

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

Evaluation de l'effet inhibiteur *in vitro* de trois espèces d'agrumes : *Citrus limon*, *Citrus reticulata* et *Citrus sinensis* sur l' α – amylase.

Présenté par : BELABBAS hayat et MAHROUFI fatiha

Devant le jury :

Présidente : Mme. KRAZA Lamia ; MAA

Rapporteur : Dr. KHACHEBA Ihen ; MCA.

Co-Rapporteur : Dr. BOUSSOUSSA Hadjer ; MCB

Examineur : Mr, BENNACEUR Farouk ; MAA

Soutenu publiquement le :09/05/2018.

Dédicace

*Tout d'abord je remercie dieu de m'avoir aidé
pour écrire ces mots.*

Je dédie ce modeste travail

À mes chers parent ,

À mes frères, sœurs,

*À tous mes profs qui m'ont enseigné durant toutes mes
années d'étude,*

À tous les enseignants qui m'ont aidé de près ou de loin,

À tous mes amis.

À tous mes collègues sans exception et à toutes les promos

2018 .

Belabbas Hayat

Dédicaces

Avec une immense joie je dédie mon travail à :

Mes parents :

*Ma mère **bakhta**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père **mohammed**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mes chers frères : **taher, ahmed et abd lkader**, avec leurs maries et a yassine et **habib***

*Mes chères sœurs : **Zahra, Amina** et leurs **maris***

*Et ma petites sœur **Khadija***

*Et mes amies qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité **rokia, aicha, mariem, lalia, fatiha, khadija et racheda***

*A ma binôme et mon amie **hayet**; qui m'a partagé le bien et le mal pour réaliser ce travail. et a tout sa famille.*

*A tutes les enfants **bochra, ilham , jalila , mohammed , mostapha , belkacem et ibrahim.***

*Mes Enseignants qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis
permettez-moi donc de vous en exprimer*

Ma reconnaissance et mes très cordiaux remerciements

A tous ceux qui me sont chers.

fatiha

Remerciement

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de mener à terme ce présent travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Madame Khacheba IHCEN et Madame BOUSSOUSSA HADJER encadreurs de ce mémoire ; elles nous ont guidé dans la conduite de ce travail et nous ont aidé à trouver des solutions pour avancer ; nous tenons à les remercier également pour leur patience et leur disponibilité tout au long de ce mémoire.

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation durant les années d'études. Leurs conseils et leurs encouragements ont été pour nous des apports déterminant dans la réalisation de ce travail

Vifs remerciement

Nous adressons également nos remerciements aux personnes qui nous ont aidées dans la réalisation de ce mémoire et tous ceux qui nous ont soutenues de près comme de loin.

Table des matières

| | |
|-----------------------------|-----|
| Liste des figures..... | I |
| Liste des tableaux..... | II |
| Liste des abréviations..... | III |

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|----------|
| I.1. Les agrumes..... | 5 |
| I.2. Bienfaits et Principes actifs des agrumes..... | 5 |
| I.3. Le diabète | 5 |
| I.3.1. Définition..... | 5 |
| I.3.2. Classification..... | 6 |
| I.3.3. Traitement | 6 |
| I.4. Inhibition de l' α -amylase..... | 9 |

CHAPITRE II. PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|---|----|
| I.1. Matériel végétal..... | 11 |
| II.2. Prétraitement des échantillons..... | 11 |
| II.3. préparation des extraits..... | 11 |
| II. 4. Quantification des composés phénoliques..... | 13 |
| II.4.1. Dosage des phénols totaux..... | 13 |
| II.4.2. Dosages des flavonoïdes..... | 14 |
| II.5. Evaluation de l'activité inhibitrice | 14 |

| | |
|---|----|
| II.5. 1. Principe de la méthode de dosage par le DNS..... | 14 |
| II.5.2. Test d'inhibition | 15 |
| II.5. 3. Étude du pouvoir anti-amylasique..... | 15 |

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| 1. III.1. Préparation des extraits..... | 17 |
| III.2. Dosage des composés phénoliques. | 18 |
| III.3. Etude de l'effet d'inhibition sur l' α -amylase..... | 22 |

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE I

ANNEXE II

Liste des figures

| | |
|-------------------------|---|
| Figure0129 | Courbe d'étalonnage d'acide gallique des polyphénols totaux |
| Figure0229 | Courbe d'étalonnage de la quercitrine des polyphénols totaux |
| Figure0337 | Les représentations graphique ($I\% = f(c)$) du tests d'inhibition des extraits végétales sur α -amylase |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I.1. Classement des antidiabétiques oraux..... | 08 |
| Tableau I.2. Description des trois espèces d'agrumes choisis pour l'étude..... | 12 |
| Tableau III.1. Teneurs, aspects et couleurs des extraits bruts des six échantillons investigués..... | 17 |
| Tableau III.2. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des six échantillons investigués..... | 20 |
| Tableau III.3. Valeurs des IC ₅₀ des extraits étudiés vis - à vis de l' α - amylase..... | 23 |

Liste des Abréviations

| | |
|--------------------------------|--|
| DNS | Acide 3,5-dinitrosalicylique |
| EAG | Equivalent d'Acide Gallique |
| GIP | Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide |
| GLP-1 | Glucagon-Like Peptide 1 |
| IC₅₀ | Inhibition Concentration at 50 % |
| Ms | Matière Sèche |
| PPARγ | Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ |

Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice sur l' α -amylase des écorces et des feuilles de trois espèces d'agrumes, « *Citrus limon* » « *Citrus sinensis* » et « *Citrus réticulata* » appartenant à la famille des *Rutacées*.

La première démarche dans cette étude, consistait en une extraction et une quantification des phénols totaux. Les teneurs en composés phénoliques totaux, dosés en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, varient entre 0,147 et 2,63 mg/g en équivalent acide gallique. Alors que les teneurs en flavonoïdes détectés en utilisant le chlorure d'aluminium varient entre 0,0043 et 1,23 mg/g en équivalents de la quercitine.

Tous les extraits ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis de l' α -amylase, avec des valeurs d'IC₅₀ qui varient entre 1,09 et 104,57 mg/ml dont la meilleure valeur a été enregistré pour l'espèce *Citrus limon* IC₅₀ : 1,09 g/l.

Mots clés : *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus réticulata*, Composés phénoliques, effet inhibiteur, α -amylase

Introduction

Introduction

A l'origine, la nature constituée essentiellement d'êtres végétaux servait d'alimentation aux animaux et aux Hommes peuplant la terre. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, l'Homme découvrit bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes, notamment le pouvoir de guérison. En effet cette faculté de guérison des plantes fut connue longtemps de nos ancêtres depuis, les temps reculés. Elle deviendra plus tard la médecine traditionnelle avec toutes les avancées notoires qu'on peut lui attribuer (**Bérubé-Gagnon, 2006**).

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (**Bérubé-Gagnon, 2006**). L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (**Ferrari, 2002**).

Les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde. En Algérie, 55,000 ha de superficie sont productives en 2011 dont 56 % se situent au centre du pays. (**Houaoura, 2013**). Sur un plan nutritionnel, comme beaucoup de fruits, ils apportent des composés de nature organique et minérale connus pour jouer un rôle biologique primordial. Les effets bénéfiques de la consommation d'agrumes sur la santé humaine étaient connus avant que les chercheurs ont commencé à percer la complexité de ces matrices alimentaires. Au cours de la dernière décennie, un grand nombre d'études ont été réalisées afin d'identifier les composés bioactifs présents dans les différentes parties des agrumes dans une tentative d'acquérir une compréhension plus profonde de la corrélation entre le régime alimentaire, les prestations de santé et un risque réduit de maladies (**Rock et Fardet, 2014**).

De nombreux travaux réalisés sur différentes espèces d'agrumes ont montré qu'elles contenaient en majorité des composés phénoliques ayant un fort potentiel antioxydant corroborant leurs usages traditionnels. Parmi toutes ces espèces l'orange « *Citrus sinensis* » et le citron « *Citrus limon* » sont populaire par leur richesse en vitamine C, des quantités considérables de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et de caroténoïdes sont identifiées. Des études épidémiologiques prouvent que la consommation

Introduction

d'agrumes et des produits à base d'agrumes peuvent protéger la santé contre différentes maladies (**Hama et Asloune, 2017**).

C'est dans ce contexte, que notre travail de mémoire s'inscrit, visant à extraire et quantifier les composés phénoliques des écorces et des feuilles de trois espèces d'agrumes locales (*Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*), et de tester leur pouvoir inhibiteur sur l' α – amylase. L'inhibition, prolonge l'hydrolyse des hydrates de carbone, réduisant ainsi le taux d'absorption du glucose afin d'éviter la montée de son taux plasmatique. Ce qui présentera une éventuelle source d'antidiabétiques naturels. Et dans le but d'enrichir la banque d'utilisation de ces espèces.

Ce présent document est présenté en deux parties, une théorique et l'autre pratique.

- On a commencé notre mémoire par un aperçu bibliographique.
- Deuxièmement, nous avons exposé les différents protocoles expérimentaux de préparation des extraits, du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes et de l'étude de l'effet inhibiteur des extraits d'agrumes sur l'activité enzymatique de l' α – amylase
- Troisièmement on a présenté les différents résultats ainsi que leurs discussions.
- Enfin, nous avons terminé avec une conclusion et quelques perspectives.

Aperçu
bibliographique

1. Les agrumes

Le nom Agrume est donné aux arbres appartenant à la famille des *Rutacées* et au genre botanique *Citrus*. Cette appellation d'origine italienne, désigne les fruits comestibles et par extension les arbres qui les portent. A cette catégorie d'arbre appartiennent les orangers, les mandariniers, les citronniers, les cédratiers et le pamplemoussier. (LOUSSERT, 1989). Les espèces des agrumes sont de 3 genres principaux du groupe citrinae dans la famille des Rutacées : *Citrus* (agrumes), *Forunella* et *Poncirus* (Hama et Asloune, 2017).

I.2. Bienfaits et Principes actifs des agrumes

Les Citrus contiennent des quantités élevées de composés qui ont des effets bénéfiques pour la sante, y compris les poly phénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les tocophérols (Ercan *et al.* 2011). Ils ont une valeur très importante dans la médecine traditionnelle et pour la fabrication des produits comestibles (Choi *et al.* 2007). Comme ils présentent plusieurs activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante et anticancéreuse (Del-rio *et al.*, 2004). La consommation d'agrumes frais ou de leurs jus semble être associée à une amélioration des profils lipidique sanguins, la survie chez les personnes âgées, moins de risque de cancers l'abaissement de la pression artérielle, ainsi que la réduction des risques d'accident vasculaire cérébral, la réduction les maladies cardiaques coronariennes et le traitement de l'obésité (Ramful *et al.*, 2011).

Les fruits d'agrumes ont également des propriétés anti-allergique qui sont dues a leurs richesse en quercitrine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, qui est un neurotransmetteur impliqué dans les réactions allergiques et inflammatoire (Gonzalez Molina *et al.*, 2010).

I.3. Le diabète

I.3.1. Définition

Le diabète est défini comme une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie (Taux de sucre dans le sang trop élevé) liée à une déficience, soit de la sécrétion, soit de l'action de l'insuline, ou des deux. L'insuline est une hormone produite

Chapitre I Aperçu bibliographique

par le pancréas, indispensable à la pénétration du glucose dans les cellules. Lorsqu'elle fait défaut, le taux de sucre augmente dans le sang, or l'organisme est très sensible à ces variations : la chronicité de l'hyperglycémie est responsable de complications à long terme touchant de nombreux organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (**Buyschaert et al. 1998 ; Racciah, 2004**).

I.3.2. Classification

On peut distinguer plusieurs types de diabètes dont les principaux sont les suivants :

➤ **Le diabète insulino-dépendant DID :**

Concerne le plus souvent les enfants, mais il peut survenir à tout âge. Les cellules qui sécrètent l'insuline sont détruites jusqu'à 90% de leur quantité normale (causes auto-immunes ou idiopathiques. Il est lié à un déficit en insuline (**Racciah, 2004; Calop et al, 2008**).

➤ **Le diabète non insulino-dépendant DNID :**

Ce type de diabète débute généralement après l'âge de 40 ans et représente 90% de l'ensemble des cas mondiaux. (**Buyschaert et al, 1998 ; Racciah, 2004**). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline. L'insuline est soit basse ou soit élevée (insulinorésistance prédominante ou insulinopénie prédominante) (**Calop et al, 2008 ; Racciah, 2004 ; Kebieche, 2009**).

I.3.3. Traitement

Le diabète reste à ce jour une maladie incurable. Les objectifs du traitement sont de maintenir l'équilibre glycémique, de stabiliser l'évolution de la maladie, de prévenir les hypoglycémies et l'acéto-acidose, de prévenir les complications et de lutter contre les facteurs de risque cardiovasculaire associés.

a. Contrôle alimentaire (régime)

Chez le patient présentant un diabète de type I, le principal objectif du régime est d'apporter des calories pour la croissance et l'exercice et de s'assurer d'une régularité de l'apport quotidien alimentaire de façon à ce que l'insuline soit disponible en coordination avec l'apport en carbohydrate. Dans le diabète de type II, le régime est destiné, via une

restriction calorique, à permettre au patient d'atteindre son poids idéal(**Little et Rhodus, 2007**).

b. Activité physique

La pratique sportive entraîne une consommation supplémentaire de glucose par les muscles en travail ; dès que le glucose circulant est consommé, le foie produit une quantité équivalente de glucose pour éviter l'hypoglycémie. La production d'insuline diminue ; de plus, les muscles en travail sont plus « sensibles » à l'action de l'insuline. Ainsi, la glycémie reste quasiment constante, même pendant un exercice important (**Beckers, 2016**).

c. Traitement à l'insuline

L'insuline est prescrite uniquement pour le traitement du DT1, l'insuline reste le moyen le plus efficace, et le plus disponible à fin d'obtenir une glycémie normale bien régulée. Le rôle de l'insuline administrée au malade d'une façon strictement contrôlée, consiste à remplacer l'insuline propre à l'organisme, les principaux effets attendus sur l'homéostasie du métabolisme sont ; une stimulation de l'utilisation périphérique du glucose et l'activation de la glycogénèse, de la glycolyse, de la lipogénèse et de la synthèse protéique. De plus l'insuline tente aussi à inhiber la gluconéogenèse et la lipolyse (**Zerriouh, 2015**).

d. Traitement médicamenteux aux agents hypoglycémiantes oraux

Les agents hypoglycémiantes (ADOs) sont destinés à réduire le niveau de glucose sérique en présence du diabète de type II. Ils ne sont pas indiqués dans le diabète de type I ou dans le diabète de type II chez la femme enceinte ou chez le patient présentant une affection aiguë ou rénale (**Little et Rhodus, 2007**). Ces médicaments sont classés par leur mode d'action :

- 1) augmenter la sécrétion d'insuline avec les sulfonylurées ou les glitinides;
- 2) augmenter la sensibilité à l'insuline avec un biguanide ou une thiazolidinedione (glitazone);
- 3) modifier l'absorption intestinale d'hydrates de carbone par un inhibiteur de l'alpha-glucosidase;
- 4) associer ces médicaments ou utiliser de nouveaux agents thérapeutiques tels que les analogues de la *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) ou les inhibiteurs de la dipeptidase de

Chapitre I Aperçu bibliographique

classe 4 qui dégrade normalement le (GLP-1; 5) Administrer de l'insuline exogène (**Littele et Rhodus, 2007**).

Tableau I.1. Classement des antidiabétiques oraux.

| Classe | Type | Mode d'action |
|---|--|---|
| Médicaments qui augmentent la sécrétion de l'insuline | Les sulfonylurées ou sulfamides hypoglycémiantes (SH) (Andreelli et al., 2011). | stimulation de l'insulino sécrétion par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, par fermeture des canaux potassiques, indépendamment du niveau de la glycémie (Scheen, 2015). |
| | Les glinides (ou les glitinides) | Ce sont des hypoglycémiantes, de très courte durée d'action. Ils agissent sur le même récepteur au niveau d'un site différent. Ils se fixent avec une très grande affinité et se détachent très rapidement de leur liaison. (Ducobu, 2003). |
| Médicaments qui augmentent la sensibilité à l'insuline | Les biguanides | réduction de la production hépatique du glucose, en augmentant la sensibilité des cellules musculaires à l'insuline et en retardant l'absorption intestinale du glucose. (Pillon et al., 2014). |
| | Les thiazolidinediones (TZD) ou glitazones | Ces molécules se lient à des récepteurs nucléaires de type PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) principalement exprimés dans le tissu adipeux, et expriment leurs effets métaboliques par leur intermédiaire (Girard, 2001). |

| | | |
|---|---|---|
| <p>Médicaments qui modifient l'absorption intestinale du glucose</p> | <p>Inhibiteurs de l'α-amylase et l'α-glucosidase</p> | <p>Ces inhibiteurs bloquent l'action de ces enzymes par inhibition compétitive, ralentissant ainsi la digestion et l'absorption des polysaccharides. Il existe deux produits : l'acarbose et le miglitol (Benmohammed, 2015).</p> |
| <p>Les médicaments à effet incertain</p> | <p>Les incrétines : GLP-1 (peptide-1 ressemblant au glucagon) et le GIP (polypeptide insulino-trope dépendant du glucose)</p> | <p>Ralentissement de la vidange gastrique, permet de stimuler les cellules β du pancréas (sécrétion d'insuline) et de diminuer la réponse des cellules α du pancréas (sécrétion de glucagon) (Swanston et al., 1990). Il résulte de cet effet combiné une suppression de l'hyperglycémie par un captage accru du glucose dans les tissus ainsi qu'une augmentation des réserves de glucose dans le foie, et ce, sans risque d'hypoglycémie (Selihiet al., 2015).</p> |

I.4. Inhibition de l' α -amylase

L' α -amylase, est une enzyme glycolytiques sécréter par la glande pancréatique à travers le suc pancréatique dans l'intestin, c'est l'enzyme clé qui catalyse la première étape du processus digestif des hydrates de carbone (glucides).

D'où, les inhibiteurs de l'hydrolyse des hydrates de carbone par l' α -amylase dans le tractus digestif retardent leur digestion et prolongent son temps, causant une réduction dans le taux d'absorption du glucose, et par conséquent diminution des niveaux de glucose plasmatique et abaissement de l'hyperglycémie. (**Raj bhandari et al ., 2008**).

Partie expérimentale

II.1. Matériel végétal

Notre travail a été réalisé sur l'un des fruits les plus consommés dans le monde et également une ressource végétale algérienne très admirable : trois espèces d'agrumes, à savoir : *Citrus limon* (Citron), *Citrus reticulata* (Mandarine) et *Citrus sinensis* (Orange) (tableau I.1).

Pour chaque espèce deux échantillons (fruits et feuilles) ont été récoltés de trois régions différentes, à Laghouat (Chtait), Chef-lieu de la wilaya de Laghouat, à Baba Hassen wilaya d'Alger et à Ghardaïa respectivement durant le mois de Janvier 2018. Dans des endroits propres et loin de toute influence de pollution.

II. 2. Prétraitement des échantillons

Après la récolte, les feuilles et les écorces des fruits de chaque espèce ont été séchées à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans un endroit sec et bien aéré. Une fois séchées, les échantillons ont été broyés et tamisés en vue d'obtenir la même granulométrie, et utilisés pour l'extraction.

II.3. Préparation des extraits

Une quantité de 1 g de chaque poudre précédemment obtenue est macérée dans de l'hexane jusqu'à épuisement à température ambiante et à l'obscurité dans un but de dépigmentation et de délipidation. Ensuite, l'extrait est filtré puis le résidu est repris pour une série de macération dans des solvants à polarité croissante à savoir : dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et méthanol successivement pendant 72 h à température ambiante et à l'obscurité. Ce qui nous a donc permis d'obtenir six extraits organiques bruts.

L'extrait brut est évaporé à l'étuve à 45°C, les extraits ainsi obtenus présentent des aspects visqueux et poudreux selon l'échantillon, de couleur verte et jaune. Les résidus secs sont repris dans 10 ml de méthanol conservée au réfrigérateur jusqu'à leur analyse.

Tableau I.1. Description des trois espèces d'agrumes choisis pour l'étude.

| Systématique | Description botanique |
|---|--|
| <i>Citrus limon</i> (Le citron) | |
| <p>Règne : Végétale Embranchement : Angiospermes Classe : Eudicotes Sous classe : Archichlomydeae Ordre : Geniales (Rutales) Famille : Rutaceae Sous famille : Aurantoideae Tribu : Citreae Sous tribu : Citrineae Genre : Citrus Espèce : <i>citrus limon</i> ADJDIR et BENSNOUSSI,2009).</p> | <p>Le citronnier arbre rustique, à feuilles persistantes, oblongues lancéolées. Les fleurs sont plus grandes que celles de <i>Citrus sinensis</i> à pétales blancs à l'intérieur et pourpre à l'extérieur. Fruits ovoïdes de 5 à 10 cm de long, terminés par un mamelon proéminent.</p> <p>L'écorce extérieure est mince et teinté d'un jaune clair très pâle. Zeste amer et aromatique, le pulpe a une saveur acide et agréable (Millet, 2014).</p> |
| <i>Citrus reticulata</i> (La mandarine) | |
| <p>Règne : végétale Embranchement : angiosperme Ordre : géraniales Famille : rutaceae Genre : citrus Espèce : <i>citrus reticulata blanco</i> (Barrett et rhodes1976).</p> | <p>Le mandarinier est un petit arbre de 3 à 5 m de hauteur. Les feuilles sont persistantes, lancéolées, ovales lancéolées à elliptiques lancéolées, d'un vert foncé brillant et pétiole</p> <p>étroitement ailé. Les fleurs sont blanches.</p> <p>Le fruit est aplati ou piriforme, écorce jaune, orange ou rouge orangé riche en glandes huileuses, lisses, rugueuses; croûte mince ou épaisse.</p> <p>Graines habituellement ovoïdes, lisses, base arrondie, apex étroit et aigu; de nombreux embryons, rarement solitaires, cotylédons verts (Lim., 2012).</p> |
| | |

| <i>Citrus sinensis</i> (L'orange) | |
|--|--|
| Règne : <i>Plantae</i> Sous règne : <i>Tracheobionta</i> Division : <i>Magnoliophyta</i> Classe : <i>Magnoliopsida</i> Ordre : <i>Sapindales</i> Famille : <i>Rutacées</i> Sous famille : <i>Aurantoideae</i> Tribu : <i>Citreae</i> Sous-tribu : <i>Citrinae</i> Genre: <i>Citrus</i> espece: <i>Citrus sinensis</i> (Anonyme,1968). . | L'oranger est un arbre environ de 6 à 13 m de haut à feuilles persistantes, racines peu profondes et des branches principalement épineuses. Les feuilles sont lisses et ovales d'un vert foncé au-dessus, brillant, avec une odeur caractéristique souvent similaire aux fruits, à pétiole articulé peu ailé .Fleur cireuse d'un blanc verdâtre, parfumée. Fruits moyen, globuleux, peau lisse, orange claire à rouge foncé (Dugo et Di Giacomo, 2004). |

II. 4. Quantification des composés phénoliques

II.4.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode adaptée de (**Singleton et Ross**., **1965**). Avec le réactif de Folin-Ciocalteu commercial. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PM_{12}O_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène(Mo_8O_{23}) (**Giner-Chavez, 1996**).

Pour réaliser le dosage, 100 μ l de chaque extrait dilué à différentes concentrations sont mélangés à 500 μ l du réactif de folin-Ciocalteu. Après deux minutes d'incubation, 2 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 sont ajouté. Les tubes sont ensuite agités et placés à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type Biochrom Libra S6, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance sont proportionnelles à la quantité de polyphénols présente dans nos extraits. Et les résultats sont présenté en **mg** équivalent **d'acide gallique/g** de matière sèche.

II.4.2. Dosages des flavonoïdes

Les teneurs des flavonoïdes ont été mesurés par une méthode adaptée de (**Lamaison et Carnat 1991**) en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) comme réactif.

Pour réaliser le dosage, 500 μl de chaque solution diluée a été mélangés à 500 μl d' AlCl_3 puis incubé à la température ambiante pendant 20 minutes. La lecture de l'absorbance de chaque solution préparée a été mesurée dans le même spectrophotomètre à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues sont proportionnelles à la quantité de flavonoïdes présente dans nos extraits. Et les résultats sont présentés en mg équivalent quercétine /g de matière sèche.

II.5. Evaluation de l'activité inhibitrice

Dans la présente étude, on s'intéresse à l'évaluation de l'effet d'extraits de feuilles et d'écorce d'agrumes sur l'activité enzymatique de l' α – amylase d'un champignon *Aspergillus oryzae*.

Dans le cas de cette enzyme la mesure de l'activité enzymatique revient à un dosage spectrophotométrie du produit libéré par unité de temps lors de l'hydrolyse du substrat, dans des conditions de température et de pH favorables.

II.5. 1. Principe de la méthode de dosage par le DNS

L'activité enzymatique de l' α – amylase est dosée sur son substrat l'amidon (mélange de 2 homopolymères, l'amylose et l'amylopectine composés d'unités de molécules de D- Glucose). Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement.

La méthode est basée sur le dinitrosalicylique (DNS, phénol cristallin, sulfite de sodium, hydroxyde de sodium et double tartarate) qui stoppe la réaction enzymatique par un changement de pH et forme un complexe avec le glucose.

Cette méthode teste la présence d'un groupe carbonyle libre ($\text{C} = \text{O}$) des sucres dits réducteurs. Ceci implique l'oxydation du groupe fonctionnel présent dans le glucose, Simultanément, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est réduit à l'acide 5-nitrosalicylique 3-amino dans des conditions alcalines (**Miller ,1956**).

Chaque molécule de maltose (une liaison hydrolysée) libérée dans le milieu réactionnel, réagit avec le DNS en excès de couleur orange entraînant une réduction de ce dernier, induisant en

parallèle un changement de couleur en rouge brique dont l'intensité est mesurée après dilution à 530 nm.

II.5.2. Test d'inhibition

Avant de procéder à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits vis-à-vis de l' α - amylase, nous les avons soumis des tests d'inhibition question de juger leur potentiel inhibiteur envers l' α - amylase, c'est-à-dire l'étude de leur comportement sur l'activité enzymatique (augmentation ou diminution) et quel pourcentage d'inhibition ils pouvaient atteindre.

Dans des tubes à essai les milieux réactionnels contenaient 200 μ l du tampon phosphate, 100 μ l d'amidon, 100 μ l de chaque extrait phénolique dilué à la même concentration dans du tampon phosphate salé (pH 7) on a fait une incubation pendant 5 min, et au temps zéro 100 μ l d' α - amylase débute la réaction pour une incubation pendant une durée de 5 min à 37 °C. La réaction enzymatique est stoppée par l'ajout du DNS, le milieu réactionnel est ensuite porté à ébullition à 100 °C pendant 5 min, après refroidissement le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau distillée. Les absorbances sont ensuite mesurées à 530 nm avec le même spectrophotomètre.

Un contrôle a été préparé de la même façon sans inhibiteur.

Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon du test}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

A_{control} : Absorbance du milieu réactionnel sans extrait.

$A_{\text{échantillon du test}}$: Absorbance du milieu réactionnel en présence de l'extrait.

II.5.3. Étude du pouvoir anti-amylasique

L'activité inhibitrice confirmée par le test précédant, nous a encouragés de procéder à l'étude de l'activité anti - amylasique en vue de déterminer pour chaque extrait le paramètre IC_{50} .

Pour cela, nous avons varié la concentration en extraits. L'activité inhibitrice des extraits est mesurée comme décrit précédemment en introduisant 100 μ l des différentes concentrations variables d'extraits.

La représentation graphique de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous a permis de déterminer les valeurs d' IC_{50} pour chaque extrait.

Résultat et discussion

III.1. Préparation des extraits

Chaque partie choisie pour l'extraction des trois espèces d'agrumes étudiées a subi rigoureusement le même traitement de séchage et d'extraction. Les teneurs des extraits, leurs couleurs et leurs aspects sont consignés dans le **Tableau.III.1**.

Au regard du **tableau III.1**, on remarque que les extraits ont montré un aspect visqueux excepté ceux de l'Hexane et du dichlorométhane qui sont poudreux, de différentes couleurs variant du vert au jaune.

Les teneurs de l'extraction, ont varié entre 1.2. et 4.9 % pour les feuilles et entre 1.5 et 5.6 % pour les écorces.

La plus part de nos extraits n'ont pas atteint 6% de teneurs. Ces faibles teneurs sont peut être les résultats d'une influence de plusieurs paramètres qui sont : la partie de la plante utilisée comme matériau de départ, le solvant utilisé pour l'extraction, la procédure d'extraction. Aussi la différence de granulométrie ne permet pas le même contact du solvant avec la poudre végétal. (**Tiwari et al., 2011**).

Nous avons remarqué que les valeurs des teneurs sont très proches les une des autres ceci peut être expliqué par le fait que ces espèces appartiennent à la même famille des *Rutaceae* qui sont connues par leur richesse en composés phénoliques. . (**agostini et al., 2008**).

Nous avons constaté en majorité que les extraits de *Citrus reticulata* ont présenté de meilleurs teneurs par rapport aux autres extraits cette différence est probablement due à la période de récolte, qui influe directement sur la composition biochimique de la plante, ainsi à la nature des plantes. Cependant, comme dans le cas des autres catégories de métabolites secondaires, le niveau de ces composés peut être fortement influencé par beaucoup de facteurs intrinsèques et externes. Les facteurs intrinsèques reflètent l'état physiologique de la plante, qui dépend principalement de stade de croissance et de développement. Les facteurs externes comprennent les effets de l'environnement, à la fois abiotiques et biotiques (la température, la fertilité des sols, la disponibilité de l'eau et de la lumière). De plus les plantes sont confrontées aux conséquences des insectes phytophages ou d'autres animaux herbivores, à la concurrence avec les plantes voisines, et les

interactions avec des agents pathogènes et parasites (bactéries, champignons, virus et nématodes) (Szakiel *et al.*, 2011)

Tableau III.1. Teneurs, aspects et couleurs des extraits bruts des six échantillons investigués.

| Extrait | espèce | Partie utilisée | Couleur | Teneur (%) | Aspects |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|----------|
| Dichloromethane | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | Vert très foncé | R= 1,7 | Poudre |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Vert très foncé | R= 1,5 | Poudre |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Vert très foncé | R= 1,2 | Poudre |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | Jaune claire | R= 1,6 | Poudre |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Jaune claire | R= 2 | Poudre |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Jaune claire | R= 1,5 | Poudre |
| Acétate d'éthyle | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | Vert foncé | R= 2,3 | Visqueux |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Vert | R= 3,2 | Visqueux |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Vert foncé | R= 1,8 | Visqueux |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | Vert claire | R= 3,1 | Visqueux |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Jaune claire | R= 5,6 | Visqueux |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Jaune foncé | R= 4,6 | Visqueux |
| Ethanol | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | Vert foncé | R= 2,3 | Visqueux |

| | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------|------------|----------|
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Vert | R= 3,2 | Visqueux |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Vert foncé | R= 1,8 | Visqueux |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | Vert claire | R= 3,1 | Visqueux |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Jaune claire | R= 5,6 | Visqueux |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Jaune foncé | R= 4,6 | Visqueux |
| | Methanol | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | Vert foncé | R= 4,4 |
| <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | Jaune foncé | | R= 4,9 | Visqueux |
| <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | Vert claire | | R= 3 | Visqueux |
| <i>Citrus limon</i> (Citron) | | Ecorce | Jaune claire | R= 5,3 | Visqueux |
| <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | | Vert claire | R= 5,1 | Visqueux |
| <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | | Vert claire | R= 5,3 | Visqueux |

Si on compare les teneurs entre les différents solvants utilisés pour l'extraction dans cette étude, on remarque pour chaque espèce que les teneurs enregistrés pour les extraits polaires sont supérieures à celles enregistrée pour les extraits apolaires. Ceci est peut être attribuée à la richesse de nos échantillons en composés polaire qui ce sont extrait plus dans les solvants polaires.

III.2. Dosage des composés phénoliques.

Avant toute tentative d'étude d'activité biologique, nous avons effectué un dosage des phénols totaux sur les différents extraits préparés à partir de six échantillons d'agrume.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique précédemment réalisée en utilisant le réactif Folin – Ciocalteu et exprimée en milligrammes équivalents en acide gallique par gramme de la matière sèche. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III.2, tandis que, la quantification en flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée en suivant le même protocole décrit lors de la préparation de la courbe d'étalonnage de la quercétine par complexation au trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus exprimés en milligrammes équivalents de la quercétine par gramme de la matière sèche sont regroupés aussi dans le **tableau.III.2.**

D'après la synthèse des résultats obtenus pour la quantification des composés phénoliques, nous avons constaté que les teneurs en phénols totaux ont varié entre 0.24 et 2.63 mg EAG/g MS pour les feuilles et entre 0.18. et 1.93 mg EAG/ g MS pour les écorces.

Les résultats révèlent que les extraits alcooliques sont les plus riches en composés phénoliques dont la meilleure valeur est enregistrée pour l'extrait méthanolique des feuilles de *Citrus limon*. Ceci peut être expliqué du fait que la méthode de dosage sert est très sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles mais non seulement ceux des composés phénoliques de ce fait la méthode est malheureusement **peu spécifique** car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer avec d'autres composés que les polyphénols. Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait (**Khacheba et al., 2014**). De plus un solvant d'extraction polaire emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (**Macheix et al, 2005**).

Les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle ont dévoilé presque les mêmes teneurs avec une légère augmentation chez les extraits acétate d'éthyle cette augmentation peut être due au fait que ce dernier a extrait d'autres composés phénoliques un peu plus polaire qui n'ont pas été extraits dans le dichlorométhane.

Tableau III.2. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des six échantillons investiguées.

| Extrait | Espèce | Partie utilisée | Teneur en phénols totaux : mg / g MS | Teneur en flavonoïdes mg / g MS |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|---|------------------------------------|
| Dichloromethane | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 0,24 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 0,33 ± 0,03 | 0,13 ± 0,00 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 0,30 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 0,15 ± 0,04 | 0,05 ± 0,00 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 0,37 ± 0,11 | 0,05 ± 0,00 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 0,18 ± 0,01 | 0,09 ± 0,00 |
| Acétate d'éthyle | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 0,447 ± 0,00 | 0,29 ± 0,02 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 0,630 ± 0,01 | 0,30 ± 0,12 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 0,947 ± 0,04 | 0,39 ± 0,14 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 1,23 ± 0,01 | 0,45 ± 0,07 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 1,84 ± 0,02 | 0,44 ± 0,09 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 1,64 ± 0,03 | 0,50 ± 0,01 |
| Ethanol | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 2,63 ± 0,00 | 1,23 ± 0,18 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 0,90 ± 0,00 | 0,71 ± 0,04 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 0,77 ± 0,00 | 0,56 ± 0,00 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 1,57 ± 0,02 | 1,09 ± 0,04 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 1,62 ± 0,00 | 0,72 ± 0,01 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 1,93 ± 0,03 | 0,82 ± 0,00 |
| Méthanol | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 2,51 ± 0,01 | 0,78 ± 0,38 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 1,52 ± 0,04 | 0,27 ± 0,01 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 1,24 ± 0,06 | 0,23 ± 0,02 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 1,80 ± 0,01 | 0,37 ± 0,03 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 1,17 ± 0,01 | 0,25 ± 0,05 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 1,27 ± 0,02 | 0,22 ± 0,04 |

Nous également remarqué que la majorité des extraits des feuilles ont présenté des teneurs élevés en composés phénoliques ces taux élevés peuvent être expliqué par la richesse et la diversité des feuilles en composés phénolique; dans la mesure où ils sont au

contact aux conditions environnementales durant toute l'année comparativement aux écorces des fruits qui apparaissent uniquement à maturité.

L'échantillon des écorces et des feuilles de *Citrus limon* ont enregistré les teneurs les plus élevée en phénols totaux dans les solvants alcooliques : **2.63**. Et **1.93** mg EAG / g de MS pour les extraits éthanol des feuilles et des écorces respectivement, et **2,51** et **1.80** mg EAG / g de MS pour les extraits méthanol des feuilles et des écorces respectivement. Tandis que pour les extrait dichlorométhane et acétate d'éthyle les teneurs les plus élevé sont enregistré pour les espèces *Citrus reticulata* et *Citrus reticulata* ceci est sûrement en raison des conditions de développement de l'échantillon. En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Sampaio et al., 2011**).

Si on compare les valeurs de ces teneurs en composés phénoliques à celles des teneurs des extraits brut, on remarque qu'elles sont toutes inférieures à ces dernières, ce qui indique que les extraits bruts obtenus contiennent d'autres composés polaires à part les phénols tel que : les protéines, les sucre simple (glucose), les glycoprotéines.

Et pour le dosage des flavonoïdes, les teneurs ont varié entre **0.13** et **1.23** mg EQ/g MS pour les feuilles et entre **0.05** et **1.09** mg EQ/g MS pour les écorces.

La même remarque a été constatée pour le dosage des flavonoïdes, les teneurs les plus élevée ont été enregistré chez les extraits polaires. Cependant les teneurs pour les dichlorométhane et acétate d'éthyle presque les mêmes, avec une teneur un peu plus élevé notée dans les extraits acétate d'éthyle.

Nous avons constaté que les extraits de l'espèce *Citrus limon* a enregistré des teneurs en flavonoïdes les plus élevés pour les extraits alcoolique et la plus faible pour les extrait dichlorométhane et acétate d'éthyle trois type d'extraction, tandis que l'espèce *Citrus sinensis* a montré l'inverse. Ceci dépend éventuellement de l'espèce étudiée ainsi que les conditions climatiques de croissance de cette dernière. (**Tiwari et al, 2011**). Effectivement les flavonoïdes sont un autre groupe de composés phénoliques dont les niveaux dans les tissus végétaux sont influencés par des facteurs environnementaux (**Sampaio et al., 2011**).

Si on compare les teneurs en flavonoïdes à celles des teneurs en composés phénoliques pour les trois extraits, on remarque qu'elles sont toutes inférieures à ces dernières, ce qui indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (Acide phénoliques, tanins, silènes...).

De plus nous remarquons que les teneurs en phénols et en flavonoïdes sont très proches ce qui peut être expliqué par le fait que presque tous les phénols extraits sont des flavonoïdes.

Dans l'étude réalisée par **Khacheba et al., 2014**, avec la même procédure d'extraction suivie dans notre étude, a montré une différence de teneurs en composés phénoliques, la teneur la plus élevée est de 11,50 mg/g EAG, alors que la teneur la plus élevée dans nos extraits est de 2,63 mg/g EAG dans l'échantillon éthanol de l'espèce de *Citrus limon*, cette différence est probablement liée à la pauvreté de nos échantillons en polyphénols, ou les conditions biotiques où nos espèces ont poussé qui ont été favorables ne stimulant pas de la biosynthèse de ces métabolites (**Khacheba et al., 2014**).

Une étude réalisée sur les deux espèces *Citrus limon* et *Citrus sinensis* a montré des valeurs allant de 0,1 à 0,45 mg/g presque proches de ceux enregistrés dans notre étude (**Mohammadian et al., 2011**). Une autre étude de **Sultana et al., 2014** réalisée sur les feuilles de l'espèce *Citrus limon* a montré une valeur de 0,2 mg/g (**Sultana et al., 2014**). D'autre part une étude de Wang et ses collaborateurs sur l'espèce *Citrus reticulata* a enregistré des valeurs variant de 11 à 21 mg/g, cette différence peut être expliquée par les conditions environnementales de croissance de l'espèce qui influent fortement sur leurs teneurs en composé phénolique (**Wang et al., 2017**).

III.3. Etude de l'effet d'inhibition sur l' α -amylase

Dans le but de trouver un inhibiteur naturel de l' α -amylase, nous avons procédé à une étude des effets de nos extraits organiques sur l'activité de l'enzyme en question ainsi que leur comportement sur l'activité enzymatique (augmentation ou diminution). Les mesures ont été effectuées avec l'amidon comme substrat.

Pour cela, dans les mêmes conditions réactionnelles, nous avons varié la concentration en inhibiteurs et nous avons introduit 100 μ l des différentes concentrations.

Les représentations graphiques de la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en extraits, nous ont permis de déterminer les valeurs d'IC₅₀ pour chaque extrait que nous avons regroupés dans le **tableau III.3**.

Tableau III.3. Valeurs des IC₅₀ des extraits étudiés vis - à vis de l' α - amylasee.

| Extrait | Espèce | Partie utilisée | IC ₅₀ (mg/ml) |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Dichloromethane | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 104.57±0.82 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 3.35±0.17 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 1.91±0.20 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 1.09±0.00 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 1.59±0.13 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 25.59±0.67 |
| Acétate d'éthyle | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 6.51±0.47 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 10.39±0.03 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 15.45±0.60 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 27.27±5.79 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 42.82±2.87 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 22.54±1.48 |
| Ethanol | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 24.10±2.72 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 6.08±0.02 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 1.32±0.12 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 11.47±0.09 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 2.48±0.05 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 6.08±0.02 |
| Methanol | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Feuilles | 31.95±2.98 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 30.78±0.09 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 17.65±3.86 |
| | <i>Citrus limon</i> (Citron) | Ecorce | 27.92±9.72 |
| | <i>Citrus reticulata</i> (Mandarine) | | 5.70±0.49 |
| | <i>Citrus sinensis</i> (Orange) | | 34.63±2.08 |

Le paramètre IC₅₀ représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle jusqu'à 50% de sa valeur maximale non - inhibée.

Les valeurs d'IC₅₀, ont variée globalement entre 1.09 et 104.57 mg/ml. Les extraits des feuilles ont enregistré de meilleurs IC₅₀ par rapport aux écorces ceci peut être expliqué par la richesse et la diversité des feuilles en molécules spécifiques qui sont responsable de l'inhibition ; dans la mesure où ils sont au contact aux conditions environnementales durant toute l'année comparativement aux écorces des fruits qui apparaissent uniquement à maturité.

Nous avons constaté un résultat très intéressant concernant les extraits dichlorométhane ces derniers ce sont montrés de bon inhibiteurs car ils ont enregistré les plus faibles valeurs d'IC₅₀ 1 mg/ml, ceci, peut être attribuée à la présence d'un groupe de molécules dont la structure peu polaire leur conférant une activité inhibitrice plus efficace que ceux polaires extraits aux solvants acétate d'éthyle et alcools.

L'espèce *Citrus reticulata* a enregistré de bonnes activités inhibitrices comparativement aux autres espèces. D'autre part l'espèce *Citrus limon* a enregistré la meilleure valeur d'IC₅₀ : 1.09 g/l. de plus il est clair que la majorité des d'IC₅₀ des extraits diffèrent d'une espèce à une autre. Cette constatation peut être expliquée par le fait que la composition en composés actifs et leurs structures chimiques dans nos extraits varient avec la région, ce qui mène à différents contacts avec le site actif de chaque enzyme, ce qui prouve que la composition et la structure jouent un rôle important dans l'inhibition.

On comparant nos résultats à l'étude de **Khacheba et al, 2014** sur l'évaluation de la capacité d'extraits phénoliques d'une plante spontanée locale d'inhiber l' α -amylase a révélé que tous les extraits phénoliques ont une activité inhibitrice similaire. Ces résultats informent que cette activité dépend fortement de deux facteurs importants : Le solvant d'extraction et la structure des principes actifs est responsable de cette activité.

D'autre étude réalisée sur la même espèce on a montré des activités proches de celle de notre étude à savoir *Citrus Lemon* par **Basli et al., 2016** : IC₅₀ : allant de 0,09 à 0,13 g/l ; écorce de *Citrus Lemon* et *Citrus sinensis* : IC₅₀ : 0,08.16 et 0,11 g/l respectivement (**Oboh et al., 2017**).

On peut dire que la variation en IC₅₀ est due à l'espèce étudiée, le mois de récolte, le mode de traitement et d'extraction de l'échantillon et du protocole de dosage utilisé pour leurs déterminations (**Salehi et al, 2013**). Ainsi notre résultat reste qu'une initiation à la

recherche à l'activité anti diabétique des agrumes algérienne dans un but de chercher des auxiliaires qui peuvent jouer un rôle dans la prévention du diabète.

Conclusion

Conclusion

Les agrumes (citron, orange, pamplemousse, mandarines...) constituent de bons apports en vitamine C et ils sont utiles entre autres pour renforcer le système immunitaire, pour la peau ou encore effectuent une prévention cardiovasculaire. De plus une série d'articles scientifiques semble plaider en faveur des rôles biologiques des agrumes de la famille des Rutacés (notamment du genre *Citrus* : citron, orange, pamplemousse...)

Dans ce contexte et pour enrichir les banques de données de référence sur les agrumes et leur bien fait, nous nous sommes intéressés à trois espèces d'agrumes locales : *Citrus limon* , *Citrus réticulata* , *Citrus sinensis* ; récoltés de trois régions différentes d'Algérie à savoir : (Laghouat, Alger et Ghardaïa).

Dans un premier temps, nous avons réalisé une extraction organique par solvants à polarité croissante (Dichlorométhane, Acétate d'éthyle, éthanol et Méthanol) pour les trois échantillons choisis. Dans un second lieu, nous avons procédé à la quantification des composés phénoliques par des méthodes spectrophotométriques. Le dosage des phénols totaux a été réalisé par la méthode de Folin – Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme étalon. Tandis que l'évaluation des composés flavonoïdiques par rapport à la quercitine a été effectuée par dosage complexométrique avec le trichlorure d'aluminium.

Les résultats montrent clairement que les teneurs en phénols totaux varient entre 0.24. et 2.63 mg / g et entre 0.18 Et 1.93 mg / g équivalent en acide gallique pour les extraits des feuilles et des écorces respectivement. L'analyse quantitative du contenu en flavonoïdes nous a confortés dans l'idée que ces plantes étaient en possession d'un matériel relativement riche en flavonoïdes. A partir des valeurs des quantités des flavonoïdes qui sont comprises entre 0.13 et 1.23 mg / g et entre .0.05. Et 1.09 équivalent en quercitine pour les extraits des feuilles et des écorces respectivement.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet inhibiteur des extraits organique des feuilles et des écorces des trois espèces d'agrumes sur l' α – amylase ; où Nous avons pu mettre en évidence *in vitro*, l'effet inhibiteur de ces espèces d'agrumes algériennes sur l' α - amylase. Les résultats obtenus à travers ce test montrent que la majorité de ces échantillons présentent des effets inhibiteurs importants. Les valeurs des constantes IC_{50} ainsi obtenues, indiquent qu'un régime à base de ces agrumes peut être suivi à des fins

Conclusion

pharmacothérapeutique, et notamment, l'espèce *Citrus limon* qui a présenté la plus faible valeur d'IC₅₀ avec une valeur de 1,09 mg/ml.

L'ensemble de ce travail a permis de mieux connaître l'intérêt des agrumes algérienne vis-à-vis de l'activité de l' α - amylase. En effet, il est souhaitable de compléter et d'approfondir le travail par une étude phytochimique plus développée (techniques chromatographiques et spectroscopiques) afin d'isoler et d'identifier les différents composés chimiques responsables de ces activités. De même, il est envisageable d'élargir le panel des tests d'inhibition, en utilisant d'autres substrats ou d'autres types d'enzymes.

Il serait aussi intéressant de faire des tests *in vivo* sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées et d'étudier l'effet synergique des extraits pour améliorer l'index thérapeutique.

Il reste encore d'autres fruits locaux utiles qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de déterminer leur potentialité dans le domaine étudié.

Ce travail a fourni un complément aux connaissances phytochimiques des agrumes algériennes et a permis de mettre en évidence encore une fois le rôle des polyphénols naturels dans la régulation et la normalisation des troubles glycémiques.

Reference bibliographique

Référence bibliographique

- . **ADJDIR ET BENSNOUSSI**.2009 Bilan d'une Agrumeraie, cas de la ferme pilote Moussadek Abdelkader (Remchi Wilaya de Tlemcen).Université Tlemcen
- . **Dugo G .& Di Giacomo A.** (2004). *Citrus : the Genus citrus*. 2 Ed Taylor and Francis
- . **Hama et Asloune**. 2017 Effet d'association d'extrait de pulpe d'orange et citron sur l'activité Antioxydante.Université Abderrahmane Mira de Bejaia
- . **Lim T.K.** (2012). *Edible Medicinal and non-medicinal plants: volume 5, Fruits*, Ed Springer Netherlands.955p
- . **LOUSSERT .** (1989) *Les agrumes arboriculture*. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris
- . **Millet F.** (2014). Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) Burm. f.
- . **ZERRIOUH,M.** 2015 Contribution à l'étude phytochimique et activité antidiabétique de *Hammada scoparia* (Pomel), « Remth ». Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen
- .**Anonyme(1968)**. -porte greffe des oranges
- Andreelli F, Jacquier D, Dierick-Gallet A, Amouyal C (2011)**. Pharmacogénétique des antidiabétiques. Médecine des maladies Métaboliques. Vol 5, No 5 :512-519.
- Barrett HC ;rhodes AM(1976)** a numerical taxonomi stady of affinité relationships in cultivated citruc and its close relative.systematic botany 1 :105 -136
- Beckers V (2016)**.Service Santé et Environnement de la Province de Liège. Département Médecine. Diabète et sport.
- Benmohammed A-K (2015)**.Traitement du diabète de type2. Diabétologie. Université Constantine - Faculté de médecine Module d'Endocrinologie.
- Bérubé-Gagnon, J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
- Bérubé-Gagnon, J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
- Ducobu J (2003)**. Les antidiabétiques oraux en 2003. Rev Med Brux. Vol 24, No 4: 361-368.
- Ferrari, J. (2002)**. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.

Référence bibliographique

Ferrari, J. (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.

Girard J (2001). Mécanisme d'action des Thiazolidinediones. *Diabetes Metab (Paris)* . Vol 27, No 2: 271-278.

Houaoura(2013)-Production des agrumes : Comment augmenté le rendement ?

Houaoura(2013)-Production des agrumes :Comment augmenté le rendement ?

Khacheba, I. 2014. Evaluation de l'activité antioxydante et étude du pouvoir d'inhibition sur l' α - amylase et l' α – glucosidase des extraits naturels de la plante *Genista*. *Thèse de doctorat L'École Normale Supérieure de Kouba-Alger*, pp 36

Little W J, Rhodus N L (2007). Pharmacologic management of type 2 diabetes: a review for dentistry. *Gen Dent*. Vol 55: 564–71. in 13ywdpLJ9iEA93BtCwez2w8zXFPWxoDota.

London. 642 p.

Macheix, J – J., Fleuriet, A., et Jay – Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechnique et universitaires romandes, p 121.

Mohammadian, M. A., Mobraimi, Z., Hasan Sajedi, R., 2011. Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23.

Phytothérapie , 12,2 : 89-97

Pillon F, Tan K, Jouty P, Frullani Y (2014). Le traitement médicamenteux du diabète de type2. *Actualités pharmaceutiques*. Vol 53, No 541: 23-28.

Rock, E., . Fardet, A. 2014. Les antioxydants des agrumes : action en solitaire ou matricielle?. [Phytothérapie](#). Volume 12, [Issue 2](#), pp 66–75.

Rock, E., Fardet, A. 2014. Les antioxydants des agrumes : action en solitaire ou matricielle?. *Phytothérapie*. Volume 12, Issue 2, pp 66–75.

Salehi, P., Asghari, B., Esmaceli, M. A., Dehghan, H., Ghazi, I., 2013. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *Journal of Medicinal Plants Research*, volume. 7(6), p 257-266.

Référence bibliographique

Sampaio, B. L., Bara, M. T. F., Ferri, P. H., Santos, S. d C., de Paula, J. R., 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. Revista Brasileira de Farmacognosia, volume 21, No 6.

Scheen A J (2015). Antidiabétiques oraux dans le traitement du diabète de type 2 : perspectives historique et médico-économique. Médecine des maladies métaboliques. Vol 9, No 2: 186- 197.

Selihi1 Z, Berrahol M, El Achhab Y, Nejjari C, Lyoussi B (2015). Phytothérapie et complications dégénératives du diabète de type 2 : quelle relation ? Médecine des maladies Métaboliques. Vol 9, No 8: 792-797.

Site : <http://www.annales.org/archives/cofrhigeo/boulaine-bio.pdf>

Sultana, B., Anwar, F., Mushtaq, M., Alim, M. 2015. Citrus residues: A potential source of phenolics with high antioxidant values International. Food Research Journal, 22(3): 1163-1168.

Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR (1990). Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. Diabetologia. Vol 33, No 8: 462-464.

Szakiel, A., Paczkowski, C., Henry, M., 2011. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants . Phytochem Rev. Volume 10, p 471 – 491.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. Internationale Pharmaceutica Scientia. Volume 1, p 98 - 106.

Wang , Y.,, Qian, J., Cao, J., Wang , D., Liu , C., Yang , R., Li, X., Sun , C. 2017. Antioxidant Capacity, Anticancer Ability and Flavonoids Composition of 35 Citrus (*Citrus reticulata* Blanco) Varieties. Molecules, , 22, 1114.

Annexe I

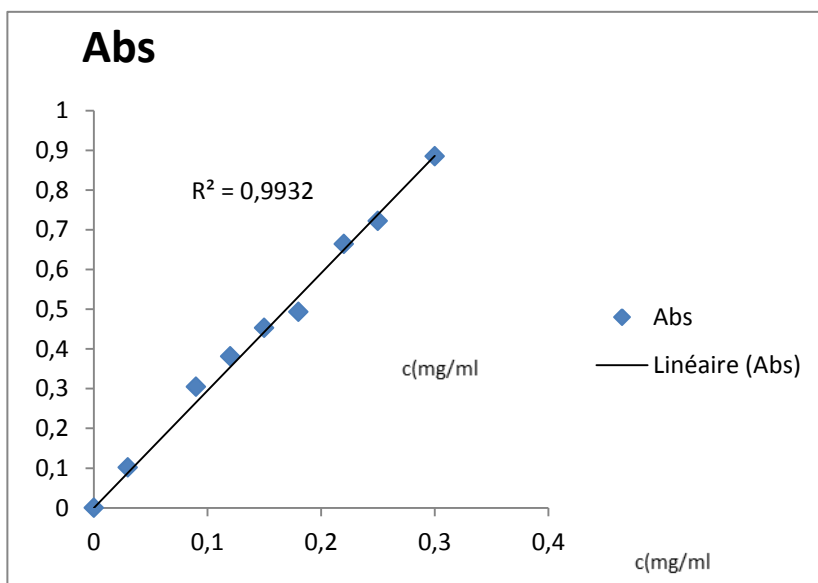


Figure 01 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique des polyphénols totaux.

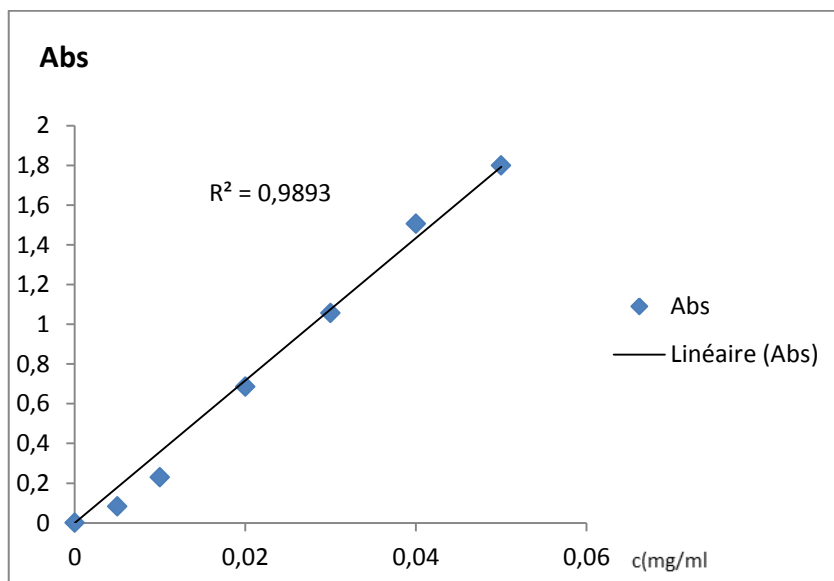
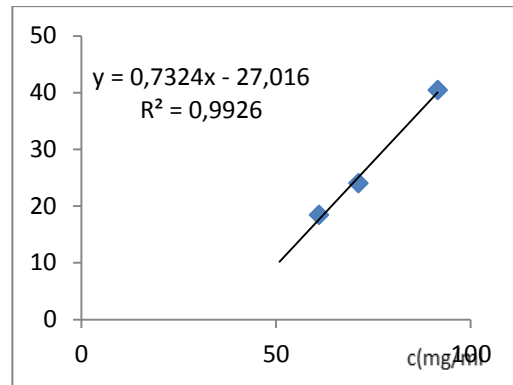
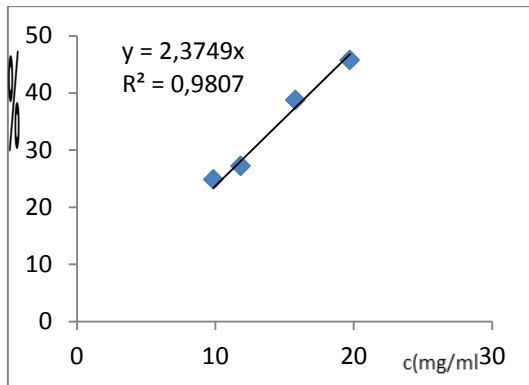


Figure 02 : Courbe d'étalonnage de la quercitrine des flavonoïdes

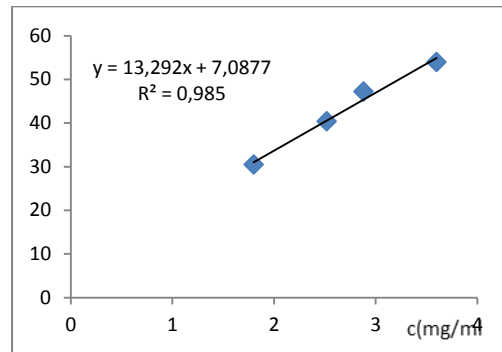
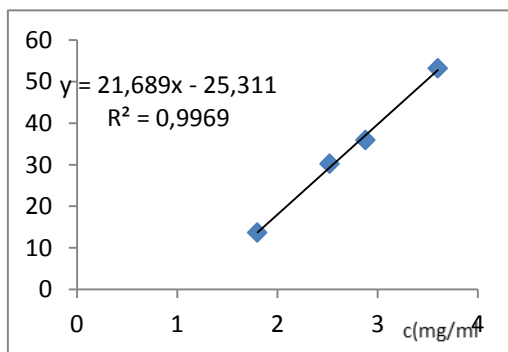
Annexe II

Les extraits de DCM

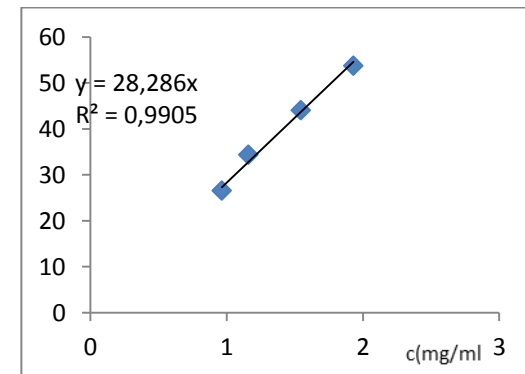
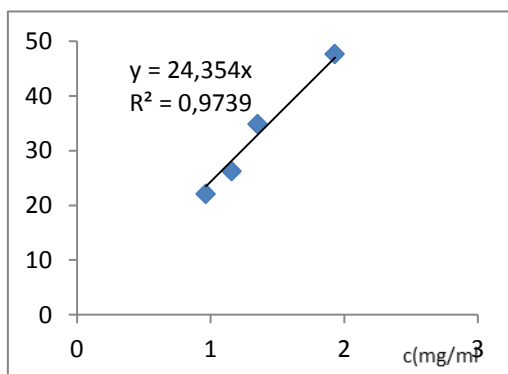
Feuilles de citron



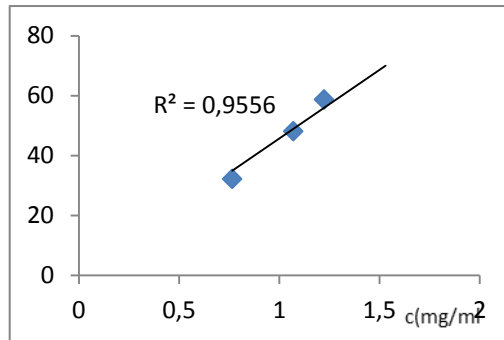
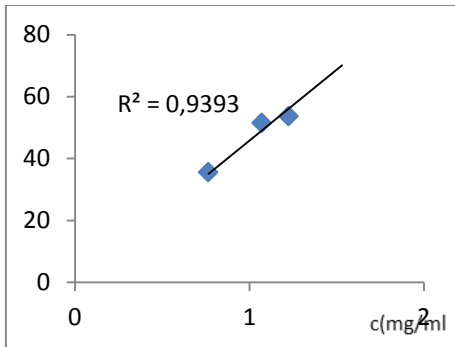
Feuilles de mandarine :



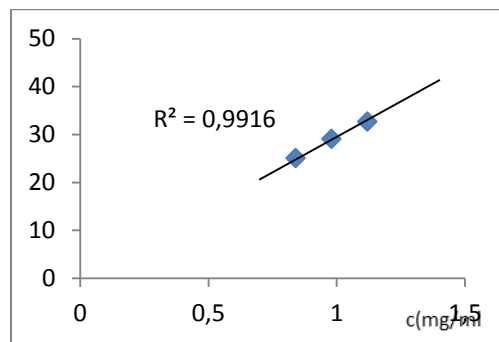
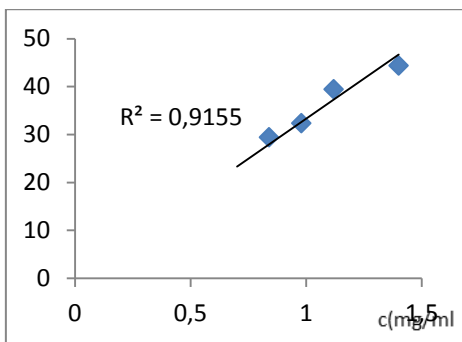
Feuilles d'orange :



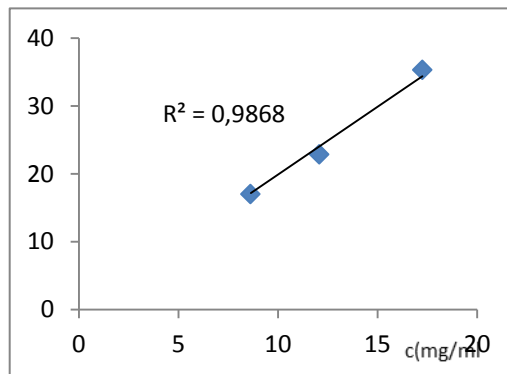
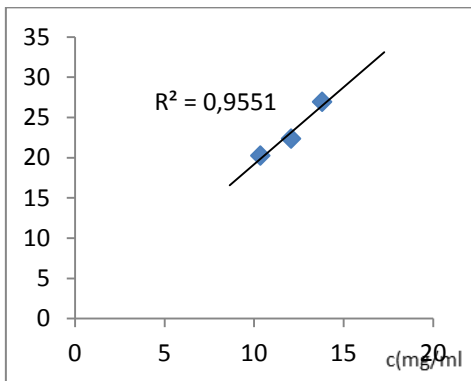
Ecorces de Citron



Ecorces de mandarine

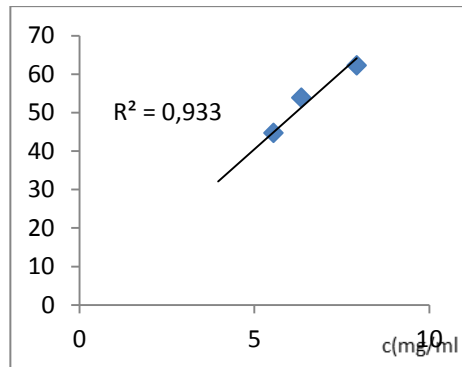
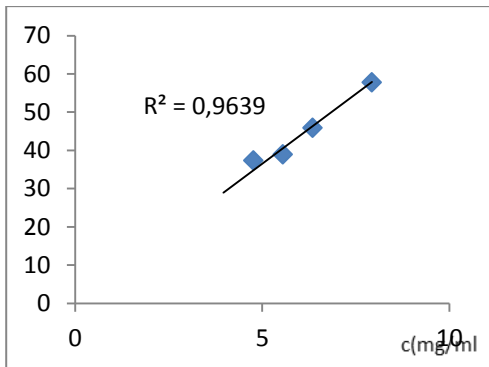


Ecorces d'orange

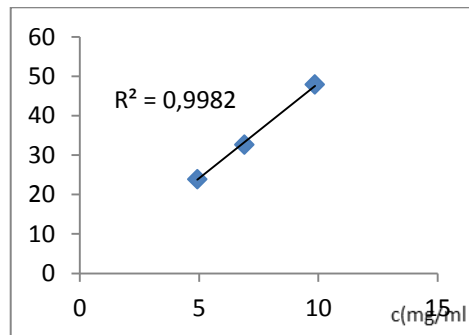
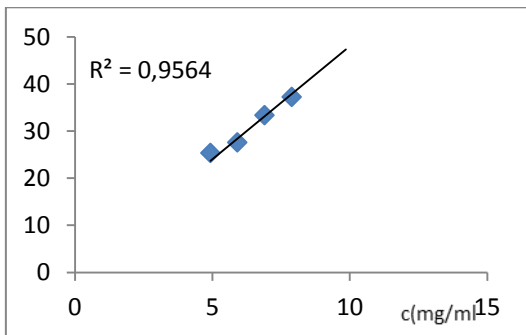


Les extraits de l'acétate d'éthyle

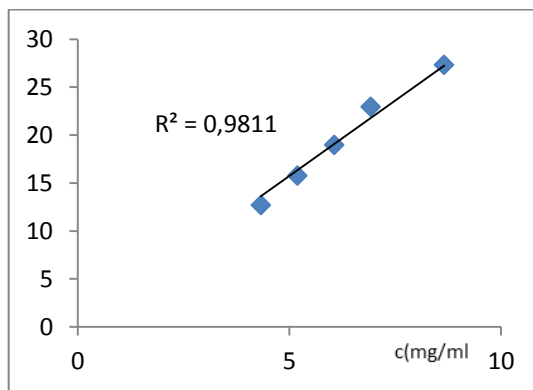
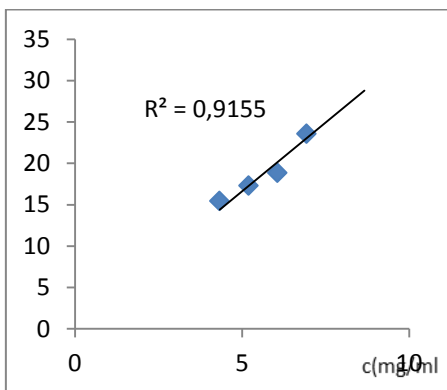
Feuilles de citron



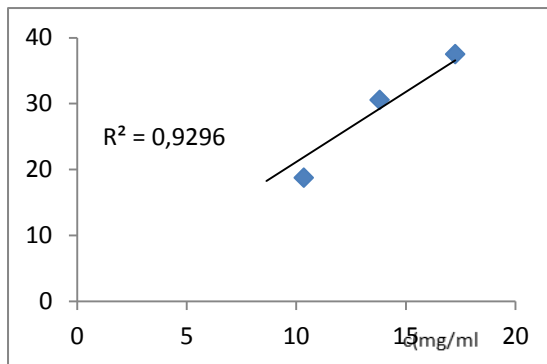
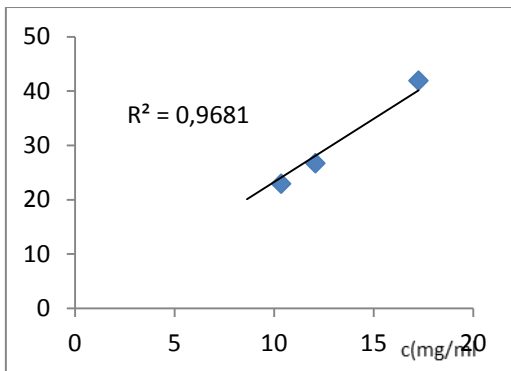
Feuilles de mandarine



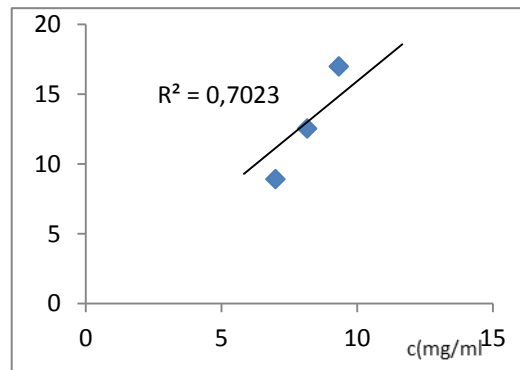
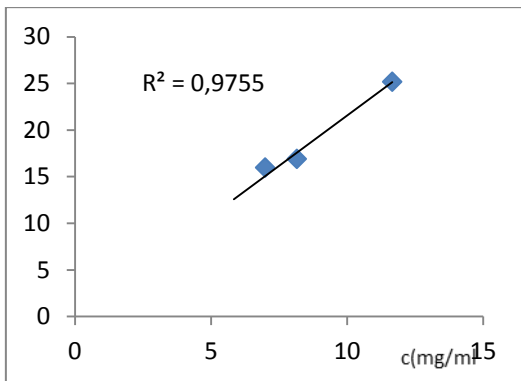
Feuilles d'orange



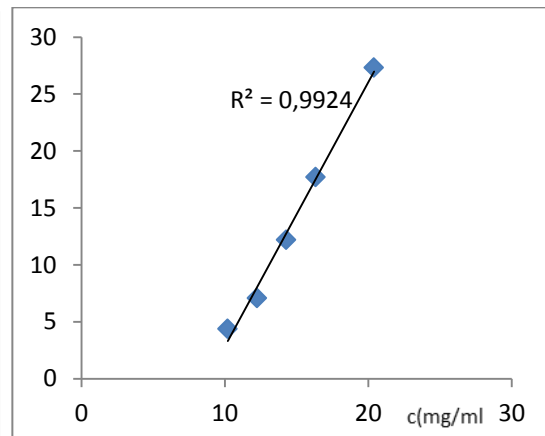
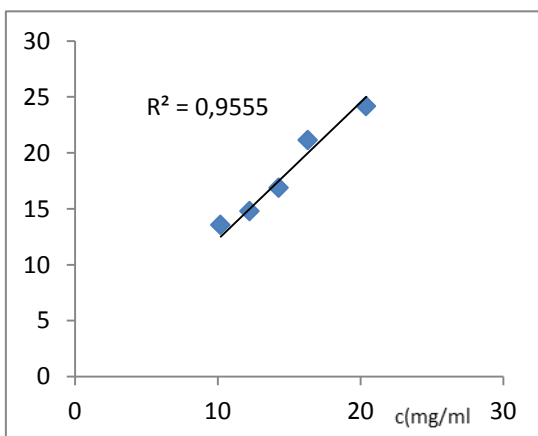
Ecorces d'orange



Ecorces de citron

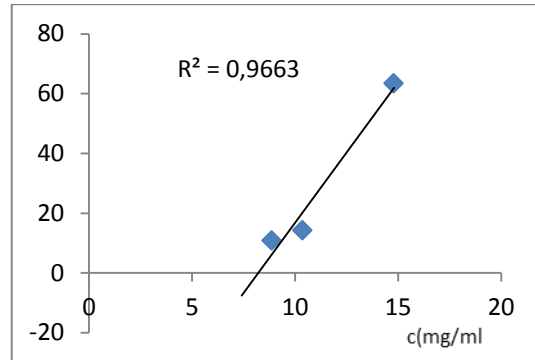
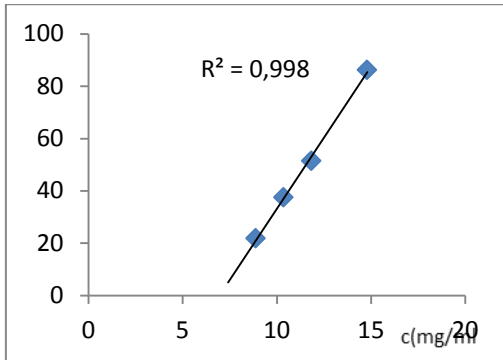


Ecorces de mandarine

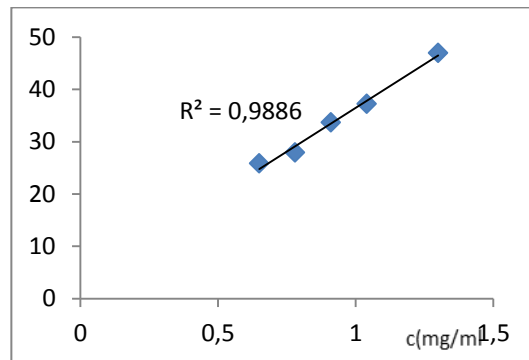
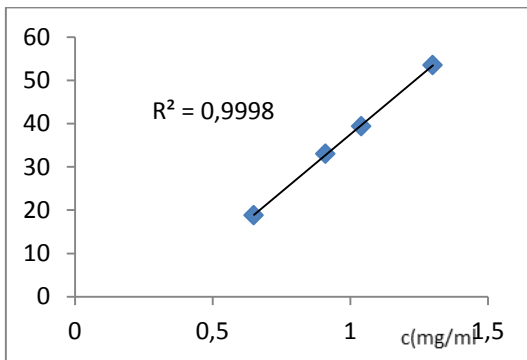


Les extraits d'éthanol :

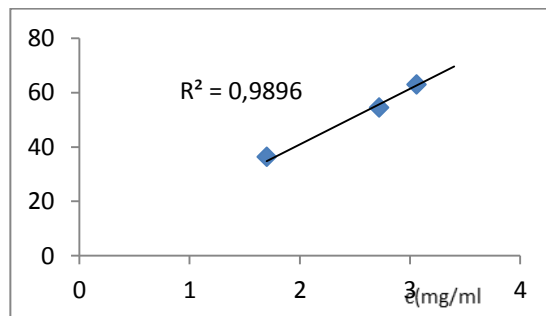
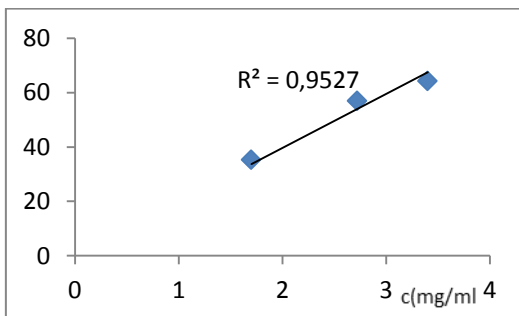
Ecorces de citron



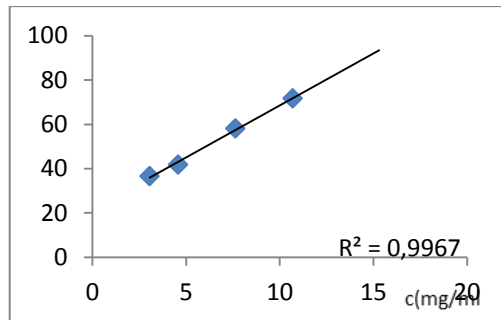
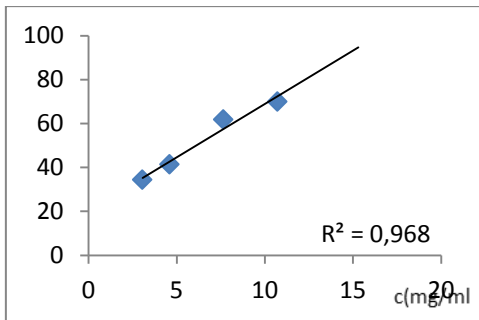
Feuilles d'orange



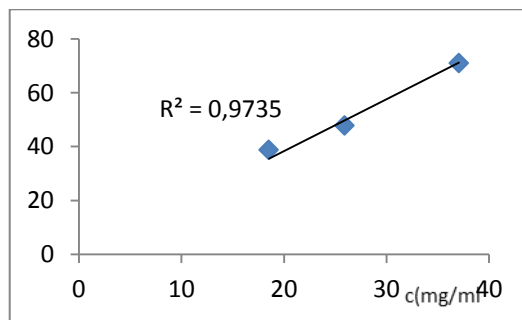
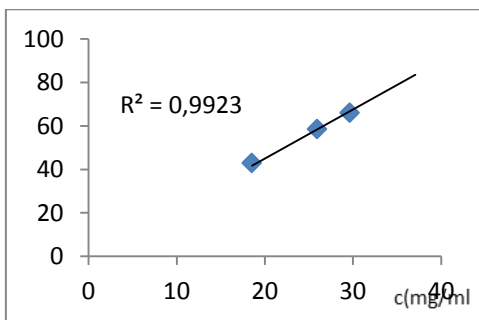
Ecorces de mandarine



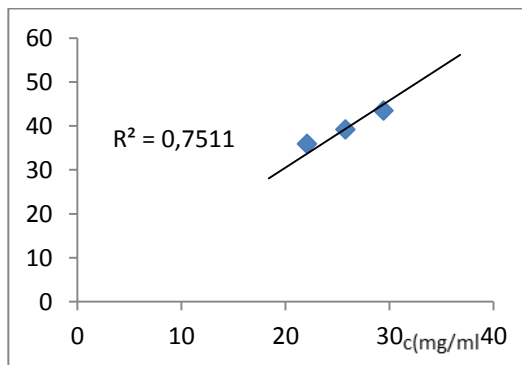
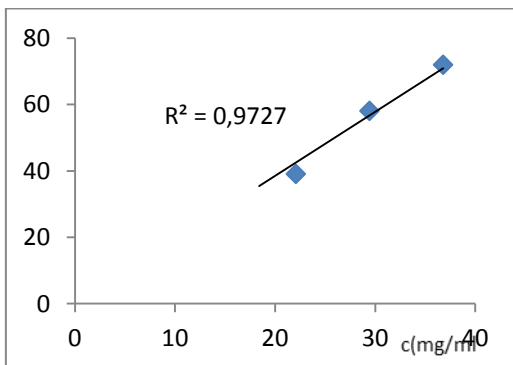
Ecorces d'orange



Feuilles de citron

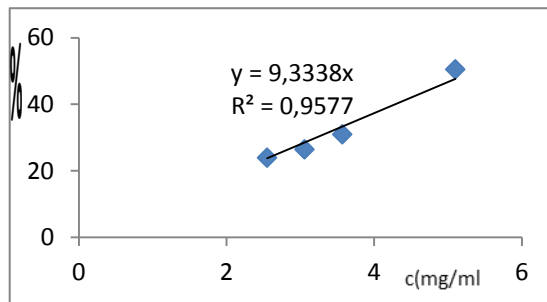
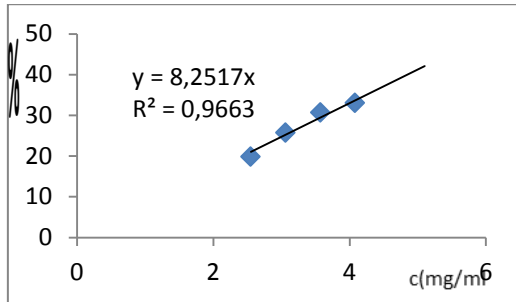


Feuilles de mandarine

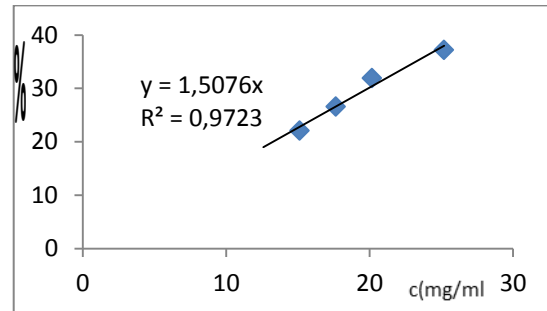
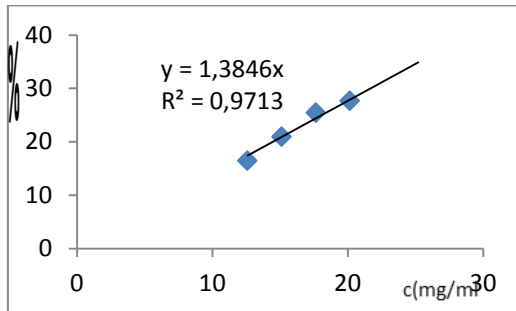


Les extraits de méthanol :

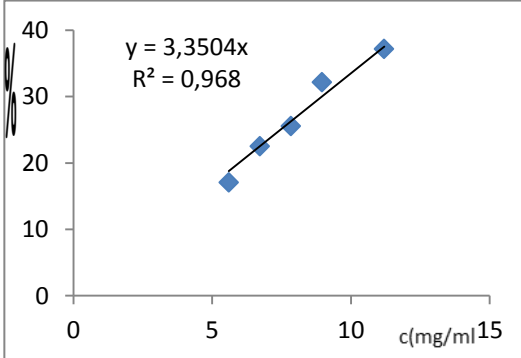
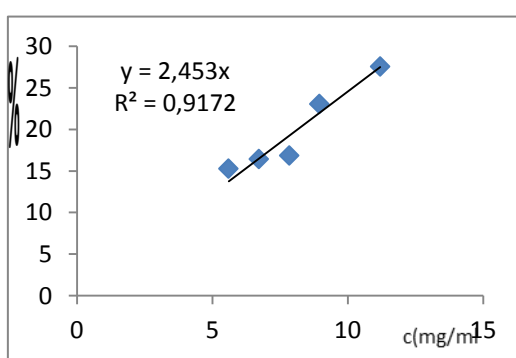
Ecorces de mandarine



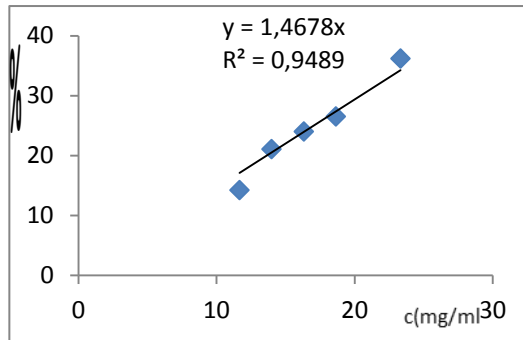
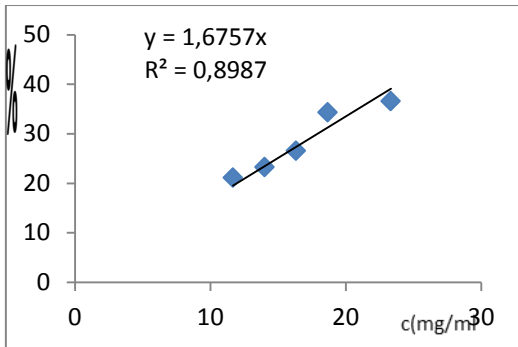
Ecorces d'orange



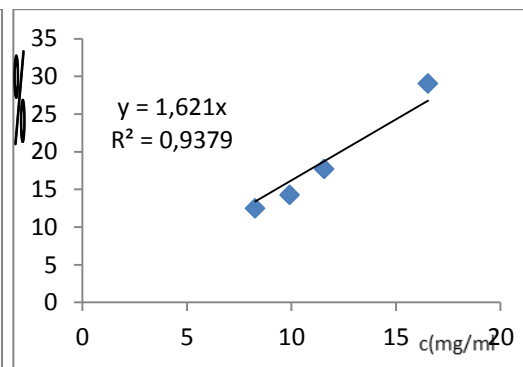
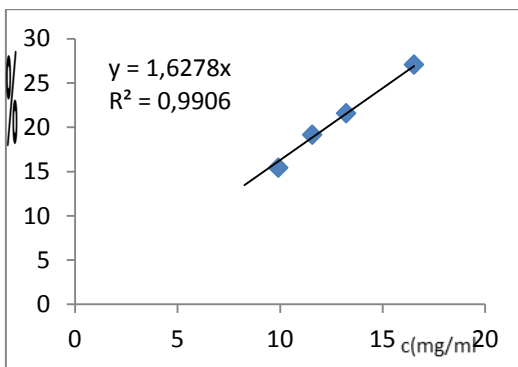
Feuilles d'orange



Feuilles de citron



Feuilles de mandarine



Ecorces de citron

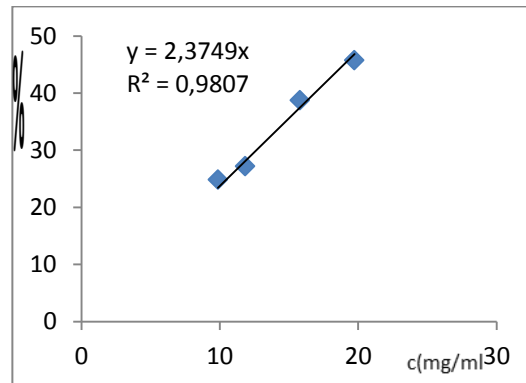
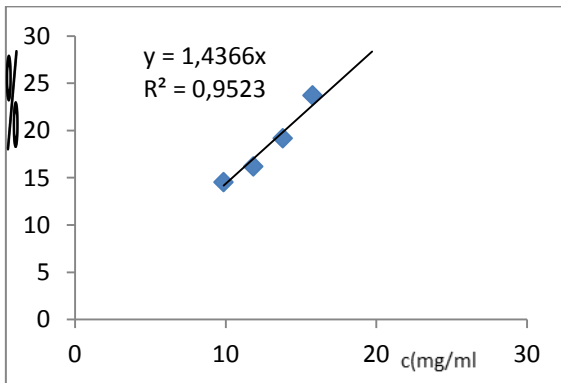


Figure 1 : les représentations graphique ($I\% = f(c)$) du test d'inhibition des extraits végétales sur alpha-amylase

Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation *in vitro* de l'activité inhibitrice sur l' α - amylase des écorces et des feuilles de trois espèces d'agrumes, « *Citrus limon* » « *Citrus sinensis* » et « *Citrus réticulata* » appartenant à la famille des *Rutacées*.

La première démarche dans cette étude, consistait en une extraction et une quantification des phénols totaux. Les teneurs en composés phénoliques totaux, dosés en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, varient entre 0,147 et 2,63 mg/g en équivalent acide gallique. Alors que les teneurs en flavonoïdes détectés en utilisant le chlorure d'aluminium varient entre 0,0043 et 1,23 mg/g en équivalents de la quercitine.

Tous les extraits ont montré des effets inhibiteurs vis-à-vis de l' α -amylase, avec des valeurs d'IC₅₀ qui varient entre 1,09 et 104,57 mg/ml dont la meilleure valeur a été enregistré pour l'espèce *Citrus limon* IC₅₀ : 1,09 g/l.

Mots clés : *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus réticulata*, Composés phénoliques, effet inhibiteur, α -amylase.

Summary

The aim of this study is to evaluate the *In vitro* inhibitory activity on α - amylase of peels and leaves of three citrus species, "*Citrus limon*" "*Citrus sinensis*" and "*Citrus reticulata*" belonging to the family Rutaceae.

The first step in this study was to extract and quantify the phenolic compounds. The content of total phenolic compounds, quantified using the Folin-Ciocalteu reagent, ranged between 0.147 and 2.63 mg / g gallic acid equivalent. While the concentrations of flavonoids detected using aluminum chloride vary between 0.0043 and 1.23 mg / g equivalents of quercitin

All extracts showed inhibitory effects on α -amylase, with IC₅₀ values ranging from 1.09 to 104.57 mg / ml. whose the best value was recorded for *Citrus limon* IC₅₀: 1.09 g / l.

Key words: *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus réticulata*, phenolic compounds, inhibitory effect, α -amylase.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد لمرض السكري في المختبر باستعمال القشور والأوراق من ثلاثة أنواع عطرية ، "حمضيات الليمون" "حمضيات البرتقال" "حمضيات المندرين" و التي تنتمي إلى عائلة الريتاسي الخطوة الأولى في هذه الدراسة هي استخراج المركبات الفينولية بحيث اظهرت النتائج ان هنالك اختلاف في محتوى المركبات الفينولية الكلية ، والتي تم قياسها باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu، فتحصلنا على نسبة ما بين 0.147 و 2.63 ملغ / غ مكافئ من حمض الجاليك. في حين أن تركيزات الفلافونويد المكتشفة باستخدام كلوريد الألومنيوم تختلف بين 0.0043 و 1.23 ملغ / غ مكافئ من quercitin. أظهرت جميع المستخلصات تأثيرات مثبطة على ألفا أميلاز ، بحيث سجلنا قيم IC₅₀ فوجدنا انها تتراوح من 1.09 إلى 104.57 ملغ/ مل.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية ، ، التأثير المثبط ، ألفا أميلاز "حمضيات الليمون" "حمضيات البرتقال" "حمضيات المندرين" .