**République Algérienne Démocratique Et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Yahia Fares De Medea**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie de Procédés et Environnement**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

**Spécialité : Génie des procédés**

**Option** : **Procédés Pharmaceutiques**

**Thème**

# EXTRACTION, CARACTERISATION ET EVALUATION BIOLOGIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES D'AGRUMES

**Proposé et dirigé par :**

**Pr : MOULAI- MOSTEFA Nadji.**

**Mlle. YOUCEF ETTOMI .Kh**

**Présenté et préparé par :**

**ALLECHE Sabrina.**

**ZAROUAT Salama.**

**Promotion : 2016/2017**

**ملخص**

يهدف هذا العمل إلى تقييم قشور الحمضيات بلستخلاص المركبات الفينولية. و قد استخدمت قشور الحمضيات: الأرنج *Citroncirus webberi* و البرتقال الحلو ( *Citrussinensis*) و هذا لغرض استخراج المركبات الفينولية بواسطة النقع الساخن باستخدام ثلاث تقنيات للتسخين وهي التسخين الكلاسيكي , التسخين عن طريق الموجة الكهرومغناطيسية القصيرة والتسخين الكهرومغناطيسي.

تم تحديد المحتوى الكلي للبوليفينول باستخدام كاشف فولين- Ciocalteu. كماأظهرت تقنية ال تحريض الكهرومغناطيسي تحسنا لا بأس به من حيث محتوى البوليفينول 46.88 ملغ مكافئ حمض الغاليك / غ مادة جافة بالمقارنة مع عملية الاستخلاص باستخدام الموجة الكهرومغناطيسية القصيرة والتسخين الكلاسيكي (29.93 ملغ مكافئ حمض الغاليك / غ مادة جافة ، 29.81 ملغ مكافئ حمض الغاليك / غ مادة جافة). تم تقييم الفلافونيدات بطريقة استخدام ثلاثي كلوريد الألومنيوم $ALCL_3$، وقدر المحتوى ب 35.94 ملغ مكافئ الروتين / غرام من المادة الجافة باستخدام طريقة التحريض الكهرومغناطيسي مقارنة بالموجة الكهرومغناطيسية القصيرة والتسخين التقليدي ( 32.87 ملغ مكافئ الروتين / غ مادة جافة، 31.58 ملغ مكافئ الروتين / غ مادة جافة) ، على التوالي.

تقييم النشاط المضاد للأكسدة • DPPH. يظهر أن المستخلصات الفينولية المختبرة تمتلك نشاطا مضادا للتفرع بالجرعة التابعة. أداء نشاط المضادة للميكروبات المطبق على 4 سلالات بكتيرية أثبت أن عمل مضاد للميكروبات كبير من مختلف المستخلصات الفينولية وجها لوجه مع مختلف السلالات : الإشريكية القولونية، المكورات العنقودية الذهبية, المعوية و الزائفة الزنجارية.

**الكلمات المفتاحية**

متعدد الفينول ,الفلافونويد , نشاط مضاد للأكسدة ,نشاط مضاد للمكروبات. البرتقال

**Résumé**

Ce travail consiste en une valorisation des écorces complètes d'agrumes dans l'extraction des composées phénoliques. Les agrumes utilisés sont : l'orange *(C.sinensis)* et le citrange (*Citronciruswebberi)*. Les composées phénoliques ont été extraits par macération à chaud en utilisant trois techniques de chauffage à savoir : le chauffage classique, le chauffage assisté par micro-onde et celui assisté par induction électromagnétique. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La technique de l'induction électromagnétique a montré une amélioration assez importante en termes de teneur en polyphénols (46.88 mg eqAG/g de matière sèche) en comparaison avec le procédé d'extraction par micro-onde et par chauffage classique (29.93 mg eqAG/g de matière sèche, 29.81 mg eqAG/g de matière sèche). Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant les chlorures d'aluminium $AlCl_3$, la teneur est estimée à 35.94 mg eqR/g de matière sèche par la méthode de micro-onde par rapport aux autre technique l'induction électromagnétique et le chauffage classique (32.87 mg eqR/g de matière sèche, 31.58 mg eqR/ g de matière sèche) respectivement. L'évaluation de l'activité antioxydante par DPPH•, montre que les extraits phénoliques testés possèdent une activité antiradicalaire avec dose dépendante. L'activité antimicrobienne effectuée sur4 souches bactériennes, a révélé une action antibactérienne importante des différents extraits phénolique vis-à-vis aux différentes souches (*E.coli*, *S.aureus*, *pseudomonas*et *enterococcus ).*

**Mots clés :** orange, Polyphénol , Flavonoïde , Activité antioxydant , Activité antimicrobienne.

**Abstract**

This work consists of a recovery of complete citrus peel in the extraction of phenolic compounds. Citrus used are: orange *(C.sinensis)* and citrange (*Citronciruswebberi).* The phenolic compounds were extracted by hot maceration using three heating techniques, namely conventional heating, microwave-assisted heating and electromagnetic induction. The total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. The magnetic induction technique showed a rather significant improvement in polyphenol content (46.88 mg EAG / g dry matter) compared with the conventional microwave and heating extraction method (29.93 mg EAG / g Of dry matter, 29.81 mg EAG / g of dry matter). The flavonoids were evaluated by the method using AlCl3 aluminum chlorides, the content is estimated at 35.94 mg ER / g dry matter by the microwave method as compared to other techniques magnetic induction and heating (32.87 mg ER / g dry matter, 31.58 mg ER / g dry matter) respectively. Evaluation of the antioxidant activity by DPPH • shows that the phenolic extracts tested possess an antiradical activity with dose dependent. The antimicrobial activity carried out by 4 bacterial strains revealed an important antibacterial action of the various phenolic extracts with respect to the different strains (*E.coli, S .Aureus, pseudomonas and enterococcus*).

**Key words**: orange, Polyphenol, Flavonoid, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.

## *REMERCIEMENTS*

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à « Allah le Tout Puissant » de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Nous remercions vivement notre promotrice Mlle YOUCEF ETTOUMI Khadidja pour sa générosité, sa patience et ses précieux conseils sans lesquels ce travaille n'aurait pas vu le jour.

Sans oublier Pr.MOULAI MUSTAPHA Nadji pour son encadrement, ses conseils, ainsi que pour son encouragement.

Nos remerciements vont particulièrement au président et membres de jury qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Nous tenons également à remercier tous nos enseignants qui nous ont suivis durant notre cursus universitaire.

Nous sommes très reconnaissantes envers les directeurs de laboratoire de recherche et laboratoire du hall technologique à l'université Dr Yahia Farés de Médéa, qui nos ont accueillies au sein de leur laboratoire, où ce travail a été effectué, nous ont avoir facilité nos travaux et mettre à notre disposition les moyens nécessaires. Un remerciement tous particulier à l'ingénieur de laboratoire chimie I du hall universitaire (Zohir), et à l'ingénieur de laboratoire de biologie (Radia).

Nous remercions enfin toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

# Dédicace



# Dédicace



**Sommaire**

**Introduction générale** _____ *1*

***I. Chapitre I : Revue bibliographique*** _____ ***3***

**I.1 Introduction** _____ **3**

**I.2 Agrumes** _____ **4**

I.2.1 Origine et historique des agrumes _____ 4

I.2.2 Définition _____ 4

I.2.3 Caractérisation et description des agrumes _____ 4

I.2.4 Classification des agrumes _____ 6

I.2.4.1 Citrus limonum(citron) _____ 7

I.2.4.2 Citrus sinensis (orange) _____ 8

I.2.4.3 Citronciruswebberi(Citrange) _____ 9

I.2.5 Composition chimique globale des écorces d'agrume _____ 10

**I.3 Les composés phénoliques** _____ **10**

I.3.1 Définition _____ 10

I.3.2 Classification des composés phénoliques _____ 11

I.3.2.1 Composés non flavonoïdes _____ 11

I.3.2.2 Les flavonoïdes (C6-C3-C6) _____ 16

I.3.3 .Mécanisme général d'action des antioxydants phénoliques _____ 19

I.3.4 . Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante _____ 19

I.3.5 Intérêt des composés phénoliques _____ 20

I.3.5.1 Rôle physiologique _____ 20

I.3.5.2 Rôle nutritionnel et thérapeutique _____ 21

I.3.5.3 Rôle antioxydant _____ 21

I.3.5.4 Rôle antimicrobien _____ 22

**I.4 Les méthodes d'extraction des composés phénoliques** _____ **22**

I.4.1 Techniques classiques _____ 22

I.4.1.1 Extraction au Soxhlet _____ 22

I.4.1.2 Macération _____ 23

I.4.1.3 Infusion _____ 24

I.4.1.4 Décoction _____ 24

I.4.1.5 Expression _____ 24

I.4.1.6 Enfleurage 24
I.4.1.7 Percolation 24
I.4.2 Techniques émergentes 24
I.4.2.1 Extraction assistée par ultrasons 24
I.4.2.2 Extraction assistée par micro-ondes 25
I.4.2.3 Extraction par fluide supercritique (SFE) 25
I.4.2.4 Extraction assisté par induction électromagnétique 26
I.4.2.5 Extraction par fluide pressurisé (PLE, PressurizedLiquid Extraction) 27
I.4.2.6 Extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction) 27
I.4.2.7 Extraction assistée par des enzymes pectolytiques 28
**I.5 Conclusion 28**
***II. Chapitre II. Matériels et méthodes 29***
**II.1 Introduction 29**
**II.2 Produis et matériels 29**
II.2.1 Les produits 29
II.2.2 Matériels 30
**II.3 Matériel végétal 30**
**II.4 Matériel de l'étude microbiologique : 31**
II.4.1 Les souches testées 31
II.4.2 Caractéristiques des souches testées 32
**II.5 La teneur en Eau 32**
**II.6 Extraction des composés phénoliques : 33**
II.6.1 A partir de la matière fraiche 33
II.6.2 A partir de la matière sèche : 34
II.6.3 Extraction conventionnelle par chauffage classique 35
II.6.4 Extraction assistée par micro-ondes (EAM) 35
II.6.5 Extraction assisté par induction magnétique 36
**II.7 Détermination de la teneur en polyphénols totaux 37**
II.7.1 Dosage des polyphénols totaux 37
**II.8 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux 39**

**II.9 Evaluation de l'activité biologique 40**
II.9.1 Détermination de l'activité antioxydante 40
II.9.2 Activité antimicrobienne 42
II.9.2.1 Préparation de l'inoculum 42
II.9.2.2 Ensemencement et dépôt des disques 43
II.9.2.3 Test par diffusion sur gélose (Antibiogramme) 43
II.9.3 Test de macrodilution en milieu liquide 44
II.9.4 Mode opératoire 44
***III. Chapitre III : Résultats et discussion 46***
**III.1 Introduction 46**
**III.2 Teneur en eau 46**
**III.3 Teneur en polyphénols totaux et en flavonoides 47**
**III.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne 50**
III.4.1 Antibiogramme 50
III.4.2 Concentration minimale inhibitrice (CMI) 53
**III.5 Evaluation de l'activité antioxydante des composées phénoliques extraites 55**
**Conclusion générale ……..57**

## Liste des tableaux

**Chapitre I :** Revue bibliographique

**Tableau I-1:** dérives de l'acide benzoïque ..... 12
**Tableau I-2:** dérives de l'acide cinnamique ..... 13
**Tableau I-3:** teneur en acides cinnamiques ..... 13
**Tableau I-4:** Principales classes des flavonoïdes. ..... 17
**TableauI-5:** Principaux classes des composes phénoliques. ..... 18
**Tableau I-6:** les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante. ..... 20

**Chapitre II:** Matériels et méthodes

**Tableau II-1:** les principaux produits utilisés. ..... 29
**TableauII-2:** les différents matériels utilisés. ..... 30
**TableauII-3:** principales caractéristiques de souches testées. ..... 32
**TableauII-4**: transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D) ..... 43

**Chapitre III**: Résultats et discussion

**Tableau III-1 :** Teneur en polyphénols et en flavonoïdes en fonction de la méthode de chauffage,et de la matière végétale. ..... 47
**Tableau III-2:** Diamètre des zones d'inhibition en mm pour les trois méthodes d'extraction. ..... 52
**TableauIII-3:** résultats de la méthode de la dilution sur milieu liquide. ..... 54

## Liste des figures

**Chapitre I :** Revue bibliographique

**Figure I.1:** Coupe transversale d'une orange ..... 5
**FigureI.2:** Citronnier. ..... 7
**FigureI.3:** Oranger..... 8
**Figure I.4:** Arbre du citrange. ..... 9
**Figure I.5:** Classification des composés phénoliques. ..... 11
**Figure I.6:** Structure de l'acide benzoïque. ..... 12
**Figure I.7:** Structure de l'acide cinnamique. ..... 13
**Figure I.8:** Structures chimiques des stilbènes. ..... 14
**Figure I.9:** principaux constituants de la lignine. ..... 15
**Figure I.10:** Structure chimique des coumarines. ..... 15
**Figure I.11:** la structure de base des flavonoïdes. ..... 16
**Figure I.12:** Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet. ..... 23
**Figure I.13:** Montage d'extraction par micro-ondes. ..... 25
**Figure I.14:** principe de chauffage par induction. ..... 26

**Chapitre II:** Matériels et méthodes

**FigureII.1**: Matière végétale..... 30
**Figure II.2:** Protocole de préparation de l'extrait phénolique de la matière fraiche. ..... 33
**FigureII.3:** Protocole opératoire d'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière sèche. ..... 34
**Figure II.4:** Extraction assisté par chauffage classique..... 35
**FigureII.5:** Extraction assisté par micro-onde..... 36
**Figure II.6**: extraction assisté par induction magnétique. ..... 36
**FigureII.7:** protocole de dosage des polyphénoles totaux..... 38
**FigureII.8:** protocole de dosage des flavonoïdes. ..... 40
**FigureII.9:** Réaction du DPPH• avec un antioxydant. ..... 41
**FigureII.10:** protocole d'étude de l'activité antioxydante. ..... 42
**FigureII.11 :** Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide..... 44

**Chapitre III**: Résultats et discussion

**FigureIII.1:** Teneur en eau de l'orange ..... 46
**Figure III.2** : Teneur en eau de citrange ..... 46
**FigureIII.3 :** Teneurs en PPTdes extraits. ..... 49
**Figure III.4:** Teneurs en flavonoïdes. ..... 49
**Figure III.5**: Halos d'inhibition des extraits sur *Enterococcus* ..... 50
**Figure III.6:** Halos d'inhibition des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa* ..... 50
**FigureIII.7 :** Halos d'inhibition des extraits sur *Staphylococcues aureus.* ..... 51
**FigureIII.8 :** Halos d'inhibition des extraits sur *Escherichia coli.* ..... 51
**Figure III.9 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations d'extrait issu des écorces de citrange par IM ..... 56

## Liste des symboles et des abréviations

| | |
|---|---|
| Abs | Absorbance |
| ALCL3 | Trichlorure d'aluminium |
| ASE | extraction par solvant accéléré |
| ATCC | American type culture collection (catalogue de microorganisme) |
| av. J.-C | avant jésus-christ |
| C° | degré celsius. |
| CC | Chauffage classique |
| CI50 | concentration d'inhibitrice à 50% |
| CMI | Concentration minimale d'inhibitrice |
| Da | Dalton |
| DO | densité optique |
| DPPH | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle |
| EAG | Equivalent acide gallique |
| G | Gramme |
| H | Heure |
| IM | Induction électromagnétique |
| ISO | Organisation Internationale de la Santé |
| Kcal | Kilocalorie |
| LDL | Lowdensity Lipoprotéines |
| M | Mètre |
| MF | Matière fraiche |
| Mg | Milligramme |
| MHB | Muller Hinton bouillon |
| Ml | Millilitre |
| Mn | Minute |
| MO | Micro-onde |
| Ms | Matière sèche |
| Nm | Nanomètre |
| PH | potentielle d'hydrogène |
| PLE | Pressurizedliquid extraction |
| R* | radical libre |
| SFE | extraction par fluide supercritique |

| | |
|---|---|
| SWE | Subcritical water extraction |
| TFT | teneur en flavonoïde totaux |
| TPPT | teneur en polyphénol totaux |
| UFC | unité formant colonie |
| UV | Ultraviolet |

# *Introduction générale*

La transformation industrielle des fruits donne lieu à une production importante de déchets ayant une incidence sur l'environnement, ces sous-produits rejetés dans les oueds, les cours d'eau, ou laissés à l'air libre sans aucune valorisation, sont classés parmi les déchets fermentescibles et sources d'une forte pollution microbienne et de produits dont la décomposition biologique est beaucoup plus lente (hémicellulose, cellulose et lignine).

Un sous-produit issu du processus de fabrication sans être l'objet principal de l'activité, peut être valorisé comme un co-produit avant d'être considéré comme déchet, certains déchets deviennent alors de véritables matières premières.

Parmi les différentes espèces agricoles transformées industriellement ; les agrumes qui occupent une place importante [1].

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérigène, anti-inflammatoire, antioxydante etc.…) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la flaveur des aliments et leur incidence sur la conservation des produits alimentaires [2].

Ce sujet porte sur l'extraction et la caractérisation physico-chimiques des composés phénoliques à partir de différentes espèces d'agrumes en utilisant trois techniques de chauffage à savoir : le chauffage classique, le chauffage assisté par micro-onde et celui assisté par induction électromagnétique. L'étude d'impact de la composition phénolique sur leur activité biologique sera également envisagée.

Cette étude comporte trois parties :

La première partie de ce manuscrit a été consacrée à une revue bibliographique sur l'importance de l'agrumiculture en tant qu'une des principales activités agro-économiques surtout à travers la production et l'exportation des oranges et de citrange et présente la composition chimique globale des écorces d'agrumes, la composition phénolique, leurs propriétés fonctionnelles et leurs domaines d'utilisation.

La deuxième partie de ce manuscrit représente l'étude expérimentale dont lequel, une partie matériel et méthodes fait le bilan précis des outils, concepts et équipements utilisés au cours de ce travail.

Un dernier chapitre est consacré aux résultats obtenus et discussion qui donnent lieu à une conclusion générale et perspective futures.

# *Chapitre I : Revue bibliographique*

## I.1 Introduction

L'agrumiculture constitue le plus grand secteur de production de fruits dans le monde, avec plus de 89 millions de tonnes produites durant l'année 2014[3], plus que le tiers de cette production est transformé industriellement en jus. La quantité correspondante de déchets industriels d'agrumes est estimée à 15×106 tonnes [4]. Le coproduit de la transformation industrielle des agrumes est constitué essentiellement des écorces d'agrumes et de résidus de graines.

Les écorces d'agrumes sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne [5,6,7].Grâce à cette richesse, l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique[8]. Ces quelques applications potentielles des substances bioactives des écorces d'agrumes en alimentation fonctionnelle, en pharmacie et en cosmétique ou en d'autres applications telles que la chimie et la conception de nouveaux matériaux ne sont possibles que si les molécules sont extraites tout en gardant leurs fonctionnalités. Certains auteurs se sont intéressés aux méthodes d'extraction par des techniques dites conventionnelles et non conventionnelles basées sur des nouvelles technologies d'extraction dites « vertes ». Ces techniques sont utilisées pour intensifier l'opération d'extraction et améliorer le rendement comme l'extraction par fluide supercritique [9], l'extraction assistée par micro-ondes[10], l'extraction assistée par ultrasons [11]l'extraction par liquide pressurisé [12] et l'extraction assistée par des enzymes [13].Mais l'extraction demeure une étape difficile en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, ce qui conduit à leur dégradation et l'altération de leurs activités antioxydantes. Ioannou et *al.*[14]Ont examiné l'effet des procédés sur les flavonoïdes, les auteurs ont montré que ces molécules présentent une sensibilité à certaines conditions de processus telles que la température, la lumière ou la matrice alimentaire.

## I.2 Agrumes

### I.2.1 Origine et historique des agrumes

Les agrumes sont originaires de l'Asie et en particulier de la Chine, ils sont d'ailleurs cités de manière récurrente dans la tradition chinoise. On trouve des descriptions d'agrumes dans le Yu Kung un texte Chinois datant de 500 av.J.-C.Leur culture remonte à un ou deux millénaires avant notre ère. Vers 500 ans av. J.-C., cette culture, en particulier celle du cédrat, s'est étendue à une partie du Moyen-Orient pour se propager ensuite au bassin méditerranéen. Entre 300 ans avant et après J.-C, l'agrumiculture était répandue dans l'empire romain, mais cette pratique s'est globalement perdue avec la chute de l'empire pour réapparaître 1000 ans plus tard en Espagne, lors des conquêtes arabes. En Italie, on pense que, vers 1400 après J.-C., oranges amères et citrons avaient été déjà "redécouverts" suite aux croisades successives. Mais c'est vers 1500, lorsque le Portugais Vasco de Gama au retour de son voyage passa par le Cap de Bonne Espérance, que les oranges douces telles que nous les connaissons aujourd'hui furent introduites en Europe, en passant par le Portugal. Nous savons également par la suite que les agrumes furent introduits aux Amériques à compter des voyages de Christophe Colomb et des autres explorateurs espagnols et portugais [15].

### I.2.2 Définition

Le mot «agrume » d'origine Italienne, est un mot qui désigne les fruits comestibles par extension aux arbres qui les portent appartenant au genre « citrus » [16].

Les agrumes sont originaires des régions chaudes. Les orangers, les citronniers, les mandariniers, les pamplemoussiers ou les cédratiers sont les espèces les plus connues. Ils ne sont rustiques qu'en climat méditerranéen.

### I.2.3 Caractérisation et description des agrumes

Tous les fruits des citrus cultivés ont presque la même structure : l'écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines. Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse. La pulpe, partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers. [17]

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (Figure I.1):

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou flavédo), qui recouvre le fruit et le protège des dommages. Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.

- Un mésocarpe (ou albedo) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit. Il est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces d'agrumes.

- La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique. [18]

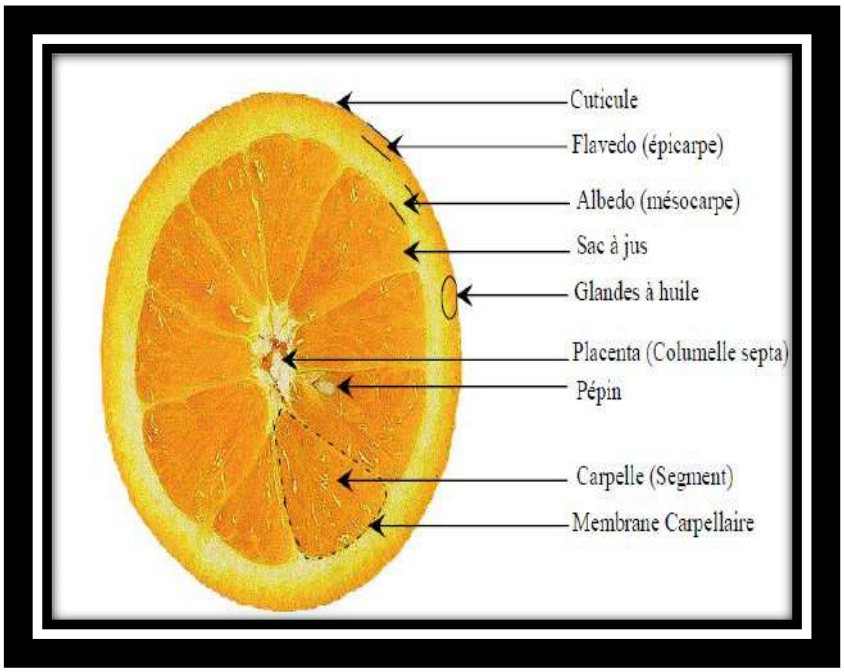



**Figure I.1:** Coupe transversale d'une orange [18]

### I.2.4 Classification des agrumes

La position systématique des agrumes est comme suite :

**Règne** : Végétal.

**Embranchement** : *Spermaphytes.*

**Sous-embranchement** : *Angiospermes.*

**Classe :** *Eudicotylédones*.

**Ordre :** *Rutales.*

**Sous- classe :** *Rosidées.*

**Famille :** *Rutacée.*

**Genres :** *Poncirus, Fortunella, et Citrus.*

Le genre *Fortunella* comprend six espèces dont deux seulement sont cultivées: *FortunellaJaponica* et *FortunellaMargarita*, les fruits sont connus sous le nom de kumquats servent à la fabrication des confits (Espagne et Maroc).

Le genre *Poncirus* renferme seulement l'espèce *Poncirustrifoliata* utilisé seulement comme porte greffe. Les fruits ne sont pas comestibles, les feuilles ont trois folioles et le feuillage est caduc.

Le genre *Citrus* est le plus important parce qu'il renferme les principales espèces cultivées. Le nombre d'espèces dans ce genre est sujet d'une grande controverse entre les botanistes, l'américain Swingle (1943) recense 16 espèces tandis que le Japonais Tanaka (1957) dénombre 156 espèces. [19]

Parmi les espèces les plus connu on site :

-Les oranges: *Citrus Sinensis*, dont on trouve les navels, les blondes, les sanguines, les demi sanguine et les douces;

-Les citronniers: *Citrus limon*;

-Les clémentiniers: *Citrus Clementina*;

-Les cédratiers: *Citrus Medica*;

-Les mandariniers: *Citrus Reticulata*;

-Les bigaradiers: *Citrus Aurantium*;

-Les pamplemoussiers: *Citrus Grandis*;

-Les pomelos: *Citrus Paradisi*.

### I.2.4.1 Citrus limonum(citron)

L'arbre d'une hauteur de 3 à 4 m, et d'une durée de vie d'environ 40 ans, supporte une température minimale de -2°C. Il produit de 30 à 40 t/ha. Les fruits sont juteux, acides et très parfumés. Les plus estimés sont dits « première fleur » (récolte d'octobre à décembre) et « seconde fleur » (mars, avril). Ils se conservent de 6 à 8 mois.

Ils sont riches en sels minéraux et en vitamines C (52 mg / 100g) et P, en acides organiques, en sélénium, en fibres…Le citron est reconnu pour ses propriétés diététiques (35kcal/100g). Il renferme du calcium à un taux relativement élevé (25mg/ 100g). Le jus de citron contient essentiellement trois acides : malique, ascorbique et citrique. Les principales variétés sont : Bears sicilienne ; Berna verna ; Eureka ; Eureka panachée (citron de chair rose) ; Genova ; Interdonato ; Lisbonne ; Monachello ; PrimofioriFino, Mesero ; Santa Teresa ; Villa Franca.

Les citrons doux sont les fruits de cultivars à jus peu ou pas acide néanmoins classés Citrus*limon (L.)Burm. f.* [20]

En médecine, il est utilisé comme antiseptique naturel mais il est aussi connu pour d'autres actions : anti-rhumatismale, anti-fatigue, diététique, digestive, contre les effets causés par les allergies….



**FigureI.2:** Citronnier.

Les couleurs, arômes, saveurs, degré d'acidité ou sucre, la richesse en huile essentielle varient selon les variétés, les terroirs, les climats, la maturité, l'âge du citronnier et le type de porte-greffe, forment une palette de goûts insoupçonnée [21].

### I.2.4.2 Citrus sinensis (orange)

D’une hauteur de 2 à 3 m et d’une durée de vie de 300 à 400 ans, les oranges raies prospèrent dans les régions tempérées disposant d'un hiver doux. Ils ont besoin de beaucoup des oleil, de chaleur et d’eau. La différence de température entre l’été et l’hiver et entre le jour et la nuit est importante pour le développement correct de la saveur et de la couleur.

L’orange est un agrume, fruit des orangers, des arbres de différentes espèces de la famille des Rutacées ou d'hybrides de ceux-ci. Il existe un très grand nombre de variétés d'orangers, mais celles cultivées à grande échelle sont en nombre limité. On peut citer: l’Orange amère utilisée seulement pour les confitures et les marmelades, la Cadénéra, l’Hamline, la Maltaise, la Portugaise, la Péra(Brésil), la Salustiana, la Sanguine, la Valencia, la Valencia late (tardive), la Tarocco, la Tomango et la Trovita (Afrique du Sud), utilisées pour la consommation en frais et pour l'industrie. Enfin, la Washington Navel, la Navel Navelina, la Navel late, la Jaffa et la Shamoutisont utilisées essentiellement pour la consommation en frais.

Comestible, elle est réputée pour sa teneur en vitamine C, bien que cette dernière ne soit pas particulièrement haute comparée à d'autres fruits et légumes. C’est le quatrième fruit le plus cultivé au monde. [22]

La peau de l'orange comprend, le flavédo, partie superficielle colorée contenant les huiles essentielles et les caroténoïdes, il représente 7 à 9% du poids du fruit et l'albédo, partie blanche de la peau riche en d’autres flavones et en pectines.[23]



**FigureI.3:** Oranger

### I.2.4.3 Citronciruswebberi(Citrange)

Le citrange (*Citronciruswebberi*) est une espèce hybride de l'oranger (*Citrus sinensis*) et du citronnier épineux (*Poncirustrifoliata*). Ce croisement était une tentative pour créer un citronnier/oranger vigoureux et résistant au froid donnant des fruits délicieux. Cependant la plupart des citranges sont amers. Tolérant au calcaire, résistant à la Tristeza, rustique jusqu'à -10°, cet hybride est de plus en plus utilisé comme porte-greffe pour la majorité des variétés d'agrumes. Cet hybride a été créé par Herbert John Webber et Walter Tennyson Swingle.[24]

L'arbre de citrange, plus vigoureux qu'un *Poncirustrifoliata,* présente un feuillage semi-persistant, avec des feuilles généralement trifoliées, mais plus larges que les plantes parents Le fruit est également beaucoup plus proche de l'orange .Il existe des sélections de citrange, comme [25] :

**a) Les citranges 'Rusk**', qui possède l'aspect d'orange de calibre moyen, et qui ont un goût où les traces désagréables d'arrière-goût de *Poncirustrifoliata*ont presque disparu. Il existe également des hybrides de citrange plus complexes, recroisés avec d'autres *Citrus*, s'approchant de plus près d'un agrume au goût totalement agréable.

**b) Lecitrange 'Hybrid 119 US'**, qui est un citrange recroisé avec *Citrusparadisi*, est un bon exemple. La rusticité de ces hybrides est bien sûr moindre au fur et à mesure des recroissements avec des citrus. C'est ainsi que le citrange 'Hybrid 119 US' est estimé rustique à -10 °C environ, ce qui reste néanmoins intéressant.



**Figure I.4:** Arbre du citrange.

### I.2.5 Composition chimique globale des écorces d'agrume

La composition chimique des écorces d'agrumes est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux.

Les écorces sont particulièrement riches en composés digestibles et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'alimentation fonctionnelle humaine et animale ainsi qu'en tant que complément alimentaire [26] L'utilisation des écorces fraîches en alimentation pour bétail est limitée à cause des maladies que peut provoquer la consommation de ce produit (mycotoxicose, parakératose du rumen). [27]

## I.3 Les composés phénoliques

### I.3.1 Définition

Les composés phénoliques également dénommés les polyphénols, sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires [28]**,** ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction. [29]**.**Les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes [30]. Ils englobent une vaste gamme des composés qui possèdent tous un groupement hydroxyle (-OH) attaché à un cycle aromatique presque toutes les plantes et l'on sait qu'ils s'accumulent dans toutes les parties de l'organisme (racines, tiges, feuilles, fleurs, et fruits).Bien qu'ils soient le groupe de plus étudié de métabolites secondaires, la fonction de beaucoup de produits phénoliques reste encore inconnue. [31]

### I.3.2 Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent une grande diversité de structures classées en flavonoïdes et non flavonoïdes comme le montre la figure I.5.[32]

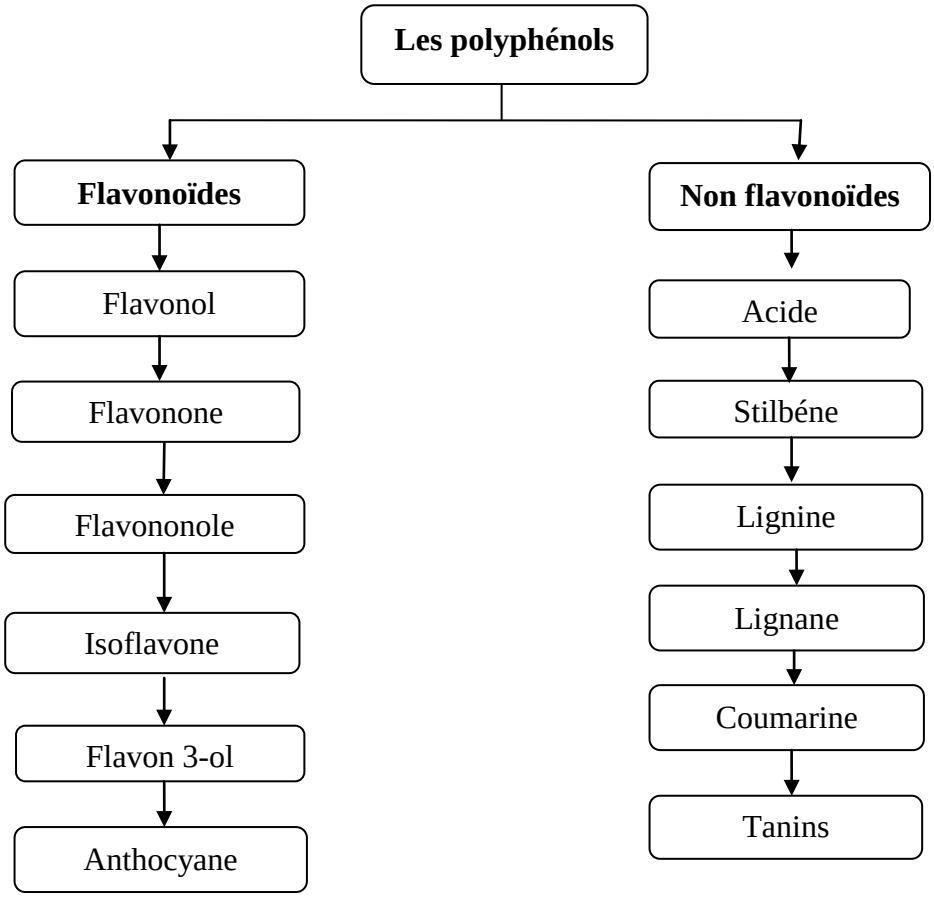



**Figure I.5:** Classification des composés phénoliques.

#### I.3.2.1 Composés non flavonoïdes

**Acides phénoliques ($C_6$-$C_1$ou $C_6$-$C_3$)**

Dans les écorces d'agrumes, les acides phénoliques sont principalement représentés par les acides hydroxycinnamiques(acides caféique, coumarique, sinapique, férulique et chlorogénique); les acides hydroxybenzoiques qui sont peu répandus.

- **Acides hydroxybenzoïques($C_6$-$C_1$)**

Ces composés répondent à une représentation structurale de type ($C_6$-$C_1$), dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique.

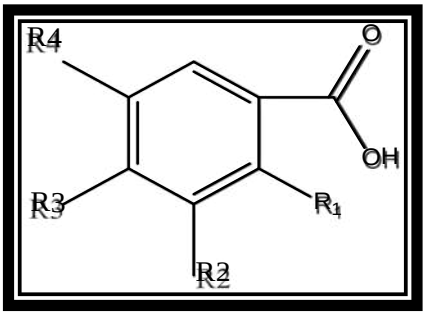



**Figure I.6:** Structure de l'acide benzoïque.

**Tableau I-1**: Dérives de l'acide benzoïque [33].

| Les acides benzoique | R1 | R2 | R3 | R4 |
|---|---|---|---|---|
| Acide benzoique | H | H | H | H |
| Acide Salicylique | OH | H | H | H |
| Acide *p*-hydroxy- benzoïque | H | H | OH | H |
| Acide Gallique | H | OH | OH | OH |
| Acideprotocatéchique | H | OH | OH | H |
| Acide vanillique | H | $OCH_3$ | OH | H |

- **Les acides hydroxycinnamiques($C_6$-$C_3$)**

Les acideshydroxycinnamiques sont des dérivés de l'acide cinnamique, constitués d'un noyauphénolique de type $C_6$-$C_3$.

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toute les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mur, les laitues, les carottes, les myrtilles, les patates douces (entières, cuites et crues), les pommes de terre ; les pêches, le jus d'orange, les pommes, les tomates et le raisin sont les sources les plus riches en acides hydroxycinnamiques[34] l'acide chlorogénique (ou acide 5-ocaféoylquinique) est la forme combiné de l'acide caféique, il est trouvé en forte concentration dans le café.

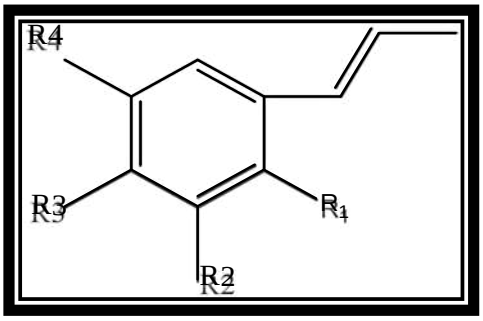



**Figure I.7:** Structure de l'acide cinnamique.

**Tableau I-2:** Dérives de l'acide cinnamique [35]

| Les acides cinnamiques | R1 | R2 | R3 | R4 |
|---|---|---|---|---|
| Acide Cinnamique | H | H | H | H |
| *Acide o*-coumarique | OH | H | H | H |
| *Acide m*-coumarique | H | OH | H | H |
| *Acide p*-coumarique | H | H | OH | H |
| Acide Caféique | H | OH | OH | H |

**Tableau I-3:** Teneur en acides cinnamiques (formes libre et formes conjuguées des oranges). [36]

| Acide cinnamique | Forme | Partie de fruit | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ecorce | Albédo | Flavédo | Sac de jus | Endocarpe |
| Acide caféique | Conjuguée | 7.29 | 3.47 | 3.82 | 3.06 | 1.78 |
| | Libre | 0.19 | 0.03 | 0.16 | 0.02 | 0.01 |
| Acide coumarique | Conjuguée | 76.65 | 5.06 | 71.59 | 5.30 | 4.44 |
| | Libre | 0.48 | 0.02 | 0.46 | 0.02 | 0.02 |
| Acide sinnapique | Conjuguée | 95.10 | 46.24 | 48.86 | 8.57 | 10.76 |
| | Libre | 5.37 | 0.12 | 5.25 | 0.11 | 0.08 |
| Acide férulique | Conjugué | 178.40 | 27.15 | 151.76 | 27.95 | 21.25 |
| | Libre | 3.15 | 0.45 | 2.15 | 0.11 | 0.08 |

**Stilbènes $C_6$-$C_2$-$C_6$**

Les stilbènes présentent une structure en $C_6$-$C_2$-$C_6$, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (figure I.8). Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine [37].Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques [38].

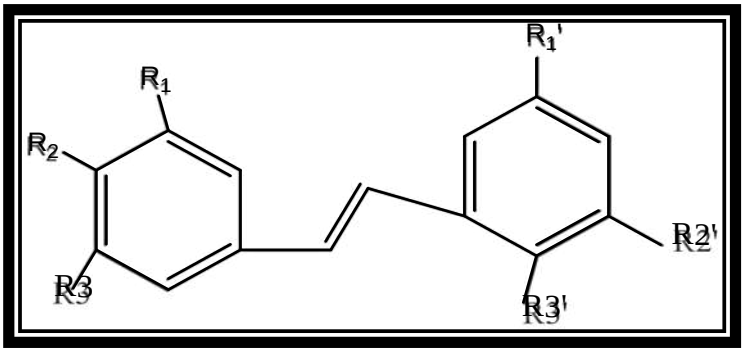



**Figure I.8:** Structures chimiques des stilbènes.

**Lignines $(C_6$-$C_3)$ n**

La lignine est un polymère fortement ramifié, formés par trois alcools phénoliques simples (figure I.9). Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes ; la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine [39].

Alcool p-coumarylique alcool conifférylique alcool sinapylique

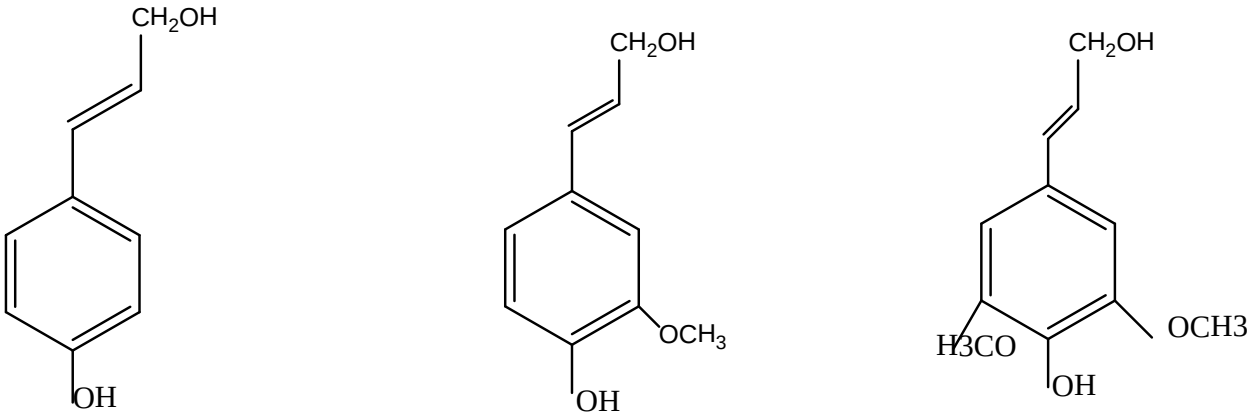



**Figure I.9:** Principaux constituants de la lignine.

**Lignanes $(C_6\text{-}C_3)_2$**

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type $(C_6\text{-}C_3)_2$ l'unité ($C_6$ - $C_3$) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes [40].

**Coumarines $C_6\text{-}C_3$**

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarounaodorata*[41].Ce sont des composés phénoliques cyclisés (figure I.10) qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux.

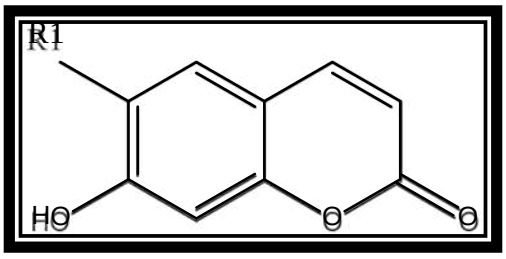



**Figure I.10:** Structure chimique des coumarines.

**Les tanins**

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringenteayant en commun la propriété de tanner la peau, cette aptitude est lié à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da. [42]

### I.3.2.2 Les flavonoïdes ($C_6$-$C_3$-$C_6$)

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétale. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. [43]

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400structures ont été identifiées. [44]

- **Structure chimique**

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en $C_3$ en formant ainsi l'hétérocycle (C)[45]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système $C_6$-$C_3$-$C_6$ [46] en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [47] (Figure I.11).

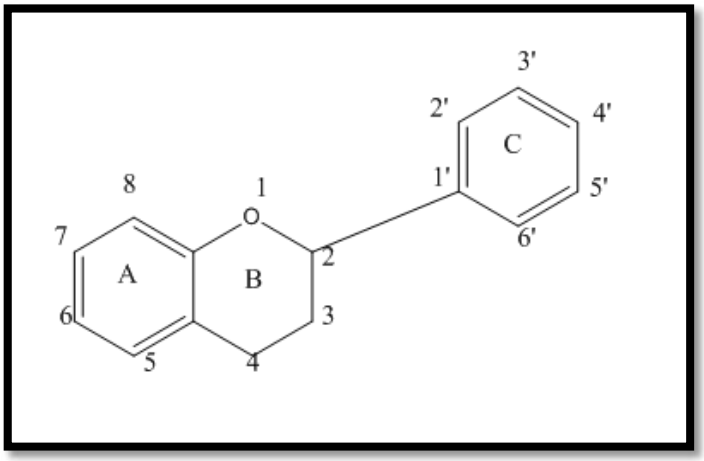
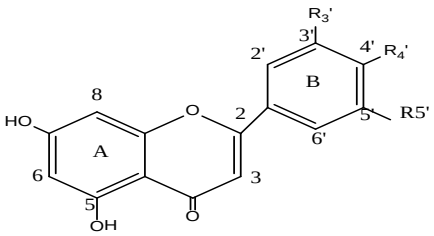
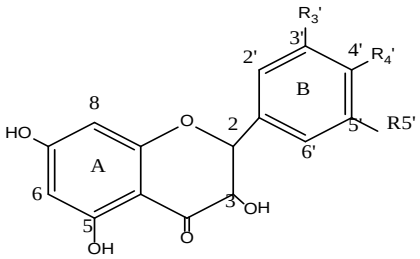
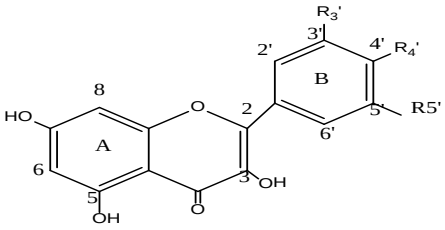


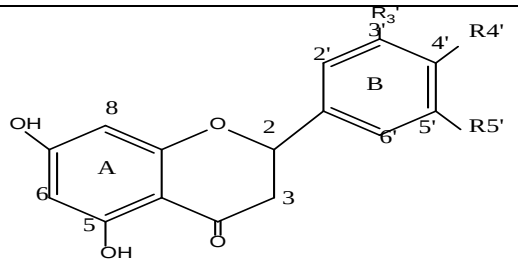
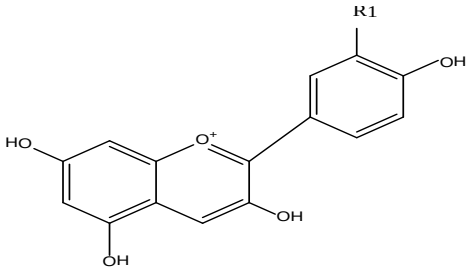
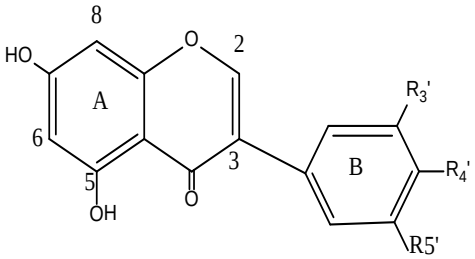

**Figure I.11:** Structure de base des flavonoïdes. [48]

## ♦ Classification des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique centrale [49], le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2,3(tableau I.4).

**Tableau I-4:** Principales classes des flavonoïdes. [50]

| Classes | Structures chimiques | R3' | R4' | R5' | Exemples |
|---|---|---|---|---|---|
| Flavones |  | H | OH | H | Apigénine |
| | | OH | OH | H | Lutéoline |
| | | OH | OCH3 | H | Diosmétine |
| Flavonols |  | H | OH | H | Kaempférol |
| | | OH | OH | H | Quercétine |
| | | OH | OH | OH | Myrecétine |
| Flavanols |  | OH | OH | H | Catéchine |
| Flavanones | | H | OH | H | Naringénine |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| |  | | | | |
| | | OH | OH | H | Eriodictyol |
| Anthocyanidines |  | H | OH | H | Pelargonidine |
| | | OH | OH | H | Cyanidine |
| | | OH | OH | OH | Delphénidine |
| Isoflavones |  | R5 | R7 | R4’ | |
| | | OH | OH | OH | Genisteine |
| | | H | O-Glu | OH | Daidezine |

Les polyphénols sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l’acide benzoïque ou dérivés de l’acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins .

**TableauI-5:** Principaux classes des composées phénoliques.

| Squelette carboné | Classe | Exemple | Origine (exemple) |
|---|---|---|---|
| $C_6$ | Phénols simple | Catéchol | |
| $C_6$-$C_3$ | Acides hydroxybenzoiques | p-hydroxybenzoiques | Epices,fraise |
| $C_6$-$C_3$ | Acides hydrocinnamique<br>Coumarines | Acide caféique, acide férulique<br>Scopolétine ,esculétine | Pomme de terre<br>Pomme<br>Citrus |
| $C_6$-$C_2$-$C_6$ | Silénes | Resvératrole | Vigne |
| $C_6$-$C_3$-$C_6$ | Flavonoides<br>• Flavonols | Kamphérol, quercétine | Fruits, légumes, fleurs |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | • Anthocyanes<br>• Flavanols<br>• Flavanones<br>• Isoflavonols | Cyanidine, pélargonidine<br>Catéchine,épicatéchine<br>Naringénine<br>Daidzéine | Fleurs, fruits rouge<br>Pommes, raisin<br>Citrus<br>Soja |
| $(C_6\text{-}C_3)2$ | Lignanes | Pinorésinol | Pin |
| $(C_6\text{-}C_3)$ n | Lignines | | Bois, noyau de fruits |
| $(C_{15})$ n | Tanins | | Raisin rouge, kaki |

### I.3.3 .Mécanisme général d'action des antioxydants phénoliques

Les composés phénoliques comportent un ou plusieurs groupements hydroxyles greffés sur un noyau benzénique. La fonction phénol peut perdre facilement un proton H+ pour former union phénoxy. La perte d'un hydrogène entraine la formation d'un radical capable de se stabiliser par mésomérie. C'est cette particularité structurale et cette réactivité chimique qui confèrent aux composés phénoliques leur caractère antioxydant. Les substances phénoliques peuvent agir comme des antioxydants « primaires » ou «antiradicalaires ». Ils sont capables de bloquer les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation des lipides en cédant un hydrogène aux peroxydes lipidiques formes. Les polyphénols peuvent aussi intervenir de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singlet, oxydant très puissant des acides gras insaturés, ou en chélatant les métaux de transition ($Fe^{2+}$, $Cu^{2+}$) qui accélèrent fortement l'autoxydation des lipides. Enfin, certains inhibent l'activité des enzymes d'oxydation telles que la lipoxygénase ou la cyclo-oxygénase [27].

### I.3.4 . Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes utilisées pour déterminer l'activité antioxydante « *in vitro*» d'un échantillon mais chacun de ces méthodes a des avantages et des inconvénients ; le tableau I.6 résume ces différentes méthodes:

**Tableau I-6:** Différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.

| Méthode de l'évolution de l'activité antioxydante « in vitro » | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Tests | DPPH | ABTS ou TEAS | FRAP | ORAC |
| Mécanismes réactionnels | *Transfère d'électron majoritaire | *Transfère d'électron ou de proton. | Transfère d'électron | Transfère de proto |
| Nature des molécules testées | *Hydrophile et lipophiles | Hydrophile et lipophile. | Hydrophile | Hydrophile et lipophile. |
| Expression des résultats | *CI50 et /ou en mg ou µmol équivalent Trolox®. | CI50 et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox®. | En mg ou µmol équivalent Fe2+ | CI50 et /ou en mg ou µmol équivalent Trolox® |
| Avantages | *Très facile à mettre en œuvre. *Peu couteux. | *Très facile à mettre en œuvre. *Cinétique de réaction très rapide. | *Très facile à mettre en œuvre *peu couteux | *facile à mettre en œuvre |
| Inconvénients | * encombrement stérique de molécules à hauts poids. *Interférences possibles à 515 nm dépendance au ph et au solvant *Radical inexistant in vitro. | Produits de dégradation antioxydants *radicale inexistant in vivo | Ph utilisé non physiologique | *Mécanisme de génération des $ROO^{\cdot}$ non physiologique * interférence possibles des protéines. |

### I.3.5 Intérêt des composés phénoliques

#### I.3.5.1 Rôle physiologique

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation. [51]

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV [52]. Ils sont impliqués dans la réaction de défense du palmier dattier contre le bayoud, maladie infectieuse due à un champignon telle que *Fusariumoxysporum* [53].

### I.3.5.2 Rôle nutritionnel et thérapeutique

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments, certains d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines (avec lesquelles les tanins se combinent), ...etc. Les décès dus au infarctus du myocarde ou par athérosclérose coronarienne sont à associés au taux élevé des cholestérols du type LDL (Lowdensity Lipoprotéines) circulant dans le sang. Des études ont démontré qu'une consommation importante d'antioxydants phénoliques (vitamine E, quercétine...) pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès par athérosclérose, en diminuant l'oxydation des LDL [54].

Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumons, peau, vessie,...etc.) à tous les stades de cancérogénèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agent bloquant en empêchant l'activation de pro carcinogène.

### I.3.5.3 Rôle antioxydant

Doués d'une forte réactivité, les radicaux libres sont des entités chimiques possédant un électron non apparié (célibataire) sur la couche externe, Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, autres radicaux libres, dits radicaux secondaires [Radical peroxyle (ROO•),Radical alkoxyle (RO•)], se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule[55].

#### I.3.5.4 Rôle antimicrobien

Plusieurs études in vitro et in vivo sont focalisées pour l'évaluation des propriétés anti bactériennes, et antifongiques des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales.

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par Katarzyna et *al*[56]qui ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigenine,kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*…) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*…).

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ces agents pathogènes n'est pas bien connu, les études exploitées par Domineco et *al* [57]ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits polyphénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physicochimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien.

## I.4 Les méthodes d'extraction des composés phénoliques

### I.4.1 Techniques classiques

Les opérations de l'extraction classiques regroupent plusieurs méthodes différentes énumérées ci-après :

#### I.4.1.1 Extraction au Soxhlet

L'extraction par Soxhlet, qui a été employé pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles.

Dans un système conventionnel de Soxhlet comme montré dans la Figure (I.13), la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc.

Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée.[58]

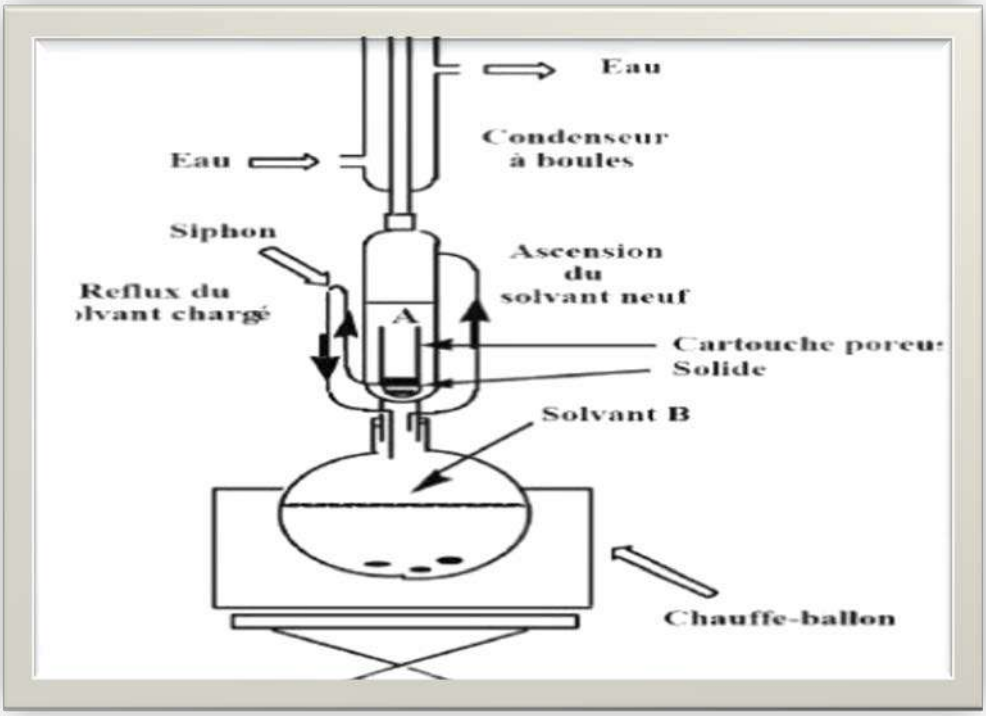



**Figure I.12:** Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet. [59]

### I.4.1.2 Macération

La macération consiste à mettre en contact le matériel végétal avec le solvant d'extraction, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à 4°C pour empêcher l'action des polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques, pour une durée déterminée. Cette technique repose sur la solubilité des substances dans un solvant d'extraction. Elle est influencée par différents facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction etc. Pour une meilleure extraction, la matrice végétale est généralement broyée et le choix du solvant doit être adéquat. Les polyphénols sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte tels que l'éthanol, le méthanol ou l'acétone purs ou en présence d'eau. [60]

#### I.4.1.3 Infusion

C’est la mise en suspension d'un solide dans un liquide chaud ou l'arrosage du solide, par ce liquide afin de dissoudre les constituants utiles suivi du refroidissement du mélange.

#### I.4.1.4 Décoction

C’est l'opération dans laquelle le solide est mis à bouillir dans un liquide en vue d'extraire les parties solubles.

#### I.4.1.5 Expression

Ou pressage Cette opération consiste à « faire sortir » un produit en exerçant une pression.

#### I.4.1.6 Enfleurage

L'enfleurage à froid, le plus ancien des procédés, est aujourd'hui presque totalement abandonné. Il était principalement utilisé pour les fleurs fragiles (exemple : violette) qui ne supportent pas la chaleur. On dépose les fleurs sur des châssis de verre enduits de graisse. On laisse reposer : la graisse absorbe les molécules odorantes. On renouvelle les fleurs souvent jusqu'à saturation de la graisse.[61]

#### I.4.1.7 Percolation

L'extraction est obtenue par passage lent et régulier d'un solvant au travers d'une poudre de drogue placée dans un percolateur. Les quantités de drogues et de solvants, la durée et le débit de l'écoulement, la température et l'agitation, la granulométrie de la drogue, le type d'appareil utilisé sont autant de paramètres de nature à influer sur l'extraction.

### I.4.2 Techniques émergentes

Parmi les différentes méthodes émergentes on peut citer :

#### I.4.2.1 Extraction assistée par ultrasons

Cette technique est apparue en 1950, avec des équipements de taille de laboratoire. Elle représente une adaptation de l'hydro distillation ou de l'extraction par solvant organique. En effet la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et dans le même temps, elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique a été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique. [62]

### I.4.2.2 Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ces procédés, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte clos dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classique condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé.[63]

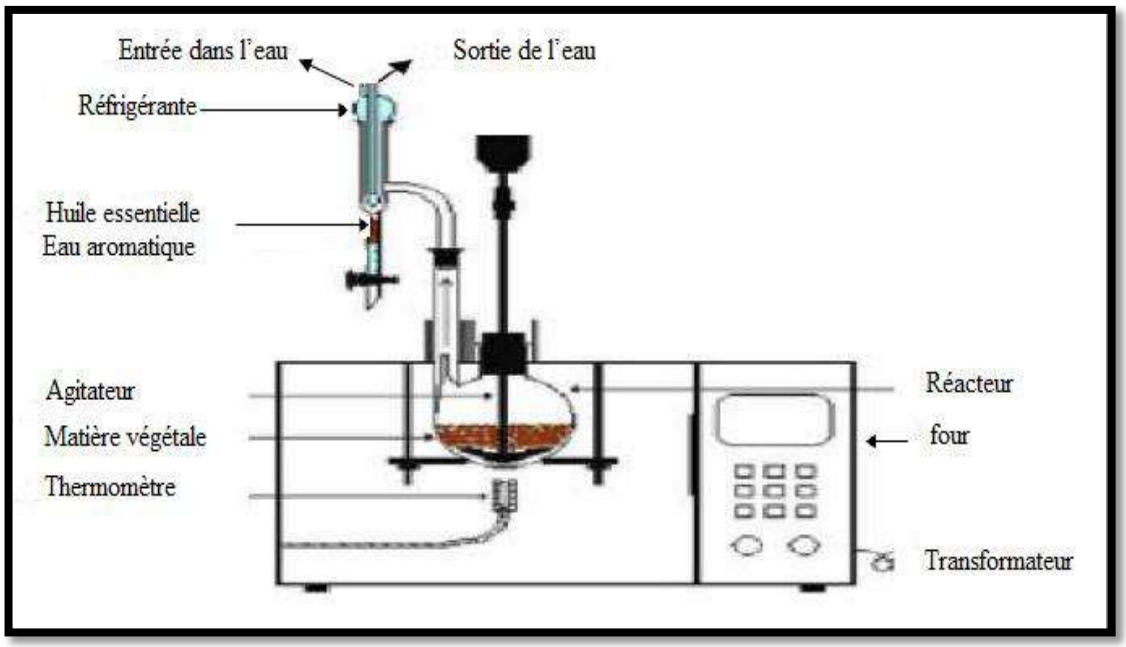



**Figure I.13:** Montage d'extraction par micro-ondes.[64]

### I.4.2.3 Extraction par fluide supercritique (SFE)

L'état supercritique d'un composé organique pur est atteint lorsque celui-ci est placé dans des conditions de pression et de température supérieures aux valeurs de ses points critiques. Au-delà de ces valeurs le fluide est dit supercritique et possède des propriétés à la fois proche d'un gaz et d'un liquide qui vont être intéressantes pour l'extraction de molécules à partir de matière végétale. En effet, un fluide supercritique possède un coefficient de diffusion plus élevé et une viscosité plus faible qu'un liquide ce qui réduit les tensions de surface et permet un meilleur transfert de masse et donc une meilleure cinétique et efficacité d'extraction [65,66]. De plus, l'extraction peut être hautement sélective car il est possible de moduler le pouvoir solvant du fluide supercritique en modifiant les valeurs de pression et/ou

de température. La SFE est principalement utilisé avec le $CO_2$ supercritique, car celui-ci est peu coûteux (sous-produit de l'industrie), non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer et nécessite des conditions critiques faciles à atteindre (T = 31.1°C, P = 73.8 bar). Ainsi les principaux avantages de la SFE sont l'obtention d'un échantillon concentré et son pouvoir solvant. Pendant le processus d'extraction, le fluide est pompé de manière continue à travers l'échantillon, et libère ainsi les composés d'intérêt qui sont récupérés sous forme concentrés après une étape de dépressurisation qui élimine le $CO_2$ sous forme gazeuse. Cependant, en plus du coût de l'appareillage, l'un des désavantages majeurs de l'extraction par $CO_2$ supercritique est l'hydrophobicité de ce composé qui limite l'extraction à des molécules apolaires et qui nécessite l'ajout de Co-solvants comme le méthanol ou l'éthanol pour permettre l'extraction de molécules plus polaires [67,68].

### I.4.2.4 Extraction assisté par induction électromagnétique

Le chauffage par induction est une application très directe à la fois de la loi de l'induction (loi de Lenz) et de l'effet Joule [69] (figure I.15). Tout conducteur appelé alors inducteur parcouru par un courant périodique crée un champ magnétique, lui aussi périodique, qui engendre des courants induits (dits de Foucault) dans un autre conducteur placé dans ce champ. Ce courant induit, produit alors de la chaleur par effet Joule dans un conducteur où il a pris naissance. [70].

Le chauffage par induction des réacteurs chimiques consiste à disposer autour d'un réacteur à paroi métallique un enroulement métallique parcouru par un courant alternatif. Cet enroulement sert d'inducteur et provoque dans la paroi métallique du réacteur des courants de Foucault qui vont produire de la chaleur par effet Joule.[70]

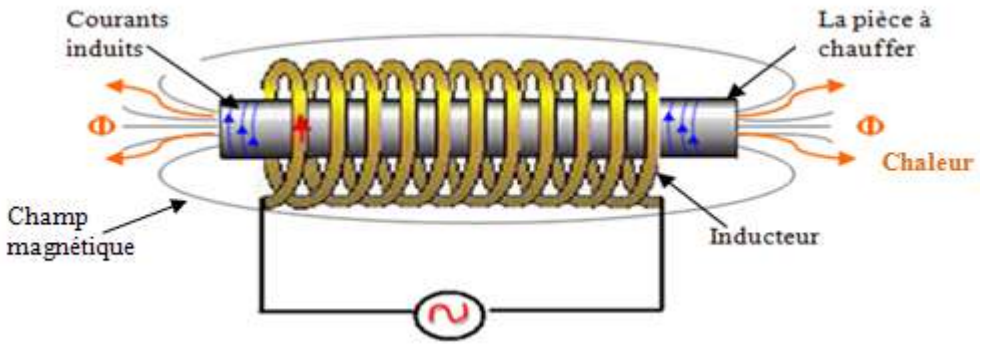



**Figure I.14:** Principe de chauffage par induction. [70]

### I.4.2.5 Extraction par fluide pressurisé (PLE, PressurizedLiquid Extraction)

La PLE, dont une des variantes les plus connues est l'extraction par solvant accéléré, est une technique d'extraction solide-liquide qui a la particularité d'utiliser des solvants sous de hautes pressions et à des températures situées au-dessus du point d'ébullition des solvants [71]. Cette combinaison de pression et température élevées fournit un processus d'extraction plus rapide et plus efficace. L'augmentation de la température diminue la viscosité des solvants permettant une meilleure pénétration dans la matrice solide et des interactions solvants-matrices-molécules plus faibles. De plus, les taux de diffusion deviennent plus rapides à température élevée ce qui diminue le temps d'extraction. La pression force le solvant à passer à travers les pores de la matrice et ainsi atteindre des composés jusqu'ici inaccessibles. Par ailleurs, le processus d'extraction, constitué de plusieurs cycles d'extraction, engendre l'introduction de solvant propre augmentant le gradient de concentration entre le solvant et la matrice solide, ce qui améliore le transfert de masse et augmente le taux d'extraction. L'extraction est réalisée en mode statique, c'est-à-dire que le solvant est en contact avec la matrice pendant un temps imparti (généralement 5 à 10 min) et pendant lequel a lieu la désorption et la diffusion des molécules de l'échantillon vers le solvant [72]. A la fin de l'extraction, le solvant est évacué de la cellule de haut en bas par un flux d'azote. Toutefois, lors de l'extraction, la matrice est introduite dans une cellule en acier inoxydable qui contient un filtre positionné dans la partie basse de celle-ci. Ainsi, l'extrait obtenu est filtré avant d'être envoyé vers un flacon de récupération ce qui élimine l'étape de filtration [73].

### I.4.2.6 Extraction par eau subcritique (SWE, Subcritical Water Extraction)

La SWE est une variante de l'extraction accélérée par solvant dans laquelle de l'eau chaude est utilisée à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374.1°C (point critique de l'eau), et c'est sous l'effet de fortes pressions que l'eau est maintenue sous sa forme liquide [74,75]. L'eau à température ambiante est un solvant polaire qui possède une permittivité, ou constante diélectrique (ε), de 75.5. Cependant, lorsque l'eau est chauffée dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, sa polarité diminue et son constant diélectrique devient équivalente à celle du méthanol (ε = 33) ou de l'éthanol (ε = 24) [76]. Ainsi la SWE permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non polaires sans utiliser de solvants organiques. De plus, une augmentation de la

température permet une meilleure pénétration de la matrice et une meilleure solubilisation de l'analyte dû à la diminution de la viscosité et des tensions de surface76. La SWE nécessite le même matériel que l'extraction accélérée par solvant et peut également être utilisé en mode statique ou dynamique. Néanmoins, la SWE n'est pas adaptée à l'extraction de composés thermolabiles.

#### I.4.2.7 Extraction assistée par des enzymes pectolytiques

Les préparations enzymatiques commerciales contiennent principalement des pectinases, des cellulases, des hémicellulases, des glucanases ou encore des tannases. Ces enzymes sont couramment utilisées pour fragiliser ou dégrader les parois cellulaires facilitant ainsi la libération du contenu intracellulaire. Elles servent donc principalement à améliorer l'extraction des polyphénols. Cependant, c'est une technique onéreuse en raison du cout des enzymes employées. [77]

## I.5 Conclusion

Les écorces d'agrumes sont hautement valorisable vue sa richesse en ingrédients fonctionnels (composés phénoliques, huiles essentielles, fibres, caroténoides, vitamine C) ayant des applications très variés dans les industries agroalimentaire, cosmétique, nutraceutique et dans les industries de production de biocarburant et de matériau biodégradables. [78]

Les écorces d'agrumes représentent un gisement important de composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques.

Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...). [79]

# *Chapitre II : Matériels et Méthodes*

## II.1 Introduction

La partie expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire chimie 1 du Hall technologique ainsi qu'au laboratoire de recherche matériaux et environnement de l'université de Médéa. Cette étude a pour principal objectif la valorisation des écorces de *Citrus* à savoir *C. sinensis*(Orange douce) et *Citronciruswebberi* (Citrange) par extraction des composés phénoliques, en adoptant trois techniques de chauffage à savoir le chauffage classique , par micro-onde et celui assisté par induction électromagnétique.

## II.2 Produis et matériels

### II.2.1 Les produits

Les différents produits utilisés lors de cette étude expérimentale, sont rassemblés dans le Tableau.

**Tableau II-1:** Principaux produits utilisés.

| Produits | Pureté (%) |
|---|---|
| Ethanol | 96 |
| Acide gallique | - |
| Carbonate de sodium | 99.9 |
| Acide ascorbique | - |
| DPPH | 99 |
| Rétine | 94 |
| Réactif de Folin-ciocalteu | - |
| Trichlorure d'aluminium | - |
| Mueller Hinton bouillon | - |
| Mueller Hinton agar | - |

### II.2.2 Matériels

**TableauII-2:** Différents matériels utilisés.

| **Matériels utilisés** |
|---|
| Etuve |
| Broyeur (Moulin électrique) |
| Balance électronique |
| Agitateur |
| Vortex |
| Spectrophotomètre ultraviolet-visible |
| Bain-marie thermostaté |
| Buchner |
| Tamis |
| Micro-onde |
| Autoclave |

## II.3 Matériel végétal

La matière végétale utilisée dans cette étude est :

- L'orange qui est acheté du marché de la wilaya de Médéa.
- Le fruit de citrange qui a récolté durant le mois de février au niveau de l'université de Médéa.




**FigureII.1**: Matière végétale.

## II.4 Matériel de l'étude microbiologique :

Pipettes pasteurs, pinces en acier, Anse de platine, Bec bunsen, Micropipettes a volume réglable, et des boites de pétri en plastique ; disque vide ; Etuve de stérilisation 120°C ; Tubes à essai ; Pipettes graduées; Flacons pour milieux de culture ; Ecouvillons ; Portoir pour tubes.

### II.4.1 Les souches testées

La détermination du pouvoir antibactérien et la CMI a été fait sur des souches de référence tels que:

*Staphylococcues aureus*

*Escherichia coli.*

*Pseudomonas aeruginosa*.

*Enterococcus.*

- *Staphylococcues aureus sont* des cocci à gram positif qui tendent à se regrouper en amas [80] irrégulier à la façon d'une grappe de raisin [81].*Staphylococcues aureus* est une germe aérobie- anaérobie facultatif [81], doit son non d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaire et nosocomiales.
- *Escherichia coli* c'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les déférences de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [80].

- *Pseudomonas aeruginosa* est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu- vert de ses colonies [80].C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de sapro dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux.

Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [81] Les *Enterococcus* sont des bactéries lactiques, ubiquitaires, trouvées fréquemment dans la flore microbienne du tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud, ainsi que dans une variété de produits alimentaires. Ils sont utilisés dans les aliments soit comme agents antimicrobiens, soit pour leurs propriétés organoleptiques et parfois comme probiotiques. [82]

### II.4.2 Caractéristiques des souches testées

Les principales caractéristiques de souches testées sont présentes dans le tableau suivant :

**TableauII-3:** Principales caractéristiques de souches testées.[83]

| Famille | *Micrococcaceae* | *Enterobacteriaceae* | *Pseudomonadaceae* | *Enterococcaceae* |
|---|---|---|---|---|
| Genres et espèces | *Staphylococcus aureus* | *Echerichia coli* | *Pseudomonas aeruginasa* | *Enterococcus* |
| Gram | + | - | - | + |
| Forme et mobilité | Cocci Immobile | Bacille Mobille | Bacille Mobille | Cocci |
| Caractère biologique | Aérobie facultatif catalase+, oxydase coagulase+ | Aérobie facultatif oxydase , lactose+, indole+ | Aérobie strict oxydase+ | Anaérobie facultatif |
| Habitat | Peau et muqueuses. | Tube digestif. | Commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux. | tractus digestif et génito-urinaire (dont urètre). |
| Pouvoir pathogène | *Infection pyogènes graves. | *Infections urinaires et des gastro-entérites infantiles. | *Infections nosocomiales. | *Endocardite *infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. |

### II.5 La teneur en Eau

La teneur en eau des écorces d'agrumes étudiées a été déterminée selon la norme internationale ISO 5534 (ISO, 2004). La teneur en eau est mesurée par la dessiccation de l'échantillon dans une étuve ventilée à 105°C jusqu'à que le poids devient constant (3heures

et 45min, chaque 15 min on prend l'échantillon et on le peser). La teneur en eau est exprimée par rapport à la base humide en(%).

$$\mathbf{H}(\%) = \frac{\mathbf{m0-m}}{\mathbf{m0}} \qquad \textbf{II-1}$$

## II.6 Extraction des composés phénoliques

### II.6.1 A partir de la matière fraiche

Les extraits phénoliques des écorces d'agrumes sont obtenus par la méthode de macération à chaud. 5g des écorces d'agrume frais sont introduits dans un bécher de 50ml de solvant (50%éthanol/50% eau distillée), l'ensemble est porté à l'ébullition et à l'abri de la lumière.

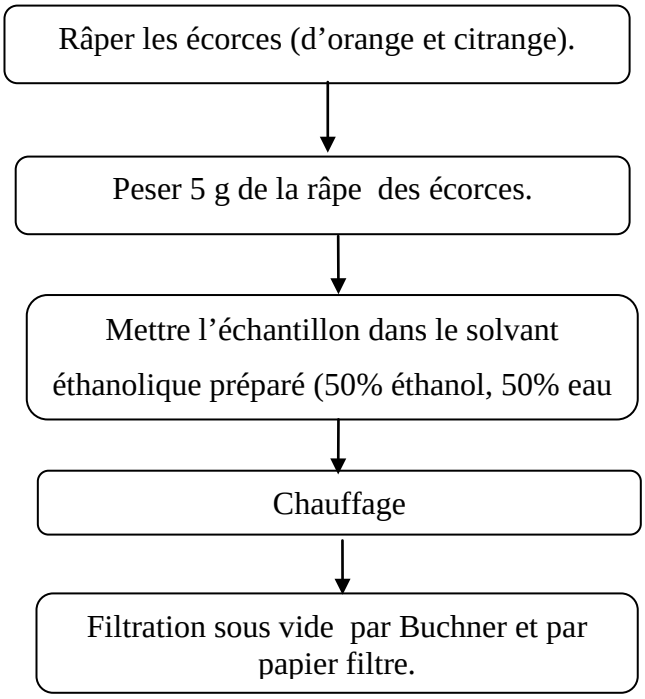
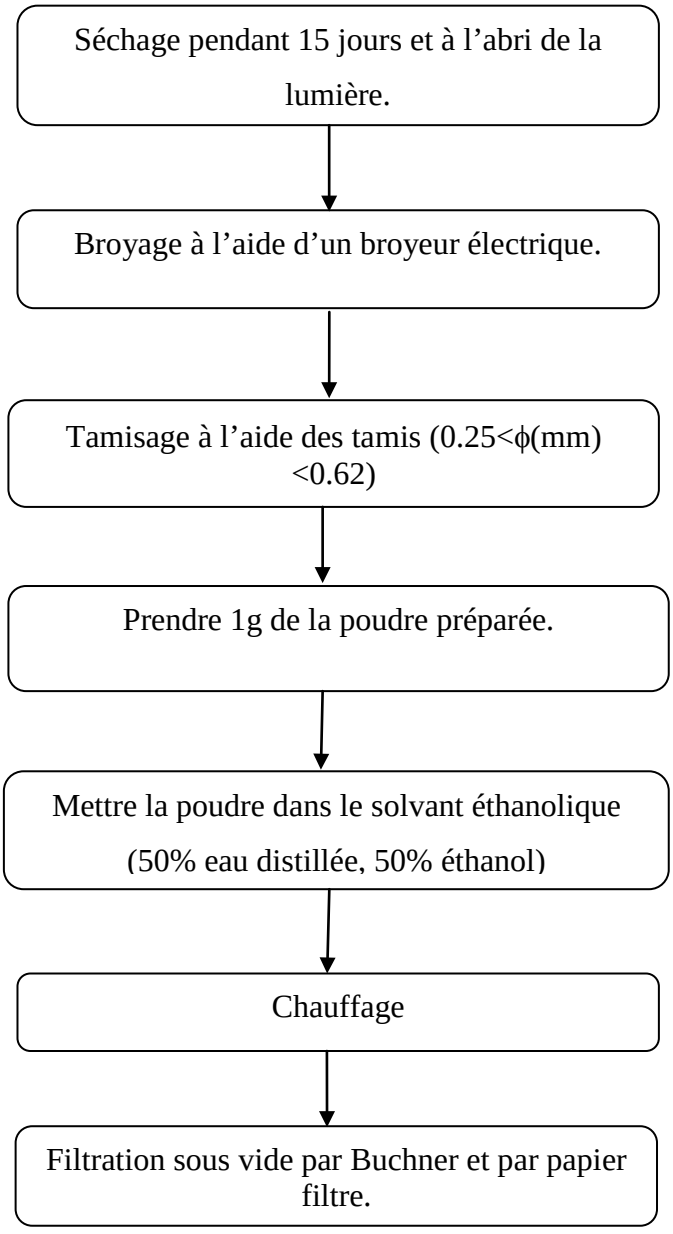



**Figure II.2:** Protocole de préparation de l'extrait phénolique de la matière fraiche.

### II.6.2 A partir de la matière sèche :

Le protocole d'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes sèches est résumé dans l'organigramme suivant (figure II.3).




**FigureII.3:** Protocole opératoire d'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière sèche.

### II.6.3 Extraction conventionnelle par chauffage classique

Les conditions de l'extraction conventionnelle ont été choisies selon les données de la littérature [84]. Le solvant utilisé est un mélange d'éthanol/eau à50%. En effet, les solvants donnant la teneur la plus élevée en phénols totaux sont le méthanol et l'éthanol. Cependant, dans les applications industrielles, l'éthanol plus respectueux pour l'environnement est le plus souvent utilisé [85]. Une concentration d'éthanol variant de 70 à 80% est la plus utilisée dans la littérature pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange. La température d'extraction a été fixée à 60°C pour éviter la dégradation des composés phénoliques au cours du processus de l'extraction.



**Figure II.4:** Extraction assisté par chauffage classique.

### II.6.4 Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction assistée par micro-ondes est réalisée dans des conditions identiques . Elle est accélérée par l'utilisation de micro-ondes (Multiwave 3000, MicrowaveReaction System, Graz, Austria). 1 g de poudre des écorces d'orange et de citrange sont introduites dans la chambre d'extraction avec 50 ml de solvant (éthanol /l'eau). L'extraction a été duré120s. Les puissances micro-ondes appliquées à 400 W.



**FigureII.5:** Extraction assisté par micro-onde.

### II.6.5 Extraction assisté par induction magnétique

Les écorces du citrange ont subi le même protocole d'extraction que la méthode classique sous les mêmes conditions opératoires, mais cette fois-ci nous avons utilisé la plaque chauffante à induction électromagnétique comme moyen de chauffage. Le protocole opératoire consiste alors à mélanger une quantité de la matière première séchée (1g) avec un volume de 50 ml de solvant (Ethanol/eau), le mélange est ensuite mis dans un récipient magnétisable puis chauffé sur une plaque à induction, en fixant le niveau de la puissance correspondant à la température de 60°C (niveau $1^{\#}$), sous une agitation continue (voir figure II.6).

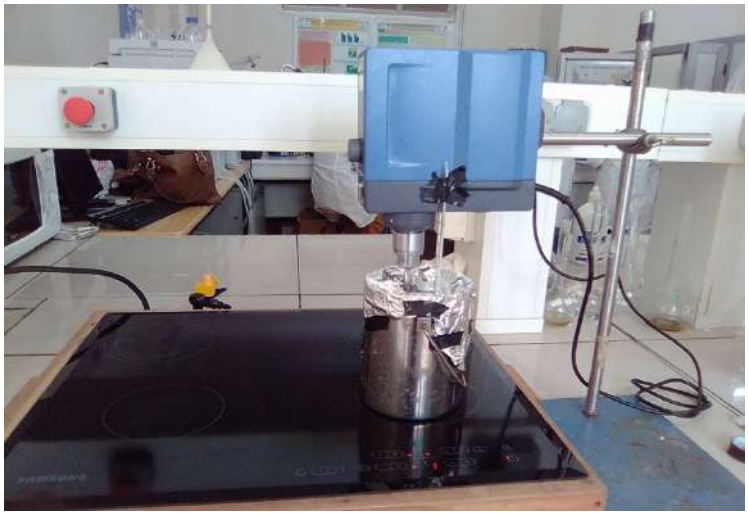


**Figure II.6**: extraction assisté par induction magnétique.

## II.7 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

### II.7.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode Folin-Ciocalteu.

- **Principe**

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Cioclateu [86], ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Cioclateu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés. [87]

- **Mode opératoire**

Mettre 100µl de chaque extrait dans des tubes à essais ; ajouter 800µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans l'eau distillée (v/v) dans chaque tube ; agiter vigoureusement puis laisser agir 5min avant d'ajouter 800µl de carbonate de sodium à 7.5%.

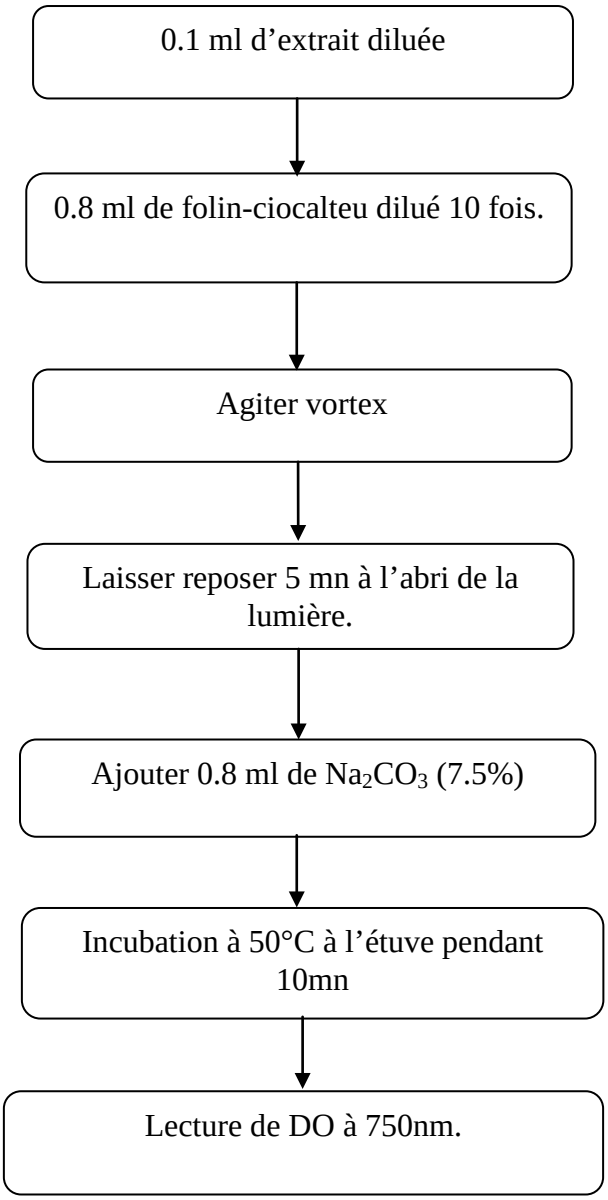
Après incubation de 10min à température de 50C° à l'étuve et à l'abri de la lumière, lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 750 nm.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné du Folin-Ciocalteu et de carbonate de sodium.

Le dosage de PPT est effectué en comparaison avec une gamme étalon d'acide gallique de concentration connue

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique/ 1 g de MF d'agrume.




**FigureII.7:** protocole de dosage des polyphénoles totaux.

Les teneurs en PPT sont exprimées en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique selon la formule suivante :

$$TPPT = C \times D \times V / P. \qquad \textbf{II-2}$$

Avec :

**TPPT** : teneur en polyphénols en mg EAG/g MS d'agrume;

**C** : concentration obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg/ml.

**D** : nombre de dilution.

**V** : volume de l'extrait récupéré (ml).

**P** : poids initial de la matière sèche utilisés (g).

## II.8 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

### ♦ Principe

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode de Bahorun et *al*. [88] Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium [89]. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons [90].

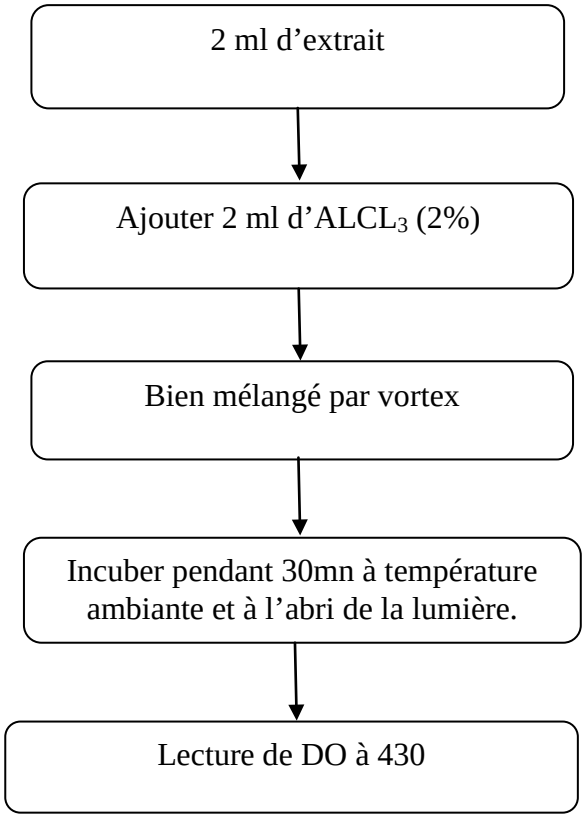
### ♦ Mode opératoire

Mettre 2ml d'extrait dans un tube à essai ; Ajouter 2 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % puis laissé incuber 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Lire les absorbances à partir du spectrophotomètre UV-visible à 430 nm.

Le blanc est représenté par l'éthanol additionné à l'$AlCl_3$.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits des écorces de citrange sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la rétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en rutine / 1 g de MF.




**FigureII.8:** protocole de dosage des flavonoïdes.

La formule suivante a été utilisée pour calculer les teneurs en flavonoïdes exprimés en mg Equivalent rétine pour 1 g de matière végétale sèche :

$TFT = C \times D \times V/P$ **II-3**

Avec :

**TFT**: teneur en flavonoïdes totaux en mg ER/g MS;

**C**: concentration obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en mg/ml ;

**D** : nombre de dilution ;

**V** : volume de l'extrait récupéré (ml) ;

**P** : poids initial de la matière sèche utilisés (g).

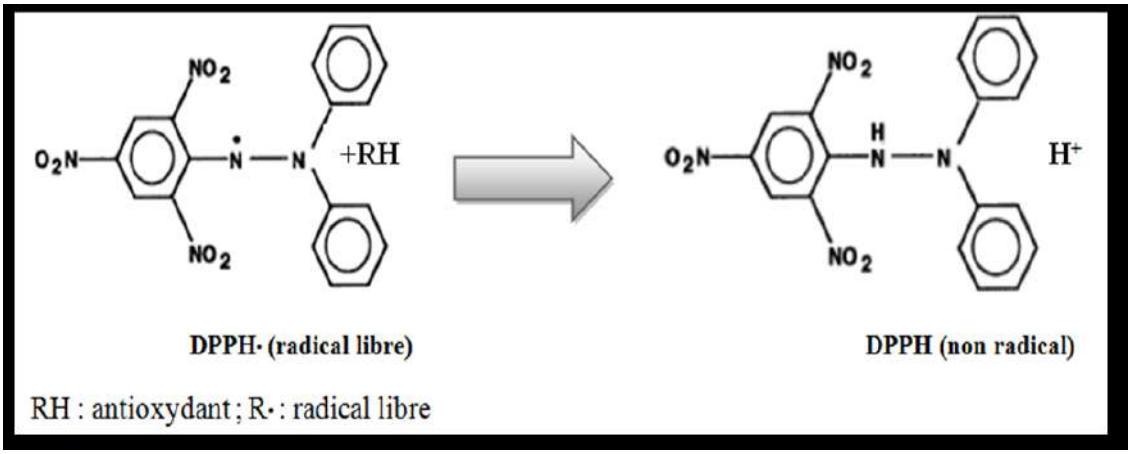
## II.9 Evaluation de l'activité biologique

### II.9.1 Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été mesurée par une méthode de DPPH.

❖ **Principe:**

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure II.9). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [91].




**FigureII.9:** Réaction du DPPH• avec un antioxydant.[92]

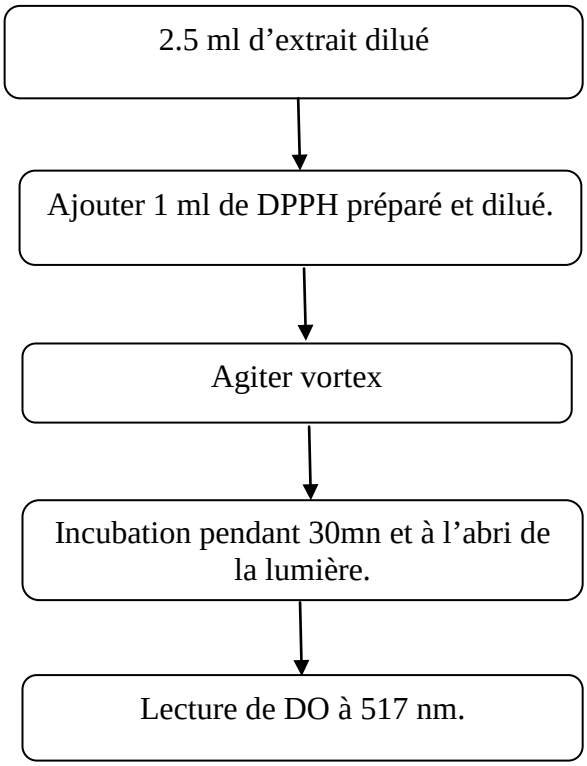
❖ **Mode opératoire:**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhammou et al. [91]

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0.004% de DPPH dans l'éthanol, différentes concentrations de solutions échantillons sont ajoutées à 1ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517 nm contre le blanc correspondant. Le paramètre IC50 (concentration inhibitrice à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Les résultats exprimés en IC50 qui sont calculés à partir des courbes de la variation du

pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque échantillon. Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante [92**]**

**% d'activité antioxydante = [Abs contrôle – Abs échantillon / Abs contrôle] x 100.**




**FigureII.10:** Protocole d'étude de l'activité antioxydante.

### II.9.2 Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques a été réalisée par deux méthodes : des antibiogrammes et celle de dilution d'Agar.

#### II.9.2.1 Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.01 à 0.08 à 620 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

### II.9.2.2 Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est Frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boite de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boites de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

### II.9.2.3 Test par diffusion sur gélose (Antibiogramme)

- **Mode opératoire**

Dans des boites contenant $10^8$ UFC/ml de culture bactérienne effectuée à la surface de 10 ml de gélose MH, des disques imprégnés d'extraits phénoliques de dose connue sont appliqués à la surface à des distances déterminés, les boites sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h min. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

- **Lecture des antibiogrammes**

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un papier millimétrique en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches.

**TableauII-4**: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D) [93,94]

| Inhibition | Transcription | Sensibilité |
|---|---|---|
| D < 8mm | - | Résistante |
| 9mm ≥ D ≤ 14 | + | Sensible |
| 15mm ≥ D ≤ 19mm | ++ | Assez sensible |
| D ≥ 20mm | +++ | Très sensible |

### II.9.3 Test de macrodilution en milieu liquide

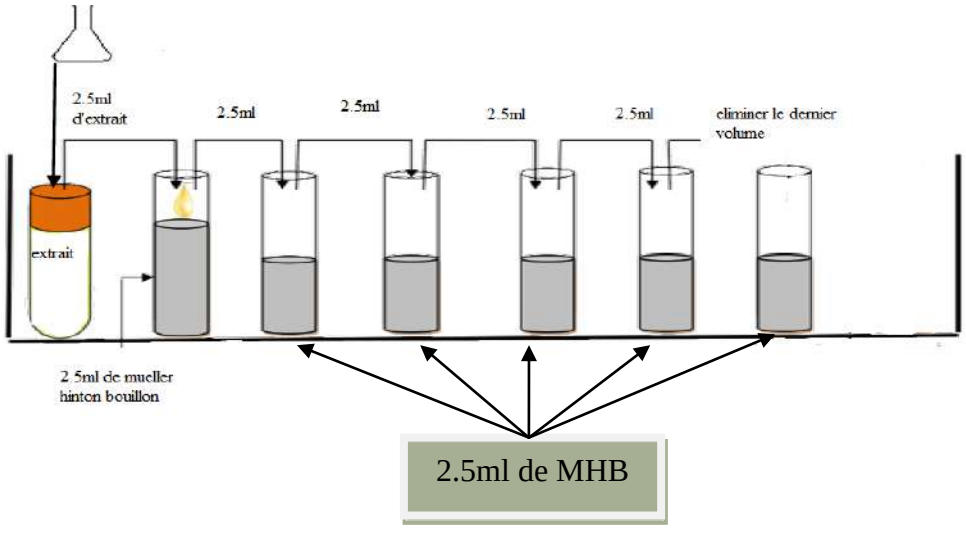
La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'extrait après un temps d'incubation de 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'extrait.

### II.9.4 Mode opératoire

La gamme de concentration de l'extrait phénolique a été préparée dans cinq tubes à essai par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison ½.

Cette technique consiste à inoculer, par une suspension bactérienne, une série de dilution des extraits effectuées dans du milieu Mueller Hinton bouillon, de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 100%et 6.25%.

Déposer 0.5 ml d'une suspension bactérienne ($10^8$ CFU/ml) dans chacun des tubes de la série, lesquels sont incubés après agitation en vortex, à 37°C pendant 24h.Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 0.5 ml de la suspension bactérienne ont été déposés dans du milieu MHB, est également réalisé. Après quoi on les observe macroscopiquement, le premier tube dans lequel il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les tubes sont centrifugés ensuite à 6000 tr/min, pendant 5 minutes pour confirmer la présence ou non de précipité bactérienne.




**FigureII.11 :** Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

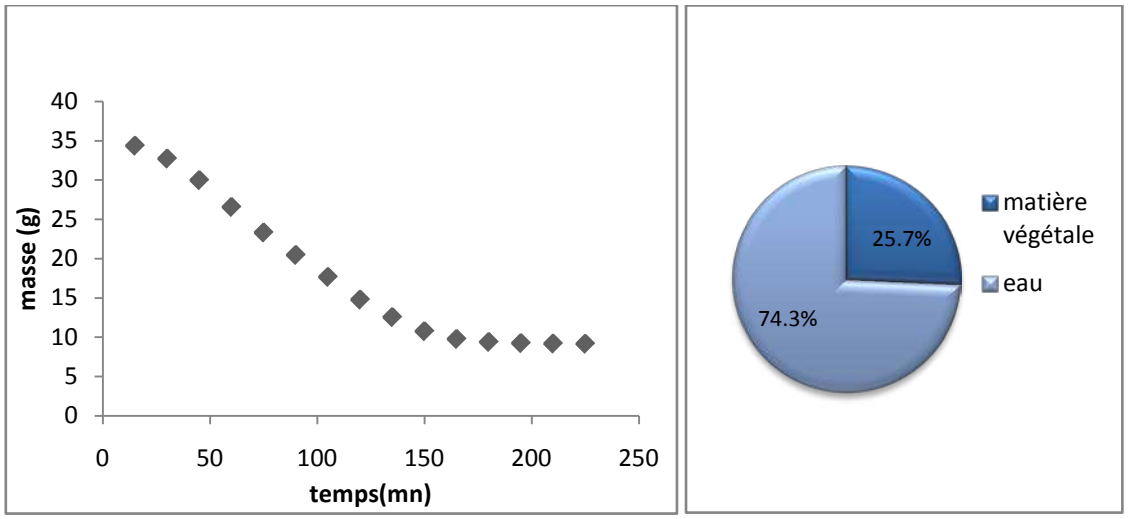
# *Chapitre III: Résultats et discussions*

## III.1 Introduction

Nous présentons dans le présent chapitre les résultats obtenus ainsi que les interprétations et les conclusions que nous en avons tirées.

## III.2 Teneur en eau

Les résultats de la détermination de la teneur en eau des différentes matières végétales sont regroupés sur les figures III.1et III.2.




**FigureIII.1:** Teneur en eau de l'orange

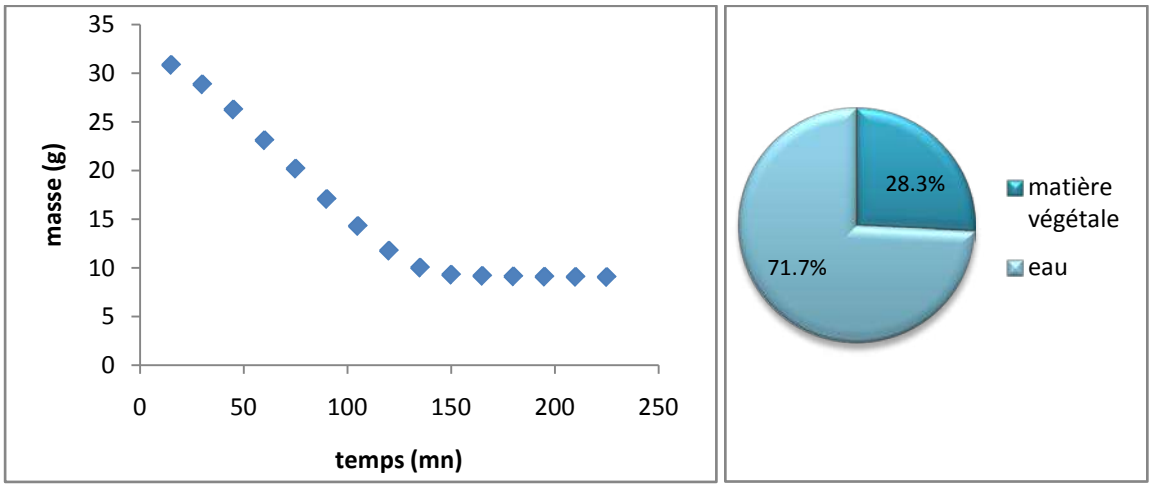



**Figure III.2** : Teneur en eau de citrange

Les résultats obtenus montrent que toutes les matières végétales sont riches en eau avec des teneurs supérieures à 50%.Les teneurs en eau enregistrées varient entre 71.76% et

74.28%. Cela signifie que plus de la moitié du poids de citrange et d'orange fraîche est constituée d'eau.

### III.3 Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits éthanoliques de citrange et d'orange au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes. Deux méthodes de dosages ont été mises en évidence pour cet objectif, une est la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu qui est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols en utilisant l'acide gallique comme standard [95](.Annexe I), l'autre méthode est celle du trichlorure d'Aluminium (AlCl3), réalisée pour la détermination de la teneur des flavonoïdes en utilisant comme standard la rutine (Annexe I).

Les résultats expérimentaux de dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont regroupés dans le Tableau (III-1) et représentés par les Figures (III-3, III-4).

**Tableau III-1 :** Teneur en polyphénols et en flavonoïdes en fonction de la méthode de chauffage, et de la matière végétale.

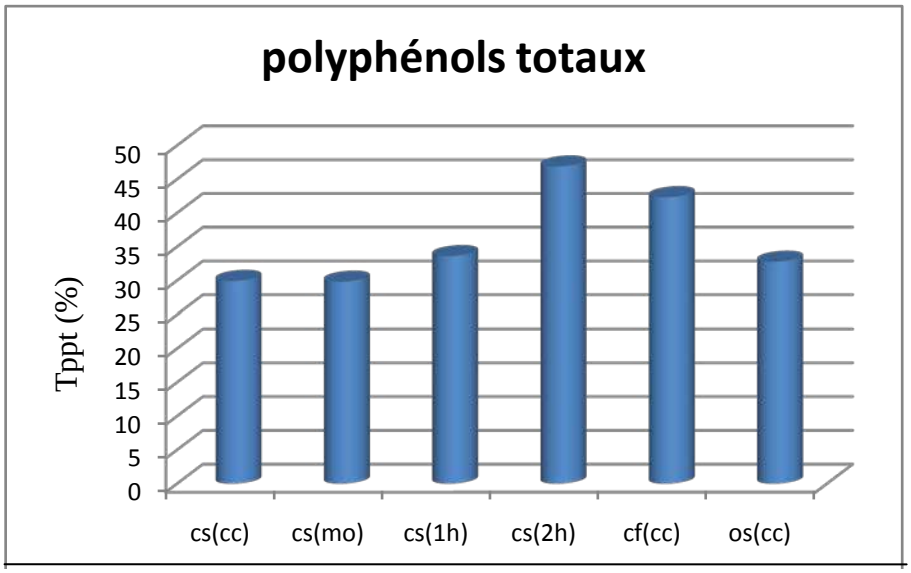
| Méthodes d'extraction | Matière végétale | | TPPT (mg eqAG/g) | TF (mg eqR/g) |
|---|---|---|---|---|
| Chauffage classique | $C_{sèche}$ | | 29.93 | 31.58 |
| | $O_{sèche}$ | | 32.77 | 34.67 |
| | $C_{fraiche}$ | | 42.33 | 52.11 |
| Induction électromagnétique | $C_{sèche}$ | 1h | 33.6 | 30.59 |
| | | 2h | 46.88 | 35.94 |
| Micro-onde | $C_{sèche}$ | | 29.81 | 32.87 |

Les résultats de tableau III-1, représentant les teneurs en flavonoïde et en polyphénols totaux en fonction de la de technique de chauffage, de la matière végétale et de séchage, montrent que :

En termes de technique de chauffage, les résultats montrent que les extrait des écorces de citrange sèches obtenus par extraction assisté par induction électromagnétique après un temps de macération de 2h sont plus riches en polyphénols (46.88 mg eqAG/g), et en flavonoïdes avec une teneur de 52.11 mg eqR/g, par rapport aux autres extraits obtenus par la méthode de chauffage classique et de micro-onde. Ces résultats sont certainement liés au mode de chauffage, sachant que le chauffage par induction électromagnétique permet l'homogénéité et la rapidité du chauffage, grâce à son principe de produire la chaleur au sein du matériau à chauffer, contrairement au chauffage classique et au chauffage par micro-onde.

En termes de la matière végétale, les résultats montrent que, les extraits issus des écorces d'orange sèches sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes avec des teneurs de 32.77 mg eq AG/g et 34.67 mg eqR/g respectivement, par rapport aux extraits obtenus à partir de citrange sèche (29.93 et 31.58 mg eq AG/g) en polyphénols et flavonoïdes respectivement. Li et al [96] suggèrent que les peaux d'orange sont très riches en polyphénols par rapport aux autres agrumes. De plus, nos résultats sont relativement supérieurs à ceux trouvés par Lagha-Benamrouche [97], qui ont rapporté des teneurs en polyphénols de l'ordre de 9.608–31.623 mg eqAG/g à partir des écorces d'orange.Cette différence dans les résultats est probablement due à la diversité de la composition chimique et selon des facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir la région de cultivar, la méthode utilisée dans l'extraction et d'évaluation.

Les résultats ont montré également, que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les écorces de citrange fraiches (42.33 mg eqAG/g, 52.11 mg eqR /g) respectivement, sont plus élevées que dans les écorces de citrange sèches (29.93 mg eqAG/g, et 31.58 mg eqR/g) respectivement.




**FigureIII.3 :** Teneurs en PPT des extraits.

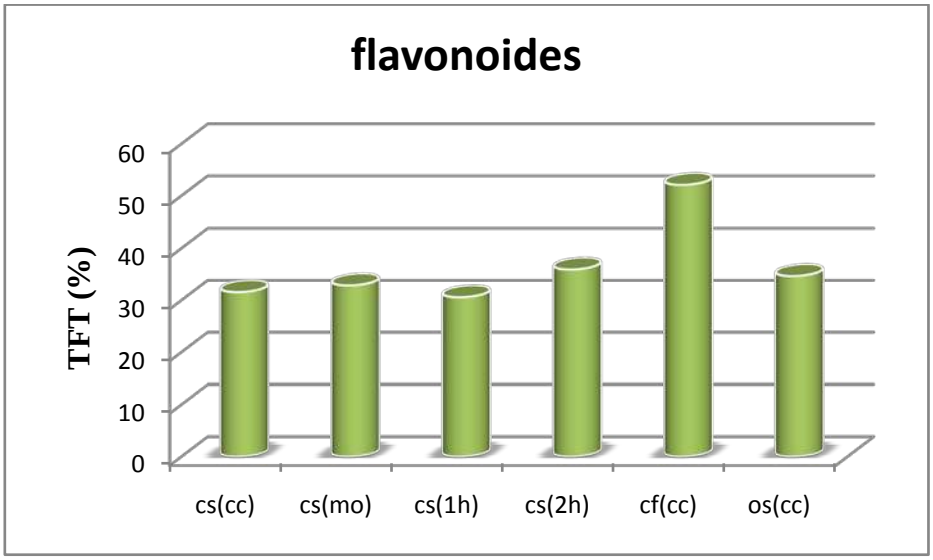



**Figure III.4:** Teneurs en flavonoïdes.

## III.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne

### III.4.1 Antibiogramme

Les observations effectuées sur l'effet des extraits phénoliques de l'orange et de citrange sur la croissance des souches bactériennes testées: *Staphylococcues aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, sont représentées dans les figures (III-5, III-6, III-7, III-8) et le tableau III-2 :



**Figure III.5**: Halos d'inhibition des extraits sur *Enterococcus*



**Figure III.6:** Halos d'inhibition des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*




**FigureIII.7 :** Halos d'inhibition des extraits sur *Staphylococcues aureus.*




**FigureIII.8 :** Halos d'inhibition des extraits sur *Escherichia coli.*

**Tableau III-2:** Diamètre des zones d'inhibition en mm pour les trois méthodes d'extraction.

| Numéro | Les extraits | *Enterococcus* | *Pseudomonas aeruginosa* | *Staphylococcues aureus* | *Esherichia coli* |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Citrange fraiche (CC) | Sensible (+) | Résistante (-) | Sensible (+) | Sensible (+) |
| 2 | Citrange sèche (MO) | Résistante (-) | Résistante (-) | Résistante (-) | Assez sensible (++) |
| 3 | Citrange sèche (IM (2h)) | Sensible (+) | Résistante (-) | Résistante (-) | Sensible (+) |
| 4 | Citrange sèche(CC) | Assez sensible (++) | Résistante (-) | Sensible (+) | Résistante (-) |
| 5 | Citrange sèche (IM (1h)) | Assez sensible (++) | Résistante (-) | Sensible (+) | Résistante (-) |
| 6 | Orange sèche(CC) | Assez sensible (++) | Sensible (+) | Assez sensible (++) | Résistante (-) |

La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Les résultats d'antibiogramme obtenu à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton révèlent que l'activité antibactérienne des extraits testés est en fonction de la bactérie cible. Il est clair qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Ps. aeruginosa*, ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des extraits des agrumes étudiés. Cependant la comparaison de l'efficacité de techniques d'extractions des extraits phénoliques testés ont montré que l'activité antibactérienne contre *Enterococcus* obtenue par antibiogramme des extraits phénoliques extraits par CC (18 mm) est légèrement supérieure à ceux obtenus par MO (9 mm) et IM (12 mm), et l'activité antimicrobienne contre l'*E. Coli* a présenté une inhibition des composés extraits de17 mm par MO, plus élevée que les autres extraites par IM (12mm), et CC (9mm).

Ceci peut être vraisemblablement justifie par la composition chimique des composés phénoliques qui varie selon les conditions expérimentales d'extraction.

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits des écorces de citrange sèche révèle une activité antibactérienne sur les souches de l'*Enterococcus* et *Staphylococcus aureus* (18 mm, 14 mm) respectivement, et absente dans les autres souches bactériennes. Contre l'extrait de citrange fraiche qui possède une activité antimicrobienne contre toutes les souches (*Staphylococcus aureus* (11 mm), E. coli (13 mm), *Enterococcus* (14 mm)) sauf la bactérie de *Pseudomona*.

L'activité antimicrobienne des extraits de l'orange révèle une activité antimicrobienne sur la souche de *Staphylococcus aureus* avec 16 mm d'inhibition par rapport au citrange (14mm), et contre la souche d'*Enterococcus*. Alors, le citrange a présenté une activité antimicrobienne plus importante avec une inhibition de 19 mm de diamètre.

### III.4.2 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Dans le tableau III.3 nous rapportons les résultats de la méthode des dilutions sur milieu liquide des extraits des agrumes étudiés qui sont les plus actifs contre les trois souches bactérienne.

**TableauIII-3:** Résultats de la méthode de la dilution sur milieu liquide.

| **La souche testée** | **Echantillon** | | **CMI (%)** |
|---|---|---|---|
| *Enterococcus* | Ecorces d'orange sèches | CC | Absence d'activité |
| | Ecorces du citrange sèches | IM (2h) | 100% |
| | | MO | 100% |
| | | CC | Absence d'activité |
| *Staphylococcues aureus* | Ecorces d'orange sèches | CC | 50% |
| | Ecorces du citrange sèches | IM (2h) | 100% |
| | | MO | 50% |
| | | CC | 100% |
| *Esherichia coli* | Ecorces d'orange sèches | CC | 50% |
| | Ecorces du citrangesèches | IM (2h) | 50% |
| | | MO | 50% |
| | | CC | 50% |

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin de croissance, il y a une diminution du trouble provoqué par la croissance des germes dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration en extrait augmente. Nos résultats montrent que les extraits aqueux ont eu une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens selon une relation dose-réponse. D'après le tableau I.3 on constate que :

➢ Un CMI > 100% a été observée vis-à-vis d'*Enterococcus.* sauf pour ceux extraites par induction électromagnétique et par micro-onde (CMI=100%). Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des extraits phénoliques de *Citrus*.

➢ Les extraits phénoliques obtenus par micro-onde ont montré une meilleure performance antimicrobienne par rapport aux extraits phénoliques obtenus par induction électromagnétique et par chauffage classique, avec des CMIs de l'ordre de 50%, 100% et 100% des extraits phénoliques de citrange obtenus par MO, IM et CC respectivement vis-à-vis de *S. aureus*. Et on observe que l'extrait d'orange fait une activité antimicrobienne très élevée (50%) par rapport au citrange sèche (100%).

➢ Les extraits phénoliques de citrange sèche ainsi que de l'orange sèche ont exercé une activité antimicrobienne (CMI=50%) à l'encontre d'*E.coli.* Contrairement à nos résultats d'aromatogramme, ont montré que cette dernière est résistante aux composés phénoliques de citrange. Ce qui signifie que les activités antimicrobiennes des composés phénoliques peuvent changer par sa composition chimique, par les génotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution).Ben Sassi et *al*.[98], ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de la partie aérienne de 23 plantes médicinales, ils ont trouvé que seul l'extrait d'acétone exerce un effet inhibiteur parmi les trois extraits (acétone, hexane, méthanol).

### III.5 Evaluation de l'activité antioxydante des composées phénoliques extraites

Pour déterminer la capacité antioxydante des différents extraits phénoliques obtenus, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), car cette méthode est simple, reproductible et est largement utilisée dans l'industrie alimentaire [99]. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH (ou notée : $DPPH^{\bullet}$) en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée [100].

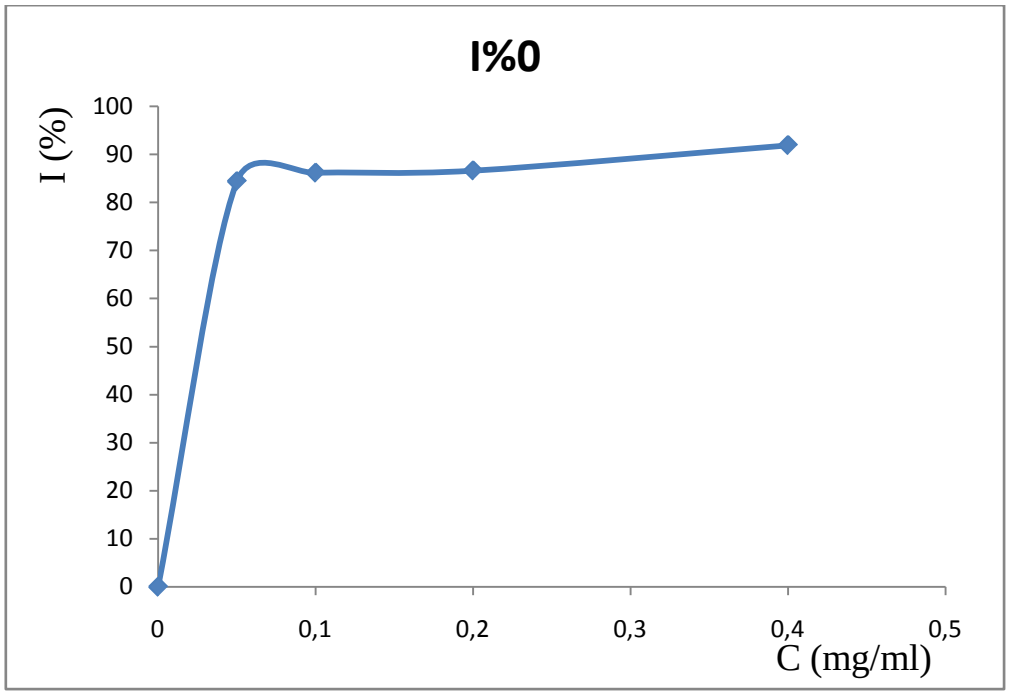



**Figure III.9 :** Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations d'extrait issu des écorces de citrange par IM.

Le profil de l'activité antiradicalaires obtenue (Figure III.9) révèle que cet extrait possède une activité antiradicalaire à dose-dépendante, soit une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait testé.

A une concentration de 0.1 mg/ml, l'extrait issu des écorces de citrange par IM révèle une activité antioxydante importante avec plus de 50% d'inhibition du DPPH.

# *Conclusions générale*

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes et éventuellement à leur caractérisation et évaluation biologique.

Pour ce faire, nous avons procédé au premier volet de ce travail, à une extraction des composés phénoliques à partir des écorces de deux espèces *de citrus* à savoir *C. sinensis* (Orange douce) et *Citronciruswebberi* (Citrange) par macération à chaud en utilisant trois techniques de chauffage : le chauffage classique, le chauffage assisté par induction électromagnétique et celui assisté par micro-onde.

D'après les résultats obtenus, on peut tirer les conclusions suivantes :

- Les teneurs en en composés phénolique obtenus par macération à chaud varient selon l'origine de la matière première utilisée. D'où les extraits issus des écorces d'orange sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes avec des teneurs de 32.77 mg eqAG/g et 34.67 mg eqR/g respectivement, par rapport aux extraits obtenus à partir de citrange.
- En comparant l'effet des différents techniques de chauffage ; les résultats montrent que les extrait des écorces de citrange obtenus par extraction assisté par induction électromagnétique après un temps de macération de 2h sont plus riches en polyphénols totaux (35.94 mg eqAG/g), et en flavonoïdes avec une teneur de 52.11 mg eqAG/g, par rapport aux autres extraits obtenus par la méthode de chauffage classique et de micro-onde.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne, montre que les extraits phénoliques d'agrumes possèdent une activité antimicrobienne sur les souches testées (*Staphylococcuesaureus, Escherichia coli, Enterococcus)*, sauf contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui manifeste une résistance pour les extraits étudies.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par DPPH•, montre que les extraits phénoliques testés possèdent une activité antiradicalaire avec dose dépendante. A une concentration de 0.1 mg/ml, l'extrait issu des écorces de citrange par IM révèle une activité antioxydante importante avec plus de 50% d'inhibition du DPPH.

A l'issus de tous ces résultats, il faut signaler que ce travail mérite une poursuite à savoir l'étude et l'identification des différentes fractions de l'extrait phénolique des écorces d'agrumes pour bien approfondir les connaissances sur les différents flavonoïdes pourvus de ces activités biologiques et aussi pour cerner d'une manière plus fine les différentes actions possibles de ces composés et leur synergie.

# *Références bibliographiques*

1 : Baississe S., 2009. Extraction et appréciation des pectines à partir d'écorces d'oranges, de pulpes d'abricots et de pomme. Thèse de magistère.Université el hadj lakhdar- batna .

2 :Hynes M. J. et Coinceanainn M. Ó., 2001. The kinetics and mechanisms of the reaction of iron (III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. Journal of Inorganic Biochemistry , 85: 131-142.

3 : USDA (United Sates Department of Agriculture). 2014. Citrus: World Markets and Trade.

4 : Marin F.A., Soler-Rivas, C., Benavente-Garcio., Castillo, J., Perez-Alvarez, J.E., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. Food Chemistry. 100: 736-741.

5 :Bocco A., Cuvelier, M.E., Richard H., Berset C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.46, 6: 2123-2129.

6 : Ma Y., Chen J., Liu D., Ye X., 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. UltrasonicsSonochemistry. 16: 57-62.

7 : HuangY.S., Ho S.C., 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the antiinflammatory activity of citrus fruit peel. Food Chemistry. 119: 868-873.

8 : Ramful D., Bahorunb T., Bourdonc E., Tarnusc E., Aruoma O.I., 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. Toxicology. 278: 75-87.

9 :Cheigh C.I., Chung E.Y., Chung M.S., 2012. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu*peel using subcritical water.Journal of Food Engineering. 110: 472-477.

10 :Jawad A., Langrish T.A.G., 2012. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. Journal of Food Engineering. 109: 162-174.

11 : Khan M.K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A.S., Dangles O., Chemat F., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis*L.) peel. Food Chemistry. 119: 851-858.

12 : Li W., Wang Z., Wang Y.P., Qun Liu C.J., Sun Y.S., Zheng Y.N., 2012. Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in Citrus reticulata 'Chachi' (Guangchenpi).*FoodChemistry*. 130: 1044-1049.

13 : Li B.B., Smith B., Hossain M.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method.Separation and Purification Technology.48: 189-196.

14 : Ioannou I., Hafsa I., Hamdi S., Charbonnel C., Ghoul M., 2012. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior. Journal of Food Engineering. 111: 208-217.

15: http://www.isolotto.com/isolotto-pepiniere-agrumes-citrus-corse/production.htm.

16 :Loussert R. (1989).les agrumes.2.production Edition Lavoisier, paris 157.

17 : Spiegel-Roy P., et Goldschmidt E.E., 1996**.** Biology of *Citrus.*1ère édition; Edition Cambridge University Press.239 .

18 : Hendrix C.M et Redd J.B., 1995 **.**Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In*:*Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic et Professional, 53-87.

19 : blogdesagrumes.blogspot.com/2011/05/une-appercie.html

20 : http:// fr.wikipedia.org/wiki/Citron.

21 : Des Plantes, Livre V, d'après le Livre II, paragraphe 25 de l'*Anthologie palatine*.

22 : https://fr.wikipedia.org/wiki/Orange (fruit) consulté le 19 janvier 2017.

23 : Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris.360

24 : https://fr.wikipedia.org/wiki/Citrange. Consulté le 05/05/2013.

25 : http://gardenberizh.org/pages/dossier 02.01.html**.** (2008).

26 :Bampidis V.A., Robinson, P.H., 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. Animal Feed Science Technology. 128, 175-217.

27 :Duoss-Jennings H. A., Schmidt T. B., Callaway T. R., Carroll J. A., Martin J. M., Shields-Menard S.A., 2013. Effect of citrus byproducts on survival of O157:H7 and non-O157 *Escherichia coli* se rogroups within in vitro bovine ruminal microbial fermentations. International Journal of Microbiology. 1-5.

28 :Lebham. Mémoire du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
29 : Girard J. 1965. L'évolution de la datte au cours de sa croissance et sa maturation. In : Compte rendu des travaux de recherches effectuées à la station d'El-Arifiane. 30

30 : Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Journal of Clinical Nutrition. 79 (5): 727-747.

31 : Peter H.,Raven,Ray F .Evert,Susan E.Echhorn.,1ère Ed., 2003. Biologie végétale. P 32.

32 :Sarni-Manchado, P. et Cheynier, **V**., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Tec & Doc éditions. France.
33 : Andersen MØ, Markham KR, 2006. FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications.Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.

34 : De la rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E. & Gonzalez-Aguilar, G. A., 2009**.** Fruit and vegetable phytochemicals : Chemistry, Nutritional value and stability. Edition John Wiley and Sons, 73.

35 : Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4ème Edition. Paris.

36 : Peleg H., Naim M., Rouseff L. R. et Zehavi U., 1991. Distribution of Bound and Free Phenolic Acids in Oranges (*Citrus sinensis*) and Grapefruits (*Citrus paradisi*).Journal of the Science of Food and Agriculture. 57 : 417-426.

37 :Belkheiri N., 2010.Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.
38 : Jean-Denis, J. B., 2005. Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, Plasmopara viticola (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat . Université de NEUCHÂTEL.
39 : Hopkins, W. G., 2003. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur :280.

40 : Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P. &McCullough, M. L., 2010. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. Nutr. Rev. 68(10): 571–603.

41 : Lacy A. et O'Kennedy, R., 2004. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer.Current Pharmaceutical Design 10: 3797-3811.

42 : Paris M et Hurabielle., 1981. Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed Masson. Paris.pp: 102-103 :104-107.

43 :Ferradj **A.**, 2011. Activité antioxydant et anti-inflammatoire des extrais alcooliques et aqueux des feuilles et des baies Pistacialentiscus . these de magéster. Université Farhat abbas –Séttif.

44 :Harborne J.B.,and Williams C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992 Phytochemistry.55 :481-504.

45 : W-Erdman J., Balentine J .D.,Arab L., Burrowes J.,2007.Flavonoids and heart health : Proceeding ofthe ILSI North America flavonoids workshop, Washington. Journal of Nutrition., 137 (3 supp 1) : 718 -737.

46 :Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P. ,2007. Self organisating maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoïd data. Journal of brazilian chemical society., 18(5) : 891-899

47 :Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. etKrishna D. R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., 33 :2-16.

48 :Dacosta E., 2003.Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317.

49 :Bouazak I., 2006. Etude phytochimiqueboiactif .Yves Dacosta (Ed). Paris ,317.

50 :Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., 33 **:** 2-16.

51 : Alibert J., Ranjeva R. et Boudet M A**.,** 1977. Organisation subcellulaire des voies de Synthèsedes composés phénoliques. Physiol. Veg. 15: 279-301

52 : Hadi M., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères pro-oxydants oucapteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Mémoire doctorat. OptionPharmacochimie. Université Louis Pasteur. Strasbourg.155.

53 :Daayf F., El BellajM.,ElHassni M.,Jaiti F. and El Hadrami I., 2003.Elicitation of solublephenolics in date palm (Phoenix dactylifera) callus by Fusariumoxsyporumf.sp. albidnis.Environ.Experiment.Botany.49 :41-47

54 : Frankel E. N., Water house A. L. and Teissedre P. L.,1995.Principal chemicals in selected Californian wines and their antioxidant activity in inhibition oxidation of human low density lipoprotein. J.Agric. Food. Chem. 43:221-235.

55 : Novelli G. P., 1997 .Role of free radicals in septic shock. J .Physiol. Pharmacol.48: 517-527.

56 :Katarzyna U., Anna M., Marta M., Joanna J.B. and Grzegorz W., 2007. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. Biologia.62 (2): 132-135.

57 :Domenico T., Francesco C., Maria G.S., Vincenza V., Mariateresa C.D., Antonella S., Gabriela M. and Giuseppe B.,2005.Mechanisms of antibacterial action of Three Monoterpenes.Antimicrob Ag .Chemother.49**:** 2474-2478.

58 : Tyler V.E., Brady L.R., Robbers J.E., 1881. Pharmacognosy. Lea&Febiger, Philadelphia, 520.p.

59 : Ben Amor B., 2005. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes Actifs; Texturisation par détente instantanée contrôlée DIC.Thèse de doctorat. Toulouse.

60 : Armelle Peroumal., 2014. Caractérisation des fruits et de la pulpe de six accessions de MAMMEA AMERICANA. Aptitude à la transformation des fruits et caractérisation des composés phénoliques de la pulpe. Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane : 60-61.

61 :Boussetta N., Lanoisellé J.-L., Bedel-Cloutour C. and VorobievE., 2009. Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. Journal of Food Engineering 95(1): 192 -198. [107] Besombes. C" Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo

62 :Besombes **C.,**2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques.Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de la Rochelles.

63 : Hemwimon S., Pavasant p et Shotiprux A., 2007. Microware-assisted extraction of antioxidativeanthraquinones from roots of Morindacitrofolia. Separation and Purification Technology.54:44-50.

64 : Lagunez R. Luicita., 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. These de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

65 :Sharma U.K., Sharma K., Sharma N., Sharma A., Singh, H.P. and Sinha, A.K., 2008.Microwave-assisted efficient extraction of different parts of Hippophaerhamnoides for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(2): 374-379.

66 : Marston A., 2011. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. Journal of Chromatography A, 1218(19): 2676-2683.

67 : Everette,J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila,G.W, and Walker, R.B., 2010 Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin−Ciocalteu reagent. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(14): 8139-8144

68 : Sun B., Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10) :4267-4274.

69 : Gauthier A., 2001. Industrie chimique, Un contexte favorable pour lesapplications de l'électricité. Info chimie magazine nº 426.

70 : Salfati S., 1996. Le vecteur énergétique de la chimie nouvelle. Informationschimie No.384.

71 : Rongsen, L., 1992. Seabuckthorn a multipurpose plant species for fragile mountains. ICIMOD occasional paper n°20, Khatmandhou, Nepal, 62.

72 : Guignard J.-L., 2006. Biochimievégétale.Dunod, 2ème éd., Paris,. 274.

73 : Yang B., Zheng J. and Kallio H.,2011. Influence of origin, harvesting time and weather conditions on content of inositols and methylinositols in sea buckthorn (Hippophaërhamnoides) berries. Food Chemistry, 125(2): 388-396.

74 : Ercisli S., Orhan E., Ozdemir O. and Sengul M., 2007. The genotypic effects on the chemical composition and antioxidant activity of sea buckthorn (Hippophaerhamnoides L.) berries grown in Turkey. ScientiaHorticulturae, 115(1): 27-33.

75 : Raffo A., Paoletti F. and Antonelli M., 2004.Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (Hippophaerhamnoides L.) cultivars. European Food Research and Technology, 219(4) : 360-368.

76 : Bruneton, J.,2008. Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique et Documentation, 3ème éd., Paris, pp. 1120.

77 :Eldarra N., 2013. Les composés phénoliques des raisins : étude du potentiel qualitatif et des procedesemergeants d'extraction. These de doctorat. Universite de Technologie de Compiègne (UTC).

78 :Ledesma-Eschobar C.A.,Luque de Castro,M.D.,1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant anlysis using liquid chromatography of flavononeglycosides.journal of agricultural and food chemestry .42:70-79.

79 :Macheix JJ, Fleuriet A and Jay-Allemand **C**., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 4-5.

80 :Nauciel. C., and Vildé J.L., 2005. Bactériologie médicale, 2èmeEd.Masson . Paris: 5-10.

81 : Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., 2000. Bactériologie clinique. 3ème edition Ellipses (Ed) Paris: 602 .

82 :Turcotte C. et al., 2004. A rapid turbidometricmicroplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. Int. J. Food Microbiol., 90 : 283-293.

83 : Fauchère .,Avril .J.L .,2002. Bactériologie générale et médicale.Ed. Ellipses, Paris : 365

84 : Dahmoune F., Boulekbache L., Moussi K., Aoun O., SpignoG., Madani K., 2006. Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants:Evaluation and optimization of microwave and ultrasound applicationto solvent extraction. Industrial Crops and Products 50 :77– 87.

85 : Bartnick D.D., Mohler C.M., Houlihan M., 2006. Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application. 20060088627.

86 : Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M.**,** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Method. Enzymol. 299**:** 152-178.

87 :Boizot N., and Charpentier .J.P.**,**2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu encomposés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra :79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

88 :Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. and Pinkas M**.,** 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittle Forshing. 46 (11):1086-1089.

89 :Boulekbache L., 2005. Profil GC-MS des polyphénols d'une plante médicinale : Eucalyptus globulus. Mémoire de Magister. Université de Bejaïa : 71p.

90 :Ribéreau-Gayon P.**,**1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris. p 254.

91 : BENHAMMOU N ., ATIK BEKKARA F ., KADIFKOVA P., 2007. Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacialentiscus L. and PistaciaatlanticaDesf .Advances in Food Sciences. 29(3):155-161

92 : Colic M .,Morse D., 1999.The Elusive Mechanism of the Magnetic 'Memory' of Water", Colloids Surf., A:, Physicochem. Eng. Asp. 154 (1-2) :167-174.

93 : Ponce AG., Itz R., Del Valle C., Roura SI., 2003. Antirnicrobial activity of essential oils n the native microflora of organic Swiss ard. Society of Food Science and Technology. 36: 679-684.

94 : Biyiti LF., Meko'o DJL ., Tamzc V., Amvam ZPH., 2004. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. Traditional pharmacology and medicine in Africa. 13: 11-20.

95 : Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P., 2008. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. J Food Composition and Analysis.21: 229-240.

96 : Li, Smith, B.B., Hossain, B., M. d.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: solvent extraction method. Separation and Purification Technology 48: 182–188.

97 : Lagha-Benamrouche S., Madani K., 2013.Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties *(*Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.*)* cultivated in Algeria: Peels and leaves. Industrial Crops and Products 50:723–730.

98: Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., and Aouni1 M.,2007. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities.J. Pharmaco.Bio.45 : 421–428.

99: Choi H.S., Song H.S., keda H.U., and Sawamura M., 2000. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. J. Agric. Food Chem., 48:4156-4161.

100 : Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. and Pizzariello A., 2007.Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. Food Chem.; 100: 1481-1489.