}$  يبلغ  $0.026 \pm 0.01$  ملجم/مل. من جهة أخرى، أظهرت عينة E4.V3 القدرة على تثبيط إنزيم شحميات الدهون الأكثر أهمية، مع  $IC_{50}$  يبلغ حوالي  $0.4 \pm 6.6$  ميكروغرام/مل، تليها العينة المجموعة EC1.V1، مع  $IC_{50}$  في حدود  $7.6 \pm 9.3$  ميكروغرام/مل. هذه القيم قريبة جدًا من  $IC_{50}$  بحوالي  $1.1 \pm 4.9$  ميكروغرام/مل من المركب المرجعي المستخدم، حمض نورديهيدروجواياريتيك.

أكدت نتائج *docking moléculaire* التقارب الإيجابي بين المركبات الغالبة في الزيت الأساسي للمندرين (على وجه الخصوص  $\gamma$ -terpinène) إذ أن البروتين المستهدف (LOX-B 2iuj)، مما يشير إلى إمكانية استخدامها كمضادات طبيعية للالتهابات.

---

**الكلمات المفتاحية:** *Citrus reticulata*، الزيوت العطرية، التركيب الكيميائي، GPC،  $^{13}C$  NMR، قوة مضادات الأكسدة، DPPH، نشاط مضاد للالتهابات، LOX، *docking moléculaire*.

<b>Table des matières</b>	
<b>Dédicace</b> .....	<b>II</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>III</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>المخلص</b> .....	<b>VI</b>
<b>Liste des photos</b> .....	<b>VII</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>VII</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>IX</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre 1 : Généralités sur les agrumes</b>	<b>5</b>
I. Origine et évolution .....	<b>5</b>
II. Définition .....	<b>5</b>
III. L'importance et la production économique des agrumes .....	<b>6</b>
III.1. Dans le monde .....	<b>6</b>
III.2. En Algérie .....	<b>6</b>
III.3. A Tlemcen .....	<b>7</b>
IV. Les mandariniers .....	<b>7</b>
IV.1. Classification botanique .....	<b>7</b>
IV.2. Description botanique .....	<b>8</b>
IV.3. L'huile essentielle de mandarine .....	<b>10</b>
IV.3.1. Caractéristiques .....	<b>10</b>
IV.3.2. Propriétés et indications thérapeutiques .....	<b>11</b>
IV.4. Travaux antérieurs .....	<b>12</b>
IV.4.1. Composition chimique .....	<b>12</b>
IV.4.2. Activités biologiques .....	<b>16</b>
<b>Chapitre 2 : Caractérisation et activités biologiques</b>	<b>20</b>
I. Généralités sur les huiles essentielles .....	<b>20</b>
II. Composition des huiles essentielles .....	<b>20</b>
III. Activités biologiques .....	<b>20</b>
III.1. Activité antioxydante .....	<b>20</b>
III.1.1. Les antioxydants .....	<b>21</b>
III.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	<b>21</b>
III.2. Activité anti-inflammatoire .....	<b>21</b>
III.2.1. Mécanisme d'action des anti-inflammatoire .....	<b>22</b>
III.2.1. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	<b>22</b>
IV. Identification des constituants dans un mélange complexe .....	<b>22</b>
IV.1. La voie A .....	<b>24</b>

IV.2. La voie B : Identification des constituants après purification .....	24
IV.3. La voie C : Analyse par RMN du <sup>13</sup> C sans séparation préalable .....	25
IV.3.1. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse .....	25
<b>Partie II : Matériel et méthodes</b>	<b>27</b>
I. Matériel végétal .....	28
I.1. Extraction de l'huile essentielle .....	29
I.2. Calcul des rendements en huile essentielle .....	29
II. Caractérisation de l'huile essentielle .....	30
II.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) .....	30
II.1.1. Conditions opératoires .....	30
II.1.2. Identification des constituants .....	31
II.2. Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (RMN <sup>13</sup> C) .....	31
II.2.1. Conditions opératoires .....	31
II.2.2. Identification des constituants .....	31
III. Activités biologiques de l'huile essentielle .....	32
III.1. Activité antioxydante .....	32
III.1.1. Méthode de Piégeage du radical libre DPPH • .....	32
III.2. Activité anti-inflammatoire .....	33
III.2.1. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	33
III.2.2. Activité anti-inflammatoire <i>in silico</i> .....	34
III.2.2.1. Logiciels et banque de données utilisés .....	36
<b>Partie III : Résultats et discussion</b>	<b>39</b>
I. Calcul de rendement .....	40
II. Caractérisation de l'huile essentielle de <i>C. reticulata</i> .....	43
II.1. Analyse détaillée de l'huile essentielle de <i>C. reticulata</i> .....	43
II.2. Etude de la variabilité de l'huile essentielle de <i>C. reticulata</i> .....	45
III. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> .....	46
III.1. Activité antioxydante .....	47
III.2. Activité anti-inflammatoire .....	51
III.2.1. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	51
III.2.2. Activité anti-inflammatoire <i>in silico</i> .....	52
<b>Conclusion</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>59</b>
<b>Annexes</b>	<b>69</b>

## Table des illustrations

### Liste des photos

<b>Photo 1</b>	Vue d'ensemble de pieds <i>C. reticulata</i> (Verger 1, Aïn El Hout)	<b>28</b>
<b>Photo 2</b>	Vue d'ensemble de pieds <i>C. reticulata</i> (Verger 3, Aïn Youcef)	<b>28</b>

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Identification botanique du <i>Citrus reticulata</i>	<b>9</b>
<b>Tableau 2</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> selon la littérature	<b>13</b>
<b>Tableau 3</b>	Activités biologiques de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> testées selon la littérature	<b>16</b>
<b>Tableau 4</b>	Composés identifiés par CPG et RMN <sup>13</sup> C dans l'huile essentielle des écorces de <i>Citrus reticulata</i>	<b>44</b>
<b>Tableau 5</b>	Composés majoritaires identifiés dans les 19 échantillons de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i>	<b>45</b>
<b>Tableau 6</b>	Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> des différents échantillons testés exprimée en CI <sub>50</sub>	<b>50</b>
<b>Tableau 7</b>	Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle des différents échantillons de <i>Citrus reticulata</i>	<b>51</b>
<b>Tableau 8</b>	Activité anti-inflammatoire l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> des différents échantillons testés exprimée en CI <sub>50</sub>	<b>52</b>
<b>Tableau 9</b>	Résultats du docking moléculaire	<b>55</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Méthodes d'analyse d'un mélange complexe	<b>23</b>
<b>Figure 2</b>	Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du <sup>13</sup> C	<b>26</b>
<b>Figure 3</b>	Situation géographique des zones de récolte	<b>29</b>
<b>Figure 4</b>	Dispositifs d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	<b>30</b>
<b>Figure 5</b>	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	<b>32</b>
<b>Figure 6</b>	Principe de base de la conception de la notion clé-serrure (Docking moléculaire)	<b>34</b>
<b>Figure 7</b>	Site actif (cavité enzymatique)	<b>35</b>
<b>Figure 8</b>	Schéma récapitulatif des logiciels utilisés	<b>36</b>
<b>Figure 9</b>	Rendements (%) en HE d'écorce de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans la station d'Aïn El Hout	<b>40</b>
<b>Figure 10</b>	Rendements (%) en HE d'écorce de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans la station de Hennaya	<b>41</b>
<b>Figure 11</b>	Rendements (%) en HE d'écorce de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans la station d'Aïn Youcef	<b>41</b>
<b>Figure 12</b>	Comparaison entre les rendements en huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> récolté dans les trois stations d'étude	<b>41</b>
<b>Figure 13</b>	Moyennes des rendements en huile essentielle des écorces de <i>Citrus reticulata</i> relative aux trois stations d'étude	<b>42</b>
<b>Figure 14</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de <i>Citrus reticulata</i> (Echantillon E1.V3)	<b>47</b>
<b>Figure 15</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de <i>Citrus reticulata</i> (Echantillon E3.V3)	<b>47</b>
<b>Figure 16</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de <i>Citrus reticulata</i> (Echantillon E4.V3)	<b>48</b>
<b>Figure 17</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de <i>Citrus reticulata</i> (E5.V3)	<b>48</b>
<b>Figure 18</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de <i>Citrus reticulata</i> (Echantillon communelle EC1.V1)	<b>48</b>
<b>Figure 19</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de <i>Citrus reticulata</i> (Echantillon communelle EC2.V1)	<b>49</b>
<b>Figure 20</b>	Structure 3D de la protéine (code PDB 2iuj)	<b>53</b>
<b>Figure 21</b>	Structure 2D du limonène	<b>54</b>
<b>Figure 22</b>	Structure 2D du $\gamma$ -terpinène.	<b>54</b>
<b>Figure 23</b>	Structure 2D de N-méthyl-anthranilate de méthyle	<b>54</b>
<b>Figure 24</b>	Structure 2D de l'acide nordihydroguaiarétique (contrôle positif)	<b>54</b>

## Liste des abréviations

<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>ha</b>	Hectare
<b>DSA</b>	Direction des services agricoles
<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>ROS</b>	Espèces réactives oxygénées
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>COX</b>	Cycloxygénase
<b>LOX</b>	Lipoxygénase
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor
<b>IL</b>	Interleukine
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>ppm</b>	Partie par million
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice médiane
<b>BHT</b>	Butyl Hydroxy Toluène
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>TMS</b>	Tétraméthylsilane
<b>Hz</b>	Hertz
<b>FID</b>	Détecteur à ionisation de flamme
<b>PDB</b>	Protein Data Bank

# **Introduction**

Depuis des siècles, la quête de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle s'appuie sur l'utilisation des plantes médicinales et les études ethnobotaniques. Ces études permettent de recenser les plantes d'une région et d'évaluer leurs propriétés grâce à des analyses phytochimiques et pharmacologiques (Muanda et al., 2009).

De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays (Aboughe Angone et al., 2015). L'Algérie, pays connu pour ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. Il existe environ 3 000 espèces de plantes médicinales dont 15% endémiques, appartenant à plusieurs familles botaniques (Dif et al., 2015).

Les métabolites secondaires des plantes médicinales, comme les huiles essentielles, jouent un rôle crucial dans la défense contre les pathogènes et ont des propriétés biologiques diverses.

En effet, elles sont utilisées à diverses fins, notamment pour leurs propriétés thérapeutiques (antibactériennes, antifongiques, antivirales, antioxydantes et anti-inflammatoires). En plus de leur utilisation en aromathérapie populaire, leur application s'étend également aux domaines de la cosmétique, de la conservation des aliments, de la santé animale et de l'agriculture (Tisserand et Young, 2014). Dans chaque domaine, les huiles essentielles offrent une alternative aux produits chimiques plus toxiques.

Un exemple contemporain de plantes médicinales est celui des agrumes, une culture majeure remontant au XXI<sup>e</sup> siècle av. J.-C. (Yaqoob et al., 2020). Le genre *Citrus*, comprenant des fruits tels que les oranges, les citrons, les mandarines et les pamplemousses, est largement reconnu pour ses bienfaits nutritionnels et thérapeutiques. Ces fruits sont riches en métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes, les caroténoïdes, la vitamine C et les huiles essentielles, qui jouent un rôle crucial dans la prévention et le traitement de diverses maladies (Rauf et al., 2014 ; Bouterfas et al., 2016 ; Rafiq et al., 2016).

Par ailleurs, mettre en avant la pertinence et la fiabilité des résultats obtenus par une confirmation *in silico* peut être crucial pour renforcer la crédibilité de l'étude. Cette approche complémentaire aux expériences *in vitro* offre plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet une exploration plus approfondie des interactions moléculaires à un niveau atomique, ce qui peut fournir des informations précieuses sur les mécanismes d'action des composés étudiés. De plus, les simulations *in silico* offrent la possibilité de tester un large éventail de conditions expérimentales qui pourraient être difficiles à réaliser au laboratoire, ce qui augmente la robustesse des résultats. En outre, cette approche permet de prédire l'activité biologique de nouvelles molécules avant même leur synthèse, ce qui peut accélérer le processus de

découverte de médicaments. Enfin, la confirmation *in silico* peut contribuer à réduire les coûts et le temps nécessaires à la recherche en évitant certains tests laborieux et coûteux.

Ainsi, cette étude contribue à la valorisation de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* extraite à partir des écorces qui sont considérées comme des coproduits. La valorisation de ces déchets est une nécessité fondamentale non seulement pour des raisons socio-économiques mais aussi pour des raisons environnementales. Ainsi, l'objectif principal est de :

- ✚ Déterminer les rendements en huile essentielle de plusieurs échantillons récoltés dans la région de Tlemcen à partir de pieds individuels ;
- ✚ Déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* des différents échantillons récoltés en 2022, par la complémentarité d'une technique chromatographique (CPG) et d'une technique spectroscopique (RMN <sup>13</sup>C) ;
- ✚ Evaluer leurs activités : antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro* et *in silico*.

Dans ce contexte, ce mémoire est subdivisé en trois grandes parties :

La première partie est une synthèse bibliographique regroupant deux chapitres. Le premier chapitre offre un aperçu général sur les agrumes, une description botanique de *Citrus reticulata*, son utilisation traditionnelle, ainsi que les travaux antérieurs sur les huiles essentielles de cette espèce végétale, en particulier la composition chimique et les activités biologiques. Le deuxième chapitre englobe des généralités sur les activités biologiques (antioxydante et anti-inflammatoire) ainsi que les techniques d'analyse utilisées pour la caractérisation des huiles essentielles et en particulier la méthode d'analyse par RMN du carbone 13 développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse.

La deuxième partie concerne les données expérimentales. Nous détaillons l'échantillonnage du matériel végétal et l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de mandarine. Ensuite, nous présentons les techniques utilisées pour la caractérisation, ainsi que pour l'évaluation des activités biologiques : antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro* et *in silico*.

La troisième partie consiste à l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion en les comparant aux données de la littérature.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion et quelques perspectives.

# **Partie I**

## **Synthèse bibliographique**

### I. Origine et évolution

D'après **Polese (2008)**, les agrumes sont originaires des pays du Sud Est asiatique cultivée depuis environ 3 000 ans, d'abord pour leur parfum ensuite pour leurs fruits. La propagation de leur culture a eu lieu dans les pays Sud Est asiatiques : Sud du Japon et archipel de Malaisie, ensuite vers l'Inde et l'Est. Dans le bassin méditerranéen, le Liban est l'un des plus anciens pays à avoir pratiqué la culture des agrumes sur une grande échelle. En Algérie, au début du XX<sup>ème</sup> siècle, le 1<sup>er</sup> clémentinier issu d'un croisement entre mandarinier et l'orange amère fut créé par un missionnaire français le père Clément DOZIER, d'où l'origine de son appellation.

### II. Définition

Le mot « agrumes » vient du latin « acrumen », nom donné par les Italiens désignant un groupe d'espèces appartenant au genre de plantes « agrumes » issues des Rutacées : se sont les orangers, les citronniers, les mandariniers...etc. Ce sont des arbres à fruits acides (**Bachés et Bachés, 2002**).

Ils sont caractérisés par leur peau épaisse et parfumée, souvent facilement séparable de la pulpe juteuse à l'intérieur. Les agrumes sont largement cultivés dans les régions subtropicales et tropicales du monde pour leur valeur nutritionnelle élevée, en particulier pour leur teneur élevée en vitamine C et en d'autres composés bioactifs (**Janick et Paull, 2008**).

Les agrumes se subdivisent en plusieurs groupes et se caractérisent principalement par la présence de sécrétions particulières et d'épines de divers types. Selon **Loussert (1989)**, le groupe de Citrinae se subdivise en 3 genres : *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*. Chaque genre se subdivise en espèces.

- **Le genre *Fortunella*** : comprend six espèces dont deux seulement sont cultivées : *Fortunella japonica* et *Fortunella margarita*, dont les fruits sont connus sous le nom de kumquats.
- **Le genre *Poncirus*** : renferme seulement l'espèce *Poncirus trifoliata* utilisé seulement comme porte greffe. Les fruits ne sont pas comestibles, les feuilles ont trois folioles et le feuillage est caduque.
- **Le genre *Citrus*** : renferme les principales espèces cultivées, et parmi les espèces les plus connues, on a :
  - Les oranges : *Citrus sinensis*, dont on trouve les navels, les blondes, les sanguines, les demis sanguins et les douces.
  - Les citronniers : *C. limon*
  - Les clémentiniers : *C. clementina*

- Les cédratiers : *C. medica*
- Les mandariniers : *C. reticulata*
- Les bigaradiers : *C. aurantium*
- Les pamplemoussiers : *C. grandis*
- Les pomelos : *C. paradisi*

### III. L'importance et la production économique des agrumes

#### III.1. Dans le monde

Selon les statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale totale d'agrumes en 2019 était d'environ 144 millions de tonnes, avec une superficie de plantation de 9,89 millions d'hectares, dont la production et la superficie de culture d'agrumes en Chine ont atteint respectivement 38 millions de tonnes et 2,88 millions d'hectares, se classant au premier rang mondial suivi du Brésil et de l'Union Européenne.

Les agrumes sont un des piliers de l'agriculture méditerranéenne, avec près d'un million d'hectares cultivés. Selon le rapport de la FAO de 2020, la production mondiale d'agrumes a augmenté de 2,1% pour atteindre plus de 98 millions de tonnes. La région méditerranée a produit environ 7,3 millions de tonnes d'agrumes, ce qui représente 7,4% de la production mondiale. La principale production méditerranéenne d'agrumes est concentrée en Espagne avec 4,2 millions de tonnes (57% de la production régionale), suivie par l'Italie (1,5 million de tonnes), la Turquie (0,8 million de tonnes) et la Grèce (0,6 million de tonnes). Les principaux agrumes produits dans la région sont le citron, la mandarine et l'orange.

#### III.2. En Algérie

En Algérie, la production des agrumes s'est considérablement accrue au cours de la dernière décennie. En 2018, la production des fruits a atteint un record de 3,2 millions de tonnes, ce qui fait le deuxième plus grand producteur d'agrumes sur le continent africain, derrière l'Égypte. Elle est dominée par la production de citrons et de clémentines, qui représentent respectivement 62% et 24% de la production totale d'agrumes. Les principales régions productrices sont les wilayas de Batna, Blida, Alger, Mostaganem et Tlemcen, qui représentent à elles seules plus de 80% de la production totale d'agrumes en Algérie (FAO, 2020).

### III.3. A Tlemcen

Une production de 784,560 quintaux d'oranges est soulevé dans la wilaya de Tlemcen, les champs d'agrumes dans la wilaya produisent différentes variétés dont la clémentine (350 ha), Thomson Naval (1211 ha), Washington Naval (600 ha). Il a été souligné que la surface plantée en orangers a connu une évolution passant de 2947 ha en 2018 à 2997 ha en 2021 à la faveur de l'engouement suscité par les agriculteurs résidant à proximité des périmètres irrigués.

Les agrumes (oranges, mandarines, clémentines et citrons) occupant une superficie de 3148 ha dont 2844 ha sont actuellement en production, selon le chef de service de l'organisation de la production et l'appui technique de la DSA de Tlemcen, qui précise que la superficie récoltée à ce jour de 500 ha, soit une production de 12025 quintaux (**DSA, 2021**).

## IV. Les mandariniers

Le mandarinier (*Citrus reticulata*) est un agrume de la famille des Rutacées produisant des fruits nommés mandarine.

Le Mandarinier est originaire de Chine et du Vietnam. Il est apparu en Europe au XIX<sup>ème</sup> siècle, notamment dans le bassin méditerranéen où il est aujourd'hui cultivé pour son fruit. La mandarine, agrume doux et sucré, est appréciée pour sa richesse en vitamine C à l'instar des autres agrumes. Il devrait son nom aux mandarins chinois qui recevaient ce fruit en cadeau par tradition, ou encore à la couleur de sa peau qui rappelle celle des robes de soie que portaient les mandarins. Par ailleurs, la peau du fruit avait une valeur médicinale en Chine puisqu'elle servait à soulager les maux d'estomac et les troubles gastriques (**Franhomme et al., 2001**).

Ce fruit est très parfumé, de couleur jaune or, facile à éplucher, avec de nombreux pépins. Il est récolté en janvier et février, et peut être étalée de Novembre à Mars (**Dorji, 2011**)

### IV.1. Classification botanique

Selon **Franhomme et al.** en **2001**, le mandarinier est classé comme suit :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermaphytes
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Rosidae
- Ordre : Sapindales

- Famille : Rutaceae
- Genre : *Citrus* L.
- Espèce : *Citrus reticulata*

### IV.2. Description botanique

Le mandarinier est un arbrisseau aujourd'hui cultivé dans les régions méditerranéennes et mesurant 2 mètres de hauteur environ. Ses feuilles sont lancéolées, persistantes et brillantes. Il donne des fleurs blanches parfumées et un fruit orange de forme baie globuleuse et aplatie sur ses deux pôles, de 5 à 9 cm de diamètre. La peau est fine et d'un orange intense à maturité (**Tableau 1**). Plus sucrée et moins acide que la plupart des agrumes, la mandarine est peu calorique et riche en vitamine C, mais elle renferme aussi de nombreux pépins. La clémentine, parfois confondue avec la mandarine, est un hybride entre cette dernière et l'orange (**Bosson, 2012**).

Le mandarinier comprend plusieurs variétés cultivées dans le monde entier. Parmi les variétés les plus populaires, on trouve (**Khan, 2007**) :

- Mandarine commune (*Citrus reticulata*) : Aussi appelée mandarine impériale ou mandarine de Floride, c'est la variété la plus courante de mandarine, caractérisée par sa peau facile à peler et sa douce saveur juteuse.
- Mandarine satsuma (*Citrus unshiu*) : Originaire du Japon, la mandarine satsuma est une variété très appréciée pour sa peau fine, sa chair juteuse et son goût sucré. Elle est souvent sans pépins.
- Clémentine (*Citrus × clementina*) : Cette variété est un croisement entre une mandarine et une orange douce. Elle est petite, facile à peler et a une saveur sucrée avec peu ou pas de pépins.
- Tangerine (*Citrus tangerina*) : Cette variété est semblable à la mandarine commune mais légèrement plus grande, avec une peau plus rugueuse et une saveur plus prononcée.
- Mandarine Dancy (*Citrus reticulata* 'Dancy') : Reconnaissable par sa couleur rouge-orange et son goût acidulé. La mandarine Dancy est appréciée pour sa chair juteuse et sucrée.
- Mandarine Murcott (*Citrus reticulata* 'Murcott') : Également appelée Honey tangerine, cette variété est connue pour son goût doux et mielleux ainsi que sa texture légèrement granuleuse.

- Mandarine Pixie (*Citrus reticulata* 'Pixie') : Une variété naine de mandarine, idéale pour la culture en pot, caractérisée par sa petite taille et sa saveur sucrée.
- Mandarine Tango (*Citrus reticulata* 'Tango') : Une variété hybride développée pour sa résistance au froid et sa saveur sucrée et acidulée.

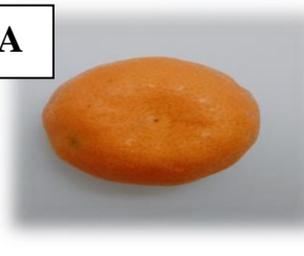
Les variétés les plus cultivées sont ((Bachés et Bachés, 2002) :

- Mandarinier Satsuma « Owari »
- Mandarinier Satsuma « Okitsu »
- Mandarinier Satsuma panaché (variegata)

Ces variétés représentent une petite sélection parmi la grande diversité de mandariniers cultivés dans le monde. Chaque variété a ses propres caractéristiques de saveur, de taille et de saison de récolte, ce qui les rend uniques et appréciées dans différentes régions du monde (Khan, 2007).

Malgré les variations marquées entre les différentes variétés de mandariniers en ce qui concerne leurs feuilles, leurs fruits et leur période de floraison, on peut identifier des traits communs qui les unissent (fleur : petites, blanches et parfumées) (Bachés et Bachés, 2002).

**Tableau 1: Identification botanique du *Citrus reticulata* (Lim, 2012)**

<b>Fruit</b>	Le fruit est sous-globuleux, oblate ou pyriforme légèrement aplatie, sa taille est estimée entre 5 - 9 cm de diamètre, croûte verte virant au jaune brillant au moment de la récolte et d'une couleur orange rougeâtre pendant la maturation.	
<b>Feuilles</b>	Les feuilles sont unifoliolées, de 6 - 8 cm, ovales, elliptiques-lancéolées, marge crénelée, base largement cunéiforme, et pétiole à ailes étroites persistante, lisse d'une couleur verte foncée.	
<b>Fleurs</b>	Les fleurs sont blanches parfumées, bisexuées, d'un calice irrégulier 3 à 5 lobes, pétales blancs.	

<b>Ecorces</b>	L'écorce est mince ou épaisse, facilement séparable du sarcocarpe, d'une surface relativement lisse parfois caillouteuse qui enferme des glandes oléifères remplies d'huiles essentielles.	<div data-bbox="1046 197 1120 271" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">A</div> 
<b>Pépins</b>	La mandarine renferme une quantité assez importante de pépins, 3 à 7 pépins.	<div data-bbox="1046 477 1120 551" style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">A</div> 

A : Photo prise au verger 1, Aïn El Hout, le 06/01/2024

### IV.3. L'huile essentielle de mandarine

L'huile essentielle de mandarine est connue pour être apaisante, sédative et légèrement antispasmodique. Elle est très bien tolérée et peut s'adapter à toute la famille. Elle est d'ailleurs plébiscitée par les enfants pour son odeur très ronde, chaude et douce (**Laurain-Mattar et Couic-Marinier, 2020**).

#### IV.3.1. Caractéristiques

L'essence est obtenue par expression à froid de la couche externe du péricarpe du fruit frais du mandarinier, un procédé qui permet d'éclater les poches sécrétrices qui contiennent les composés aromatiques. Il est aussi possible de réaliser une scarification du fruit entier, puis son expression au moyen de cylindres ou de disques. Du fait de ce mode d'obtention particulier, il s'agit au sens strict d'une essence et non d'une huile essentielle classiquement obtenue par distillation.

D'autres techniques d'expression existent, mais ne sont pas admises pour des usages pharmaceutiques ou alimentaires : écrasement du fruit entier suivi d'une centrifugation pour séparer le jus de l'essence, extraction à l'aide de solvants faiblement volatils ou distillation à la vapeur d'eau sous vide. Les produits aromatiques qui en résultent sont utilisés comme arômes, en savonnerie, en cosmétique ou en parfumerie (eau de Cologne, par exemple).

L'huile essentielle de petit grain des mandarines est obtenue par distillation à la vapeur d'eau des feuilles du mandarinier. Elle est la seule HE qui renferme plus de 50% de N-méthyl-anthranilate de méthyle, mais son usage en aromathérapie est beaucoup moins répandu que celui de l'essence de mandarine (**Laurain-Mattar et Couic-Marinier, 2020**).

Les principales caractéristiques de l'huile essentielle de mandarine sont les suivantes :

- Organes producteurs : zestes

- Rendement : 1 à 1,5%, pour une mandarine de taille moyenne de 120 g, cela correspond à environ 1,8 ml d'essence, soit 93 gouttes. Les rendements des fruits verts sont meilleurs que ceux des fruits orange arrivés à maturité.
- Caractères organoleptiques : liquide limpide à température ambiante mais peut devenir trouble à basse température, incolore à jaune pâle, odeur fraîche. Elle est très volatile, peu stable et s'oxyde rapidement au contact de l'air.
- Densité : 0,848 à 0,855 à 20 °C
- Indice de réfraction à 20 °C : 1,472 à 1,478
- Pouvoir rotatoire à 20 °C : +64° à +78°.

### IV.3.2. Propriétés et indications thérapeutiques

#### -a- Utilisations traditionnelles

- **Sphère nerveuse** : Depuis des siècles, la mandarine, verte en particulier, est connue pour ses vertus apaisantes et calmantes (**Gargano et al., 2008**).

- **Sphère olfactive et dépression** : La sphère olfactive est très étroitement liée au cerveau, lequel est en retour très sensible aux odeurs. Aussi, des parfums agréables permettront d'apporter confort et détente aux patients, cela est ce qu'on appelle l'olfacto-thérapie. Donc, cette particularité est utilisée en aromathérapie pour traiter les troubles dépressifs (**Brand et Schaal, 2017**). Une étude suggère que les fragrances des essences d'agrumes, comme la mandarine, restaurent l'immunité après immunosuppression induite par le stress et permet une réduction du dosage des antidépresseurs (**Komori et al., 1995**).

#### -b- Utilisations de l'essence de mandarine

- **Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires** : L'essence de mandarine possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (**Dongmo, 2008**), notamment grâce à la présence de limonène qui supprime la production de facteurs pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  et oxyde nitrique). Elle protège les voies digestives des problèmes inflammatoires, notamment des colites digestives, des maladies auto-immunes inflammatoires comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, tout en calmant les spasmes digestifs grâce à la présence du D-limonène (**Mesquita et al., 2021**).

- **Sphère hépatique** : L'essence de mandarine aurait, comme toute HE contenant du limonène, des effets intéressants sur la sphère hépatique en drainant le foie par action cholérétique et hépato-protectrice. Le D-limonène a des effets hypolipémiants (triglycérides, cholestérol) (**Ariyoshi et al., 1975**) intéressants qui s'associent aux effets du  $\gamma$ -terpinène. Le D-limonène serait un inhibiteur de la glycation des protéines (**Joglekar et al., 2013**).

Combinée à l'amino-guanidine, cette essence peut freiner les complications secondaires du diabète (Arvindekar et al., 2017).

- **Sphères digestive et métabolique** : L'HE de mandarine est connue pour calmer le hoquet, aider à la digestion et augmenter le péristaltisme intestinal pour lutter contre la constipation (Wilkins et Joe, 2002).

- **Prévention anticancéreuse** : De nombreuses études *in vitro* ont montré les propriétés chimio-préventives et curatives du D-limonène présent en grande quantité dans l'essence de mandarine verte (tumeurs mammaires, cutanées, hépatiques, pulmonaires, gastriques, etc.) (Kaji et al., 2001).

Enfin, l'huile essentielle de mandarine est idéale pour le soin des peaux sèches et aide à lutter contre la cellulite et les vergetures. En cuisine, elle est utilisée pour parfumer aussi bien les plats salés que les plats sucrés (taboulé, marinade, cake et autres gourmandises sucrées). Elle parfume aussi agréablement les pièces de la maison en diffusion et détend l'atmosphère (Laurain-Mattar et Couic-Marinier, 2020).

#### IV.4. Travaux antérieurs

##### IV.4.1. Composition chimique

La composition de l'huile essentielle (ou essence) varie selon la variété, la saisonnalité, l'origine géographique et le degré de maturité du fruit. Pour être considérée comme de qualité pharmaceutique et apte à l'aromathérapie, elle doit contenir des proportions spécifiques de composés tels que le limonène (65 à 75%), l' $\alpha$ -pinène, l' $\alpha$ -terpinène, le myrcène et le N-méthyl-anthranilate de méthyle (dont les quantités varient selon la couleur de la mandarine). L'analyse approfondie des composés volatils (représentant 85 à 90% des constituants de l'essence) et de la fraction non volatile permet aujourd'hui de déterminer avec précision l'origine géographique des différents lots d'essence et les méthodes d'extraction utilisées à des fins industrielles (Laurain-Mattar et Couic-Marinier, 2020).

Selon les données de la littérature, l'huile essentielle du zeste de mandarine est très riche en limonène, suivi de myrcène et/ou du  $\gamma$ -terpinène. Cependant, certaines compositions atypiques sont ponctuellement décrites (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* selon la littérature

Parties utilisées	Composés identifiés	Lieu de récolte	Méthode d'extraction et rendement	Références bibliographiques
<b>En Algérie</b>				
Feuilles fraîches	N-Méthyl-anthranilate de méthyle (34,0%), $\gamma$ -terpinène (26,6%), limonène (22,5%), $\alpha$ -pinène (4,7%), $\beta$ -pinène (4,3%), $\alpha$ -thujène (2,0%), $\beta$ -myrcène (1,0%), terpinolène (1,2%)	Chlef	Hydrodistillation 0,51%	Hamdani et al., 2015
Feuilles fraîches	Limonène (32,0%), $\gamma$ -terpinène (25,5%), N-méthyl-anthranilate de méthyle (24,5%), $\alpha$ -pinène (3,3%), $\beta$ -pinène (3,3%), $\alpha$ -thujène (2,0%), $\gamma$ -terpinolène (1,9%), myrcène (1,1%)	Région d'Azzaba (Skikda)	Hydrodistillation 0,50 $\pm$ 0,2%	Boughendjioua, 2019
Zeste	D-limonène (94,8%), $\beta$ -pinène (2,4%), 1-5-diméthylvényl (0,7%)	Chlef	Expression à froid 0,039%	Bengag, 2021
<b>Au Maroc</b>				
Parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs)	Limonène (69,2%), $\gamma$ -terpinène (12,7%), nérol (5,6%), $\alpha$ -pinène (2,8%), $\beta$ -pinène (1,8%), myrcène (1,5%)	Région de Béni Mellal	Hydrodistillation	Ainane et al., 2018
Ecorce	D-Limonène (84,8%), sabinène (6,1%), linalol (2,8%)	INRAA du Maroc	Hydrodistillation 2,09%	Houmy et al., (2020)
<b>En Tunisie</b>				
Zeste	Limonène (92,6%), $\gamma$ -terpinène (3,4%), $\beta$ -pinène (1,6%), $\alpha$ -pinène (0,6%)	Zaghouan	Hydrodistillation 4,62%	Hosni et al., 2010
Ecorce (Cycle de développement des fruits)	Limonène (65,4% ; 51,8% ; 69,0%), 1,8-cinéole (0,01% ; 26,4% ; 0,2%), $\gamma$ -terpinène (12,4% ; 2,5% ; 14,1%), ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimène (0,8% ; 7,9% ; 1,1%)	Elarbi	Hydrodistillation 0,22% ; 2,70% ; 1,13% (à maturité)	Bourgou et al., 2012

<b>Feuilles séchées</b>	Linalol (73,0%), acétate de linalyle (10,9%), terpinéol-4 (4,9%), isobornéol (3,5%), $\alpha$ -pinène (1,1%)	Zaghouan	Hydrodistillation 0,41%	<b>Hosni et al., 2013</b>
<b>Dans le monde</b>				
<b>Zeste</b>	Limonène (95,1%), myrcène (2,0%)	Vietnam	Expression à froid 0,25%	<b>Minh Tu et al., 2002</b>
<b>Fruit</b> <b>Zeste</b>	Limonène (80,3%), $\gamma$ -terpinène (4,7%), myrcène (2,1%), $\alpha$ -pinène (1,2%)	Japon	Expression à froid Fruit : 0,12% Flavédo : 0,53%	<b>Sawamura et al., 2004</b>
<b>Feuilles</b>	N-méthyl-anthranilate de méthyle (57,6 %), $\gamma$ -terpinène (20,2 %), limonène (11,8 %)	Madagascar	Hydrodistillation 0,86 %	<b>Dongmo et al., 2007</b>
<b>Ecorce</b>	Limonène (84,8%), $\gamma$ -terpinène (5,4%), myrcène (2,2%), $\alpha$ -pinène (1,1%)	Burund (Japon)	Expression à froid	<b>Njoroge et al., 2009</b>
<b>Ecorce</b>	Limonène (46,7%), gèranial (19,0%), néral (14,5%), acétate de gèranyle (3,9%), gèraniol (3,5%), $\beta$ -caryophyllène (2,6%), nérol (2,3%), citronellal (1,3%), acétate de néryle (1,1%)	Inde	Hydrodistillation 0,6 ml/100g	<b>Chutia et al., 2009</b>
<b>Zeste</b>	Limonène (74,7%), $\gamma$ -terpinène (15,7%), <i>p</i> -cymène (2,0%), $\alpha$ -pinène (2,0%), myrcène (1,4%)	Espagne	Expression à froid	<b>Viuda-Martos et al., 2009</b>
<b>Ecorce</b>	Limonène (52,2 - 96,2%), $\gamma$ -terpinène (tr - 36,7 %), linalol (0,1 - 2,5%), $\alpha$ -pinène (0,1 - 2,1%), myrcène (1,3 - 1,8%), sabinène (0,1 - 1,3%)	Corse	Expression à froid 0,10 - 0,45%	<b>Lota et al., 2000</b>
<b>Feuilles fraîches</b>	$\gamma$ -Terpinène (0,2 - 61,3%), sabinène (0,2 - 59,4%), N-méthyl-anthranilate de méthyle (tr - 58,0%), linalol (0,2 - 54,3%), limonène (1,5 - 44,3%), <i>p</i> -cymène (tr - 20,4%), ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimène (0,6 - 13,7%), $\beta$ -pinène (0,1 - 10,7%), terpinéol-4 (0,1 - 10,6%)	Corse	Expression à froid 0,10 - 0,45%	<b>Lota et al., 2000</b>

<b>Ecorce</b>	Limonène (55,8 - 96,7%), $\gamma$ -terpinène (tr - 19,9%), <i>p</i> -cymène (tr - 12,0%), myrcène (0,7 - 24,0%), $\beta$ -pinène (tr - 14,2%), sabinène (0,1 - 8,7%), $\alpha$ -pinène (0,2 - 2,2%)	Corse	Expression à froid 0,05 - 0,60%	<b>Lota et al., 2001</b>
<b>Feuilles fraîches</b>	$\gamma$ -Terpinène (0,1 - 67,4%), sabinène (0,1 - 57,3%), N-méthyl-anthranilate de méthyle (0,0 - 78,7%), linalol (tr - 59,3%), limonène (1,4 - 15,9%), <i>p</i> -cymène (0,0 - 16,6%), ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimène (0,0 - 14,0%), $\beta$ -pinène (0,1 - 15,4%), terpinéol-4 (0,1 - 7,9%)	Corse	Expression à froid 0,05 - 0,60%	<b>Lota et al., 2001</b>
<b>Fruit</b>	d-limonène (67,0%), $\gamma$ -terpinène (17,0%)	Italie	Expression à froid	<b>Frassinetti et al., 2011</b>
<b>Ecorce</b>	Limonène (74,4%), oxyde de <i>cis</i> -limonène (2,8%), <i>cis-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol (2,3%), carvone (1,9%), <i>trans</i> -carvéol (1,8%), ( <i>Z</i> )-patchénol (1,2%)	Espagne	Expression à froid	<b>Espina et al., 2011</b>
<b>Ecorce</b>	D-Limonène (75,7%), limonène glycol (6,6%), <i>trans-p</i> -mentha-2,8-diéno (4,0%), <i>Z</i> -5-nonadécane (3,2%), heneicosane (2,4%), eugénol (2,4%), <i>cis-p</i> -mentha-2,8-diéno (1,8%), $\alpha$ -pinène (1,6%), thujol (1,4%)	Pakistan	Hydrodistillation (0,04%)	<b>Khan et al., 2012</b>
<b>Ecorce</b>	Limonène (91,6%), myrcène (2,8%), $\alpha$ -pinène (0,9%)	Vietnam	Expression à froid	<b>Van Hung et al., 2013</b>

#### IV.4.2. Activités biologiques

Le tableau ci-dessous présente un résumé des études antérieures concernant les activités biologiques de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*, mettant en évidence les différentes méthodes utilisées pour les différents tests et les résultats obtenus.

**Tableau 3 : Activités biologiques de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* testées selon la littérature**

Activités biologiques	Résultats	Références bibliographiques
Antibactérienne	L'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> n'a montré aucune activité contre les souches bactériennes suivantes : <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> et <i>Campylobacter jejuni</i> .	Smith-Palmer <i>et al.</i> , 1998
	Rapportent des propriétés antibactériennes contre différentes souches pathogènes telles que <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella enterica</i> , testée par la méthode de diffusion sur disque et par contact direct (CMI).	Job <i>et al.</i> , 2023
	Montrent un pouvoir antibactérien important avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) variant entre 20 et 230 µg/ml, contre dix souches bactériennes (7 à Gram négatif : 3 <i>Xanthomonas campestris</i> , 2 <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> et 3 à Gram positif : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterobacter aerogenes</i> ).	Frassinetti <i>et al.</i> , 2011
	Ils ont utilisé deux méthodes (contact direct et diffusion sur disque) contre cinq souches bactériennes : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Les résultats ont montré que les souches étaient sensibles, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 13,8 et 21,3 mm, à l'exception de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , qui s'est	Espina <i>et al.</i> , 2012

	révélé résistant. Ils ont également observé des CMI's faibles à modérées, allant de 1 à 5 µl/ml.	
	Ils ont testé l'activité antibactérienne contre trois bactéries : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque montrent que <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> étaient les micro-organismes les plus sensibles, avec des zones d'inhibition variant entre 16,0 et 26,0 mm. En revanche, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> s'est révélé très résistant.	<b>Bourgou et al., 2012</b>
	Aucune activité n'a été observée contre les souches bactériennes testées, à savoir : <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> par la méthode de diffusion sur disque.	<b>Hadj Mohammed et Benamar, 2019</b>
<b>Antifongique</b>	Ils indiquent que l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> est extrêmement efficace contre : <i>Alternaria alternata</i> (Aa), <i>Rhizoctonia solani</i> (Rs), <i>Curvularia lunata</i> (Cl), <i>Fusarium oxysporum</i> (Fo) et <i>Helminthosporium oryzae</i> (Ho), avec des pourcentages d'inhibition du mycélium par contact direct, de 100% à une concentration de 0,2 ml/100 ml contre Aa, Cl et Fo et à une concentration supérieure à 0,2 ml/100 ml contre Rs et Ho.	<b>Chutia et al., 2009</b>
	Ils ont testé l'activité antimicrobienne contre trois champignons filamenteux : <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Penicillium expansum</i> et <i>Fusarium proliferatum</i> . Ils ont obtenu des pourcentages d'inhibition du mycélium très faibles, allant de 37,1 à 50,9%, à une concentration de l'ordre de 2000 ppm.	<b>Van Hung et al., 2013</b>
	Ils rapportent des CMI's très faibles de 0,01 et 1,0 mg/ml contre <i>Penicelium</i> sp. et <i>Alternaria alternata</i> , avec un effet fongicide. Ils ont obtenu des pourcentages d'inhibition des souches fongiques de l'ordre de 100%, à une concentration de : 0,01 mg/ml contre <i>Fusarium</i>	<b>Hamadi et Allem, 2015</b>

	<i>oxysporum</i> , 0,05 mg/ml <i>Fusarium</i> sp., 1 mg/ml contre <i>Penicillium</i> sp. et 0,1 mg/ml contre <i>Alternaria</i> sp.	
	L'huile essentielle des feuilles de <i>Citrus reticulata</i> a exercé une très faible activité inhibitrice vis-à-vis des champignons testés. Les deux souches fongiques, <i>Fusarium oxysporum</i> et <i>Alternaria</i> sp. ont été inhibées à partir de la concentration (1/1000, v/v) et (1/2000, v/v), respectivement.	<b>Boughendjioua, 2019</b>
<b>Antimicrobienne</b>	Les diamètres des zones d'inhibition obtenus varient entre 16,62 et 35,81 mm contre <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> et <i>Trichophyton album</i> , ce qui indique une très bonne activité de l'huile. En revanche, <i>Aspergillus flavus</i> et <i>S. epidermis</i> se sont montrés résistants.	<b>Khan et al., 2012</b>
<b>Antioxydante</b>	Le test de DPPH met en évidence un pouvoir anti-radicalaire modéré, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 60% à une concentration de 1000 µg/ml, ce qui est comparable à celui du composé de référence, le trolox (70% à une concentration de 100 µg/ml).	<b>Frassinetti et al., 2011</b>
	L'activité de l'huile essentielle des feuilles de <i>C. reticulata</i> var. <i>madagascar</i> est très faible (CI <sub>50</sub> = 4,10 ± 0,05 g/l) par comparaison avec le standard : BHT (CI <sub>50</sub> = 7,02 ± 0,5 mg/l).	<b>Dongmo et al., 2007</b>
	Ils rapportent une bonne activité anti-radicalaire (DPPH), avec une CI <sub>50</sub> de l'ordre de 1,0007 mg/g.	<b>Khan et al., 2012</b>
	Par le test de DPPH, l'extrait des feuilles a enregistré le meilleur pouvoir réducteur, avec une CI <sub>50</sub> de l'ordre de 1,40 mg/ml, suivi par l'extrait des pépins (CI <sub>50</sub> = 1,78 mg/ml), alors que l'extrait des écorces (CI <sub>50</sub> = 20,73 mg/ml) s'est montré le moins actif. Les résultats restent faibles par comparaison avec l'acide ascorbique (CI <sub>50</sub> = 0,072 mg/ml), considéré comme composé de référence.	<b>Mostefaoui et al., 2022</b>

	<p>L'extrait des écorces possède l'effet le plus puissant parmi les quatre extraits testés avec une valeur de <math>CI_{50}</math> de 14,127 mg/ml, suivi par l'extrait de pépins de 14,308 mg/ml. Cependant, leurs potentielle anti-radicalaire restent largement inférieur à celui de l'acide ascorbique (<math>CI_{50} = 60,073 \mu\text{g/ml}</math>). Par contre, ils rapportent un très faible pouvoir antioxydant de l'huile essentielle des écorces, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 26% à une concentration de 1500 mg/ml.</p>	<b>Belkaddar et Benhamou, 2020</b>
	<p>Par le test DPPH, les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle des pépins de <i>Citrus reticulata</i> a une faible activité, avec une <math>CI_{50}</math> de l'ordre de <math>162,685 \pm 0,042 \text{ mg/ml}</math>, moins active par comparaison au standard (BHT : <math>CI_{50} = 1,603 \pm 0,064 \text{ mg/ml}</math>).</p>	<b>Hadj Mohammed et Benamar, 2019</b>
<b>Anti-inflammatoire</b>	<p>Le plus puissant effet inhibiteur de la dénaturation de l'albumine a été obtenu avec l'extrait d'écorce (76,22% à 300 <math>\mu\text{g/ml}</math>) comparable au standard (acide salicyclique : 70,03%), suivi par celui des pépins (68,01%), ensuite celui des feuilles (29,68%). Ainsi, les sous-produits de mandarine sont doués d'activité anti-inflammatoire.</p>	<b>Mostefaoui et al., 2022</b>
	<p>Ils ont testé l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle des feuilles de mandarine contre la lipoxgénase. Ils ont obtenu une <math>CI_{50}</math> de l'ordre 53,5 mg/l, faible par comparaison avec le composé de référence (ANDG, <math>CI_{50} = 0,7 \text{ mg/ml}</math>).</p>	<b>Dongmo et al., 2007</b>
<b>Anti-cancéreuse</b>	<p>Les études sur des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF7 et MDA-MB-231) ont révélé une cytotoxicité dose-dépendante de l'HE de <i>C. reticulata</i>, avec des valeurs de <math>CI_{50}</math> de <math>56,67 \pm 3,12 \mu\text{g/ml}</math> et <math>76,44 \pm 2,53 \mu\text{g/ml}</math>, respectivement.</p>	<b>Job et al., 2023</b>

## I. Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits complexes, composés de substances volatiles présentes dans les plantes et obtenues à partir de différentes parties végétales telles que les fleurs, les feuilles, le bois, les racines, l'écorce ou les fruits, grâce à des méthodes d'extraction telles que la distillation à la vapeur d'eau ou l'extraction mécanique. Elles se distinguent par leur composition chimique variée, qui leur confère des propriétés spécifiques, ainsi que par leurs caractéristiques telles que la couleur, l'odeur, la densité et le chémotype qui détermine la famille biochimique et les principes actifs dominants (**Bruneton, 1993**). Chaque huile essentielle est donc unique, définie par :

- ✚ Leur nom latin qui précise l'espèce botanique et évite les confusions.
- ✚ La partie ou l'organe dont est tirée l'huile essentielle : racines, feuilles, fleurs, graines.
- ✚ Son mode d'obtention : distillation à la vapeur d'eau ou expression à froid.
- ✚ Le chémotype ou principe actif caractéristique qui donne les effets physiologiques majeurs.

## II. Composition des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables, telles que l'origine géographique, les conditions climatiques, le stade de maturité des plantes et la méthode d'extraction.

Les composants des HEs sont inclus dans deux groupes. Il s'agit des terpènes et des terpénoïdes qui représentent la classe la plus importante et des composés aromatiques (phénylpropanoïdes) (**Bakkali et al., 2008**), synthétisés à travers deux voies métaboliques différentes.

## III. Activités biologiques

### III.1. Activité antioxydante

Dans le corps humain, ainsi que sous l'influence de facteurs environnementaux, divers processus biochimiques peuvent entraîner une surproduction excessive de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Cette surcharge peut rapidement dépasser nos systèmes de défense antioxydants, entraînant un phénomène appelé stress oxydant. Ce dernier se caractérise par un déséquilibre significatif entre les pro-oxydants (ROS) et les antioxydants, conduisant à des dommages cellulaires souvent irréversibles. Le stress oxydant est associé au développement de plus de 200 maladies, telles que les maladies cardiovasculaires, dégénératives, inflammatoires, le cancer, le diabète, le sida, entre autres (**Pincemail et al., 2001**).

### III.1.1. Les antioxydants

L'antioxydant est toute substance capable d'entrer en compétition avec des substrats oxydables en empêchant l'oxydation de ces derniers (Ndoye Foe *et al.*, 2016).

Les molécules antioxydantes peuvent se diviser en :

- ✚ Antioxydants exogènes (vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, ...).
- ✚ Antioxydants endogènes incluant des enzymes (superoxyde dismutase SOD, glutathion peroxydase, catalase) et des protéines (ferritine, transferrine, albumine, ..).

### III.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Parmi lesquelles, on peut citer :

- Méthode de piégeage du radical, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : Réduction du radical DPPH<sup>•</sup> en DPPH réduit, en présence d'antioxydants. Changement de couleur violette à jaune mesurable à 517 nm. (Do *et al.*, 2014).
- Méthode de piégeage du radical-cation, l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique (ABTS) : Réduction du cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup> en ABTS en présence d'antioxydants. Mesure de la décoloration par spectrophotométrie à 734 nm (Rivero-Pérez, 2007).
- Méthode du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP) : Réduction du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) par les réducteurs dans les extraits de plantes. Mesure de la densité de couleur bleue à 700 nm (Conteras-Calderón *et al.*, 2011).
- Méthode de la capacité d'absorption des radicaux libres (test ORAC).
- N,N-diméthyl-*p*-phénylènediamine (DMPD) : Réduction du radical-cation DMPD<sup>•+</sup> de couleur rose à la forme incolore. Mesure de la décoloration par spectrofluorimètre à des longueurs d'onde spécifiques (Rivero-Pérez, 2007).

Les méthodes DPPH et ABTS sont largement utilisées en raison de leur praticité et de leur indépendance vis-à-vis d'équipements coûteux (Zhang *et al.*, 2018).

### III.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un moyen de défense naturelle des organismes supérieurs contre toute agression extérieure (infection, blessure, agression mécanique, etc).

Elle se manifeste par quatre signes cardinaux (la rougeur, l'œdème, la chaleur, la douleur) résultant d'une augmentation du flux sanguin, d'une augmentation de la perméabilité capillaire permettant aux compléments, aux anticorps et aux cytokines de franchir la barrière endothéliale et de la migration des leucocytes vers le tissu lésé pour une réparation de la lésion (Youghbaré-Ziébro *et al.*, 2016).

### III.2.1. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires

La réponse inflammatoire met en jeu divers enzymes, notamment les lipoxygénases et les cyclooxygénases (COX 1 et COX 2), qui produisent des médiateurs pro-inflammatoires comme les leucotriènes et les prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Cette surproduction de médiateurs inflammatoires tels que les interleukines (IL 1 $\beta$ , IL-6, IL-8), le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), le facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$  B), et la molécule d'adhésion (ICAM-1) peut conduire à des maladies inflammatoires et au cancer (**Taofiq et al., 2017**). Les lipoxygénases sont des enzymes qui catalysent une déshydrogénation stéréospécifique et une dioxygénation subséquente d'acides gras polyinsaturés ayant une structure 1,4-*cis*-pentadiène. La réaction conduit à la formation d'un hydro-péroxyde (**Drazen et al., 1996**).

Les inflammations aiguës peuvent se résoudre spontanément ou avec un traitement, souvent à l'aide d'anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) ou non stéroïdiens. Cependant, ces médicaments, bien qu'efficaces, sont associés à des effets secondaires indésirables comme des troubles digestifs et des toxicités rénales (insuffisance rénale aiguë).

En raison de ces risques, il est crucial d'explorer de nouveaux agents thérapeutiques anti-inflammatoires issus des plantes médicinales, qui représentent une source potentielle de molécules naturelles anti-inflammatoires (**Yougbaré-Ziébrou et al., 2016**).

### III.2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* peut être évaluée en utilisant plusieurs méthodes : l'inhibition de la dénaturation des protéines et la stabilisation de la membrane des érythrocytes sont les tests les plus couramment utilisés (**Benbalia et al., 2020**).

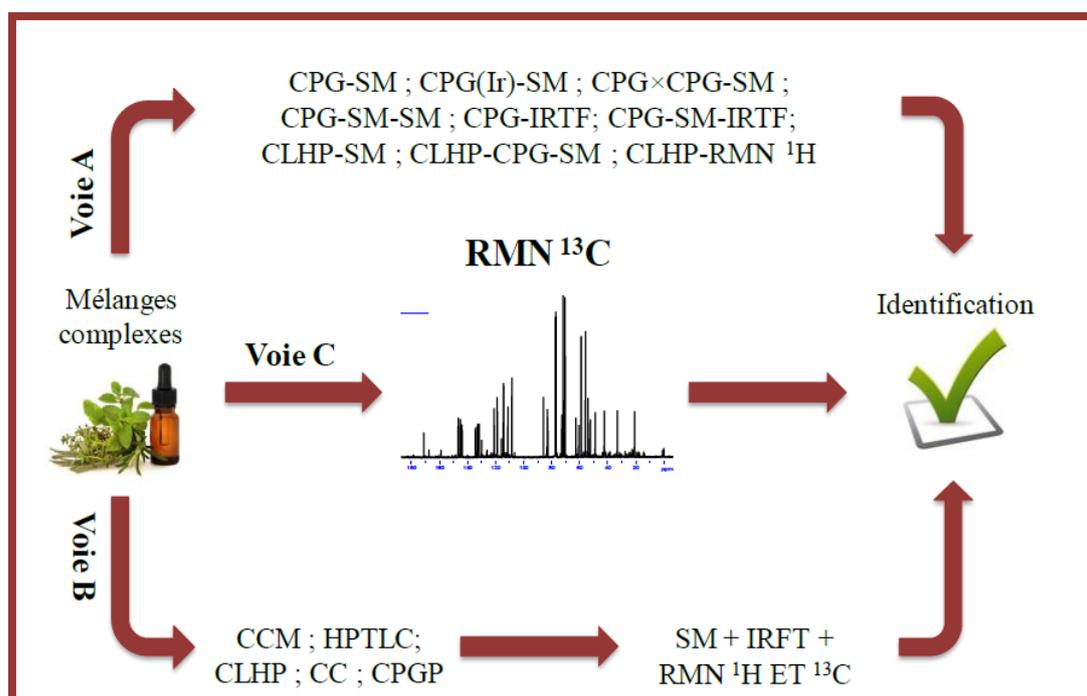
## IV. Identification des constituants dans un mélange complexe

Les produits naturels d'origine végétale (extraits, huiles essentielles ou résines) sont de nos jours très recherchés. Ils se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs composés en proportions variables. Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, le cosmétique, la parfumerie et l'agro-alimentaire (**Bruneton, 1993**).

Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés thérapeutiques et prévoir sa toxicité potentielle. Cette connaissance permet également d'assurer la reproductibilité des effets biologiques et de garantir l'efficacité et la sécurité des applications cliniques et cosmétiques.

De plus, l'analyse détaillée des composés volatils présents dans l'huile essentielle aide à identifier les interactions possibles entre ses différents constituants, offrant ainsi une compréhension plus approfondie de ses mécanismes d'action (Lobstein, Couic-Marinier, 2013).

Pendant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires (Joulain, 1994 ; Coleman et Lawrence, 1997). L'analyse de la composition chimique d'un mélange naturel, telle qu'une huile essentielle s'effectue de manière conventionnelle selon les voies A ou B (Figure 1).



CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ; SM : Spectrométrie de Masse ; IRTF : Infra -Rouge à Transformée de Fourier ; CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance ; RMN : Résonance Magnétique Nucléaire ; CCM : Chromatographie sur Couche Mince ; CC : Chromatographie sur Colonne ; CPGP : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative ; HPTLC : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance.

**Figure 1: Méthodes d'analyse d'un mélange complexe (adaptée de Nam, 2014)**

L'analyse peut également être menée selon la voie C (Figure 1) qui met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN <sup>13</sup>C) pour l'identification des composés en mélange sans séparation préalable ou précédée d'une étape de fractionnement réduite au minimum. Cette technique peut en outre être employée pour la quantification des constituants si nécessaire.

### I.1. La voie A

Met en œuvre le couplage "en ligne" des techniques chromatographiques et spectroscopiques.

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est largement utilisée pour sa sensibilité, sa polyvalence et sa rapidité, mais elle est limitée aux composés moléculaires thermostables et volatils (**Rouessac et al., 2004**).

- Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse (SM) en mode impact électronique (IE) est fréquent au laboratoire pour identifier les composés en comparant leur spectre à des bibliothèques (**Masada, 1976 ; Jennings et Shibamoto, 1980 ; Sandra et Bicchi, 1987; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Adams, 1989 et 2001 ; Joulain et König, 1998**).

- Les techniques d'ionisation chimique positive (ICP) ou négative (ICN) fournissent des informations complémentaires sur la masse molaire des composés (**Zupanc et al., 1992**).

- La CPG bidimensionnelle (CPG x CPG ou CPG-2D) permet une meilleure séparation des constituants (**Filippi et al., 2013**).

- Le couplage de la CPG avec la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IRTF) fournit des informations sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules (**Chamblee et al., 1997**).

- La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) est moins fréquemment utilisée, mais le couplage CLHP-CPG-SM permet une séparation préalable des constituants, leur individualisation et leur identification (**Munari et al., 1990 ; Mondello et al., 1995**).

- Le couplage CLHP-RMN <sup>1</sup>H-SM permet de détecter et d'identifier des composés dans des échantillons biologiques complexes ou des extraits de plantes, malgré quelques inconvénients liés à l'utilisation de solvants deutérés (**Lindon et al., 2000**).

### I.2. La voie B : Identification des constituants après purification

Comprend deux étapes principales :

- Le fractionnement du mélange par différentes techniques chromatographiques, telles que la chromatographie sur colonne, sur couche mince ou en phase liquide.

- L'identification des constituants dans les fractions enrichies par comparaison de leurs données spectrales avec celles des composés de référence.

Cette méthode est extrêmement fiable mais peut être chronophage, surtout lorsque les molécules sont déjà décrites dans la littérature. Initialement utilisée dans le domaine des huiles essentielles, elle reste pertinente pour les échantillons complexes malgré la montée en popularité de la voie A.

La voie B garantit une identification précise des composés mais demande souvent un investissement important en temps.

La voie C, intermédiaire, se base sur l'identification et/ou la quantification par RMN  $^{13}\text{C}$  des principaux composés des mélanges naturels, sans séparation préalable (Weyerstahl *et al.*, 2000).

### II.3. La voie C : Analyse par RMN du $^{13}\text{C}$ sans séparation préalable

L'identification des constituants d'un mélange par RMN  $^{13}\text{C}$  se fait en comparant les déplacements chimiques des carbones avec ceux des composés de référence dans des bibliothèques de spectres.

Contrairement aux techniques précédentes, les composés ne sont pas purifiés au préalable.

- Pour identifier un composé, il faut pouvoir observer et individualiser ses signaux dans le spectre, puis attribuer ces déplacements chimiques à une molécule spécifique.
- Les conditions expérimentales doivent être optimisées pour assurer la reproductibilité des résultats.

La RMN fournit des données sur le déplacement chimique, la multiplicité et l'intensité des signaux, permettant de reconnaître un noyau par rapport à son environnement dans la molécule.

- Chaque molécule est définie par une série de déplacements chimiques constituant son spectre, qui sert d'empreinte digitale pour son identification.
- La comparaison avec des spectres de référence permet d'identifier les composés dans le mélange.

#### I.3.1. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse

Depuis 1989, l'équipe "Chimie et Biomasse" utilise la RMN du  $^{13}\text{C}$  pour analyser les mélanges naturels, dans le but d'identifier et éventuellement quantifier leurs constituants sans purification préalable.

La méthode repose sur l'utilisation d'un logiciel spécialement conçu pour comparer les déplacements chimiques du mélange avec ceux des composés de référence dans des bibliothèques de spectres.

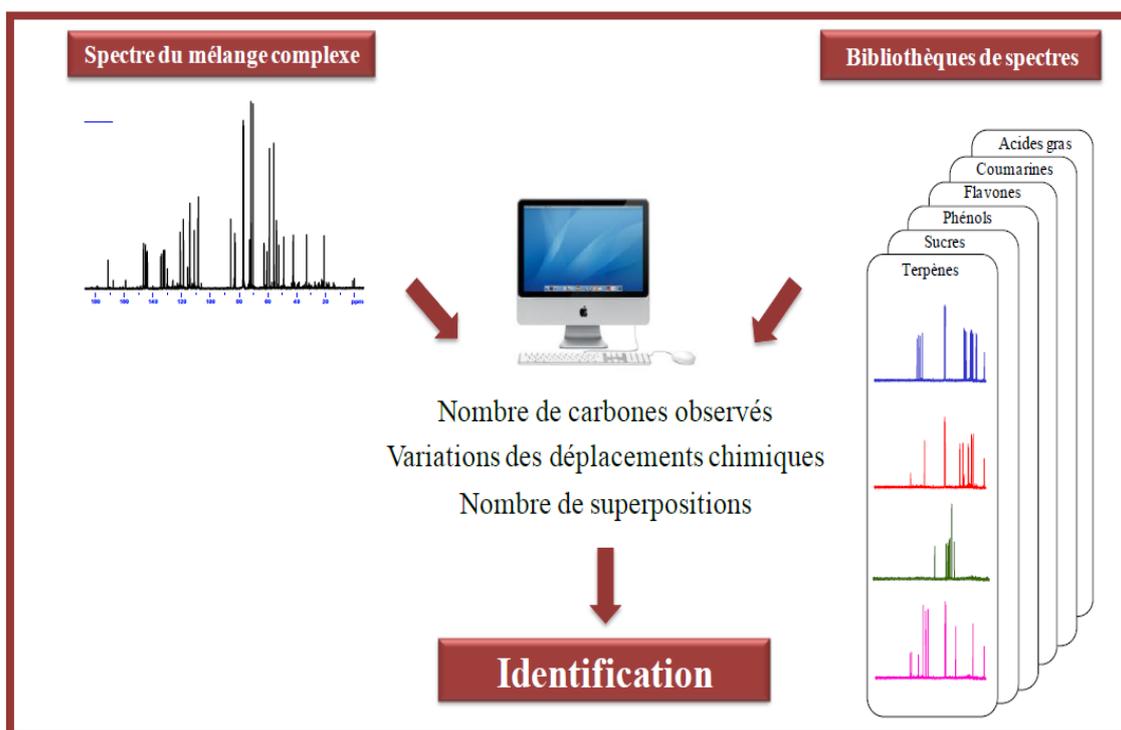
- Les spectres de référence et des mélanges sont enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales pour assurer la comparabilité.

- Trois paramètres sont pris en compte pour l'identification des composés : le nombre de pics observés par rapport au nombre attendu, les superpositions de pics et les variations des déplacements chimiques par rapport aux valeurs de référence (**Figure 2**).

Cette méthode a été appliquée avec succès à différentes familles de molécules et a permis la création de bibliothèques de spectres continuellement enrichies. La RMN du  $^{13}\text{C}$  est particulièrement utile pour identifier rapidement et sans ambiguïté des composés difficiles à analyser par d'autres techniques conventionnelles, notamment dans le domaine des huiles essentielles :

- Elle permet d'identifier jusqu'à deux douzaines de composés dans un même mélange, même à des teneurs très faibles (0,4-10%), sans séparation préalable.
- La méthode est également efficace pour l'identification de stéréo-isomères et la mise en évidence de la variabilité chimique dans les mélanges naturels.

Enfin, elle est utilisée pour l'analyse structurale de nouvelles molécules, nécessitant toutefois une purification préalable et une quantité suffisante de produit (**Corticchiato et Casanova, 1992 ; Tomi et al., 1995**).



**Figure 2 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du  $^{13}\text{C}$  (adaptée de Nam, 2014)**

# **Partie II**

## **Matériel et Méthodes**

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire des « Produits Naturels » (LAPRONA), université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

Notre étude se concentre sur trois aspects principaux :

- Détermination des rendements en huile essentielle de plusieurs échantillons prélevés à partir des pieds individuels ;
- Caractérisation de l'huile essentielle de mandarine (*Citrus reticulata*) ;
- Evaluation des activités biologiques : antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro* et *in silico*.

### I. Matériel végétal

La cueillette des fruits du mandarinier a été effectuée dans la wilaya de Tlemcen. Nous avons effectué des récoltes dans trois stations différentes (**Figure 3**) :

- ✚ La première récolte (verger 1, **Photo 1**) a eu lieu dans la station d'Aïn El Hout, le 06/01/2024.
- ✚ La deuxième récolte (verger 2) s'est déroulée dans la station de Hennaya, le 27/01/2024.
- ✚ La troisième récolte (verger 3, **Photo 2**) a été réalisée dans la station d'Aïn Youcef, le 10/01/2024.



**Photo 1 : Vue d'ensemble de pieds *C. reticulata* (Verger 1, Aïn El Hout)**



**Photo 2 : Vue d'ensemble de pieds *C. reticulata* Verger 3, Aïn Youcef)**

L'échantillonnage a été effectué sur dix pieds individuels dans les deux premiers vergers (1 et 2), et sur cinq pieds individuels dans le troisième verger.

L'identification de cette espèce végétale a été réalisée par le Professeur F. Hassani (Laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes, université de Tlemcen).

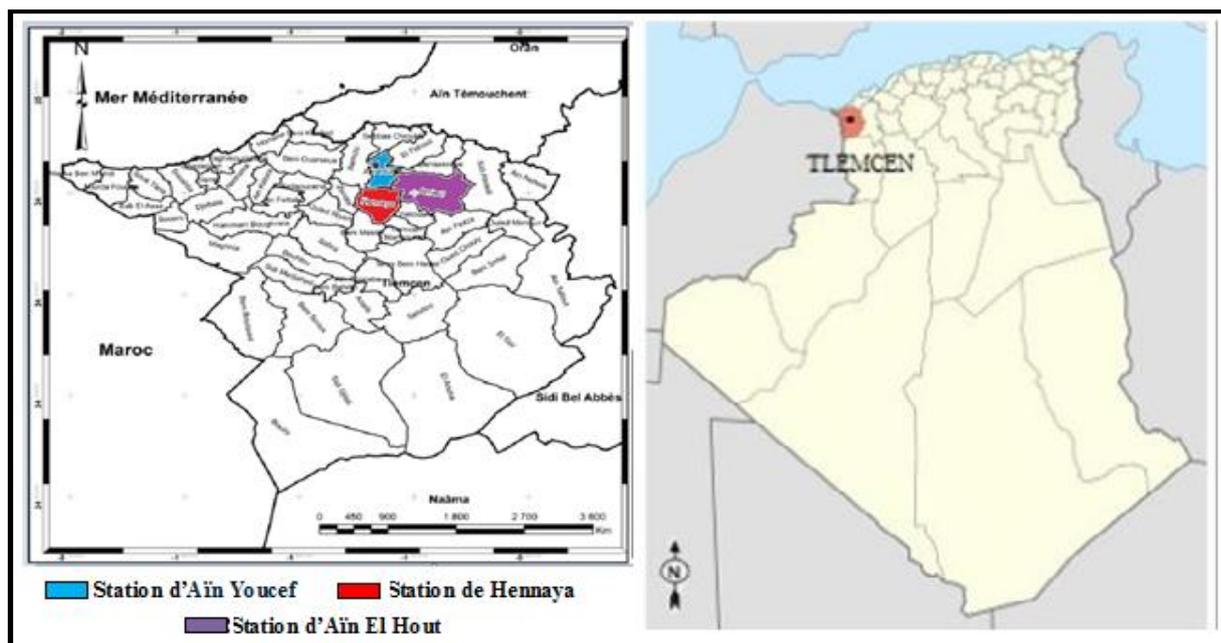


Figure 3 : Situation géographique des zones de récolte

### I.1. Extraction de l'huile essentielle

Pour extraire l'huile essentielle des écorces de mandarine, nous avons employé deux techniques d'hydrodistillation (**Figure 4**) : une méthode utilisant un dispositif de type Clevenger, ainsi qu'une hydrodistillation classique, avec une durée de deux heures.

Dans cette méthode, le matériel végétal est placé dans un ballon rempli d'eau et chauffé jusqu'à ébullition. La chaleur libère les composés volatils sous forme de vapeur, qui montent dans une colonne jusqu'à un réfrigérant. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles se condensent avant de retomber dans une ampoule de décantation. Ensuite, l'huile se sépare de l'eau en raison de leur différence de densité.

Pour prévenir leur détérioration due à l'oxygène ou à la lumière, les huiles essentielles sont stockées à 4 °C, dans des piluliers en verre, à l'abri de la lumière.

### I.2. Calcul des rendements en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle (HE) est une mesure qui exprime la quantité d'huile essentielle obtenue par rapport à la quantité de matière végétale utilisée lors du processus d'extraction. Il est généralement exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

✚ **Rdt %** : Rendement en huile essentielle

✚ **M** : Masse d'HE récupéré en gramme

✚ **M<sub>0</sub>** : Masse de matière végétale à traiter en gramme

$$\text{Rdt \%} = (M/M_0) \times 100$$



A : Hydrodistillation classique, B : Hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger, C : Ecorces de *Citrus reticulata*

**Figure 4 : Dispositifs d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation**

## II. Caractérisation de l'huile essentielle

L'analyse des échantillons a été réalisée par les méthodes CPG-Ir et RMN  $^{13}\text{C}$  au niveau du laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse-CNRS. Nous avons analysé 19 échantillons récoltés en 2022, dans deux stations dans la région de Tlemcen : Aïn El Hout et Hennaya (Boutaayachet et Zazzoua, 2022).

### II.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

#### II.1.1. Conditions opératoires

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer Clarus 500, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur et de deux colonnes capillaires de dimensions (50 m x 0,22 mm ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ), apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et polaire (BP-20, polyéthylène glycol).

Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 ml/min), avec une pression en tête de colonne de 25 psi ; la température de l'injecteur et du détecteur est de 250 °C ; la température est programmée depuis 60 °C jusqu'à 220 °C, à raison de 2 °C/min, suivie d'un palier de 20 min à 220 °C ; l'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/60. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,1  $\mu\text{l}$ .

### II.1.2. Identification des constituants

Les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcane (C8-C28) avec interpolation linéaire sur les deux colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire.

## II.2. Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

La RMN du  $^{13}\text{C}$  est utilisée selon la méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse (Tomi *et al.*, 1995), qui est basée sur la comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des produits de référence enregistrés dans des conditions expérimentales (solvant, dilution) rigoureusement identiques à celles des huiles essentielles et stockés dans des bibliothèques de spectres propres au laboratoire.

### II.2.1. Conditions opératoires

Les spectres RMN ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm dans le chloroforme deutéré ( $\text{CDCl}_3$ ) additionné de tétraméthylsilane (TMS) sur un spectromètre de marque « Bruker AVANCE 400 », opérant à 100,623 MHz pour le carbone 13 sous les conditions opératoires suivantes : angle d'impulsion  $45^\circ$  ; temps d'acquisition de 2,73 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 220 000 Hz (220 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulation est compris entre 2 000 et 3 000 pour chaque enregistrement.

Les spectres RMN des échantillons ont été enregistrés en dissolvant 40 mg d'huile essentielle dans 0,5 ml de  $\text{CDCl}_3$ . Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourier par une fonction exponentielle ( $\text{LB} = 1,0$  Hz). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont donnés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne.

### II.2.2. Identification des constituants

L'identification est réalisée par la prise en compte de trois paramètres :

- ✚ Le nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule ;
- ✚ Le nombre de superpositions des signaux ;
- ✚ Les variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de référence ( $\Delta\delta$ ).

En plus de ces paramètres qui sont directement accessibles par un logiciel élaboré au laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'université de Corse (Tomi *et al.*, 1995 ; Rezzi *et al.*, 2002 ; Tomi et Casanova, 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009), l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé

donné. Cette technique permet l'identification de différents composants à une teneur supérieure ou égale à 0,3-0,4% sans purification préalable.

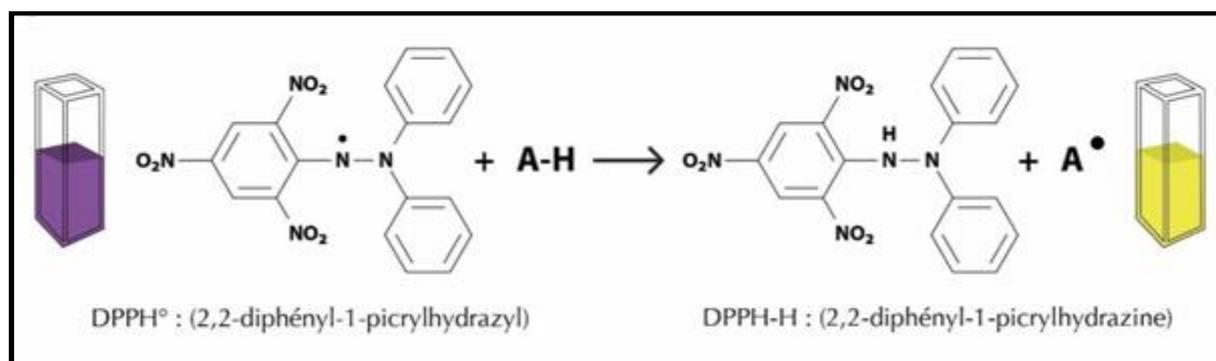
### III. Activités biologiques de l'huile essentielle

#### III.1. Activité antioxydante

Dans cette partie, le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été déterminé sur plusieurs échantillons par la méthode du piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) en utilisant l'éthanol comme solvant.

##### III.1.1. Méthode de Piégeage du radical libre DPPH•

Ce dosage spectrophotométrique est basé sur la réduction du radical stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée facilement mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 515 à 520 nm, en DPPH réduit (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) de couleur jaune (**Figure 5**). Cette réduction est due à l'aptitude des composés antioxydants à céder des protons ou des électrons (**Bandoniene *et al.*, 2002 ; Pavlov *et al.*, 2002 ; Gazi *et al.*, 2004**).



**Figure 5 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH**

Le protocole repose sur la méthode expérimentale de **Blois (1958)**. 2,5 ml de diverses concentrations (256 ; 128 ; 64 ; 32 ; 16 et 8 mg/ml) d'HE préparées dans l'éthanol absolu sont ajoutés à 1 ml d'une solution éthanolique de DPPH à 0,03 mg/ml. Pour chaque concentration, un blanc a été préparé. En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 2,5 ml d'éthanol absolu avec 1 ml d'une solution éthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'activité de l'huile essentielle a été comparée à l'acide ascorbique en tant que contrôle positif.

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH en pourcentage (%) a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Avec : A<sub>contrôle</sub> : Absorbance du contrôle ; A<sub>test</sub> : Absorbance du test effectué

La concentration de l'huile essentielle nécessaire pour la réduction de 50% de la concentration initiale du DPPH<sup>\*</sup> (CI<sub>50</sub>), a été calculée à partir du graphique tracé en pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations en huile essentielle.

### III.2. Activité anti-inflammatoire

#### III.2.1. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

La capacité anti-inflammatoire de l'huile essentielle a été évaluée par un test d'inhibition de la lipoxigénase *in vitro* (Eshwarappa et al., 2016 ; Bayala et al., 2014).

L'analyse *in vitro* de l'activité inhibitrice de la lipoxigénase a été réalisée en utilisant une lipoxidase de type I-B (Lipoxigénase, LOX, EC 1.13.11.12) de Glycine max (soja). Elle est déterminée par spectrophotométrie, en enregistrant le taux de variation de l'absorbance à 234 nm. En effet, l'augmentation de l'absorbance à 234 nm est due à la formation de 13-hydroperoxydes d'acide linoléique (Eshwarappa et al., 2016 ; Bayala et al., 2014).

Cinq concentrations d'huile essentielle dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été testées pour le test d'activité d'inhibition de LOX (1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 20 mg/ml).

Les tests d'inhibition de LOX ont été réalisés en mélangeant 20 µl de solution LOX (concentration finale, 200U/ml) et 20 µl d'huile essentielle dans 1960 µl de tampon d'acide borique (0,2 M ; pH 9,0) et en les incubant 5 minutes à température ambiante. La réaction a ensuite été déclenchée par l'ajout de 20 µl de solution de substrat (acide linoléique, 25 mM) et incubés pendant 4 minutes. Après, avoir placé les tubes dans un bain marie-bouillant pendant 3 minutes, la lecture des absorbances a été effectuée à 234 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour chaque concentration, un blanc a été préparé. En parallèle, un contrôle négatif est préparé en remplaçant l'huile essentielle par 20 µl de DMSO.

L'activité de l'huile essentielle a été comparée à l'acide nordihydrogaurétique en tant que contrôle positif.

Le pourcentage d'inhibition de la lipoxigénase a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

A<sub>contrôle</sub> est l'activité de l'enzyme (LOX) en absence d'huile essentielle, et A<sub>test</sub> est l'activité de l'enzyme en présence de l'huile essentielle (Bayala et al., 2014).

La CI<sub>50</sub> a été calculée par la concentration d'huile essentielle inhibant 50% de l'activité de la LOX.

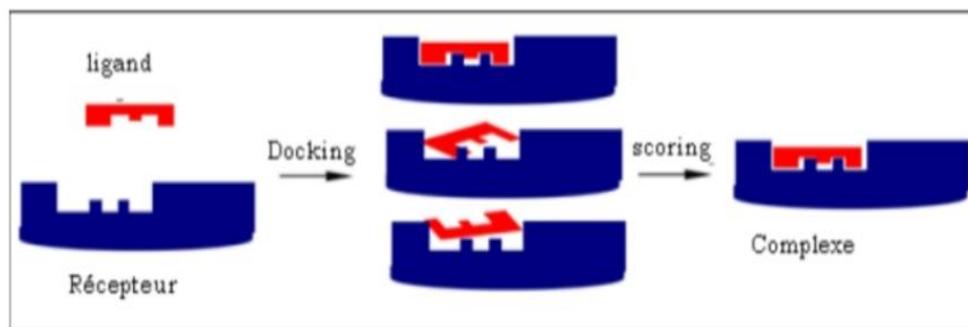
### III.2.2. Activité anti-inflammatoire *in silico*

En continuité avec l'étude *in vitro*, nous nous sommes proposé d'étudier l'activité anti-inflammatoire *in silico*, en particulier le docking moléculaire, pour confirmer cette activité.

Tout d'abord, le docking (ancrage ou amarrage) est l'expression donnée aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches chimique, physique et biologique sont combinées pour étudier au niveau atomique les interactions entre deux molécules (**Bastard, 2005**) :

- ✚ L'une, la cible, une protéine possédant un ou plusieurs sites actifs spécifiques avec une structure tridimensionnelle connue ;
- ✚ L'autre, le ligand, une petite molécule flexible.

Il permet la détermination des conformations les plus favorables pour la fixation du ligand à la cible conduisant à la formation du complexe (ligand-protéine) le plus stable (**Figure 6**).



**Figure 6 : Principe de base de la conception de la notion clé-serrure (Docking moléculaire)**

On a trois principaux outils pour passer le docking :

- **Récepteur** : Les structures 3D des différentes protéines sont disponibles et accessibles gratuitement dans la banque de données PDB. Les coordonnées atomiques des structures se trouvent dans un format (PDB). Donc, il suffit de consulter la PDB et d'inscrire le nom de la structure pour télécharger le fichier du récepteur au format pdb indispensable à l'opération de docking (**Martin, 2006**).

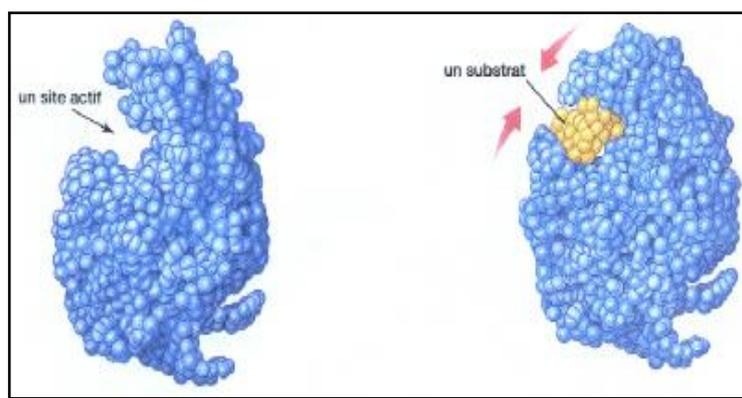
- **Ligand** : Pour faire un docking, la structure du ligand doit être en 3D, il existe deux méthodes pour recevoir un ligand :

- ✚ Par les bases de données de structures chimiques appelées chimio-thèques tels que : PubChem, ZINC ... qui comportent plusieurs informations sur les différents ligands (structure, activité, propriétés physicochimiques).

La structure dans ces bases est enregistrée avec les formats : SMILES, SDF, MOL2 et PDB.

✚ A l'utilisation des ligands de la PDB ou de la littérature. Nous pouvons dessiner, optimiser et sauvegarder sous formats (PDB, mol, mol2...) avec des logiciels de modélisation moléculaire comme HyperChem, Avogadro, Arguslab ...etc. (Monge, 2006).

- **Le site actif** : La protéine, lors de son interaction avec le substrat, modifie la réactivité moléculaire en formant un complexe enzyme-substrat. L'activité des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif qui a la forme d'une cavité ou d'un sillon (**Figure 7**). Le site actif d'une enzyme est la région privilégiée de l'enzyme qui interagit avec le substrat.



**Figure 7 : Site actif (cavité enzymatique)**

**Les programmes du docking se résument en :**

- **Autodock Tools** : Une interface graphique pour AutoDock, un logiciel d'accueil automatisé prédisant comment de petites molécules se lient à un récepteur 3D.
- **Autodock Vina** : Programme open source d'amarrage moléculaire, utilisant le même format de fichier que AutoDock et pouvant être visualisé avec MGLTools.
- **Chimera Software** : Outil interactif pour la visualisation et l'analyse des structures moléculaires, cartes de densité, trajectoires, alignements de séquences.
- **BIOVIA Discovery Studio Visualizer** : Une application gratuite de modélisation moléculaire pour afficher, partager et analyser des données sur les protéines et les petites molécules.
- **PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler)** : Outil pour identifier rapidement les interactions non covalentes entre les macromolécules biologiques et leurs ligands.
- **PubChem** : La plus grande collection d'informations chimiques au monde, permettant de rechercher des produits chimiques par nom, formule, structure, etc.

- **PDB (Protein Data Bank)** : Archive mondiale de données structurales de macromolécules biologiques, incluant des données de cristallographie et de RMN soumises par des chercheurs du monde entier (Min et al., 2015).

### III.2.2.1. Logiciels et banque de données utilisés

Pour mieux illustrer notre approche méthodologique et les équipements utilisés dans l'étude de l'activité anti inflammatoire *in silico*, nous avons suivi le schéma suivant :

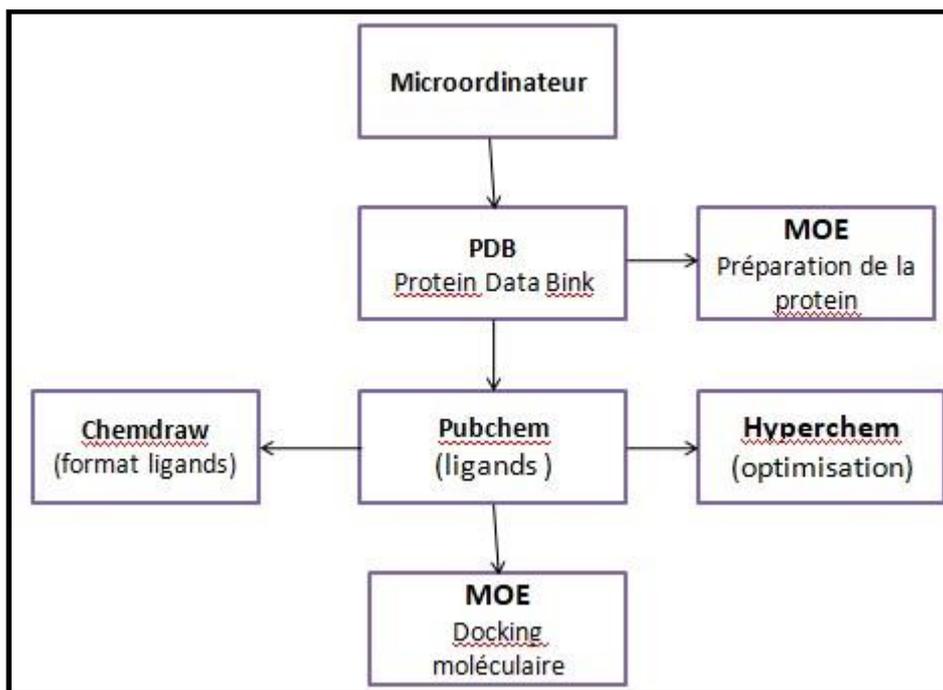


Figure 8 : Schéma récapitulatif des logiciels utilisés

## A. Méthode

### A.1. Préparation des Protéines sur le Logiciel MOE

Sur la banque de données PDB (Protein Data Bank), qui contient des fichiers de données avec des informations sur la structure tridimensionnelle des protéines, des acides nucléiques et d'autres molécules biologiques, nous avons utilisé la lipoxigénase-B (LOX-B).

### A.2. Étapes de Préparation de la Protéine

- **Téléchargement de la Protéine Cible** : Nous avons téléchargé la structure 3D de la protéine cible à partir de la PDB.
- **Alignement des Séquences** : Nous avons aligné les séquences des protéines, en conservant la chaîne la plus longue qui contient le site actif le plus grand.

- **Élimination des Molécules Non Protéiques** : Dans cette étape, nous avons éliminé les molécules d'eau et les molécules de co-cristallisation.
- **Ajout des Atomes d'Hydrogène** : Nous avons ajouté les atomes d'hydrogène pour compléter la structure de la protéine.
- **Sélection de la Cavité Enzymatique** : Nous avons sélectionné la cavité enzymatique où se situe le site actif de la protéine.

Après avoir finalisé ces étapes, la protéine est préparée. Ensuite, nous avons enregistré la structure finale pour l'utiliser dans le test d'activité. Cette procédure nous garantit que la protéine est dans un état optimal pour les études *in silico*, permettant ainsi une analyse précise de son interaction avec des composés anti-inflammatoires.

### A.3. Préparation du Ligand

- **Téléchargement du Substrat** : Sur la banque de données PubChem, nous avons téléchargé les substrats : le limonène,  $\gamma$ -terpinène et N-méthyl-anthranilate de méthyle ainsi que le contrôle positif (l'acide nordihydroguaiarétique, NDGA), au format SDF.
- **Conversion du Format** : nous avons utilisé le logiciel ChemDraw pour convertir le fichier SDF en format (.mol). Cette conversion facilite la lecture du substrat par d'autres logiciels.
- **Optimisation de la Structure** : Nous avons importé le fichier format (.mol) dans le logiciel HyperChem, afin d'optimiser la structure du ligand pour obtenir une conformation énergétique favorable.
- **Enregistrement du Ligand Optimisé** : Nous avons enregistré la structure optimisée du ligand au format (.mol) pour une utilisation ultérieure.

Cette procédure assure que le ligand est dans un état optimal pour les études *in silico*, permettant une analyse précise de son interaction avec la protéine cible.

### A.4. Docking moléculaire

- **Importation de la Protéine Préparée** : Nous avons importé la protéine préparée sur MOE, incluant le site actif sélectionné.
- **Importation du Ligand Optimisé** : Nous avons importé le ligand optimisé au format (.mol) dans MOE.
- **Placement du Ligand** : Nous avons placé le ligand dans le site actif de la protéine. Nous avons remarqué que le logiciel prendra plusieurs positions (ou conformations) pour déterminer la meilleure affinité ou complémentarité avec la protéine.
- **Étape de Scoring** : Nous avons appliqué la fonction de scoring ( $\Delta G$ ) pour évaluer la formation du complexe protéine-ligand. Cette étape fournit les valeurs des scores ( $\Delta G$ ).

- **Sélection de la Meilleure Conformation** : Nous avons choisi l'énergie la plus basse qui assure la conformité du complexe protéine-ligand (Une énergie plus basse indique une meilleure affinité et potentiellement, une meilleure efficacité pour les activités anti-inflammatoires).

Cette procédure nous permet de trouver la meilleure interaction entre la protéine et le ligand, optimisant ainsi les résultats pour les activités anti-inflammatoires.

# **Partie III**

## **Résultats et discussion**

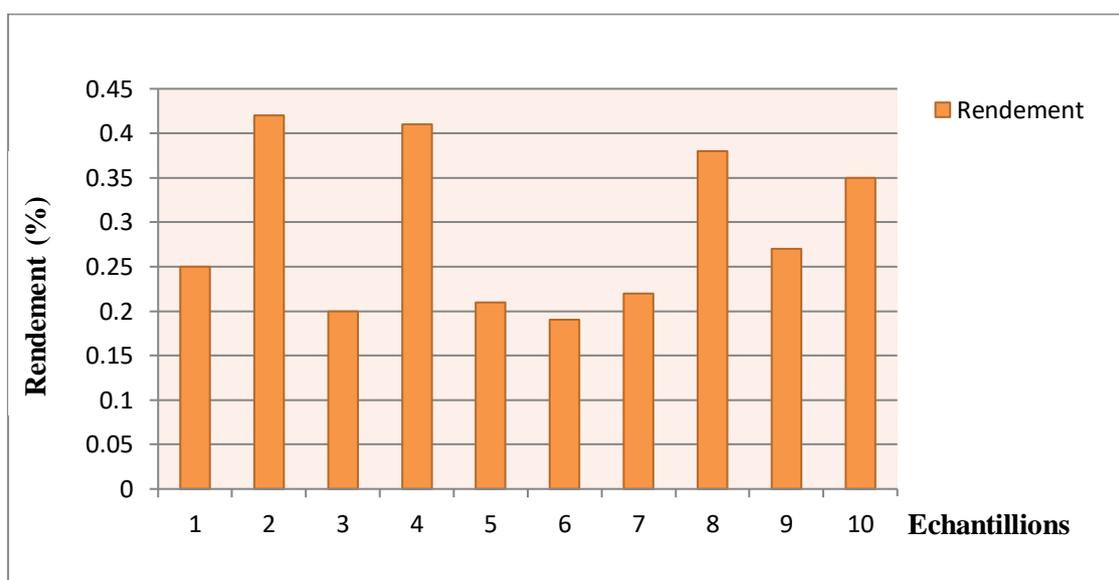
## I. Calcul de rendement

Les huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* sont obtenues par hydrodistillation en utilisant deux dispositifs : classique et un appareil de type Clevenger. Les huiles essentielles obtenues sont incolores avec un aspect liquide, caractérisé par une odeur agréable, fraîche, douce, fruitée et légèrement acidulée.

Nous avons prélevé 25 échantillons : 10 échantillons à la station d'Aïn El Hout, 10 échantillons à la station d'Hennaya et 5 échantillons à la station d'Aïn Youcef. La cueillette a été effectuée sur des pieds individuels.

Les rendements en huile essentielle sont calculés par rapport à la quantité de la matière végétale fraîche. Les teneurs en huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* récoltés dans les trois vergers, sont représentés dans les **figures (9, 10 et 11)**.

Selon les **figures 9, 10 et 11**, les résultats obtenus indiquent que les rendements en huile essentielle sont très variables, allant de 0,19% à 0,42% pour le verger d'Aïn El Hout, de 0,15% à 0,28% pour le verger de Hennaya et de 0,84% à 1,36% pour le verger d'Aïn Youcef. Cette variabilité existe entre les différents échantillons récoltés dans la même station et entre les trois zones d'étude (**Figure 12**). Cependant, les échantillons prélevés dans la station d'Aïn Youcef sont les plus riches en huile essentielle (Moyenne = 1,17%). Par contre, nous avons constaté que la différence des moyennes des rendements entre la station d'Aïn El Hout et la station d'Hennaya n'est pas importante (0,29% contre 0,20% ; respectivement) (**Figure 13**).



**Figure 9 : Rendements (%) en HE des écorces de *Citrus reticulata* récolté dans la station d'Aïn El Hout**

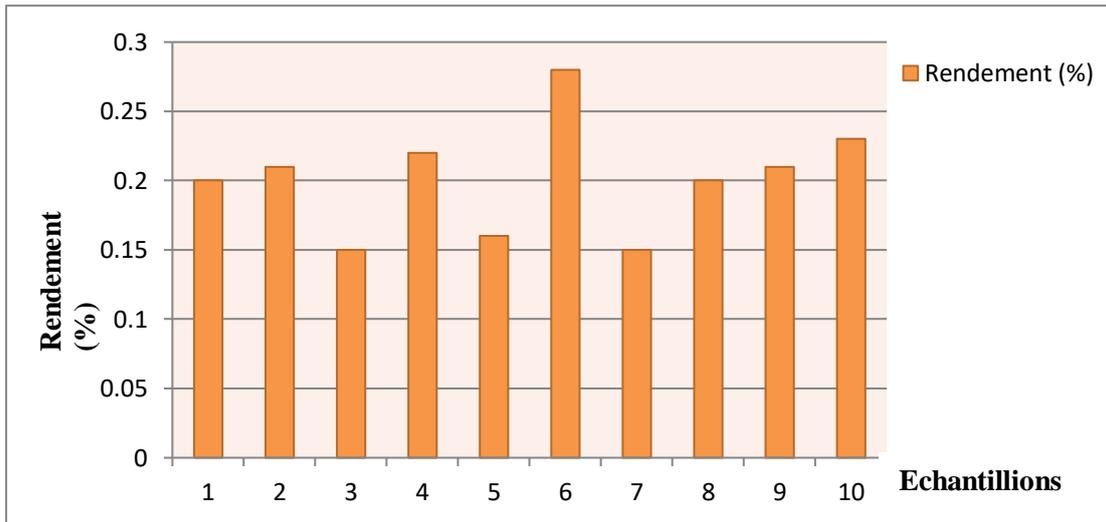


Figure 10 : Rendements (%) en HE des écorces de *Citrus reticulata* récolté dans la station de Hennaya

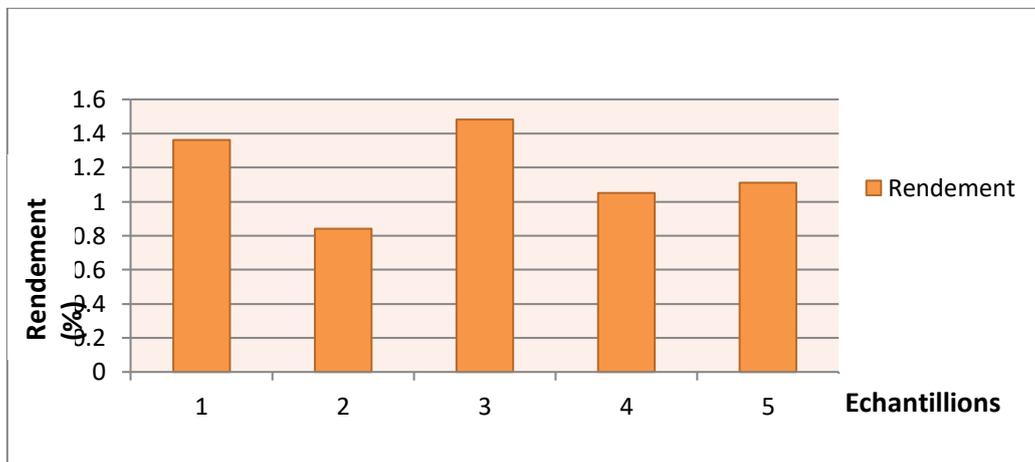


Figure 11 : Rendement (%) en HE des écorces de *Citrus reticulata* récolté dans la station d'Ain Youcef

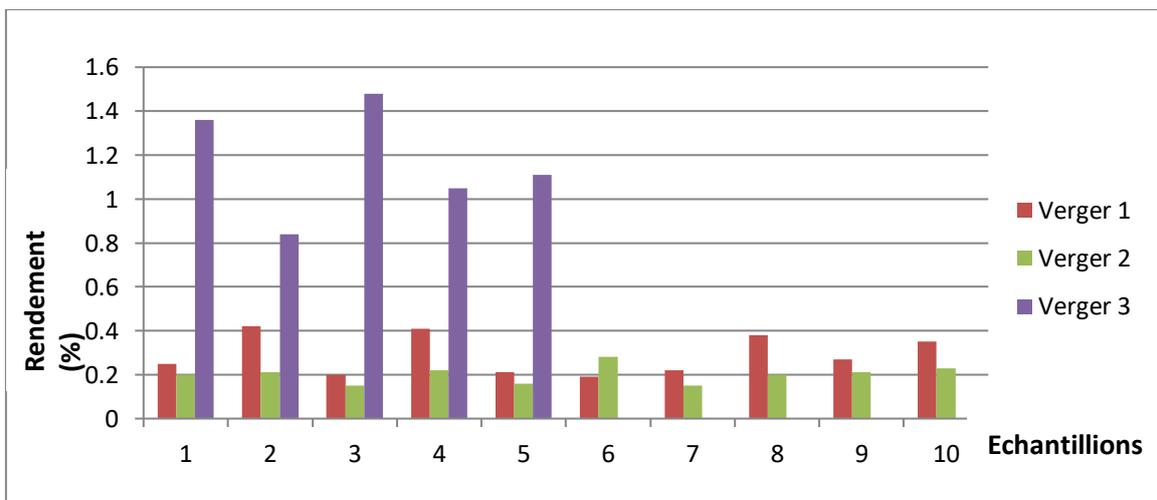
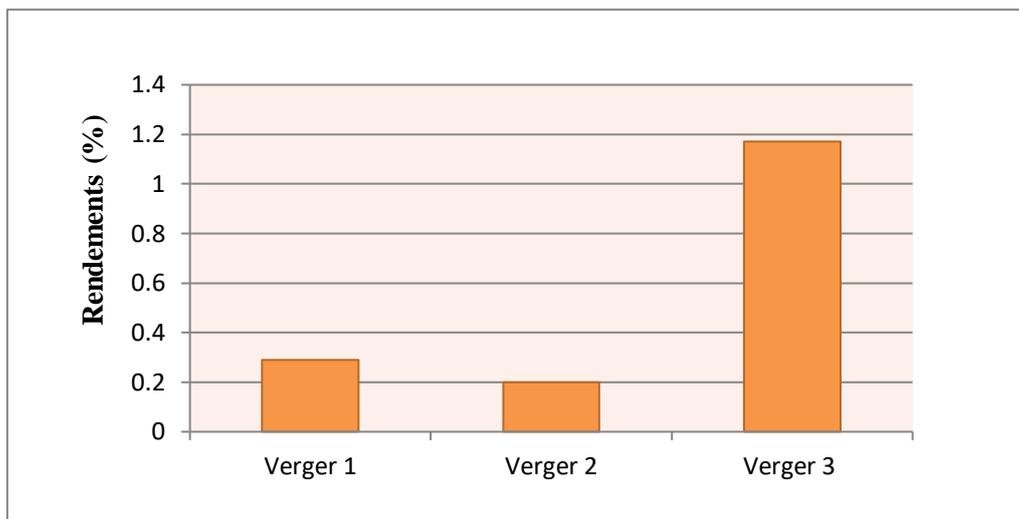


Figure 12 : Comparaison entre les rendements en huile essentielle de *Citrus reticulata* récoltés dans les trois stations d'étude



**Figure 13 : Moyennes des rendements en huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* relative aux trois stations d'étude**

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons constaté que :

- ✚ Les rendements obtenus, pour des échantillons récoltés en Tunisie au cours du cycle de développement et rapportés par **Bourgou et al.**, en **2012**, varient de 0,22% à 2,70%, avec une moyenne de 1,13% à maturité, qui est comparable à celle obtenue pour la station d'Aïn Youcef. De même, un échantillon récolté au Maroc a fourni une teneur en HE très importante de l'ordre de 2,09% (**Houmy et al.**, **2020**). Par contre, un rendement d'environ 0,04% a été obtenu pour deux échantillons prélevés en Tunisie et en Algérie, respectivement et rapporté par **Khan et al.** en **2012** et par **Bengag** en **2021**. Cette teneur est très faible par rapport à nos résultats.
- ✚ Les résultats obtenus pour les stations d'Aïn El Hout et d'Hennaya sont comparables à ceux obtenus pour des échantillons récoltés en Corse : 0,05% à 0,60% (**Lota et al.**, **2001**) et 0,10% à 0,45% (**Lota et al.**, **2000**). De même, pour un échantillon provenant de Vietnam (0,25%) et cité par **Minh Tu et al.**, en **2002**.
- ✚ En revanche, nos teneurs (stations d'Aïn El Hout et d'Hennaya) sont moins importantes que celles obtenues pour des échantillons récoltés en Japon (0,53%) et en Inde (0,6 ml/100g), respectivement (**Sawamura et al.**, **2004** ; **Chutia et al.**, **2009**).
- ✚ D'une manière surprenante, **Hosni et al.**, en **2010** ont rapporté un rendement très élevé de l'ordre de 4,62%, pour un échantillon de zeste de mandarine récolté en Tunisie.

Enfin, nous avons comparé nos rendements avec ceux obtenus en **2022** par **Boutaayachet et Zazzoua** qui ont effectué des prélèvements dans les mêmes stations que les nôtres, à savoir : Aïn El Hout (0,05 et 0,34%, avec une moyenne de l'ordre de 0,16%),

Hennaya (0,08 et 0,29%, avec une moyenne de l'ordre de 0,18%). Nous avons constaté que nos teneurs sont plus importantes (0,19% à 0,42% pour le verger d'Aïn El Hout, avec une moyenne de l'ordre de 0,22% de 0,15% à 0,28% pour le verger de Hennaya, avec une moyenne de l'ordre de 0,20%).

Ainsi, les différences de rendement peuvent être attribuées aux variations dans les méthodes d'extraction, les conditions climatiques et de culture, ainsi qu'aux spécificités régionales des mandarines utilisées. Les rendements obtenus sont généralement cohérents avec les tendances globales, bien que certaines valeurs dépassent les rendements typiquement observés, tandis que d'autres sont très faibles.

## II. Caractérisation de l'huile essentielle de *C. reticulata*

L'analyse de l'huile essentielle du zeste de mandarine a été réalisée par les techniques chromatographique et spectrométrique (CPG-Ir et RMN  $^{13}\text{C}$ ) au niveau du laboratoire « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse-CNRS.

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique de l'huile essentielle du zeste de mandarine, les 19 échantillons récoltés par **Boutaayachet et Zazzoua**, en **2022**, ont été soumis à l'analyse par CPG et des indices de rétention (Ir) de différents composants ont été mesurés sur deux colonnes de polarité différente.

### II.1. Analyse détaillée de l'huile essentielle de *C. reticulata*

Trois échantillons ont été analysés en combinant une méthode chromatographique (CPG-Ir) et une méthode spectrométrique (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

La caractérisation de l'huile essentielle de ces échantillons a été réalisée par RMN  $^{13}\text{C}$  sans séparation préalable des constituants. Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. Elle nous a permis d'identifier 14 composés, représentant entre 93,5 et 94,5% de la composition chimique totale de l'huile essentielle (**Tableau 4**). Les constituants identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$ , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés.

La composition de l'huile essentielle de *C. reticulata* est homogène, constituée de monoterpènes (**Tableau 4**). Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes hydrocarbonés, dont un composé nettement majoritaire, le limonène qui représente entre 62,7

et 63,1%. Deux autres monoterpènes de nature oléfiniques sont présents en quantité appréciable, il s'agit de :  $\gamma$ -terpinène (7,5 - 14,9%) et *p*-cymène (4,1 - 5,9%).

Cette huile essentielle contient également que des monoterpènes oxygénés, présents en quantités appréciables, variant entre 21,6 et 24,4%, avec prédominance de l' $\alpha$ -terpinéol (1,3 - 4,6%) et N-méthyl-anthranilate de méthyle (3,4 - 4,3%). D'autres monoterpènes sont présents en faible teneur, soient : myrcène (1,0 - 1,5%), linalol (1,0 - 1,9%), terpinèn-4-ol (0,7 - 1,9%), périllaldéhyde (0,5 - 1,3%) et thymol (0,8 - 2,3%). Un monoterpène linéaire est également identifié en très faibles teneurs, à savoir : octanal (0,4 - 0,6%).

**Tableau 4 : Composés identifiés par CPG et RMN <sup>13</sup>C dans l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata***

Composés	IRa	IRp	E3 V2	E5 V2	E10 V1
$\alpha$ -Pinène	925	1019	0,6	0,5	0,6
$\beta$ -Pinène	965	1115	0,8	0,7	0,8
Octanal	972	1287	0,4	0,5	0,6
Myrcène	973	1156	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>
<i>p</i> -Cymène	1006	1275	<b>5,9</b>	<b>4,1</b>	<b>5,2</b>
Limonène*	1016	1206	<b>63,1</b>	<b>62,9</b>	<b>62,7</b>
1,8-Cinéole*	1016	1213	0,2	0,2	0,6
$\gamma$ -Terpinène	1043	1249	<b>7,5</b>	<b>8,7</b>	<b>14,9</b>
Linalol	1077	1548	<b>1,7</b>	<b>1,9</b>	<b>1,0</b>
Terpinèn-4-ol	1154	1602	<b>1,6</b>	<b>1,9</b>	<b>0,7</b>
$\alpha$ -Terpinéol	1166	1697	<b>4,2</b>	<b>4,6</b>	<b>1,3</b>
Périllaldéhyde	1240	1782	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>
Thymol	1261	2186	<b>1,7</b>	<b>2,3</b>	<b>0,8</b>
N-méthyl-anthranilate de méthyle	1370	2072	<b>3,4</b>	<b>3,8</b>	<b>4,3</b>
<b>Total (%)</b>			<b>93,5</b>	<b>94,1</b>	<b>94,5</b>

L'ordre d'élution est donné sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). IRa et IRp : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20).

## II.2. Etude de la variabilité de l'huile essentielle de *C. reticulata*

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons analysé 19 échantillons d'huile essentielle préparée à partir des écorces. Ceux-ci proviennent de deux stations qui sont : (Aïn El Hout (E1 à E9), Hennaya (E10 à E19) (**Boutaayachet et Zazzoua, 2022**)). Tous les échantillons ont été analysés par CPG(Ir). Ainsi, sur l'ensemble des échantillons, nous avons identifié 14 constituants. Nous rapportons dans le **tableau (5)** les teneurs des constituants majoritaires. Les échantillons analysés sont qualitativement très proches. Par contre, nous remarquons une variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants : limonène (31,3 - 74,3%), N-méthyl-anthranilate de méthyle (0,1 - 16,7%) et  $\alpha$ -terpinéol (0,6 - 10,2%). Ces huiles essentielles renferment également d'autres monoterpènes en quantités appréciables à savoir : octanal (0,2 - 3,0%), *p*-cymène (2,1 - 5,9%), 1,8-cinéole (0,1 - 2,3%), linalol (0,4 - 5,9%), terpinèn-4-ol (0,4 - 3,1%), et thymol (0,1 - 2,5%).

**Tableau 5 : Composés majoritaires identifiés dans les 19 échantillons de l'huile essentielle de *Citrus reticulata***

Composés (en %)	19 échantillons		
	Moy $\pm$ ET	Min	Max
$\alpha$ -Pinène	0,7 $\pm$ 0,38	0,1	1,2
$\beta$ -Pinène	0,7 $\pm$ 0,35	0,1	1,2
Octanal	0,9 $\pm$ 0,98	0,2	3,0
Myrcène	1,2 $\pm$ 0,39	0,4	1,6
<i>p</i> -Cymène	4,1 $\pm$ 0,81	2,1	5,9
Limonène*	61,5 $\pm$ <b>12,64</b>	31,3	74,3
1,8-Cinéole*	0,5 $\pm$ 0,48	0,1	2,3
$\gamma$ -Terpinène	10,5 $\pm$ <b>4,10</b>	0,1	16,7
Linalol	1,6 $\pm$ 1,52	0,4	5,9
Terpinèn-4-ol	1,1 $\pm$ 0,81	0,4	3,1
$\alpha$ -Terpinéol	2,9 $\pm$ 2,74	0,6	10,2
Péridaldéhyde	0,7 $\pm$ 0,40	0,3	1,5
Thymol	0,9 $\pm$ 0,69	0,1	2,5
N-méthyl-anthranilate de méthyle	3,2 $\pm$ 3,83	0,1%	<b>16,7</b>

Moy : Moyenne, ET : Ecart type, Min : minimum, Max : Maximum

Ainsi nos résultats sont bien en accord avec les données décrites dans la littérature (Minh Tu *et al.*, 2002 ; Sawamura *et al.*, 2004 ; Njoroge *et al.*, 2009 ; Chutia *et al.*, 2009 ; Viuda-Martos *et al.*, 2009 ; Lota *et al.*, 2000 ; Lota *et al.*, 2001 ; Frassinetti *et al.*, 2011 ; Espina *et al.*, 2011 ; Khan *et al.*, 2012 ; Van Hung *et al.*, 2013 ; Hosni *et al.*, 2010 ; Bourgou *et al.*, 2012), en particulier, pour le limonène, le  $\gamma$ -terpinène et/ou le myrcène. Cependant, ils rapportent des teneurs très importantes en limonène variant 51,8 et 96,7%, en  $\gamma$ -terpinène (jusqu'à 36,7%), en myrcène (jusqu'à 24,0%) et en *p*-cymène (jusqu'à 12,0%).

A notre connaissance, certains monoterpènes oxygénés présents en quantités appréciables dans nos échantillons, n'ont jamais été cités dans la littérature, il s'agit de : l' $\alpha$ -terpinéol (jusqu'à 10,2%), le N-méthyl-anthranilate de méthyle (jusqu'à 16,7%) et le thymol (jusqu'à 2,5%). En revanche, Bourgou *et al.* en 2012, rapportent une teneur élevée en 1,8-cinéole (jusqu'à 26,4%) pour un échantillon prélevé en Tunisie.

Enfin, certains auteurs rapportent ponctuellement des compositions radicalement différentes. Un échantillon d'huile essentielle de *C. reticulata* originaire d'Inde contient du limonène (46,7%) comme composé majoritaire, mais suivi de géraniol (19,0%), néral (14,5%), acétate de géranyle (3,9%), géraniol (3,5%),  $\beta$ -caryophyllène (2,6%) et nérol (2,3%) (Chutia *et al.*, 2009). Un autre échantillon de l'huile essentielle de *C. reticulata* récolté en Espagne, est caractérisé par une forte teneur en limonène, accompagné d'oxyde de *cis*-limonène (2,8%) et *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol (2,3%) (Espina *et al.*, 2011). Un autre échantillon provenant de Pakistan est dominé aussi par le D-Limonène (75,7%), mais suivi par le limonène glycol (6,6%), le *trans-p*-mentha-2,8-diénoïl (4,0%), le Z-5-nonadécane (3,2%), l'heneicosane (2,4%) et l'eugénol (2,4%) (Khan *et al.*, 2012).

Les variations observées peuvent être dues à des différences dans les méthodes d'extraction, les conditions de culture, et les variétés régionales de mandarines.

### III. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de *Citrus reticulata*

Cette partie concerne l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* de quatre échantillons individuels (E1.V3 ; E3.V3 ; E4.V3 ; E5.V3) et deux échantillons « communelle » du verger (Aïn El Hout) : EC1.V1 (E1+3+5+6+7+9) et EC2.V1 (E2+4+8+10). Nous avons regroupé les huiles des différents échantillons, afin de disposer de quantités suffisantes pour pouvoir effectuer la totalité des tests.

### III.1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de l'HE des six échantillons a été testé par la méthode de DPPH, en utilisant l'éthanol absolu comme solvant et la mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations. Les résultats sont reportés sur les figures (14, 15, 16, 17, 18 et 19).

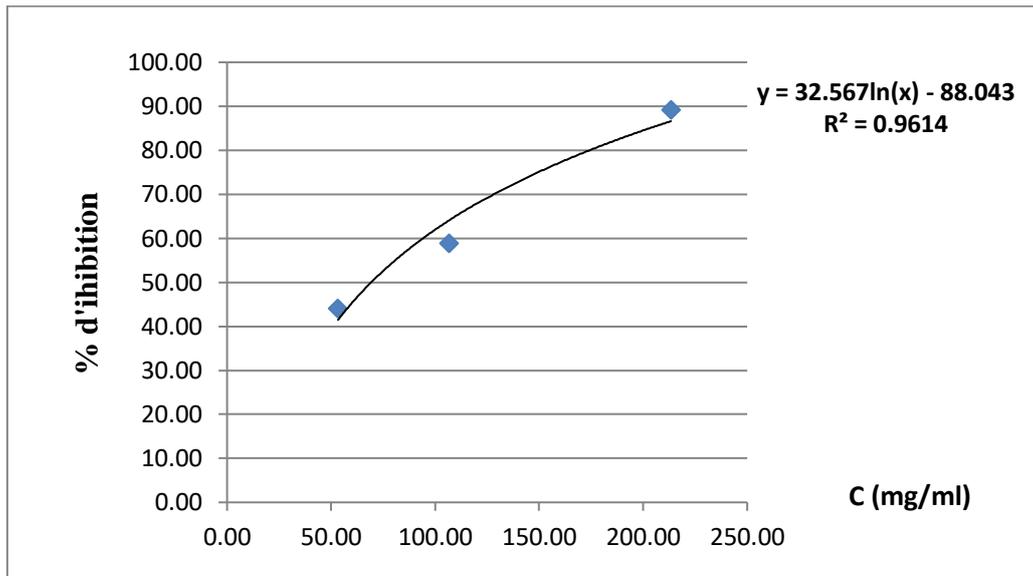


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de *Citrus reticulata* (Echantillon E1.V3)

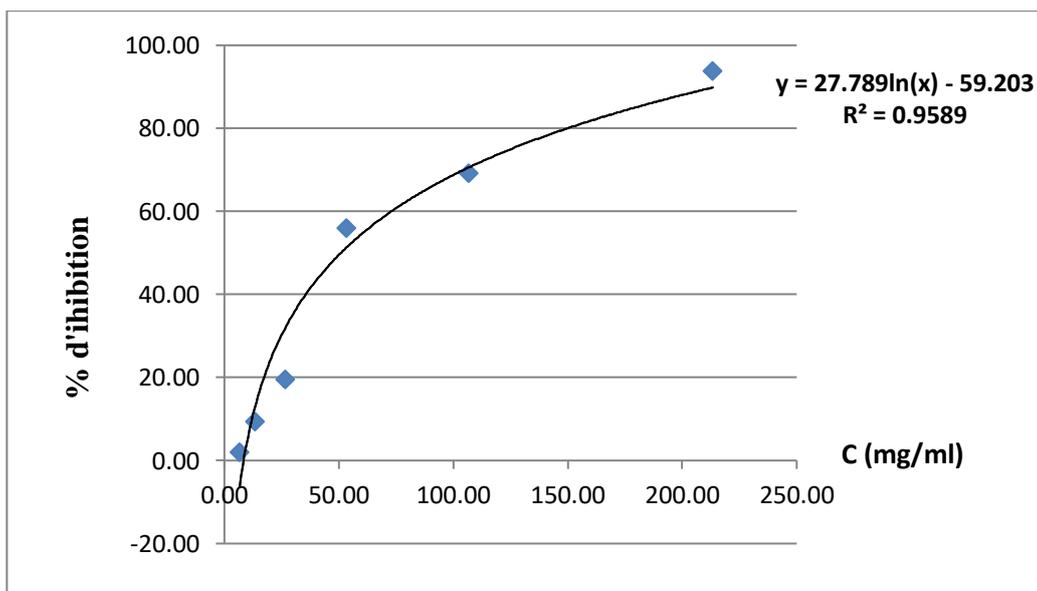


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de *Citrus reticulata* (Echantillon E3.V3)

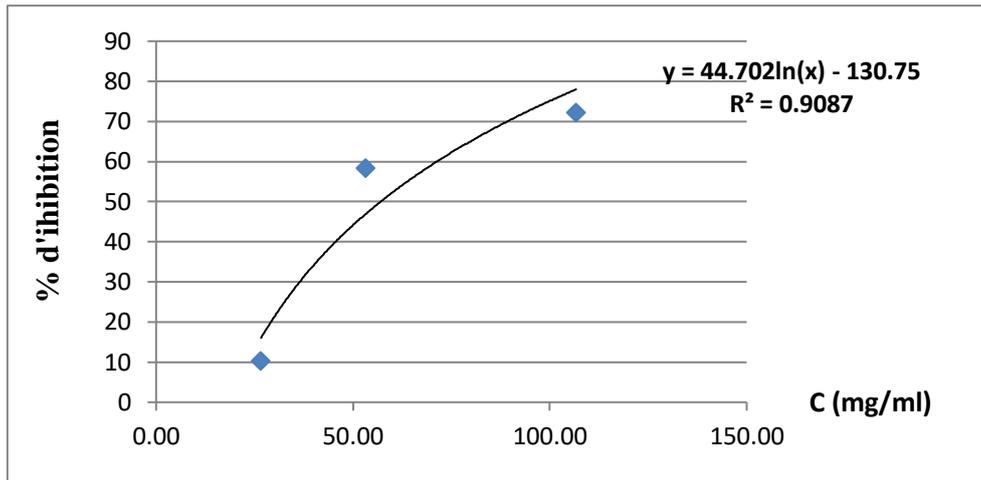


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de *Citrus reticulata* (E4.V3)

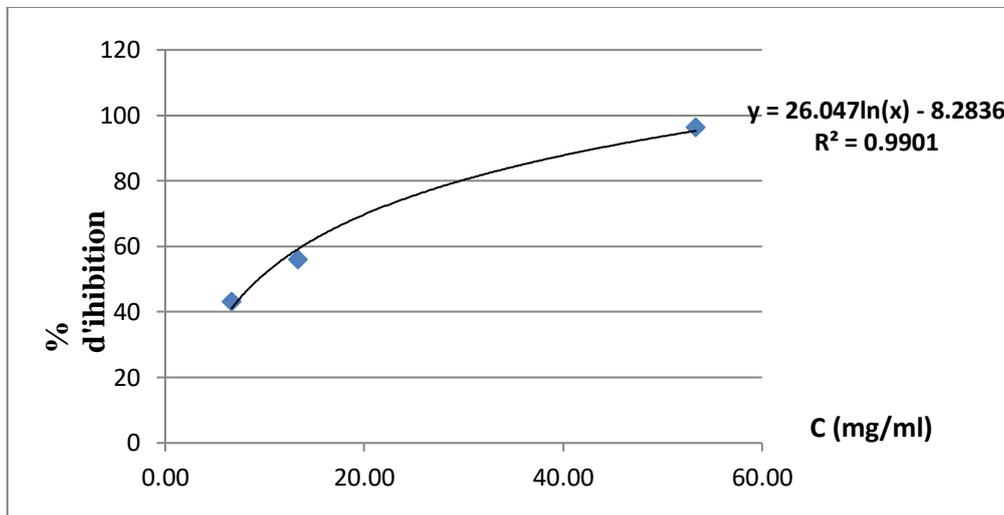


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes de l'HE des écorces de *Citrus reticulata* (Echantillon E5.V3)

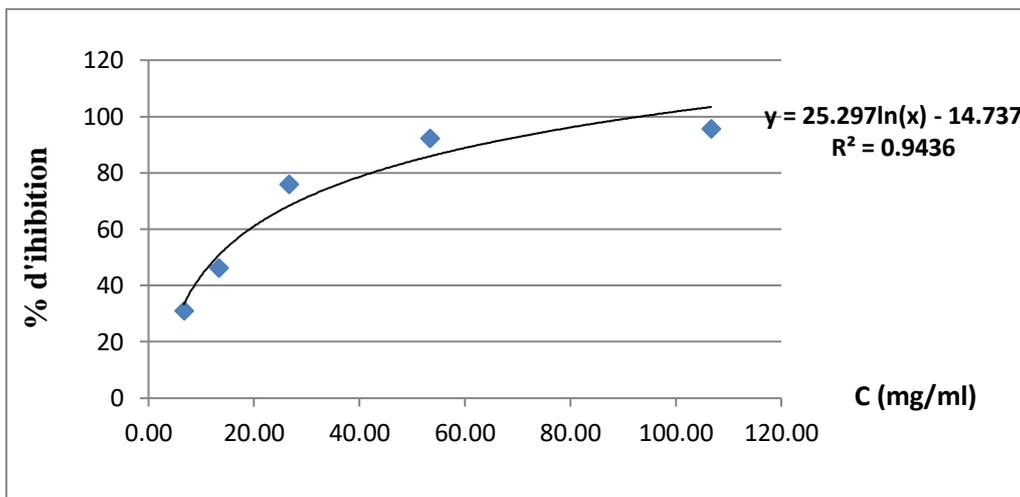
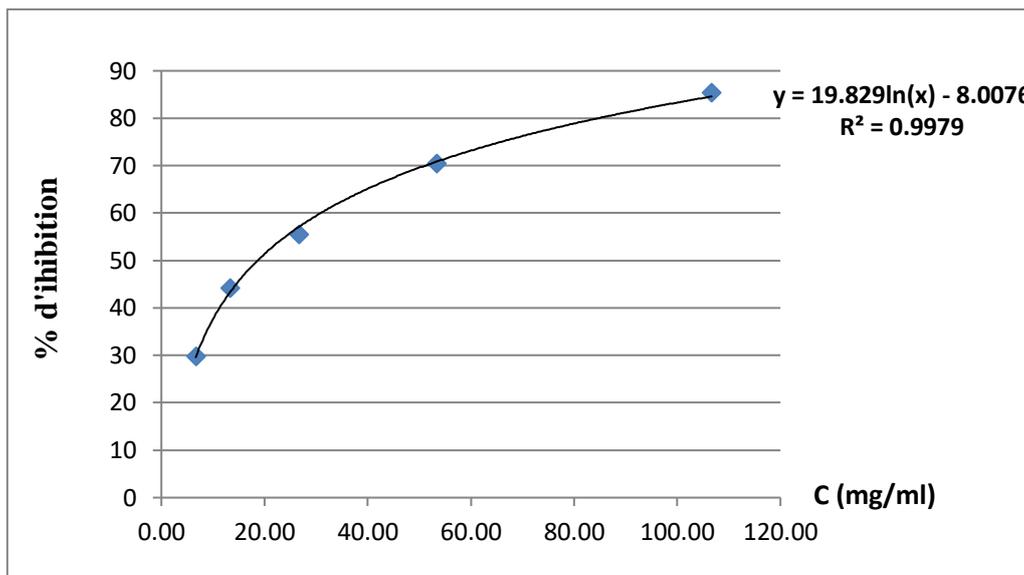


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de *Citrus reticulata* (Echantillon EC1.V1)



**Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentration de l'HE des écorces de *Citrus reticulata* (Echantillon EC2.V1)**

Selon les graphes ci-dessus, les profils de l'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que les huiles essentielles testées possèdent une activité dose-dépendante.

Les résultats révèlent qu'à la concentration 256 mg/ml, les échantillons (E5.V3, E3.V3 et E1.V3) ont montré un pouvoir réducteur important de l'ordre de 99,11% ; 93,74% et 89,22%, respectivement.

Par contre, à une concentration plus faible de l'ordre de 128 mg/ml, les échantillons (EC1, E5.V3 et EC2) se sont avérés les plus actifs, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 95,35% ; 88,39% et 85,43%, respectivement. En revanche, à cette même concentration, nous avons obtenu une activité antioxydante moins importante pour les échantillons E1.V3 ; E3.V3 et E4.V3, avec des pourcentages d'inhibition variant entre 41,76 et 69,19%.

Par comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature, nous avons constaté que nos échantillons présentent une activité antioxydante comparable à celle rapportée par **Boutaayachet et Zazzoua** en **2022**. En effet, ils avancent des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 81,4 et 88,2% à des concentrations de 128 et 256 mg/ml, respectivement. Par contre, **Frassinetti et al.** en **2011** rapporte un pouvoir antioxydant important avec un pourcentage d'inhibition obtenu par le test de DPPH\* de l'ordre de 60% à une concentration de 1000 µg/ml comparable à celui du standard testé, 70% pour le trolox.

En revanche, **Belkaddar et Benhamou** en **2020** rapportent un très faible pouvoir antioxydant de l'huile essentielle des écorces de *C. reticulata*, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 26% à une concentration de 1500 mg/ml.

Nous rapportons dans le **Tableau 6**, les valeurs des  $CI_{50}$ , qui expriment la quantité d'un antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Elles nous permettent de comparer l'efficacité des huiles essentielles des différents échantillons avec celle du contrôle positif. Nous rappelons que plus la valeur de la  $CI_{50}$  est faible plus l'huile essentielle possède un potentiel pour le piégeage des radicaux libres.

**Tableau 6 : Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'huile essentielle de *Citrus reticulata* des différents échantillons testés exprimée en  $CI_{50}$**

Echantillons	$CI_{50}$ (mg/ml)
<b>E1.V3</b>	65,6 ± 2,7
<b>E3.V3</b>	52,3 ± 4,8
<b>E4.V3</b>	94,2 ± 26,5
<b>E5.V3</b>	9,4 ± 0,6
<b>EC1.V1</b>	12,9 ± 0,4
<b>EC2.V1</b>	18,7 ± 0,4
<b>Acide ascorbique</b>	0,026 ± 0,01

Ces résultats confirment ceux obtenus pour les pourcentages d'inhibition. En effet, conformément à ces données, l'échantillon E5.V3 présente la plus importante activité antioxydante, avec une  $CI_{50}$  de l'ordre 9,4 ± 0,6 mg/ml, suivi par les deux échantillons communelles EC1.V1 et EC2.V1, avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 12,9 ± 0,4 mg/ml et 18,7 ± 0,4 mg/ml, respectivement. Cependant, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé, l'acide ascorbique, avec une  $CI_{50}$  de 0,026 ± 0,01 mg/ml.

En revanche, les autres échantillons (E1.V3, E3.V3 et E4.V3) se sont montrés les moins actifs, avec des  $CI_{50}$  les plus élevées, variant entre 52,3 ± 4,8 mg/ml et 94,2 ± 26,5 mg/ml.

**Houmy et al. (2020)** ont étudié l'activité antioxydante de l'huile essentielle de six variétés de mandarines, qui contiennent des teneurs en limonène variant entre 55,44 et 100%. Ces auteurs rapportent des pourcentages d'inhibition plus faibles par rapport à nos résultats, variant entre 5,0 et 24,0%, à une concentration de l'ordre de 25 µl/ml.

Enfin, **Yang et al.**, en **2010** ont avancé un fort pouvoir antioxydant du limonène, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 93,1%, à une concentration de l'ordre de 5 µg/ml.

De même, **Khan et al. (2012)** rapportent une  $CI_{50}$  très faible de l'ordre de 1,007 mg/g. pour un échantillon de l'huile essentielle de *C. reticulata*.

### III.2. Activité anti-inflammatoire

#### III.2.1. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

La capacité de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* à inhiber la lipoxgénase de soja a été évaluée en tant qu'indication d'une potentielle activité anti-inflammatoire. Les résultats du pourcentage d'inhibition de la lipoxgénase des six échantillons sont reportés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle des différents échantillons de *Citrus reticulata***

C ( $\mu\text{g/ml}$ )	% d'inhibition						C ( $\mu\text{g/ml}$ )	% d'inhibition ANDG
	E1.V3	E3.V3	E4.V3	E5.V3	EC1.V1	EC2.V1		
12,5	19,2	30,5	60,2	17,6	31,4	8,4	3,125	46,6
25	57,9	39,0	88,9	61,0	50,0	40,2	6,25	83,2
50	73,5	66,3	91,9	79,8	67,2	52,4	12,5	89,7
100	84,5	79,3	-	82,8	-	84,3	25	94,3

C : Concentration ; % : Pourcentage

Selon le tableau 7 ci-dessus, les pourcentages d'inhibition des différents échantillons obtenus révèlent que les huiles essentielles de *C. reticulata* testées possèdent une activité dose-dépendante.

A 50  $\mu\text{g/ml}$ , l'échantillon E4.V3 s'est révélé le plus actif, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 91,9%. En revanche, les autres échantillons se sont montrés moins actifs. En effet, les pourcentages d'inhibition varient entre 79,3 et 84,5% à la concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$ , mais qui restent plus faibles par rapport au standard, l'acide nordihydroguaiarétique (ANDG), qui présente un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 94,3% à la concentration de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

Ces résultats indiquent que l'huile essentielle de *Citrus reticulata* possède un potentiel anti-inflammatoire prometteur.

Nous rapportons dans le **Tableau 8**, les valeurs des  $CI_{50}$  (concentration à laquelle 50% de la lipoxgénase a été inhibée). Elles nous permettent de comparer l'efficacité des huiles essentielles des différents échantillons avec celle du contrôle positif.

**Tableau 8 : Activité anti-inflammatoire l'huile essentielle de *Citrus reticulata* des différents échantillons testés exprimée en CI<sub>50</sub>**

Echantillons	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
E1.V3	28,0 ± 8,3
E3.V3	30,4 ± 11,0
E4.V3	6,6 ± 0,4
E5.V3	53,0 ± 11,3
EC1.V1	9,3 ± 7,6
EC2.V1	46,4 ± 0,85
ANDG	4,9 ± 1,1

ANDG : Acide nordihydroguaiarétique

Ces résultats confirment ceux obtenus pour les pourcentages d'inhibition. En effet, conformément à ces données, l'échantillon E4.V3 présente la plus importante activité anti-inflammatoire, avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre 6,6 ± 0,4 µg/ml, suivi par l'échantillon communelle EC1.V1, avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre de 9,3 ± 7,6 µg/ml. Ces valeurs sont très proches à la CI<sub>50</sub> de l'ordre de 4,9 ± 1,1 µ/ml du composé de référence utilisé, l'acide nordihydroguaiarétique.

En revanche, les autres échantillons se sont montrés moins actifs, avec des CI<sub>50</sub> les plus élevées, variant entre 28,0 ± 8,3 µg/ml et 53,0 ± 11,3 µg/ml.

Par ailleurs, nous avons constaté que nos résultats sont comparables à ceux de la littérature. En effet, **Baylac et Racine** en **2003**, rapportent une bonne activité anti-inflammatoire pour l'HE de *C. reticulata*, avec une CI<sub>50</sub> variant entre 10 et 30 µg/ml par comparaison au contrôle positif, à savoir : ANDG (CI<sub>50</sub> < 10 µg/ml) comparable à celle du limonène pur.

De même, **Viljoen et al.**, en **2006** ont évalué l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de 17 espèces du genre *Agathosma*. Ces auteurs rapportent que toutes les HE de ces espèces possèdent la capacité à inhiber la lipoxygénase. Ils avancent également que l'HE de l'espèce *A. collina* qui contient 30,9% de limonène est la plus active, avec une CI<sub>50</sub> = 25,98 µg/ml par comparaison au standard (ANDG : CI<sub>50</sub> = 2,39 µg/ml).

### III.2.2. Activité anti-inflammatoire *in silico*

Dans cette étude, la protéine cible sélectionnée est la lipoxygénase-B (LOX-B) <https://doi.org/10.2210/pdb2IUJ/pdb>, représentée par la structure cristalline 2iuj (**Figure 20**) de résolution 2.40 Å. La LOX-B est une enzyme clé impliquée dans la cascade inflammatoire,

jouant un rôle essentiel dans la conversion de l'acide arachidonique en leucotriènes, des médiateurs inflammatoires importants.

La LOX-B est activement impliquée dans les processus inflammatoires, contribuant à la production de leucotriènes qui sont responsables de la réponse inflammatoire, de la bronchoconstriction et de la régulation de la perméabilité vasculaire. Son expression est induite dans divers tissus en réponse à des stimuli inflammatoires et son dysfonctionnement ou sa suractivité sont associés à diverses maladies inflammatoires, telles que l'asthme, la rhinite allergique et d'autres maladies inflammatoires chroniques.

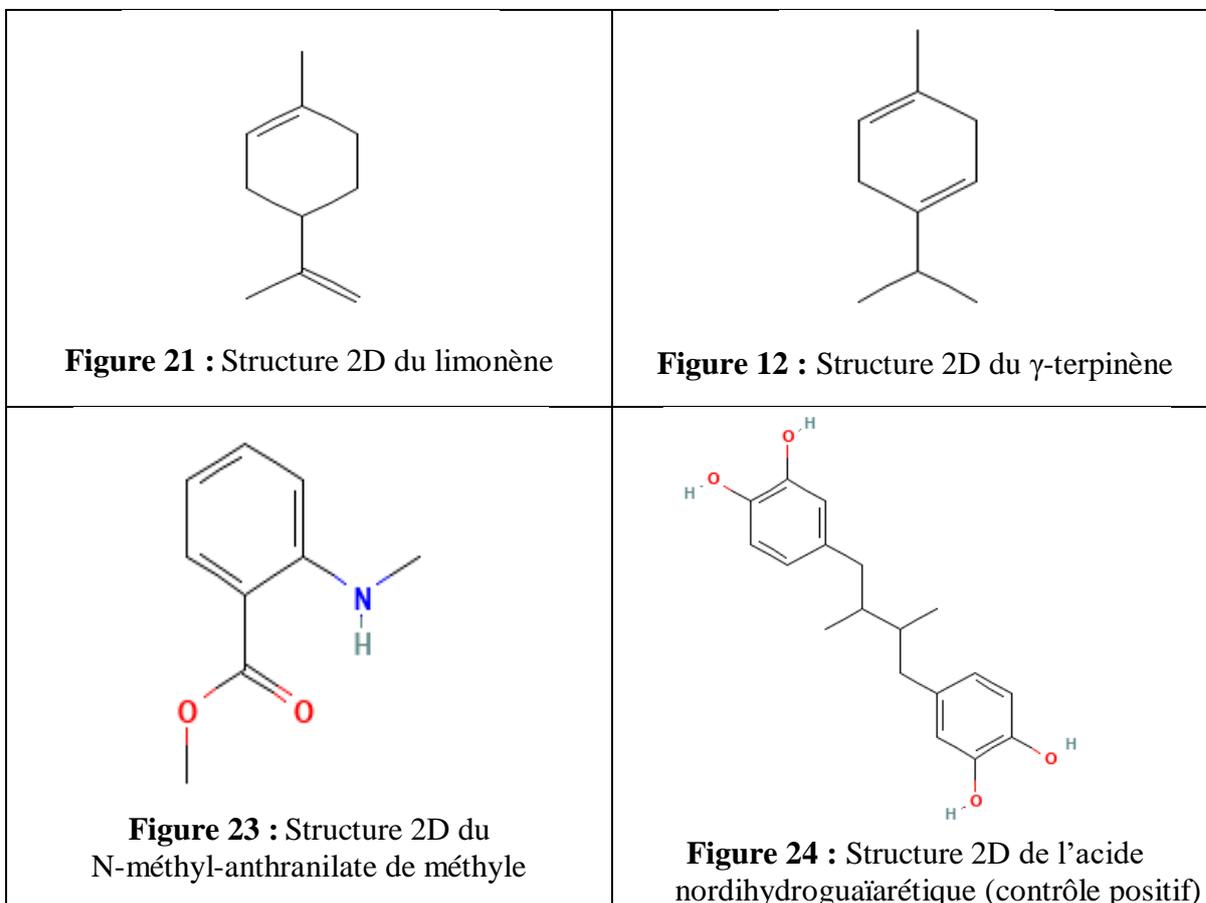
Étant donné le rôle central de la LOX-B dans la médiation de l'inflammation, elle représente une cible thérapeutique prometteuse pour le développement de médicaments anti-inflammatoires. En inhibant sélectivement l'activité de la LOX-B, il est possible de moduler la production des leucotriènes et ainsi atténuer la réponse inflammatoire sans affecter d'autres voies biologiques importantes.

Étudier les interactions moléculaires entre les ligands potentiels et la LOX-B, représentée ici par la structure 2iuj, permet de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition de cette enzyme et de concevoir de nouveaux composés pharmacologiques capables de moduler sélectivement son activité. Cela ouvre la voie au développement de thérapies plus spécifiques et mieux tolérées pour le traitement des maladies inflammatoires, offrant ainsi de nouvelles perspectives pour la gestion des troubles inflammatoires.



**Figure 20 : Structure 3D de la protéine (code PDB 2iuj)**

Les ligands utilisés pour tester l'activité anti-inflammatoire sont : le limonène (**Figure 21**), le  $\gamma$ -terpinène (**Figure 22**), le N-méthyl-anthranilate de méthyle (**Figure 23**) et l'acide nordihydroguaiarétique (Contrôle positif, **Figure 24**).



Les résultats de scoring (**Tableau 9**) représentent les interactions énergétiques entre la protéine (2iuj) et les différents ligands (les composés majoritaires de l'HE de *Citrus reticulata* et le contrôle positif), mesurées en unités de Kcal/mol, qui reflètent l'affinité de liaison entre la protéine et le ligand. Plus le score est négatif, plus l'interaction entre la protéine et le ligand est forte et donc potentiellement favorable. Nous constatons que :

- L'acide nordihydroguaiarétique, avec un score de -13.9958 Kcal/mol, montre une affinité beaucoup plus forte pour la protéine 2iuj par rapport aux autres ligands. C'est la molécule de référence et elle se lie le plus efficacement à la protéine.
- Le  $\gamma$ -terpinène est le ligand avec la plus forte affinité (-8.7352 Kcal/mol), parmi les composés majoritaires de l'HE de *Citrus reticulata*, mais il reste moins efficace que la molécule de référence.

- Le limonène et le N-méthyl-anthranilate de méthyle ont des affinités plus faibles, avec des scores comparables de l'ordre de -7.6916 et -7.5547 Kcal/mol, respectivement, indiquant qu'ils se lient moins efficacement à la protéine que le contrôle positif, à savoir : l'acide nordihydroguaiarétique.

Enfin, selon les résultats obtenus, les composés majoritaires de l'huile essentielle (HE) de *Citrus reticulata*, tels que le limonène, N-méthyl-anthranilate de méthyle et en particulier le  $\gamma$ -terpinène, montrent des interactions favorables avec la protéine 2iuj. Cela suggère qu'ils pourraient être utilisés comme des anti-inflammatoires naturels potentiels en remplaçant les substances synthétiques qui ont de nombreux effets secondaires.

**Tableau 9 : Résultats du docking moléculaire**

Protéine – Ligands	$\Delta G$ (Kcal/mol)
2iuj - Limonène	-7,6916
2iuj - $\gamma$ -Terpinène	<b>-8,7352</b>
2iuj - N-Méthyl-anthranilate de méthyle	-7,5547
2iuj - Nordihydroguaiarétique	<b>-13,9958</b>

# Conclusion

L'Algérie possède, sans aucun doute, l'une des flores les plus riches au monde renfermant un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales depuis les rives de la méditerranée jusqu'aux confins du Sahara.

Le monde tend vers le biologique et cherche à remplacer les produits chimiques par des alternatives naturelles. Les composés naturels présents dans les *Citrus* et leur utilisation traditionnelle offrent une solution prometteuse.

Cette étude vise à valoriser les plantes aromatiques médicinales de la famille des Rutacées, en particulier *Citrus reticulata* (mandarine), récolté dans trois stations de la région de Tlemcen : Aïn El Hout, Hennaya et Aïn Youcef. Nos investigations ont porté sur l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces de mandarine, la détermination des rendements, la caractérisation chimique, et l'évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de plusieurs échantillons.

Les rendements en huile essentielle sont très variables, allant de 0,19% à 0,42% pour le verger d'Aïn El Hout, de 0,15% à 0,28% pour le verger de Hennaya et de 0,84% à 1,36% pour le verger d'Aïn Youcef. Cependant, nous avons constaté que les échantillons prélevés dans la station d'Aïn Youcef sont les plus riches en huile essentielle (Moyenne = 1,17%).

L'analyse de la composition chimique par combinaison de la CPG et la RMN <sup>13</sup>C a permis d'identifier 14 composés, représentant entre 93,5 et 94,5% de la composition chimique totale de l'huile essentielle. L'huile essentielle de *C. reticulata* est homogène, très riche en monoterpènes hydrocarbonés, dont un composé nettement majoritaire, le limonène qui représente entre 62,7 et 63,1%. Trois autres monoterpènes sont présents en quantité appréciable, il s'agit de :  $\gamma$ -terpinène (7,5 - 14,9%), *p*-cymène (4,1 - 5,9%) et N-méthyl-anthranilate de méthyle (3,4 - 4,3%). Par ailleurs, dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons analysé 19 échantillons d'huile essentielle préparée à partir des écorces de mandarine prélevés à partir de pieds individuels. Nous avons remarqué une variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants : le limonène (31,3 - 74,3%), le N-méthyl-anthranilate de méthyle (0,1 - 16,7%) et l' $\alpha$ -terpinéol (0,6 - 10,2%).

Les résultats des activités biologiques de l'huile essentielle de *C. reticulata*, nous permettent d'avancer les points suivants :

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité antioxydante de six échantillons en utilisant la méthode du piégeage du radical DPPH. Les résultats révèlent qu'à la concentration 256 mg/ml, les échantillons (E5.V3, E3.V3 et E1.V3) ont montré un pouvoir réducteur important de l'ordre de 99,1% ; 93,7% et 89,2%, respectivement. Cependant, l'échantillon

E5.V3 présente la plus importante activité antioxydante, avec une  $CI_{50}$  de l'ordre  $9,4 \pm 0,6$  mg/ml, suivi par les deux échantillons communelles EC1.V1 et EC2.V1, avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de  $12,9 \pm 0,4$  mg/ml et  $18,7 \pm 0,4$  mg/ml, respectivement. En revanche, cette activité reste faible par rapport à l'antioxydant de référence utilisé, l'acide ascorbique, avec une  $CI_{50}$  de  $0,026 \pm 0,01$  mg/ml.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la capacité de l'huile essentielle des six échantillons à inhiber la lipoxigénase. Les résultats de ce test montrent que le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration de l'huile essentielle, atteignant 91,9% à 50  $\mu$ g/ml pour l'échantillon E4.V3 et avec une  $CI_{50}$  de l'ordre  $6,6 \pm 0,4$   $\mu$ g/ml, suivi par l'échantillon communelle EC1.V1, avec une  $CI_{50}$  de l'ordre de  $9,3 \pm 7,6$   $\mu$ g/ml. Ces valeurs sont très proches à la  $CI_{50}$  de l'ordre de  $4,9 \pm 1,1$   $\mu$ g/ml du composé de référence utilisé, l'acide nordihydroguaiarétique.

Enfin, nous avons évalué l'activité anti-inflammatoire *in silico*. Nous avons constaté que l'acide nordihydroguaiarétique, avec un score de -13.9958 Kcal/mol, montre une affinité beaucoup plus forte pour la protéine 2iuj (lipoxigénase-B) par rapport aux autres ligands (limonène,  $\gamma$ -terpinène, N-méthyl-anthranilate de méthyle, composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. reticulata*). Par ailleurs, le  $\gamma$ -terpinène est le ligand avec la plus forte affinité (-8.7352 Kcal/mol), parmi les composés majoritaires de l'HE de *Citrus reticulata*, mais il reste moins efficace que le composé de référence (ANDG).

Enfin, il serait pertinent de poursuivre cette étude :

- ✚ Par une analyse statistique de la composition des différents échantillons afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique ;
- ✚ En déterminant le test anti-inflammatoire *in vivo* pour évaluer leur efficacité et leur sécurité chez les animaux et éventuellement chez les humains.
- ✚ En évaluant d'autres activités biologiques tels que l'activité antidiabétique, l'activité antibactérienne et antifongique.
- ✚ En étudiant l'activité antioxydante par d'autres tests : FRAP, ...

Il serait intéressant aussi d'isoler les molécules bioactives pour la recherche d'un remède naturel.

# **Références bibliographiques**

A

- ✚ **Aboughe Angone S., Aworet Samseny R. R. R., Eyele Mve Mba C. (2015).** Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. *Phytothérapie*, 13(5): 283-287.
- ✚ **Adams RP. (1989)** Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press, San Diego, 780p.
- ✚ **Ainane, A., Khammour, F., Talbi, M., Charaf, S., Elabboubi, M., El Kouali, M., Bricha, M.R., Abba, El-H., Cherroud, S., Ainane, T. (2018).** Chemical characterizations of the aromatic compositions of two *Citrus* species: *Citrus aurantium* and *Citrus reticulata*. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, 2(3): 80-83.
- ✚ **Ariyoshi T., Arakaki M., Ideguchi K., Ishizuka Y., Noda K. (1975)** Studies on the metabolism of d-Limonene (*p*-Mentha-1,8-diene). III. Effects of d-Limonene on the lipids and drug-metabolizing enzymes in rat livers. *Xenobiotica*, 5(1): 33-8.
- ✚ **Arvindekar A. U., Joglekar M., Bavkar L. N., Sistla S. (2017)** Effective inhibition of protein glycation by combinatorial usage of limonene and aminoguanidine through differential and synergistic mechanisms. *International Journal Biological Macromolecules*, 99: 563-569.

B

- ✚ **Bachés B., Bachés M. (2002)** Agrumes : Comment les choisir et les cultiver facilement, Editeur : Ulmer, Paris, France, 96p.
- ✚ **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008)** Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- ✚ **Bandoniene D., Murkovic M., Pfannhauser W., Venskutonis P. R., Gruzdiene D. (2002)** Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. *European Food Research and Technology*, 214, 143-147.
- ✚ **Bastard K. (2005)** Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques. UFR Biologie et Sciences de la Nature. *Biomedical Sciences and Applications*, 748: 233-258.
- ✚ **Bayala B., Bassolé I. H. N., Gnoula C., Nebie R., Yonli A., Morel L., Figueredo G., Nikiema J. B., Lobaccaro J. M. A., Simpore J. (2014)** Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities of Essential Oils of Plants from Burkina Faso. *PLoS One*, 9(3), e92122.
- ✚ **Baylac S., Racine P. (2003)** Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13: 138-144.
- ✚ **Belkaddar R., Benhamou A. (2020)** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts et de l'huile essentielle du *Citrus reticulata*. Mémoire de Master en Biochimie, Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent, Algérie, 90p.

- ✚ **Benbalia A., Aggoun A., Baalia, B. (2020)** Etude de l'activité anti-inflammatoire d'une plante médicinale : *Moringa oleifera*. Mémoire de Master en biologie, spécialité : immunologie appliquée, Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie, 74p.
- ✚ **Bengag A. (2021)** Activité anti-inflammatoire, antibactérienne et antioxydante des essences de *Citrus* de la région de Chlef, Thèse de doctorat en Sciences, spécialité : Biochimie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, Algérie, 166p.
- ✚ **Bighelli A., Casanova J. (2009)** Analytical methods for *Cymbopogon* oils in essential oil bearing grasses, the genus *Cymbopogon*. Edition Taylor & Francis, London, 195-215.
- ✚ **Blois MS. (1958)** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- ✚ **Bosson L. (2012)** Grandir avec les huiles essentielles, Editions Amyris, Bruxelles, Belgique, 280p.
- ✚ **Boughendjioua H., Hafsa A., Kadach, A. (2019)** Antiacetylcholinesterase activity of sweet Orange (*Citrus reticulata*) essential oil from Algeria. *Algerian Journal of Natural Products*, 7(2): 701-705.
- ✚ **Bourgou S., Rahali F. Z., Ourghemmi I., Saïdani Tounsi M. (2012)** Changes of peel essential oil composition of four Tunisian *Citrus* during fruit maturation. *The Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/528593.
- ✚ **Boutaayachet A., Zazzoua A. (2022)** Contribution à l'étude des rendements et des activités biologiques des huiles essentielles des zestes du *Citrus reticulata* (Mandarine) et du *Citrus sinensis* (Orange) Mémoire de master en Sciences Biologiques, spécialité : Biochimie Appliquée, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie, 80p.
- ✚ **Bouterfas K., Mehdadi Z., Elaoufi M. M., Latreche A., Benchiha W. (2016)** Antioxidant activity and total phenolic and flavonoïds content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 74(6): 453-462.
- ✚ **Brand G, Schaal B. (2017)** Faction in depressive disorders: issues and perspectives. *Encephale*, 43(2): 176-82.
- ✚ **Bruneton J. (1993)** Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, 916p.

### C

- ✚ **Chamblee T. S., Karelitz R. L., Radford T., Clark B. C. (1997)** Identification of sesquiterpenes in *Citrus* essential oil by cryofocusing GC/FT-IR. *Journal of Essential Oil Research*, 9: 127-132.
- ✚ **Chutia M., Bhuyan P. D., Pathak M. G., Sarma T. C., Boruah P. (2009)** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3): 777-780.

- ✚ **Coleman W. M., Lawrence B. M. (1997)** A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 1-8.
- ✚ **Contreras-Calderón J., Calderón-Jaimes L., Guerra-Hernández E., GarcíaVillanova B. (2011)** Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7): 2047-2053.
- ✚ **Corticchiato M., Casanova J. (1992)** Analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13 : application aux huiles essentielles. *Analysis*, 20: 51-58.

#### D

- ✚ **Dif M. M., Benhassaini H., Cheriet A. (2015).** Contribution à l'étude ethnobotanique et floristique des plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie). *Journal of Applied Biosciences*, 91: 8490-8505.
- ✚ **Do Q. D., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L., Huynh L. H., Soetaredjo F. E., Ismadji S., Ju Y. H. (2014)** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoïd content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3): 296-302.
- ✚ **Dongmo P. M. J., Kuate J., Ngouana V., Damesse F., Tchinda Sonwa E., Zollo P. H. A. A., Menut C. (2008)** Comparaison des propriétés antiradicalaires et anti-inflammatoires des huiles essentielles de *Citrus reticulata* var. *madagascar* et *Citrus sinensis* var. *casagrande* du Cameroun. *Fruits*, 63(4): 201-208.
- ✚ **Dorji K., Yapwattanaphun C. (2011)** Morphological Identification of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in Bhutan. *Kasetsart Journal, (Natural Science)*, 45: 793-802.
- ✚ **Drazen J. M., Dahlen S. E., Lee T.H. (1996)** Five Lipoxygenase Products in Asthma. CRC Press, New York, 27p.
- ✚ **DSA wilaya de Tlemcen, 2021** (direction des services agricoles), adresse: 35 bd mohamed 5 Bel Air, Tlemcen.

#### E

- ✚ **Eshwarappa R. S. B., Ramachandra Y. L., Subaramaiha S. R., Subbaiah SGP, Austin RS, Dhananjaya BL. (1016)** Anti-Lipoxygenase activity of leaf gall extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Research*, 8(1): 78-82.
- ✚ **Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D., Pagán R. (2011)** Chemical composition of commercial *Citrus* fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6): 896-902.

#### F

- ✚ **FAO (2020)** *Citrus* Fruit Fresh and Processed Statistical Bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italie.
- ✚ **Filippi J. J., Belhassen E., Baldovini N., Brevard H., Meierhenrich U. J. (2013)** Qualitative and quantitative analysis of Vetiver essential oils by comprehensive two-

dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1288: 127-148.

- # **Franchomme P., Jollois R., Péroël D., (2001)** L'aromathérapie exactement. Editions Roger Jollois, 490p.
- # **Frassinetti S., Caltavuturo L., Cini M., Della Croce C.M., Maserti B. E. (2011)** Antibacterial and antioxidant activity of essential oils from *Citrus* spp. *Journal of Essential Oil Research*, 23(1): 27-31.

### G

- # **Gargano A. C., Costa A., Costa M. (2008)** Essential oils from *Citrus latifolia* and *Citrus reticulata* reduce anxiety and prolong ether sleeping time in mice. *Tree For Sci Biotech*, 2(1): 121-124.
- # **Gazi M. R., Kanda K., Yasuda M., Kato F. (2004)** Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *Sporobolomyces salmonicolor*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7: 1365-1370.

### H

- # **Hadj Mohamed R., Benammar I., (2019)** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles des pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*. Mémoire de Master en Sciences Biologiques, spécialité : Biochimie, université Belhadj Bouchaïb d'Aïn Témouchent, Algérie, 93p.
- # **Hamdani F. Z., Allem R., Meziane M., Setti B., Ali A. S., Bourai M. (2015)** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian *Citrus*. *African Journal of Biotechnology*, 14(12): 1048-1055.
- # **Hosni K., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Sebei H. (2010)** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4): 1098-1104.
- # **Hosni K., Hassen I., M'Rabet Y., Sebei H., Casabianca H. (2013)** Genetic relationships between some Tunisian *Citrus* species based on their leaf volatile oil constituents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50: 65-71.
- # **Houmy N., Brahmi F., Hasnaoui I., Asehrou A., Rokni Y., Esegir L., Benyahya H., Mokhtari O. (2020)** Etude comparative des huiles essentielles de six variétés des nouvelles obtentions d'agrumes cultivées au Maroc. *African Mediterranean Agricultural Journal*, 129: 226-239.

### J

- # **Jennings W., Shibamoto T. (1980)** Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. 465 Seiten. Academic Press, New York, 26: 830p.
- # **Joglekar M. M., Panaskar S. N., Chougale A. D., Kulkarni M. J., Arvindekar A. U. (2013)** A novel mechanism for antiglycative action of limonene through stabilization of protein conformation. *Molecular Biosystem*, 9(10): 2463-7242.

- ✚ **Job J. T., Visakh N. U., Pathrose B., Alfarhan A., Rajagopal R., Thayyullathil J., P. Thejass, Ramesh V., Narayanankutty A. (2023)** Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil from *Citrus reticulata* Blanco Peels Collected from Agrowastes. *Chemistry and Biodiversity*, 21, e202301223.
- ✚ **Joulain D., König WA. (1998)** The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E.B.- Verlag, Hamburg, 658p.
- ✚ **Joulain D. (1994)** Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13: 56-61.
- ✚ **Janick J., Paull R. E. (2008)** The Encyclopedia of Fruit and Nuts. Ed. CABI, Etats-Unis, 954p.

### K

- ✚ **Kaji I., Tatsuta M., Iishi H., Inoue A., Kasugai H. (2001)** Inhibition by d-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21(ras) plasma membrane association. *International Journal of Cancer*, 93(3): 441-444.
- ✚ **Khan I. A., Kender W. J. (2007)** *Citrus* genetics, breeding and biotechnology. Edition : CABI International, Wallingford, UK, 369p.
- ✚ **Khan M. M., Iqbal M., Hanif M. A., Mahmood M. S., Naqvi S. A., Shahid M., Jaskani M. J. (2012)** Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6): 972-979.

### L

- ✚ **Laurain-Mattar D., Couic-Marinier F., (2020)** Huile essentielle (essence) de mandarine verte, Laboratoire de pharmacognosie, Faculté de pharmacie, France, 59: 57-59.
- ✚ **Lim T. K. (2012)** *Citrus reticulata* Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer sciences et Business Media, 4: 695-715.
- ✚ **Lindon J. C., Nicholson J. K., Wilson I. D. (2000)** Directly coupled HPLC–NMR and HPLC–NMR–MS in pharmaceutical research and development. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications*, 748(1): 233-258.
- ✚ **Lota M. L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. (2000)** Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(1): 61-78.
- ✚ **Lota M. L., de Rocca Serra D., Tomi F., Casanova J. (2001)** Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(1): 77-104.
- ✚ **Lobstein A., Couic-Marinier F. (2013)** Composition chimique des huiles essentielles (Chemical composition of essential oils). *Actualités Pharmaceutiques*, 52(525): 22-25.
- ✚ **Loussert A. (1989)** Les agrumes, production. Ed. SCIEN. Univ., Liban, 280p.

## M

- ✚ **Martin L. (2006)** Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK. Thèse de doctorat en Biochimie et Biologie Moléculaire, université de Montpellier, France, 149p.
- ✚ **Masada Y. (1976)** Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. John Wiley & sons, New York.
- ✚ **Mc Lafferty F. W., Stauffer D. B. (1994)** Wiley Registry of Mass Spectral Data (6th Ed.), Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10 d. Palisade Co: Newfield.
- ✚ **Mesquita K. D. S. M., Feitosa B. D. S., Cruz J. N., Ferreira O. O., Franco C. D. J. P., Cascaes M. M., de Oliveira M. S., Andrade E. H. D. A. (2021)** Chemical Composition and Preliminary Toxicity Evaluation of the Essential Oil from *Peperomia circinnata* Link var. *circinnata*. (Piperaceae) in *Artemia salina* Leach. *Molecule*, 26: 7359.
- ✚ **Min D., Zhang Y., Chen X., Liu, J. (2015)** Molecular docking and virtual screening for drug discovery. *Bioinformatics Journal*, 31(8): 1234-1245.
- ✚ **Minh Tu N. T., Thanh L. X., Une A., Ukeda H., Sawamura M. (2002)** Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerines and lime peel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(3): 169-174.
- ✚ **Mondello L., Dugo P., Bartle K. D. (1995)** Automated HPLC-HRGC: A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpenes Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD). *Flavour and Fragrance Journal*, 1: 33-42.
- ✚ **Monge A. (2006)** Création et utilisation de chimithèques optimisées pour la recherche < in silico > de nouvelles composées bioactifs. Thèse de doctorat en Chimie Informatique et Théorique, université d'Orléans, France, 154p.
- ✚ **Mostefaoui R., Mazzouz F. Z., Moussi H. B. (2022)** Valorisation des extraits bruts du *Citrus reticulata* de la région d'Aïn Témouchent par l'étude de son activité antioxydante et anti-inflammatoire. Mémoire de Master en Biologie, spécialité : Biochimie, Université d'Aïn Témouchent-Belhadj Bouchaib, 73p.
- ✚ **Muanda C. S., Dicko A., Soulimani R., Kanika M., Bouayed J. (2009)** Chemical composition and, cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9): 653-659.
- ✚ **Munari F., Dugo G., Cotroneo A. (1990)** Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of *Citrus* Essential Oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13(1): 56-61.

## N

- ✚ **Nam A. M. (2014)** Contribution de la RMN <sup>13</sup>C à l'analyse des huiles végétales, huiles essentielles et résines (*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*). Thèse de

Doctorat en Chimie, Mention : Chimie théorique, physique, analytique, Université de Corse Pascal-Paoli, France, 186p.

- ✚ **Ndoye Foe F. M. C., Tchinang T. F. K., Nyegue A. M., Abdou J. P., Yaya A. J. G., Tchinda A. T., Etoa F. X. (2016)** Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1): 1-12.
- ✚ **Njoroge S. M., Phi N. T. L., Sawamura M. (2009)** Chemical composition of peel essential oils of sweet oranges (*Citrus sinensis*) from Uganda and Rwanda. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(1): 26-33.

### P

- ✚ **Pavlov A., Kovatcheva P., Georgiev V., Koleva I., Ilieva M. (2002)** Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z. Naturforsch*, 57, 640-644.
- ✚ **Pincemail J., Heusele C., Bonté F., Lim R., Defraigne J. O. (2001)** Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Actualité Médicale Internationale: Métabolismes-Hormones-Nutrition*, 5(4): 158-164.
- ✚ **Polese J.-M. (2008)** La culture des agrumes. Ed. ARTIMES, Paris, France, 75p.

### R

- ✚ **Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Nayik, A. G. (2016)** *Citrus* peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4): 351-358.
- ✚ **Rauf A., Uddin G., Ali J. (2014)** Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of *Citrus sinensis*, *Citrus anrantifolia*, and *Citrus limonum*. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4(1): 1-3.
- ✚ **Rezzi S., Bighelli A., Castola V., Casanova J. (2002)** Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy: Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Applied Spectroscopy*, 56: 312-17.
- ✚ **Rivero-Pérez M. D., Muñoz P., González-Sanjosé M. L. (2007)** Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14): 5476-5483.
- ✚ **Rouessac F., Rouessac A., Cruché D. (2004)** *Analyse Chimique -Méthodes et techniques instrumentales modernes-*. 6<sup>ème</sup> édition Dunod, Paris, France, 462p.

### S

- ✚ **Sandra P., Bicchi C. (1987)** Chromatographic methods-Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, Heidelberg, Verlag, New York.
- ✚ **Sawamura M., Minh Tu N.T., Yu X., Xu B. (2004)** Volatile constituents of the peel oils of several sweet oranges in China. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1): 2-6.

- ✚ **Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (1998)** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 26(2): 118-122.

T

- ✚ **Taofiq O., González-Paramás A., Barreiro, M. Ferreira, I. (2017)** Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules*, 22(2): 281.
- ✚ **Tisserand R., Young R. (2014)** *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. 2<sup>nd</sup> edition, Churchill Livingstone, London, UK, 780p.
- ✚ **Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. (1995)** Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, 1: 25-34.
- ✚ **Tomi F., Casanova J. (2006)** <sup>13</sup>C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae, A review. *Acta Horticulturae*, 723: 185-192.

V

- ✚ **Van Hung P., Thi Lan Chi P., Thi Lan Phi N. (2013)** Comparison of antifungal activities of Vietnamese Citrus essential oils. *Natural Product Research*, 4-5: 506-508.
- ✚ **Viljoen A. M., Moolla A., Van Vuuren S. F., Van Zyl R. L., Başer K. H. C., Demirci B., Özek T., Trinder-Smith T. H. (2006)** The Biological Activity and Essential Oil Composition of 17 *Agathosma* (Rutaceae) Species. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 12-16.
- ✚ **Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. (2009)** Chemical composition of mandarin (*C. reticulata* L.), grapefruit (*C. paradisi* L.), lemon (*C. limon* L.) and orange (*C. sinensis* L.) essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 52(525): 22-25.

W

- ✚ **Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Surburg H. (2000)** Constituents of Haitian vetiver oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 15: 395-412.
- ✚ **Wilkins J., Joe S. 2002**, Method for treating gastrointestinal disorder. U.S. 19. Patent (642045).

Y

- ✚ **Yang S. A., Jeon S. K., Lee E. J., Shim C. H., Lee I. S. (2010)** Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24: 140-151.
- ✚ **Yaqoob M., Nawaz S., Murtaza G., Anwar P. (2020)** Potential of *Citrus* Peel as a Source of Valuable Active Ingredients: A Review. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 8(4): 153-160.

- ✚ **Yougbaré-Ziébrou M. N., Ouédraogo N., Lompo M., Bationo H., Yaro B., Gnoula C., Sawadogo W. R., Guissou I. P. (2016)** Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 14: 213-219.

**Z**

- ✚ **Zhang H., Yang Y., Zhou Z. (2018)** Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1): 256-263.
- ✚ **Zupanc M, Prošek M, Dušan M. (1992)** Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15: 510-513.

# **Annexe**

**Annexe 1 : Rendements en huile essentielle de *Citrus reticulata* obtenus dans les trois vergers**

<b>V1 : Station Aïn El Hout</b>				<b>V2 : Station Hennaya</b>			
<b>E (HT)</b>	<b>P MV (g)</b>	<b>P HE (g)</b>	<b>Rdt (%)</b>	<b>E (HT)</b>	<b>P MV(g)</b>	<b>P HE (g)</b>	<b>Rdt (%)</b>
<b>E1 (HC)</b>	359	0,9	0,25	<b>E1(HC)</b>	433	0,86	0,2
<b>E2 (HS)</b>	309	1,3	0,42	<b>E2(HS)</b>	268	0,56	0,21
<b>E3 (HC)</b>	295	0,6	0,2	<b>E3(HC)</b>	391,17	0,58	0,15
<b>E4 (HS)</b>	358,54	1,46	0,41	<b>E4(HS)</b>	362,24	0,78	0,22
<b>E5 (HC)</b>	317,7	0,65	0,21	<b>E5(HC)</b>	364,64	0,6	0,16
<b>E6 (HS)</b>	321,78	0,61	0,19	<b>E6(HS)</b>	282,61	0,78	0,28
<b>E7 (HC)</b>	337,31	0,75	0,22	<b>E7(HC)</b>	387	0,58	0,15
<b>E8 (HS)</b>	356,53	1,35	0,38	<b>E8(HS)</b>	404,02	0,8	0,2
<b>E9 (HC)</b>	292,16	0,8	0,27	<b>E9(HC)</b>	291,1	0,6	0,21
<b>E10 (HS)</b>	306,6	1,07	0,35	<b>E10(HS)</b>	315,5	0,72	0,23
<b>Moy</b>			<b>0,29</b>				<b>0,20</b>

P : Poids ; MV : Matériel végétal ; HE : Huile essentielle ; Rdt : Rendement ; Moy : Moyenne ; HC : Hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger ; HS : Hydrodistillation classique ; % : Pourcentage

<b>V3 : Station Aïn Youcef</b>			
<b>E(HT)</b>	<b>P MV (g)</b>	<b>P HE (g)</b>	<b>Rdt (%)</b>
<b>E1(HC)</b>	494,63	6,71	1,36
<b>E2(HS)</b>	400,21	3,35	0,84
<b>E3(HC)</b>	713,94	10,55	1,48
<b>E4(HS)</b>	485,49	5,1	1,05
<b>E5(HC)</b>	564,34	6,26	1,11
<b>Moy</b>			<b>1,17</b>

