

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE 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

*Etude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des feuilles
et des écorces de l'espèce Citrus limon, Citrus sinensis et Citrus
reticulata*

Présenté par :

Melle Lamri Yasmine

Melle Bouti Ahlem

Devant le jury :

Président(e) : Mme Kraza Lamia MAA

Rapporteur : Mme Boussoussa Hadjer MCA

Co-Rapporteur : Mme Khacheba Ihen MCA

Examineur(ric)e(s) : Melle Benabed Houda Khadidja MCB

Soutenu publiquement le :15 MAI 2018.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Remerciements

Avant tout, nous remercions **Dieu** le tout puissant de nous avoir donné la force et le courage pour finaliser ce travail.

Nos sincères remerciements vont aux professeurs qui ont concouru à rendre possible ce rêve d'enfance, un grand merci à notre encadreur madame *madame Hadjer Boussoussa* pour tous les déployés afin d'aboutir à ce travail qui reflète nos ambitions futures et qui représente le premier pas de notre chemin vers l'exercice de notre métier.

Nous tenons à remercier vivement notre co-promotrice de ce travail, madame Ihcen Khacheba pour ses conseils avisés, Son esprit de synthèse et son érudition qui restent pour nous exemple à suivre.

Merci pour cette merveilleuse année passée en votre présence, vous nous avez attribués une grande motivation et un grand savoir-faire.

Les membres de jury qui ont bien voulu évaluer nos efforts, qu'ils trouvent ici notre profonde gratitude.

A tous nos enseignants depuis notre premier jour d'école jusqu'à ce jour, on vous remercie infiniment.

Dédicace

Je dédie ce travail a ceux qui, sans leur présence ma vie n'est qu'un immense désert et à qui le fruit de mes effort revient

Mon père, Ma mère

...mes études ont toujours fait partie de vos priorités, aujourd'hui après tant d'années d'effort, j'arrive au bout du chemin. Un chemin que vous avez si bien su éclairer grâce à votre amour, votre soutien, compréhension et présence...vos avez toujours cru en moi et vous continuez à le faire, j'espère ne jamais vous décevoir. En cette occasion, ce présent travail vous est dédié. Que dieu le tout puissant vous garde pour moi.

Je dédie spécial Mon fiancée **Abdellatif Marfoua** qui n'a jamais cessé de croire source d'amour et de tendresse sans toi ce mémoire n'aurait jamais un le jour...

A mes frères : **Yacine, Khalil et Mohamed**

Ma belle-sœur : Khadîdja

Pour leur encouragement et je souhaite que dieu leur donne la bonne santé et succès dans leur vie.

A ma chère collègue de groupe : **Ahlem**

A tous **mes amis** avec lesquels j'ai partagé mes moments de Joie et de bonheur.

Que toute personne qui m'a aidé de près ou de loin, trouve ici L'expression de ma reconnaissance.

Dédicace

Je dédie ce travail a ceux qui, sans leur présence ma vie n'est qu'un immense désert et à qui le fruit de mes effort revient

Mon père, Ma mère

...mes études ont toujours fait partie de vos priorités, aujourd'hui après tant d'années d'effort, j'arrive au bout du chemin. Un chemin que vous avez si bien su éclairer grâce à votre amour, votre soutien, compréhension et présence... vos avez toujours cru en moi et vous continuez à le faire, j'espère ne jamais vous décevoir. En cette occasion, ce présent travail vous est dédié. Que dieu le tout puissant vous garde pour moi.

A mes frères : **mohammed,said et abdellazize**

A ma sœur : **fatima zohra**

Pour leur encouragement et je souhaite que dieu leur donne la bonne santé et succès dans leur vie.

A ma chère collègue de groupe : **Yasmine**

A tous **mes amis** avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Table des matières

I.Introduction	01
II-synthèse bibliographique	04
II-1 Aperçu sur les principes actifs des plantes médicinales.....	05
II-2 l'activité antioxydante.....	06
II-3 Polyphénols naturels comme antioxydants.....	07
III- Matériel et méthode	08
III-1 Matériel végétal.....	09
III-1-1 Le citron.....	09
III -1 -1-1 Système botanique.....	09
III -1-2 L'orange.....	09
III -1-2 -1 Système botanique.....	09
III -1-3 Le mandarinier.....	10
III -1-3 -1 Système botanique.....	10
III -2 Préparation des extraits.....	10
III -2 -2-1. Prétraitement de l'échantillon.....	10
III -2 -2-2. Extraction.....	11
III -3. Quantification des composés phénoliques.....	13
III -3-1. Dosage des phénols totaux.....	13
III -3-3-2. Dosage des flavonoïdes.....	14
III -4. Évaluation de l'activité antioxydante.....	15
III -4-1 Test DPPH.....	16
III -4-2. Méthode au molybdate d'ammonium.....	17
IV-Resultats et discussion	18
IV-1. Rendement d'extraction en métabolites secondaires.....	19
IV-2. Estimation quantitative des phénols totaux.....	20
IV-3. Estimation quantitative des flavonoïdes.....	22
IV-4. Résultats du pouvoir antioxydant par le test du DPPH.....	25

IV-5. Résultats du pouvoir antioxydant par le test du phosphomolybdate.....	32
V. Conclusion	43

Liste des Tableaux

Tableau 1 :	Les activités biologiques de quelques métabolites secondaires.....	05
Tableau 2 :	Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et son utilisation.....	07
Tableau 3 :	Teneur, aspect et couleur des différents extraits.....	19
Tableau 4 :	Teneurs en phénols totaux des différents extraits des plantes étudiée.....	20
Tableau 5 :	Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des plantes étudiée.....	22
Tableau 6 :	Les valeurs d'IC50 en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.....	28
Tableau 7 :	Les valeurs Les VCEAC en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards.....	38

Liste des figures

Figure 1:	Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène. Le radical formé devient moins dangereux.....	07
Figure 2:	Feuilles, fleurs et fruits de citron.....	09
Figure 3:	Feuilles, fleurs et fruits d'oranger.....	10
Figure 4:	Feuilles et fruits de mandarine.....	10
Figure 5:	Organigramme résumant les différentes étapes de l'extraction solide – liquide.....	12
Figure 6:	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	14
Figure 7:	Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	15
Figure 8:	La réduction du radical libre DPPH en une forme non radicalaire.	16
Figure 9:	Teneurs en phénols totaux des différents extraits des plantes étudiée	22
Figure 10:	Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des plantes étudiée	24
Figure 11:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait dichlorométhane.....	25
Figure 12:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait acétate d'éthyle.....	26
Figure 13:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait éthanol	27
Figure 14:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait méthanolique	27
Figure 15:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l'étude.	28
Figure 16:	Classement décroissant des extraits phénoliques des plantes étudiées selon leurs EC50....	30
Figure 17:	Variation des valeurs d'IC50 en fonction des teneurs en phénols totaux.....	31
Figure 18:	Variation des valeurs d'IC50 en fonction des teneurs en flavonoïdes.	32
Figure 19:	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction hexanique.	33
Figure 20:	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction dichlorométhane	34
Figure 21:	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en	35

	phénols des extraits issus d'une extraction d'acétate d'éthyle.....	
Figure 22:	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'éthanol	36
Figure 23:	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction méthanol	37
Figure 24:	Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.	38
Figure 25:	Variation des valeurs d'VCEAC en fonction des teneurs en polyphénols	40
Figure 26:	Variation des valeurs VCEAC en fonction des teneurs en flavonoïdes.	41

Liste des abréviations et symboles

% :	pourcentage
Abs:	Absorption
ABTS :	2, 2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid
AlCl₃:	Trichlorure d'aluminium
DPPH :	radical 1, 1-Diphényl-2 picrylhydrazyl
EQ :	Equivalent de Quercétine
ERO :	Espèces Réactives de l'oxygène
FRAP :	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE :	équivalent en acide gallique
IC₅₀:	concentration de substrat qui inhibe 50% du radical DPPH
ORAC :	Oxygen Radical absorbance capacity
PI% :	Pourcentage d'Inhibition
R:	rendement
ROO°:	Radicaux libres peroxylés
UV :	Ultraviolet
VCEAC :	Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity
µg:	Microgramme

Introduction

I. Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales connues par leurs propriétés biologiques intéressantes sont utilisées dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie, en cosmétologie et en agriculture (**Anthony., 2009.**)

Les études épidémiologiques ont suggéré les effets bénéfiques des agrumes contre de nombreuses maladies dégénératives.

Ces influences positives sur la santé humaine ont augmenté de manière significative la consommation des agrumes au cours des dernières années et on estime que la production mondiale d'agrumes atteint 110 millions de tonnes à la session 2015-16, dont l'orange est le plus commercialisé avec environ 60 %. (**Albertini ., 2016**)

Des molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant .Ce dernier est à l'origine de plusieurs maladies, telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète...etc .Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre antioxydants/pro-oxydants par une consommation suffisante d'antioxydants. (**Ahmad et al., 2012**)

En outre, ces d'agrumes sont une bonne source de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes (des flavanones hétérosides) qui comprennent principalement naringine, hespéridine, narirutine, et neohespéridine. (**Abd El-aal et al., 2009**)

Notre travail vise à démontrer la richesse de nos fruits en polyphénols Pour cela notre étude englobe deux aspects :

Le premier aspect est basé principalement sur l'extraction des composés phénoliques des écorces et feuilles d'agrumes, par différents solvants

Le second aspect est consacré à l'évaluation de l'apport en substance à activité antioxydante (acide ascorbique, composés phénoliques, flavonoïdes,.....) et la détermination

de potentiel antioxydant (activité anti-radicalaire à DPPH et les pouvoirs réducteurs : au phosphomolybdate d'ammonium) des extraits de nos échantillons.

Nous terminons par une conclusion et perspectives sur les résultats obtenus.

Synthèse

bibliographique

II-1 Aperçu sur les principes actifs des plantes médicinales

Les propriétés médicinales que possèdent les plantes sont dues à des produits chimiques. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent. De plus, les plantes synthétisent une gamme d'autres composés appelés métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui sont une source importante de molécules très utiles tels que ; les alcaloïdes, les terpènes, et les composés phénoliques (Gañan *et al.*, 2009), qui ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées (Tableau 01).

Tableau 01. Les activités biologiques de quelques métabolites secondaires

Les métabolites secondaires	Activités biologiques	Références
Alcaloïdes	antitumoral	Hesse., 2002
	antileucémique	Dewick., 2001
	antispasmodiques	Bhat <i>et al.</i> , 2005
	antisécrétrices	Katoh <i>et al.</i> , 2004
	anticancéreuse	
	antiparasitaires	
Huiles essentielles	antiseptiques	Nicolas.,1991 Mishara
	anti-inflammatoires	<i>et al.</i> , 1994
	antivirales	
	antifongiques	
	antitoxiques	
Les terpènes	antimicrobienne	Langenheim., 1994
Les composés phénoliques	Inhibiteurs d'enzymes	Dahanukar <i>et al.</i> , 2000
	antioxydants	Van Vuuren., 2008
	antimicrobiens	Tachakittirungrod <i>et al.</i> , 2007
	antibactérienne	Bruneton.,1999
	anti-inflammatoire	
	anticoagulant	Hennebelle., 2006

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Urquiaga et Leighton., 2000**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix et al., 2005**). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina., 2002**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. 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...) (**Macheix et al., 2005**).

Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (conférence internationale sur l'application des polyphénols, 2006).

II-2 l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés phénoliques provient de leur capacité à donner un électron ou un hydrogène, et de délocaliser un électron impair à l'intérieur de leur structure aromatique. Ils protègent ainsi les molécules biologiques contre l'oxydation.

Les propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques *in vitro* peuvent être évaluées grâce à plusieurs méthodes telles qu'ORAC (Oxygen Radical absorbance capacity) qui sert à évaluer la capacité antioxydante d'un aliment, ABTS (le balayage du radical cation 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), molybdate d'ammonium, DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ; mesure la capacité réductrice de ce radical stable en présence d'antioxydants.

Récemment, les mesures de l'activité anti-oxydante peuvent être aussi effectuées grâce aux modèles basés sur les cultures cellulaires (**Vuong., 2009 ; Krishnaiah et al., 2010 ; Liu., 2010**).

Tableau 02. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et son utilisation.

Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	Utilisation
ORAC (Oxygen Radical absorbance capacity)	qui sert à évaluer la capacité antioxydante d'un aliment
ABTS	le balayage du radical cation 2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	mesurer la capacité antioxydante totale
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	mesure la capacité réductrice de ce radical stable en présence d'antioxydants
molybdate d'ammonium	déterminer la capacité antioxydante totale

II-3 Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. (**Apak et al., 2007 ; Milatovic et al., 2016**).

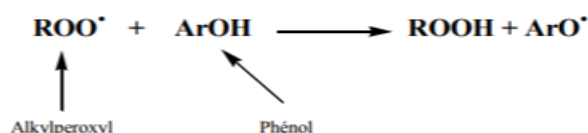


Figure01. Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène. Le radical formé devient moins dangereux.

Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes :

Inhibition enzymatique ;

Chélation des ions métalliques ;

Piégeage des radicaux libres.

III-1 Matériel végétal

Description des plantes exploitées

III-1-1 Le citron

III -1 -1-1 Système botanique

Le citronnier, un membre de la famille des Rutacées, est un petit arbre (arbuste) vert et aromatique dont la taille peut varier de 2 à 10 m de haut, porte 5-6 branches charpentières très fournies en rameaux, les racines superficielles forment un réseau dans les 80 premiers centimètres de sol. Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes, alternatives et persistantes, très adurantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visible à l'œil nu (Gollouin et Tonelli., 2013).

Règne	Végétal
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus limon</i>



Figure 02. Feuilles, fleurs et fruits de citron

III -1-2 L'orange

III -1-2 -1 Système botanique

L'oranger est un petit arbre ou arbuste, pouvant atteindre 10 à 15 m de hauteur environ. L'arbre est à rameaux nombreux ; formant une cime touffue, avec un feuillage vert sombre, glabre, persistant et légèrement ailé. Les feuilles sont persistantes, cireuses, coriaces et alternes, la floraison blanche très parfumée, Le fruit est une baie, ronde ou allongée, souvent pourvue d'un mamelon proéminent du côté opposé au pédoncule fructifère (Teuscheret *al.*, 2005). Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, ils sont de taille moyenne et de couleur caractéristique orange. L'intensité de la couleur et la forme du fruit sont caractéristiques pour chaque variété (Li-ying et *al.*, 2008)

Règne	Végétal
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus sinensis L</i>



Figure 03. Feuilles, fleurs et fruits d'oranger

III -1-3 Le mandarinier

III -1-3 -1 Système botanique

Les mandariniers et les clémentiniers sont des arbustes mesurant de 3 m à 6 m de haut pour 1,5 m à 3 m de diamètre. Leur feuillage persistant est d'un beau vert foncé. Le fruit est petit, de forme globuleuse, le plus souvent de couleur jaune orangé.

Règne	Végétal
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus reticulata</i>



Figure 04. Feuilles et fruits de mandarine

La récolte des trois différents échantillons a été effectuée dans la région de Laghouat (*Citrus limon* et *Citrus sinensis L* (rue habib Chohra Mgataa Gibli) ; *Citrus reticulata* (rue Sayeh Lamri Baten) durant le mois de décembre 2017, Le matériel végétal est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante. Le séchage est de 7 jours en moyenne pour les différentes plantes.

III -2 Préparation des extraits

III -2 -2-1. Prétraitement de l'échantillon

Après le séchage, les feuilles et les écorces obtenues sont réduites en poudre manuellement à l'aide d'un mortier puis avec un broyeur électrique ; Après broyage la poudre est tamisée à la même granulométrie et utilisée pour l'extraction.

III -2 -2-2. Extraction des composées phénoliques

Le protocole consiste à des macérations successives dans cinq solvants à polarité croissante à savoir l'hexane, le dichlorométhane, L'acétate d'éthyle, éthanol et le méthanol.

Une quantité de 1 g de la poudre de chaque échantillon précédemment obtenue, est macérée dans 20 ml d'hexane pendant 24 h à température ambiante.

L'extrait est filtré puis le résidu est repris pour une deuxième macération dans un même volume de 20 ml d'hexane pendant 24 heures à température ambiante (on répéter l'opération jusqu'à épuisement).

Le résidu de l'extraction précédente, a été repris pour une seconde macération dans 20 ml de dichlorométhane pendant 72h (chaque 24h on fait la filtration), une troisième macération dans 20 ml d'acétate d'éthyle pendant 72h, une quatrième macération dans 20 ml d'éthanol et une dernière macération dans 20 ml de méthanol (**Figure 5**).

Ceci, nous a permis d'avoir cinq fractions différentes hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et méthanol.

Les extraits organiques ainsi obtenus sont évaporés à sec sous pression réduite à 45°C. Les extraits ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux, de couleur verte et jaune. Les résidus secs sont repris dans 10 ml méthanol et conservés à 40°C jusqu' à leurs analyse.

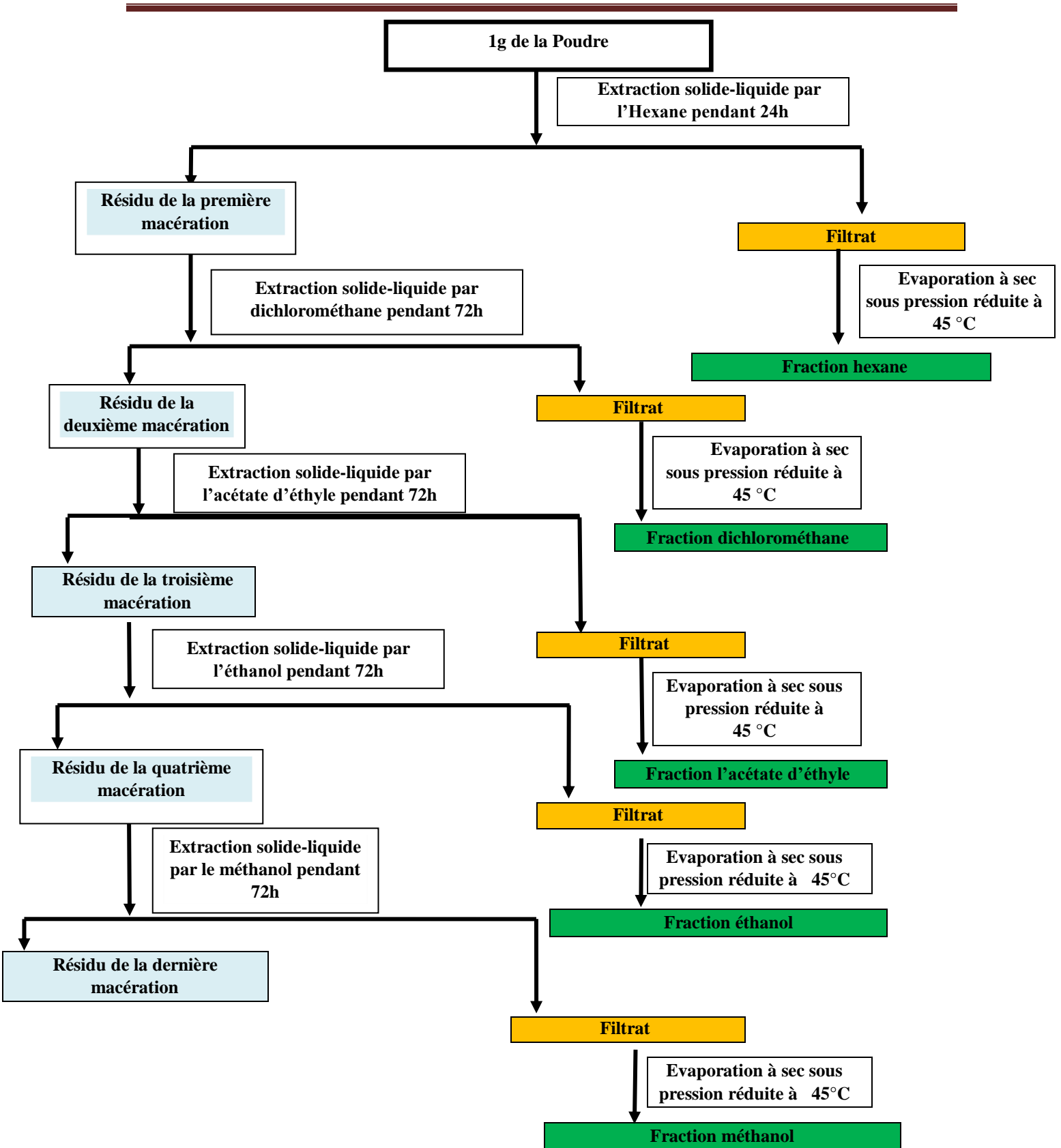


Figure 05. Organigramme résumant les différentes étapes de l'extraction solide – liquide

III -3. Quantification des composés phénoliques

III -3-1. Dosage des phénols totaux

Le dosage a été effectué avec le réactif Folin-Ciocalteu qui est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). La méthode de folin-ciocalteu est basée sur l'oxydation des cycles phénoliques, couplée à la réduction de l'acide Phosphomolybdique (**Castellucci., 2010**).

Le réactif de folin-ciocalteu voit ses propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules, il réagit avec la fonction OH des phénols, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée, permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues (**Castellucci., 2010**).

Pour quantifier les phénols totaux dans nos extraits une courbe d'étalonnage de l'acide gallique, a été réalisée.

a. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

À partir d'une solution étalon d'acide gallique (voir annexe), une gamme étalon de solutions diluées à différentes concentrations a été préparée. 100 μ l de chaque solution diluée sont mis dans un tube auquel est ajouté 500 μ l du réactif de folin-Ciocalteu (10 fois diluée). Après deux minutes, 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% (m/v) sont ajoutés, les mélanges ainsi obtenues ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. (**Boussoussa.,2011**).

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance de chaque solution ainsi préparée nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 06)

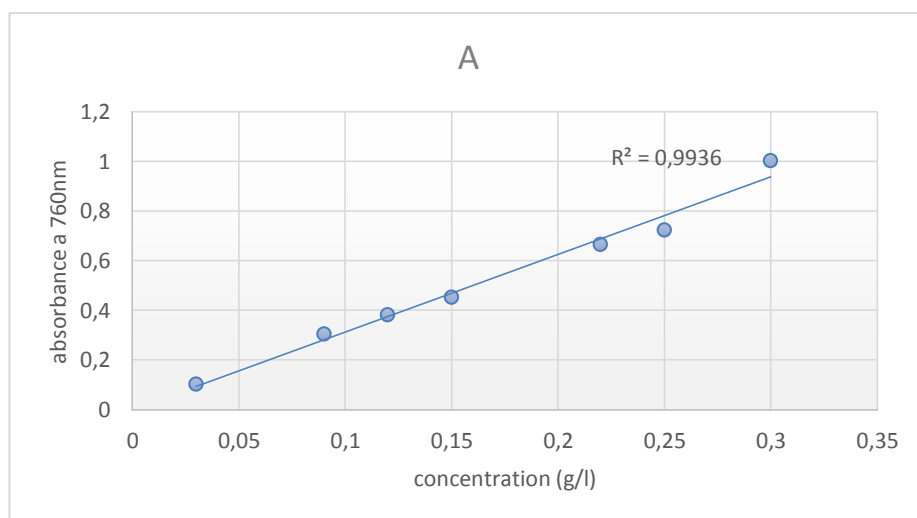


Figure 06. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

b. Mise en œuvre du dosage

Pour la quantification des phénols totaux dans nos extraits, nous avons suivi la même procédure décrite précédemment. À noter que les extraits ont été dilués pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0,1 et 1.

III -3-3-2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par **Lamaison et Carnat (1991)** en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements dihydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (**Mabry *et al.*, 1970**), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

Pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits une courbe d'étalonnage de quercétine (voir annexe), a été réalisée.

a. Courbe d'étalonnage de la quercétine

Une gamme étalon de solutions diluées à différentes concentrations a été préparée. 500 µl de chaque solution diluée sont mis dans un tube auquel est ajouté 500 µl d'AlCl₃ 2 %, les mélanges ainsi obtenus ont été maintenus à l'obscurité pendant 20 min à température ambiante (**Boussoussa., 2011**).

L'absorbance de chaque solution préparée est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc. Les valeurs de l'absorbance de chaque solution ainsi préparée nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine (Figure 07).

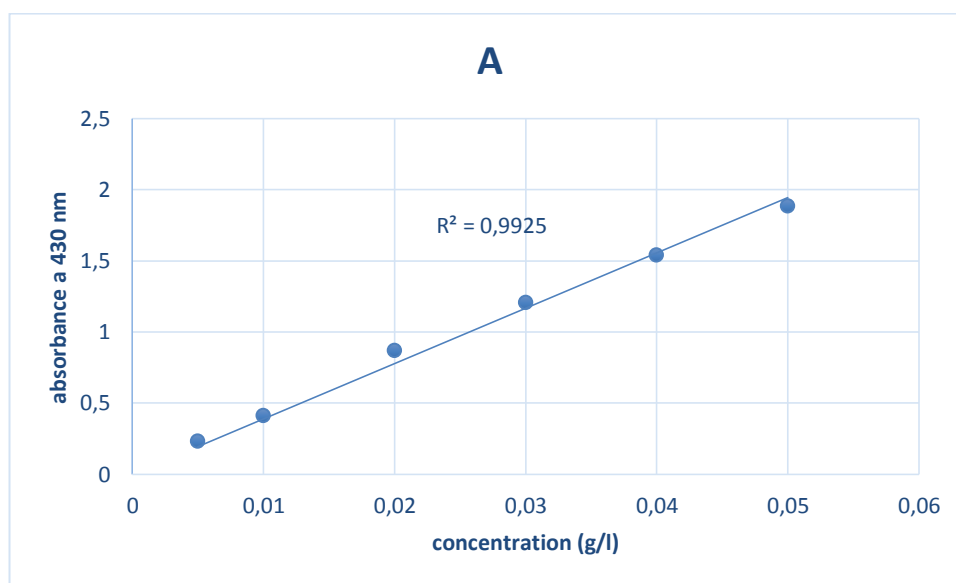


Figure 07. Courbe d'étalonnage de la quercétine

b. Mise en œuvre du dosage

L'analyse quantitative des flavonoïdes des extraits phénoliques a été réalisée par la même procédure, en effectuant des dilutions pour obtenir des absorbances comprises entre 0,1 et 1.

III -4. Évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (**Georgieva et al., 2010**).

Dans notre étude nous avons utilisé deux différents tests chimiques à savoir : le test DPPH et le test de phosphomolybdate.

III -4-1 Test DPPH

Le composé chimique DPPH (voir annexe) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydants des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur l'atome du pont formé par les deux azotes (**Popovici et al., 2009**).

a-Principe

La réduction du radical libre DPPH[°] (2,2'-diphényle-1-picrylhydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 Diphényl 1 picrylhydrazyl) de couleur violet se réduit en 2,2 Diphényl 1 picrylhydrazine de couleur jaune (**Popovici et al., 2009**).

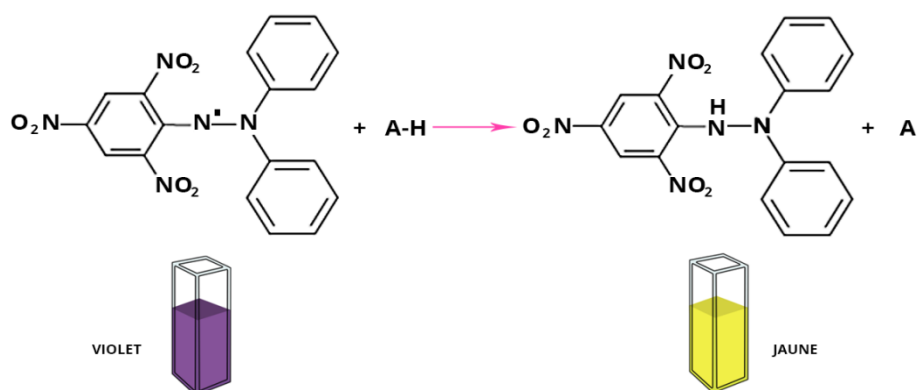


Figure 08. La réduction du radical libre DPPH en une forme non radicalaire.

b- Le protocole expérimental

A partir d'une solution mère de chaque échantillon d'extrait à tester, nous avons préparé des dilutions à différentes concentrations croissantes.

Dans un tube à essai 500 µl de chaque dilution est mélangée à 500 µl de la solution de DPPH (250 µM). Le mélange réactionnel a été secoué à l'aide d'un vortex, puis maintenu à l'obscurité pendant une durée de 30 minutes à une température ambiante.

La mesure de l'absorbance de chaque milieu réactionnel a été à l'aide du même spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 517 nm contre un blanc. (**Boussoussa.,2011**).

L'efficacité antioxydante de nos extraits est déterminée ensuite par le calcul du paramètre EC50 «efficient concentration» qui est défini comme étant la concentration en substance qui est à l'origine de la perte de 50% de l'activité du DPPH (la couleur) (**Ruan et**

al, 2008). C'est – à – dire qui représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres.

Le pourcentage d'inhibition est donné selon la formule suivante : (**Harris et al., 2009**).

$$I \% = [(Abs\ témoin - Abs\ Échantillon) / Abs\ témoin] \times 100$$

I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon.

Abs témoin : Absorbance du témoin. (**Meddour et al., 2013**).

III -4-2. Méthode au molybdate d'ammonium

a- Principe

Ce test est employé pour déterminer la capacité antioxydante totale, qui est basée sur la réduction de l'ion Mo^{+6} en ion Mo^{+5} par les antioxydants contenus dans l'extrait. Par conséquent, il y a formation d'un complexe phosphate- Mo^{+5} de couleur verdâtre (**Prieto et al., 1999 ; Sathish-Kumaret al., 2007**).

b-Mode opératoire

Pour le test de phosphomolybdate, 200 μ l de chaque échantillon dilué est ajouter à 2 ml d'un réactif contenant (0,6 M) d'acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4mM de molybdate d'ammonium. Le tube est coiffé et incubé dans un bain marie à 90C° pendant 90 min, après refroidissement de l'échantillon, l'absorbance de la solution aqueuse est mesurée à 695 nm contre blanc dans un spectrophotomètre UV. Nous utilisons l'acide ascorbique comme un standard et on les a traités dans les mêmes conditions opératoires (**Boussoussa.,2011**).

IV-1. Rendement d'extraction en métabolites secondaires (les composés phénoliques)

Les extraits obtenus, présentent tous le même aspect visqueux mais des couleurs différentes. Les teneurs de ces différentes fractions, leurs couleurs ainsi que leurs aspects sont consignés dans le (Tableau 03).

Tableau 03. Teneur, aspect et couleur des différents extraits.

Nom de l'extrait	Nom de la plante	couleur	aspect	Teneurs (%)
Hexanique	<i>Citrus limon</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	6
	Feuilles	verts	Visqueux	8,5
	<i>Citrus sinensis</i>			
	Ecorce	Orange	Visqueux	4,2
	Feuilles	Verts	Visqueux	8,9
	<i>Citrus reticulata</i>			
	Ecorce	Jaune foncé	Visqueux	1,2
Feuilles	Verts	Visqueux	2	
Dichlorométhane	<i>Citrus limon</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	14,9
	Feuilles	Vert militaire	Visqueux	3,8
	<i>Citrus sinensis</i>			
	Ecorce	Jaune	Visqueux	7,1
	Feuilles	Vert militaire	Visqueux	1,4
	<i>Citrus reticulata</i>			
	Ecorce	Jaune	Visqueux	5,9
Feuilles	Vert militaire	Visqueux	1,1	
Acétate d'éthyle	<i>Citrus limon</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	5,3
	Feuilles	verts	Visqueux	7,9
	<i>Citrus sinensis</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	13
	Feuilles	verts	Visqueux	6,1
	<i>Citrus reticulata</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	3
Feuilles	Vert claire	Visqueux	5,7	
Ethanol	<i>Citrus limon</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	4,8
	Feuilles	Vert claire	Visqueux	1,3
	<i>Citrus sinensis</i>			
	Ecorce	Orange	Visqueux	27,2
	Feuilles	Vert claire	Visqueux	3,5
	<i>Citrus reticulata</i>			
	Ecorce	Orange	Visqueux	23
Feuilles	Vert claire	Visqueux	3,4	
Méthanolique	<i>Citrus limon</i>			
	Ecorce	Jaune claire	Visqueux	4,2
	Feuilles	Vert militaire	Visqueux	7,8
	<i>Citrus sinensis</i>			
	Ecorce	Orange claire	Visqueux	11,4
Feuilles	Vert militaire	Visqueux	7,8	

<i>Citrus reticulata</i>			
Ecorce	Orange claire	Visqueux	12,7
Feuilles	verts	Visqueux	8,8

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que tous les extraits ont montré différentes couleurs variant du jaune clair à l'orange pour les écorces, tandis que les feuilles les couleurs ont varié du vert clair au vert militaire.

D'après les résultats obtenus (Tableau 03), nous remarquons que les teneurs des extraits hexanique varient de 1,2 à 8,9 % et pour les extraits dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et méthanolique varient de 1,1 à 14,9 %, 3 à 13 %, 1,3 à 27,2%, 4,2 à 12,7% respectivement.

En analysant les résultats du (Tableau 03), nous pouvons déduire que les plus hauts rendements ont été enregistrés dans l'extrait éthanol avec une teneur de 27,2%. Les solvants les moins polaires ont montré de faibles rendements de 1,2 à 8,9 % et 1,1 à 14,9 % pour les extraits dichlorométhaniques et les extraits hexaniques respectivement.

IV-2. Estimation quantitative des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 04

Tableau 04. Teneurs en phénols totaux des différents extraits des plantes étudiée

Nom de l'extrait	Nom de la plante	Teneur en Phénols Totaux (mg/g) équivalent en acide gallique
Hexanique	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,66 ±0,07
	Feuilles	0,48±0,03
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,44±0,02
	Feuilles	0,57±0,005
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,49±0,02
	Feuilles	1,29±0,04
Dichlorométhane	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,32±0,01
	Feuilles	0,39±0,02
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,49±0,04
	Feuilles	0,48±0,04
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,46±0,02
	Feuilles	0,87±0,07

Acétate d'éthyle	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	1,51±0,01
	Feuilles	0,5±0,01
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	1,83±0,02
	Feuilles	0,26±0,01
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	1,5±0,03
	Feuilles	0,94±0,02
Ethanol	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	1,56±0,02
	Feuilles	0,96±0,01
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	5,7±0,02
	Feuilles	0,55±0,003
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	2,69±0,02
	Feuilles	1,57±0,01
Méthanolique	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	2,7±0,04
	Feuilles	17,1±0,03
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	18,9±0,01
	Feuilles	2,5±0,03
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	12,24±0,03
	Feuilles	28,36±0,03

D'après la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux, nous pouvons constater que les teneurs de ces composés varient entre 0,26 et 28,36 mg GAE/g de la matière sèche.

Les taux de composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans : l'extrait méthanolique avec une concentration de 28,36 mg GAE/g, suivi par l'extrait éthanol 2,69 mg GAE/g de la matière sèche tandis que, la teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait acétate d'éthyle avec un taux de 0,26 mg GAE/g de la matière sèche (Tableau 04).

Dans l'extrait méthanolique pour *Citrus reticulata* et *Citrus limon*, les quantités des phénols totaux observées dans les feuilles égalent à 28,36 et 17,1 mg GAE/g respectivement. Ces valeurs sont importantes par rapport à celles trouvés dans les écorces 12,24 et 2,7 mg GAE/g. Par contre *Citrus sinensis* a montré la concentration la plus importante observée dans l'écorce avec une teneur de 18,9 mg GAE/g de la matière sèche et celui de feuille nous a donné la valeur la plus faible 2,5 mg GAE/g.

Dans l'extrait éthanol et l'acétate d'éthyle pour toutes les espèces les quantités des phénols totaux observés dans les écorces sont importantes par rapport à celles trouvés dans les feuilles.

Une faible quantité des phénols totaux a été observée dans les extraits hexanique et dichlorométhane.

À partir de cet histogramme (figure09), nous pouvons constater la richesse de nos extraits en composés phénoliques très variés selon leurs natures chimiques, leurs solubilités dans les différents solvants choisis pour l'extraction ainsi que leurs degrés de liaison avec d'autres constituants végétaux (Rodriguez Vaquero et al., 2007 ; Nostro et al., 2000).

Ce résultat, confirme aussi que le méthanol dans ce cas nous a permis d'avoir la teneur la plus importante. La différence des teneurs en phénols totaux entre les cinq extraits pourrait être expliquée par la polarité de molécules de notre matière végétale.

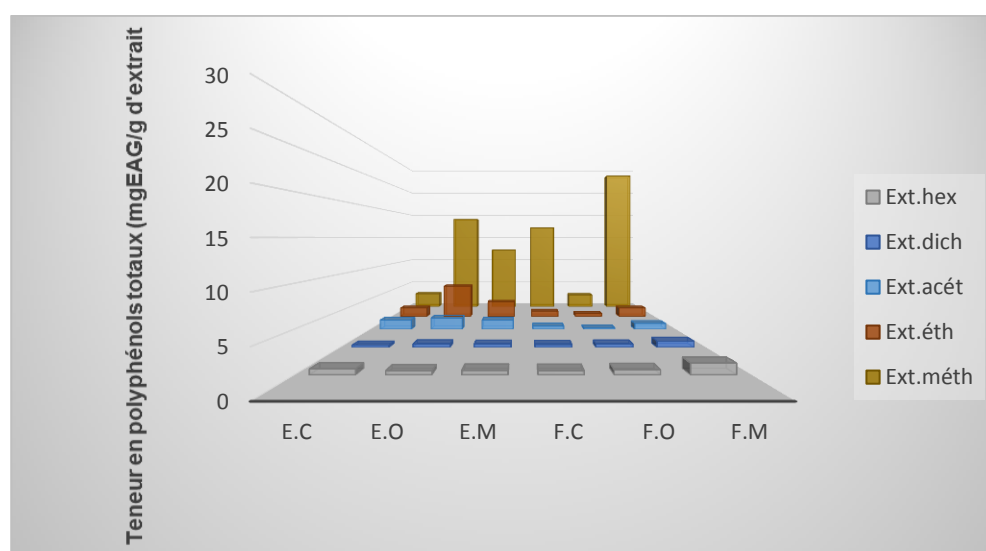


Figure 09. Teneurs en phénols totaux des différents extraits des plantes étudiée

IV-3. Estimation quantitative des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait de plante a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage. La quercétine considérée comme étalon nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différents extraits exprimée en mg équivalent de la quercétine (EQ) par gramme de la matière végétale (Tableau 05).

Tableau 05. Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des plantes étudiée

Nom de l'extrait	Nom de la plante	Teneur en flavonoïdes (mg/ml) équivalent en de la quercétine
Hexanique	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,004 ±0,008
	Feuilles	0,27±0,08
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,3±0,05
	Feuilles	0,34±0,08

	<i>Citrus reticulata</i>		
	Ecorce	0,2±0,03	
	Feuilles	0,35±0,01	
Dichlorométhane	<i>Citrus limon</i>		
	Ecorce	0,02±0,04	
	Feuilles	0,03±0	
	<i>Citrus sinensis</i>		
	Ecorce	0,08±0,06	
	Feuilles	0,05±0	
	<i>Citrus reticulata</i>		
	Ecorce	0,06±0,04	
	Feuilles	0,85±0	
Acétate d'éthyle	<i>Citrus limon</i>		
	Ecorce	0,24±0,007	
	Feuilles	0,28±0,03	
	<i>Citrus sinensis</i>		
	Ecorce	0,19±0,04	
	Feuilles	0,08±0,01	
	<i>Citrus reticulata</i>		
	Ecorce	0,14±0,01	
		Feuilles	0,5±0,07
	Ethanol	<i>Citrus limon</i>	
Ecorce		0,36±0,05	
Feuilles		0,9±0,03	
<i>Citrus sinensis</i>			
Ecorce		0,74±0,007	
Feuilles		0,16±0,008	
<i>Citrus reticulata</i>			
Ecorce		0,37±0,04	
		Feuilles	1,43±0,01
Méthanolique		<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,56±0,02	
	Feuilles	4,27±0	
	<i>Citrus sinensis</i>		
	Ecorce	1,17±0,04	
	Feuilles	1,52±0	
	<i>Citrus reticulata</i>		
	Ecorce	1,77±0,04	
		Feuilles	6,25±0

D'après la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus lors de la quantification en flavonoïdes, nous pouvons constater que les teneurs de ces composés varient entre 0,004 et 6,25 mg EQ/g de la matière sèche.

Les taux de composés phénoliques les plus élevés ont été détectés dans : l'extrait méthanolique avec une concentration de 6,25 mg EQ/g, suivi par l'extrait éthanol 1,43 mg EQ/g de la matière sèche tandis que, la teneur la plus basse a été remarquée dans l'extrait hexanique avec un taux de 0,04 mg EQ/g de la matière sèche (Tableau 05).

Dans l'extrait méthanolique et hexanique pour *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* les quantités en flavonoïdes observées dans les feuilles égalent à (4,27 ; 1,52 ; 6,25 mg EQ/g) et (0,27 ; 0,34 ; 0,35 mg EQ/g) respectivement. Ces valeurs sont importantes par rapport à celles trouvés dans les écorces (0,56 ; 1,17 ; 1,77 mg EQ/g) et (0,004 ; 0,3 ; 0,2 mg EQ/g) respectivement.

Dans l'extrait éthanol, l'acétate d'éthyle et dichlorométhane pour *Citrus limon* et *Citrus reticulata* les quantités en flavonoïdes observées dans les feuilles égalent à (0,9 ; 1,43 mg EQ/g) ; (0,28 ; 0,5 mg EQ/g) et (0,03 ; 0,85 mg EQ/g) respectivement. Ces valeurs sont importantes par rapport à celles trouvés dans les écorces (0,36 ; 0,37 mg EQ/g) ; (0,24 ; 0,14 mg EQ/g) et (0,02 ; 0,06 mg EQ/g) respectivement.

Par contre chez *Citrus sinensis* a montré la concentration la plus importante observées dans les écorces avec une teneur de (0,74 ; 0,19 ; 0,08 mg EQ/g) de la matière sèche et celui de feuille nous a donné la valeur la plus faible (0,16 ; 0,08 ; 0,05) mg EQ/g.

À partir de cet histogramme (figure10), confirme aussi que le méthanol dans ce cas nous a permis d'avoir la teneur la plus importante. La différence des teneurs en flavonoïdes entre les cinq extraits pourrait être expliquée par la polarité de molécules de notre matière végétale

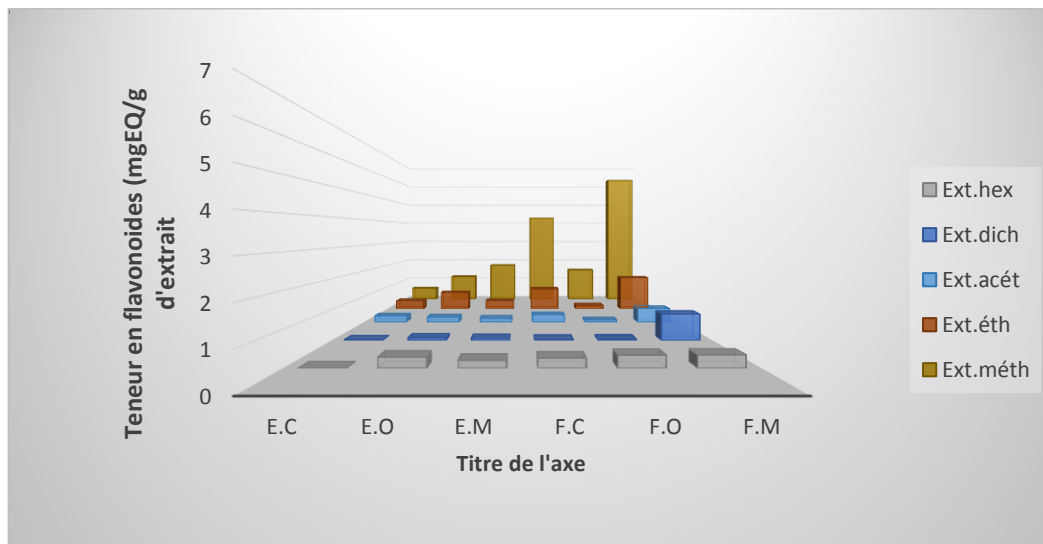


Figure 10. Teneurs en flavonoïdes des différents extraits des plantes étudiée

À travers les résultats cités dans le (tableau 05 et figure 10), nous constatons que les feuilles de l'espèce *Citrus limon* et *Citrus reticulata* est en possession d'un matériel riche en flavonoïdes par rapport aux écorces. Par contre l'espèce *Citrus sinensis* a montré que les écorces sont riches en flavonoïdes par rapport aux feuilles. Ainsi, nous pouvons déduire que l'analyse des polyphénols par les méthodes spectroscopiques nous offre une bonne idée sur l'identification quantitative de ces composés.

IV-4. Résultats du pouvoir antioxydant par le test du DPPH

Les figures qui suivent représentent les tracés du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des extraits (Figure 11, Figure 12, Figure 13, Figure 14) ainsi que la Figure 15 qui représente la variation des pourcentages d'inhibition (%) en fonction des concentrations en mg/ml de antioxydant standards et les étalons choisis pour cette étude à savoir la vitamine C .

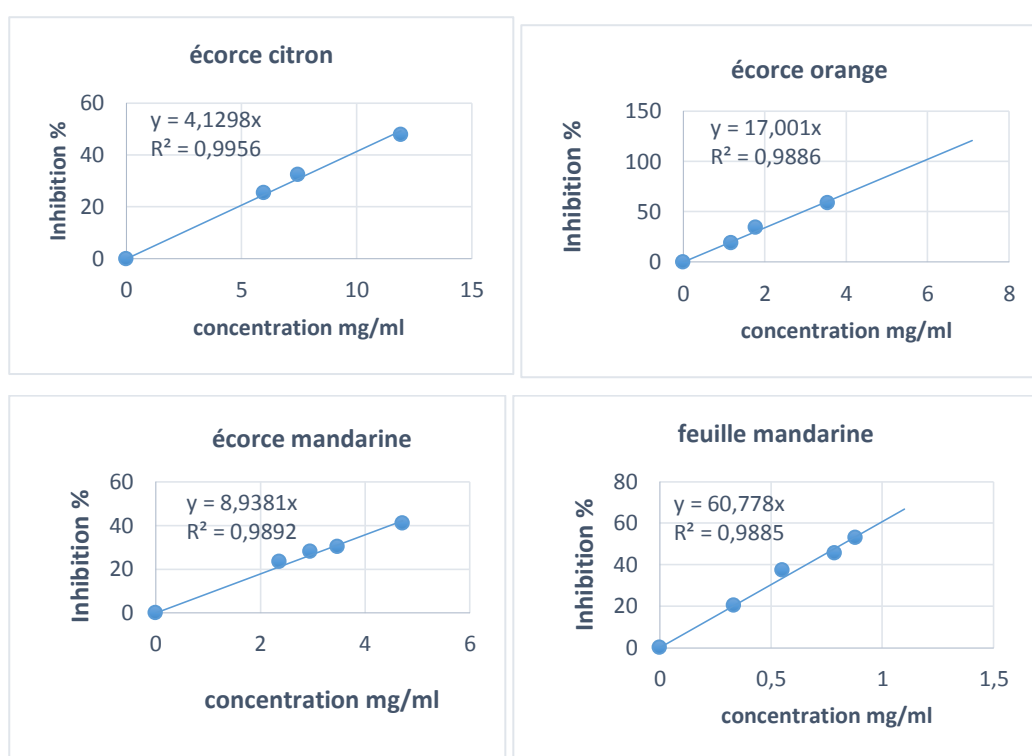
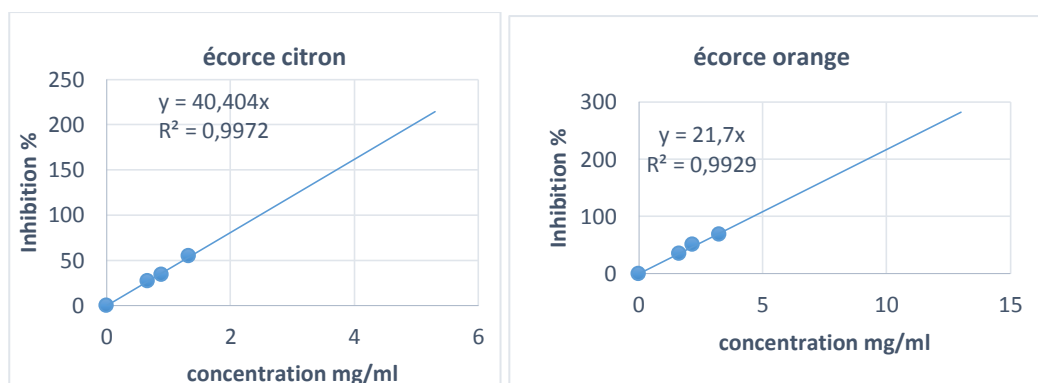


Figure 11. Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait dichlorométhane



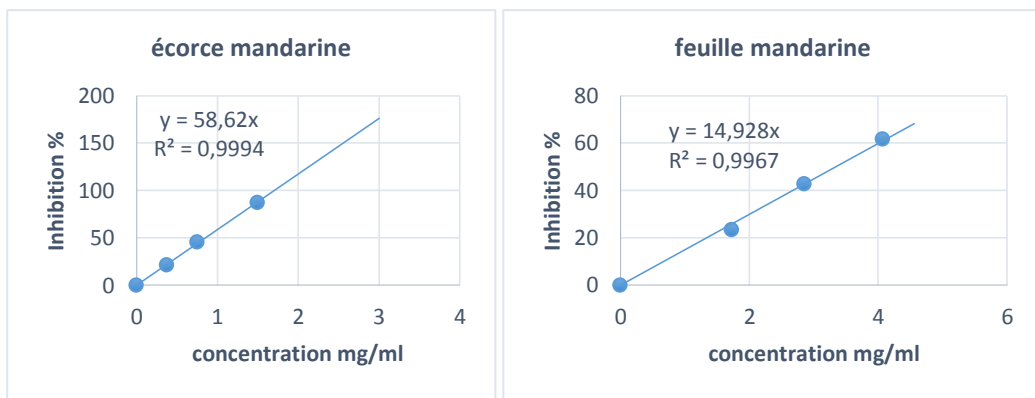


Figure 12. Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait acétate d'éthyle

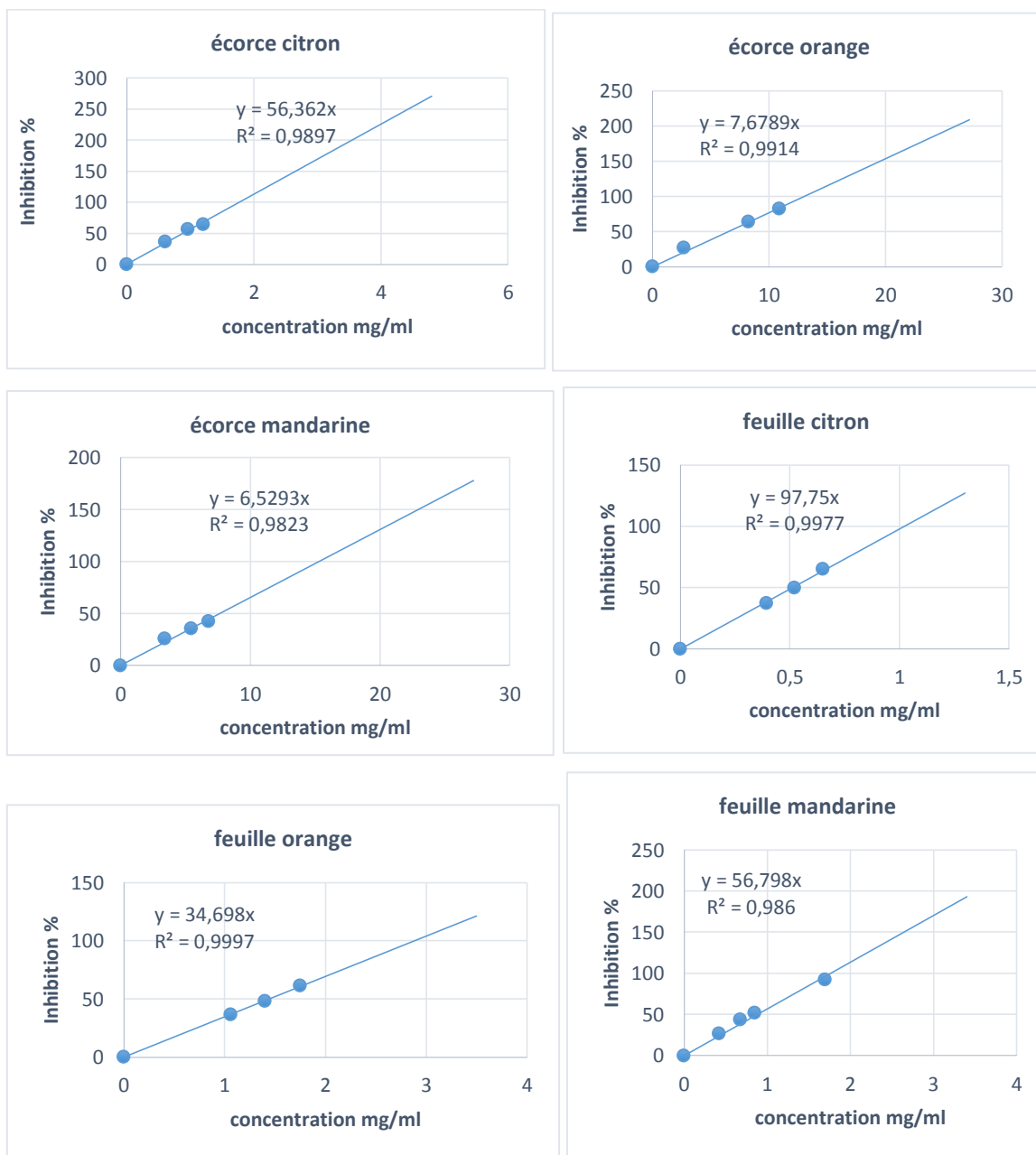


Figure 13. Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait éthanol

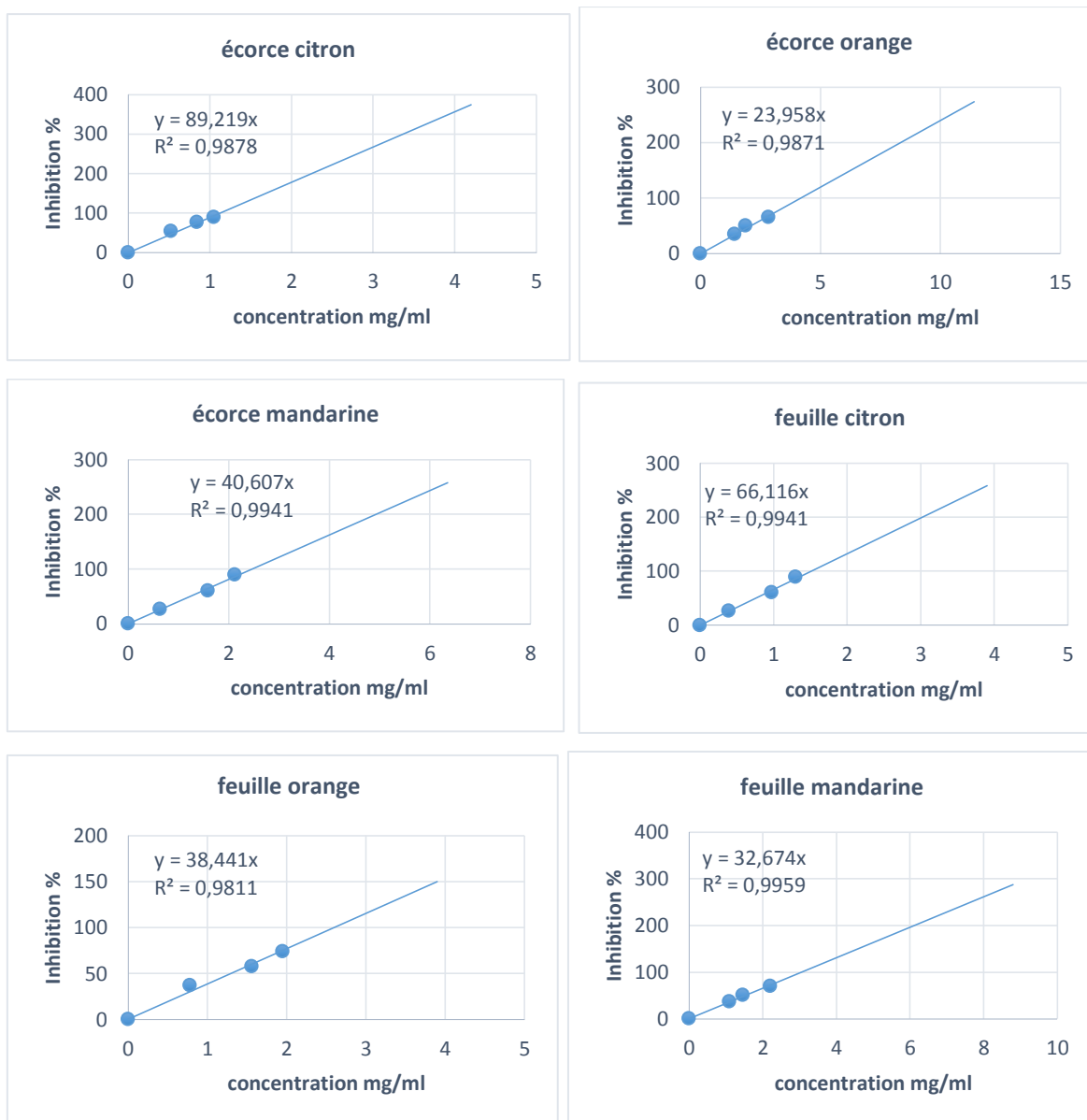


Figure 14. Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits de l'extrait méthanolique

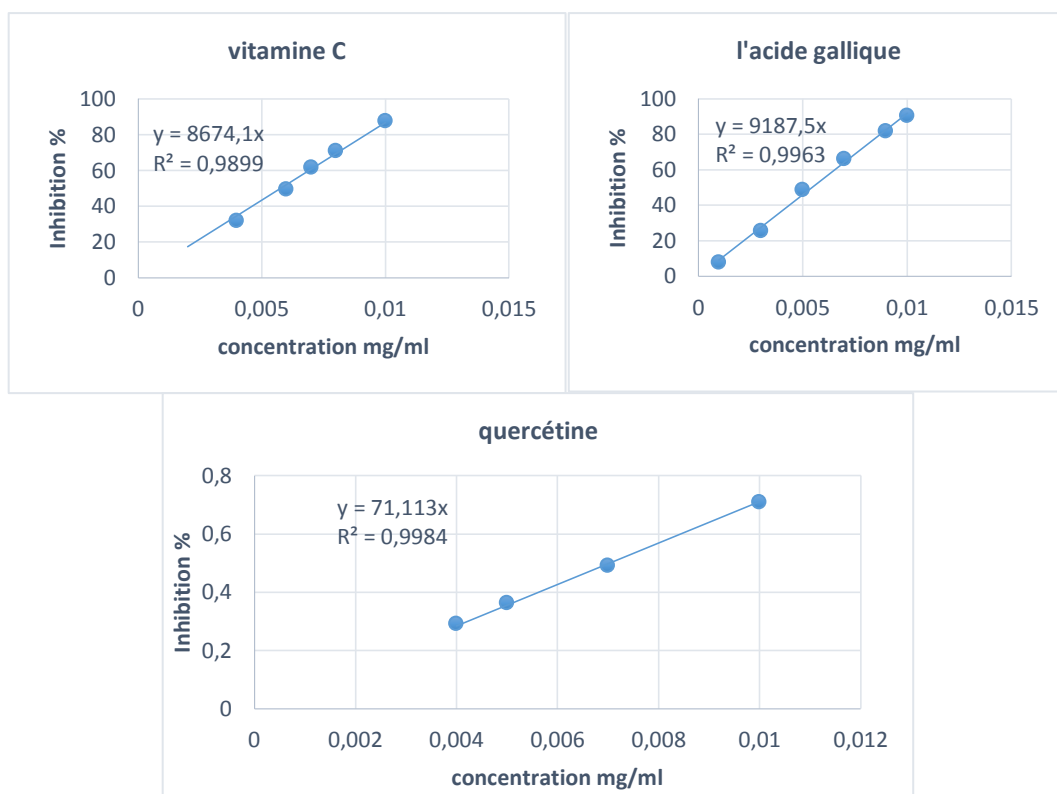


Figure 15. Courbes représentant la variation du pourcentage d’inhibition I% en fonction de la concentration en antioxydants standards choisis pour l’étude.

Les pourcentages d’inhibition ainsi déterminés à partir des tracés précédents, nous ont permis de déterminer la concentration d’inhibition à 50% (IC50) des antioxydants présents dans les extraits exprimés en mg/ml.

De même, nous avons calculé les IC50 de la vitamine C (l’acide ascorbique), acide gallique et quercétine afin de les comparer avec ceux des différents extraits. Les valeurs d’IC50 obtenues sont résumées dans le (tableau 06). Ce paramètre est utilisé pour la comparaison entre l’activité antioxydante de nos échantillons avec celle des références : la vitamine, L’acide gallique et quercétine Plus la valeur d’IC50 est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante (**Shimamura, et al, 2007 ; Mazza et Miniati, 1993**).

Tableau 06. Les valeurs d’IC50 en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards

Nom de l’extrait	Nom de la plante	IC50 en (mg/ml)
Hexanique		Pas d’activité
Dichlorométhane	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	12 ,10±0,01
	Feuilles	Pas d’activité

	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	2,94±0,06
	Feuilles	Pas d'activité
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	5,59±0,02
	Feuilles	0,82±0
Acétate d'éthyle	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	1,23±0,01
	Feuilles	Pas d'activité
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	2,3±0,06
	Feuilles	Pas d'activité
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,85±0,01
	Feuilles	3,35±0,02
	Ethanol	<i>Citrus limon</i>
Ecorce		0,89±0,07
Feuilles		0,51±0,03
<i>Citrus sinensis</i>		
Ecorce		6,51±0,04
Feuilles		1,44±0,007
<i>Citrus reticulata</i>		
Ecorce		7,66±0,01
Feuilles		0,88±0,01
Méthanolique		<i>Citrus limon</i>
	Ecorce	0,56±0,02
	Feuilles	0,76±0
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	2,08±0,05
	Feuilles	1,3±0
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	1,23±0,03
	Feuilles	1,53±0
	Vitamine C	
L'acide gallique		0,005±0,09
La quercétine		0,7±0,04

Les résultats présentés dans le (tableau 06) montrent que les valeurs de l'IC₅₀ varient globalement de 0,51 mg/ml à 12,10 mg/ml. La plus forte activité a été enregistrée pour l'extrait éthanol, par contre l'activité la plus faible a été enregistrée pour l'extrait dichlorométhane.

En analysant l'ensemble de nos résultats (Tableau 06) et sachant que le paramètre IC₅₀ est inversement proportionnel à l'activité antioxydante. Nos résultats, montrent clairement que les extraits phénoliques de l'espèce *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* possèdent un potentiel antioxydant faible comparable avec celui des

antioxydants utilisés comme référence dans ce test. Par contre *Citrus limon* extrait méthanolique (écorce) et éthanol (feuille) possède un potentiel antioxydant important en comparaison avec le standard quercétine.

En raison de simplification et afin de mieux comparer entre les activités antioxydantes obtenues par nos extraits la (figure 16) illustre le classement décroissant du pouvoir antiradicalaire exprimé en EC₅₀ des différentes extraits.

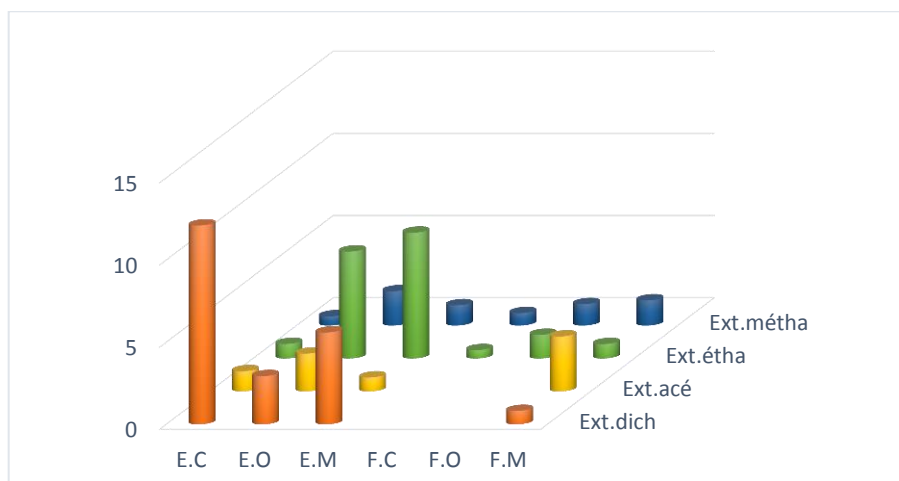


Figure.16 Classement décroissant des extraits phénoliques des plantes étudiées selon leurs EC₅₀.

À partir de cet histogramme nous constatons que les feuilles de l'espèce *Citrus limon* représente activité antiradicalaire importante en comparaison avec les écorces, et que l'extrait éthanol représente la fraction la plus puissante par contre l'extrait dichlorométhane est l'antioxydant le plus faible dans les conditions de ce test.

D'après les valeurs d'IC₅₀ obtenues dans le (Tableau 06), on s'aperçoit que tous nos extraits testés ont montré des activités antiradicalaires inférieure à celles déterminées pour les antioxydants standards.

Des études réalisées par **Tounsi et al., (2010)**, sur l'orange amer et sanguine, ont montré que la capacité antiradicalaire est de 96,1%, 90,21% respectivement. De plus, **Xu et al., (2008)** rapportent que le jus himlin, citron possèdent des activités antioxydantes de 60,24 ; 24,50 respectivement.

Guimarães et al., (2010) Ont apporté des teneurs pour le jus des agrumes de 8 ,38 (pamplemousse) 6,41 (citron jaune), 12,47 (citron vert), et 5,30mg/ml (orange) (**Bragance, Portugal**).

Moreno et al. (2005), l'activité antiradicalaire de jus d'orange varient de 163,91 à 206,90 ml/g

L'activité antiradicalaire peut être affectée par de nombreux facteurs tels que, la polarité des solvant et la procédure d'extraction, la variation des espèces utilisées (Ismail et al., 2004).

Pour vérifier la validation des résultats obtenus nous avons tracé les courbes qui représentent la variation des valeurs d'IC₅₀ en fonction des teneurs des phénols totaux.

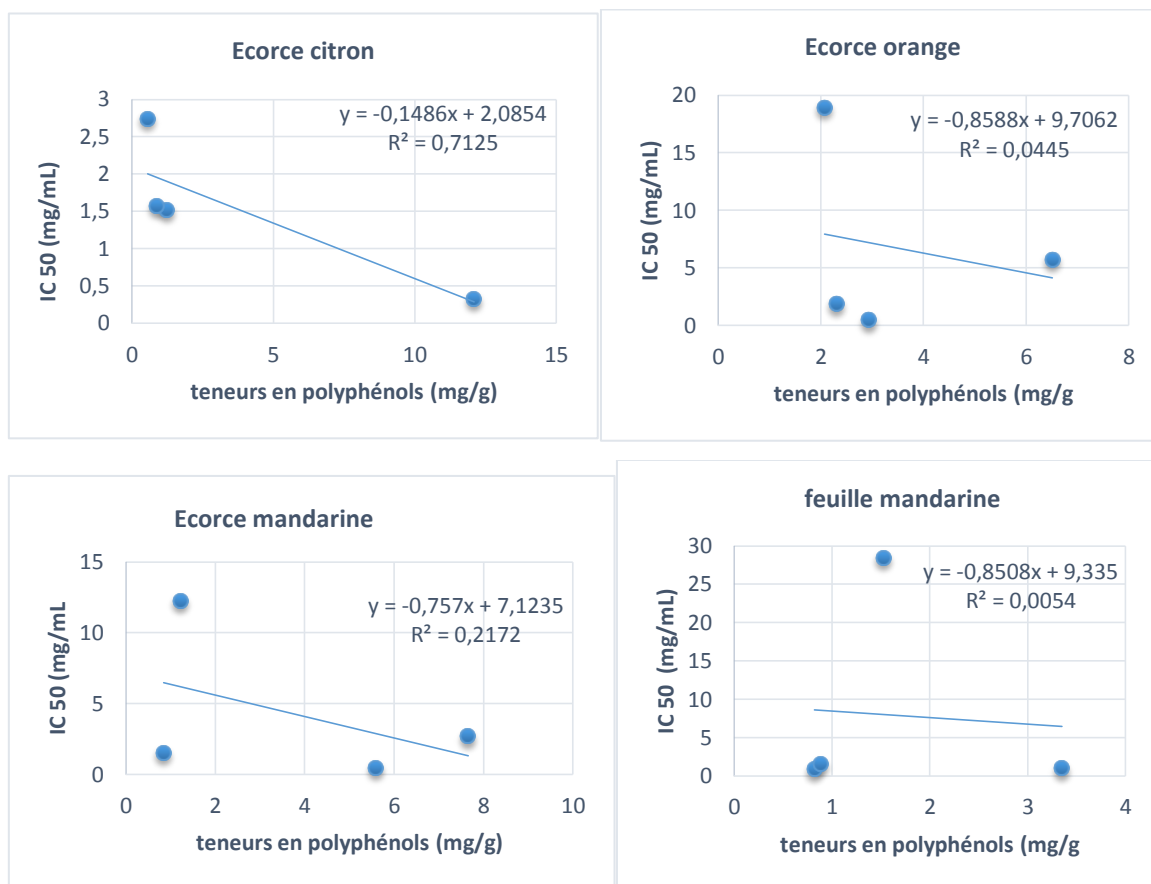


Figure 17. Variation des valeurs d'IC₅₀ en fonction des teneurs en phénols totaux.

Les tracés de la figure (17) montrent une bonne corrélation sur l'espèce *Citrus limon* écorce citron, entre l'activité antiradicalaire de nos extraits et leur teneur en phénols totaux, avec un coefficient de corrélation R²= 0,71.

Par contre *Citrus limon* (feuille) *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* ne présente pas de corrélation entre l'activité antiradicalaire de nos extraits et leur teneur en phénols totaux.

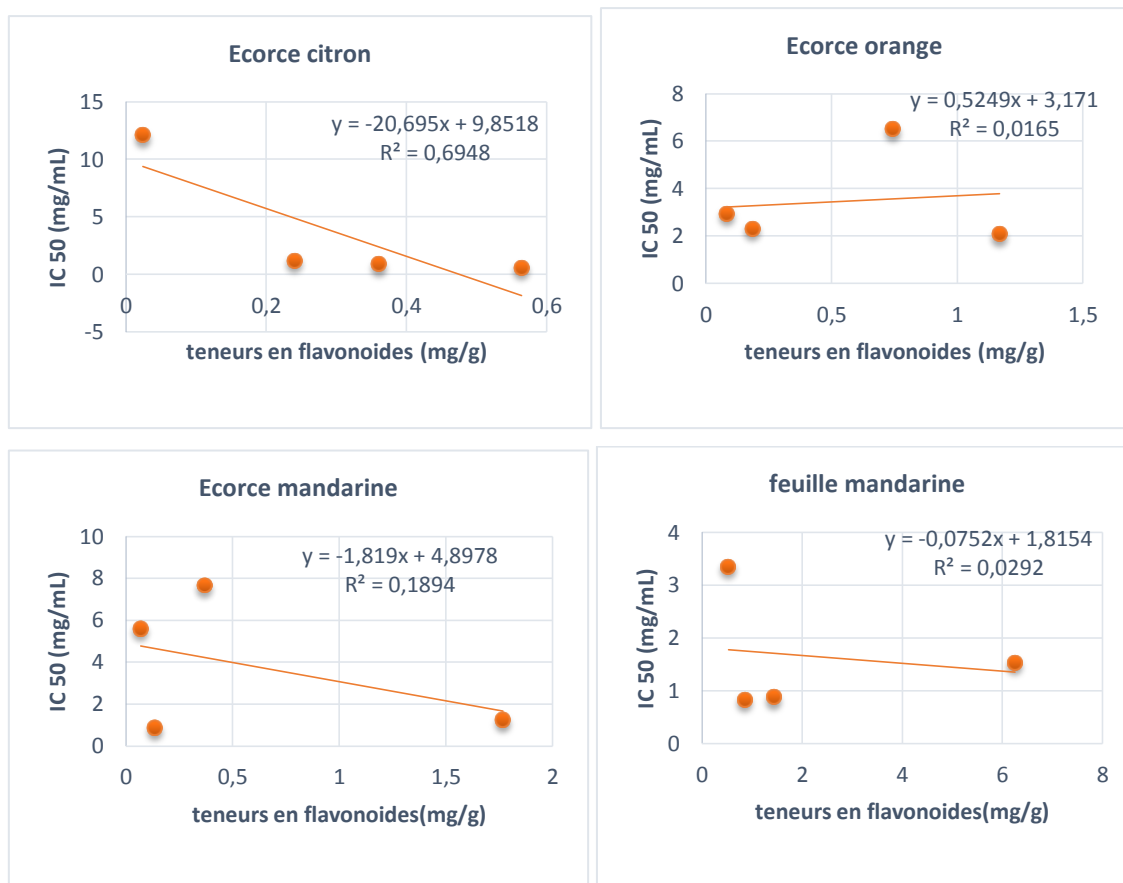


Figure 18. Variation des valeurs d'IC₅₀ en fonction des teneurs en flavonoïdes.

Seuls les phénols totaux, ont présenté de bonnes corrélations avec l'activité antioxydante qui a été faite par le test de DPPH (Figures17). Dans les flavonoïdes les corrélations sont plus faibles et dont le coefficient de corrélation le plus faible est de ($R=0,02$) (Figures18).

IV-5. Résultats du pouvoir antioxydant par le test du phosphomolybdate

Les courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en composés phénoliques issus d'une extraction hexanique et dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, éthanol et méthanol de différentes polarités sont présentées dans les (Figure 18 et Figure 19). De plus, nous avons tracé les courbes des antioxydants de synthèse (vitamine C),(l'acide gallique)et (quercétine)(Figure 24), afin de référer le pouvoir antioxydant de nos extraits à celui de la vitamine C.

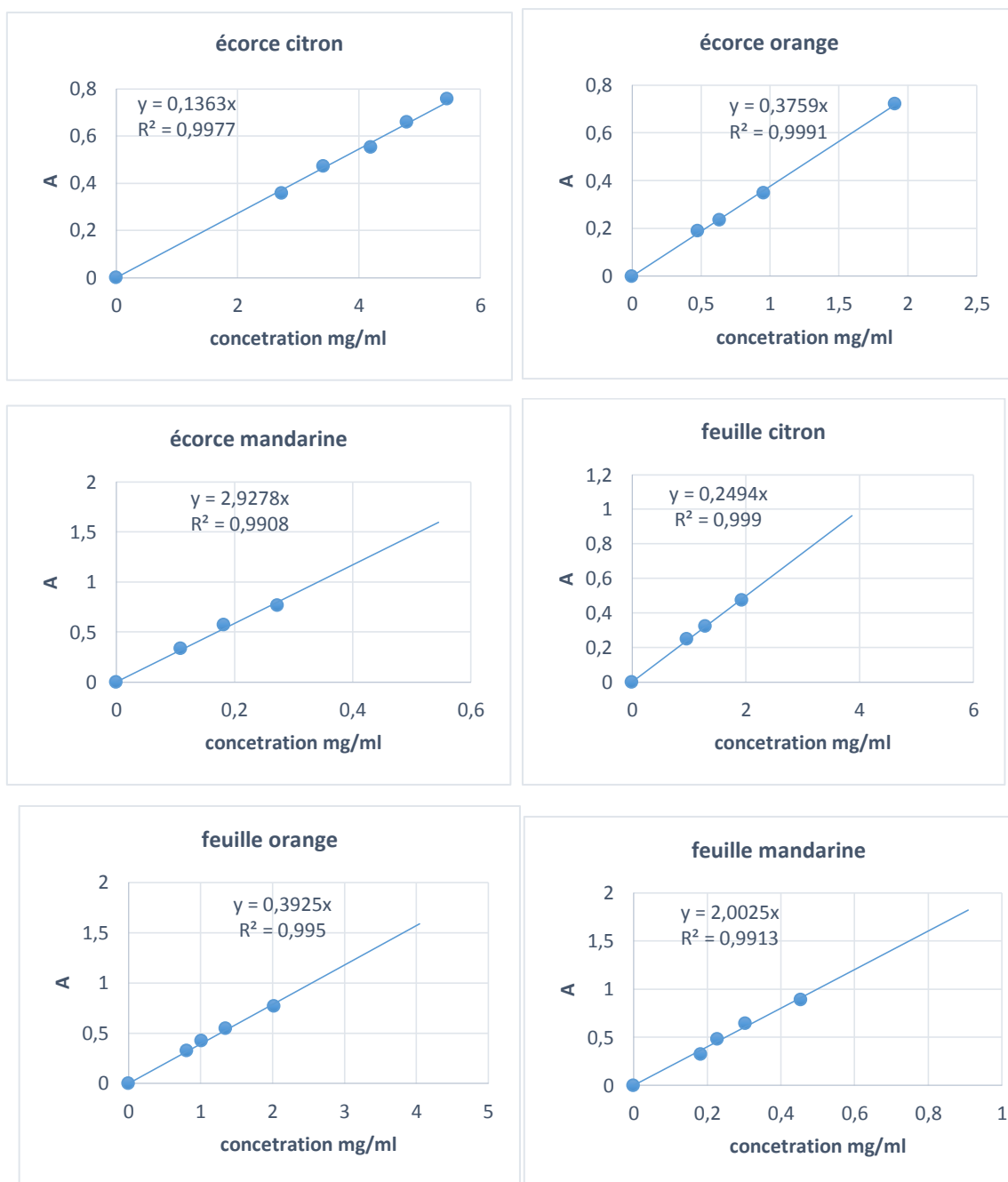


Figure 19. Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction hexanique.

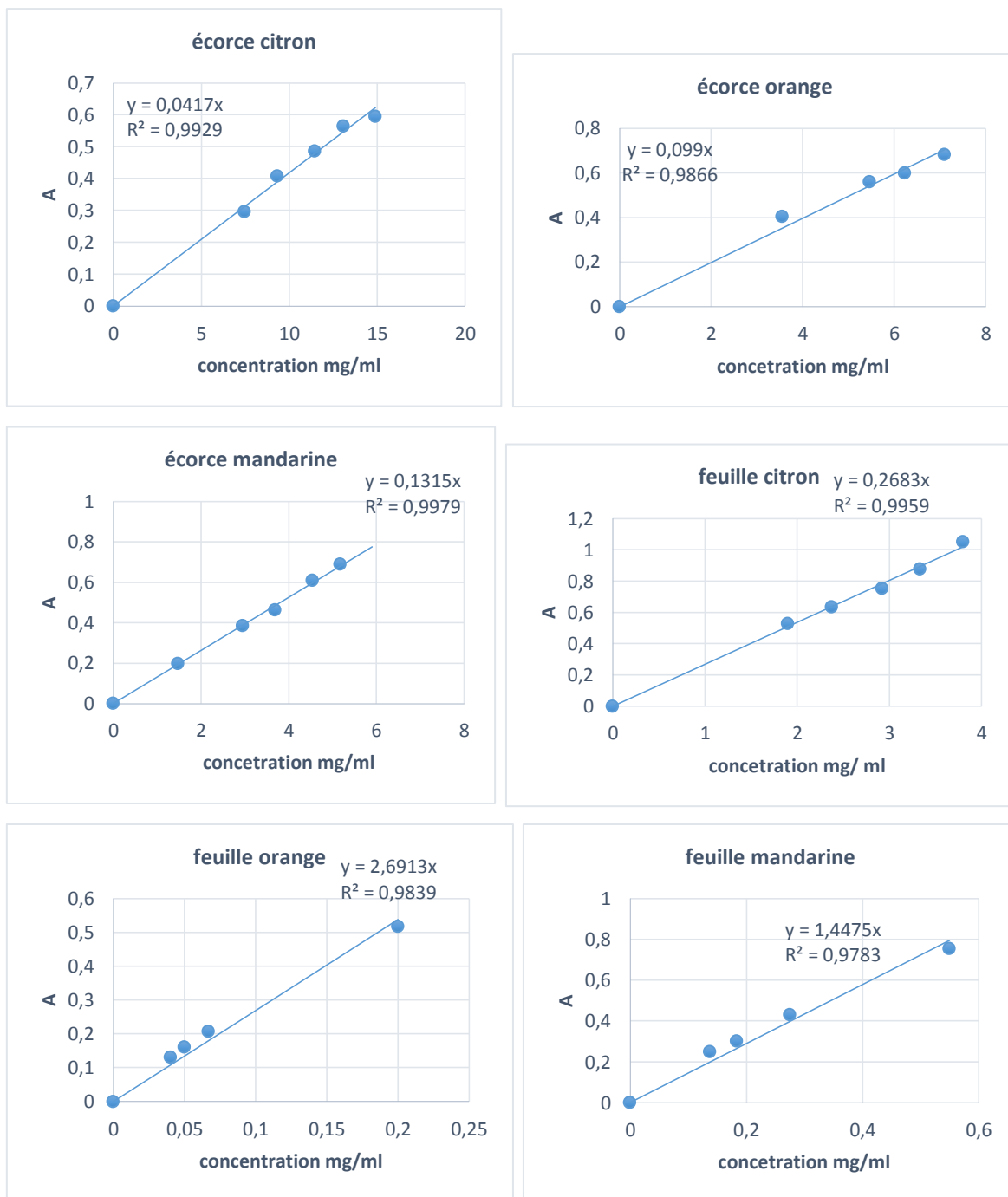


Figure 20. Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction dichlorométhane.

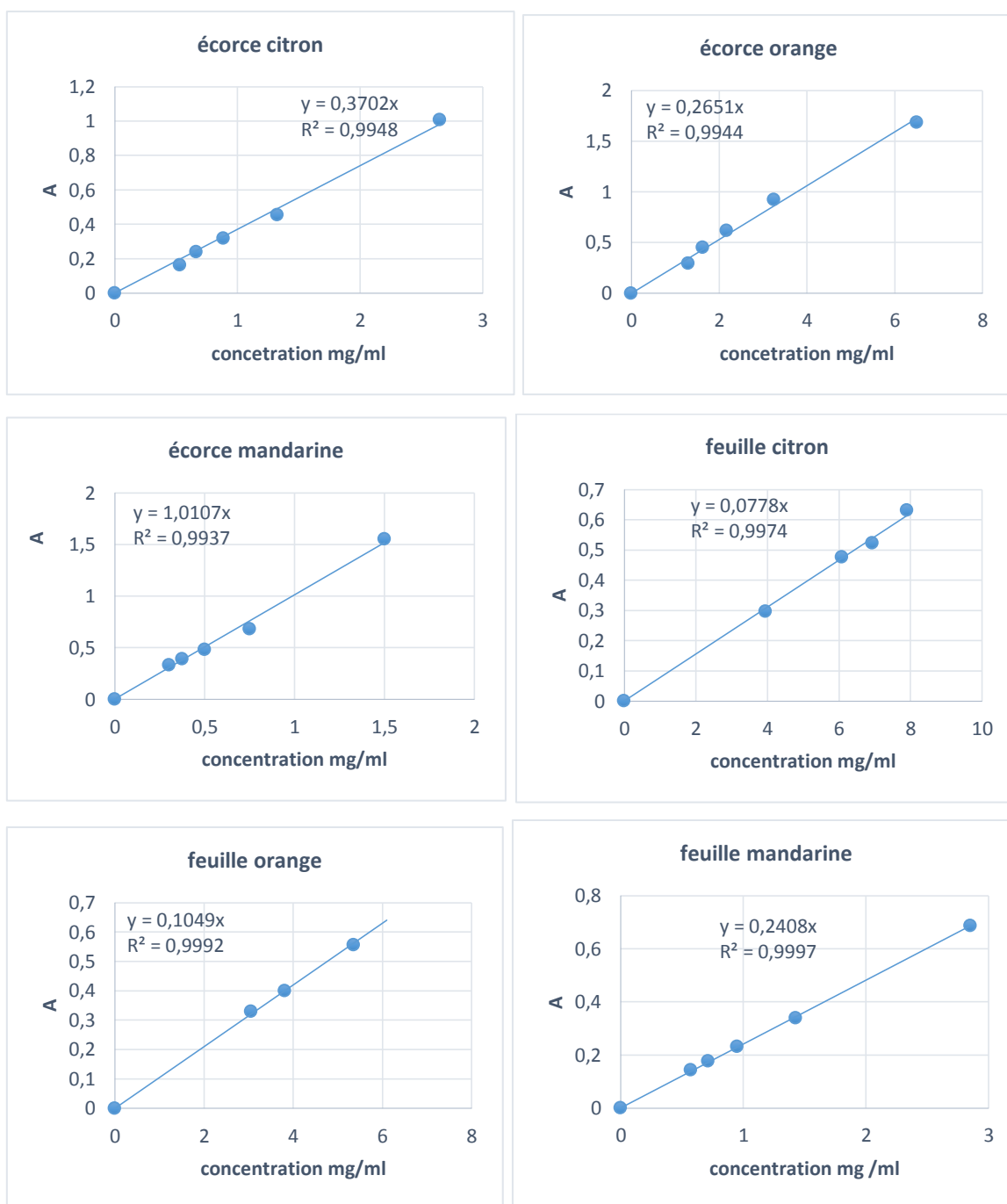


Figure 21. Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'acétate d'éthyle.

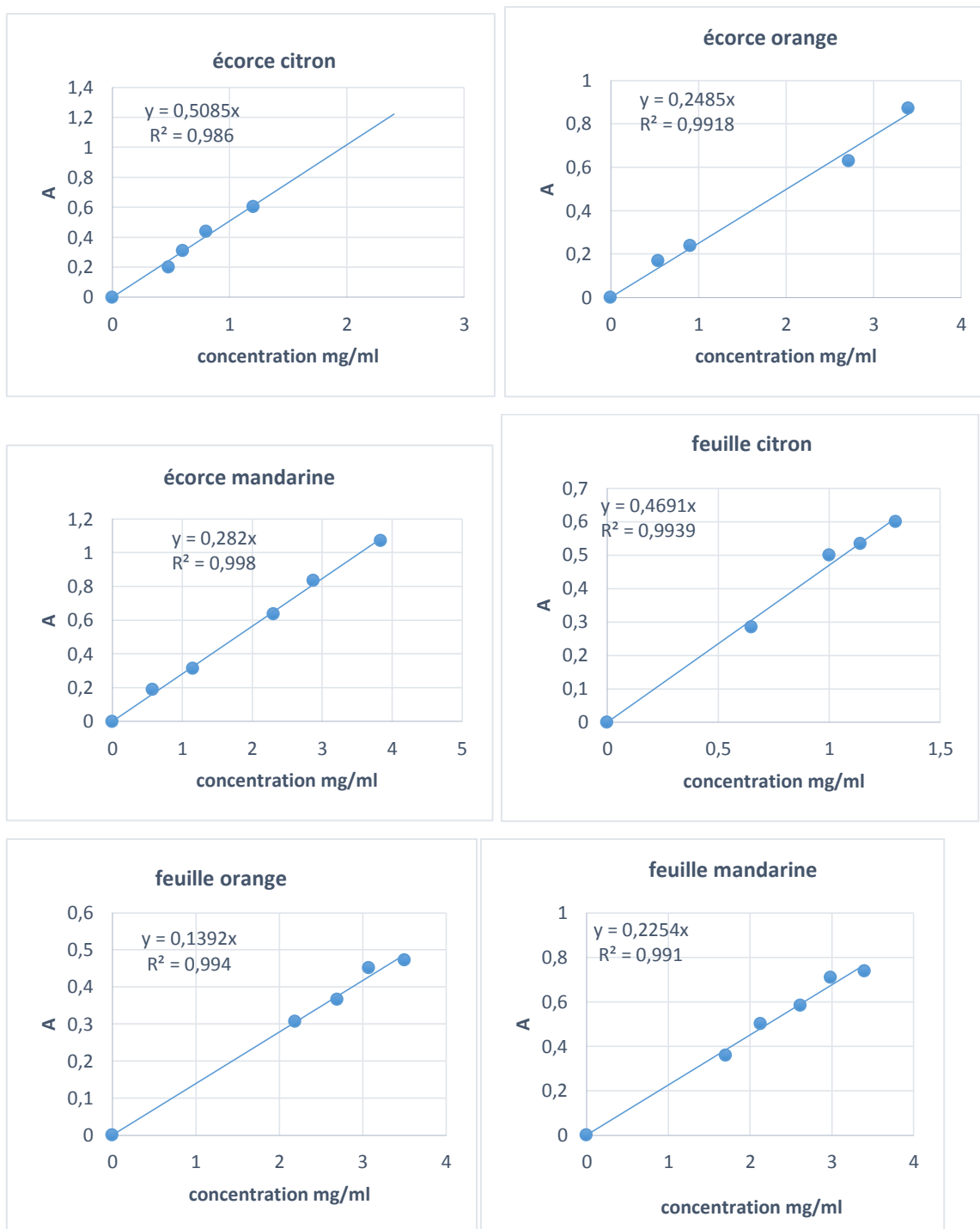


Figure 22. Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction d'éthanol

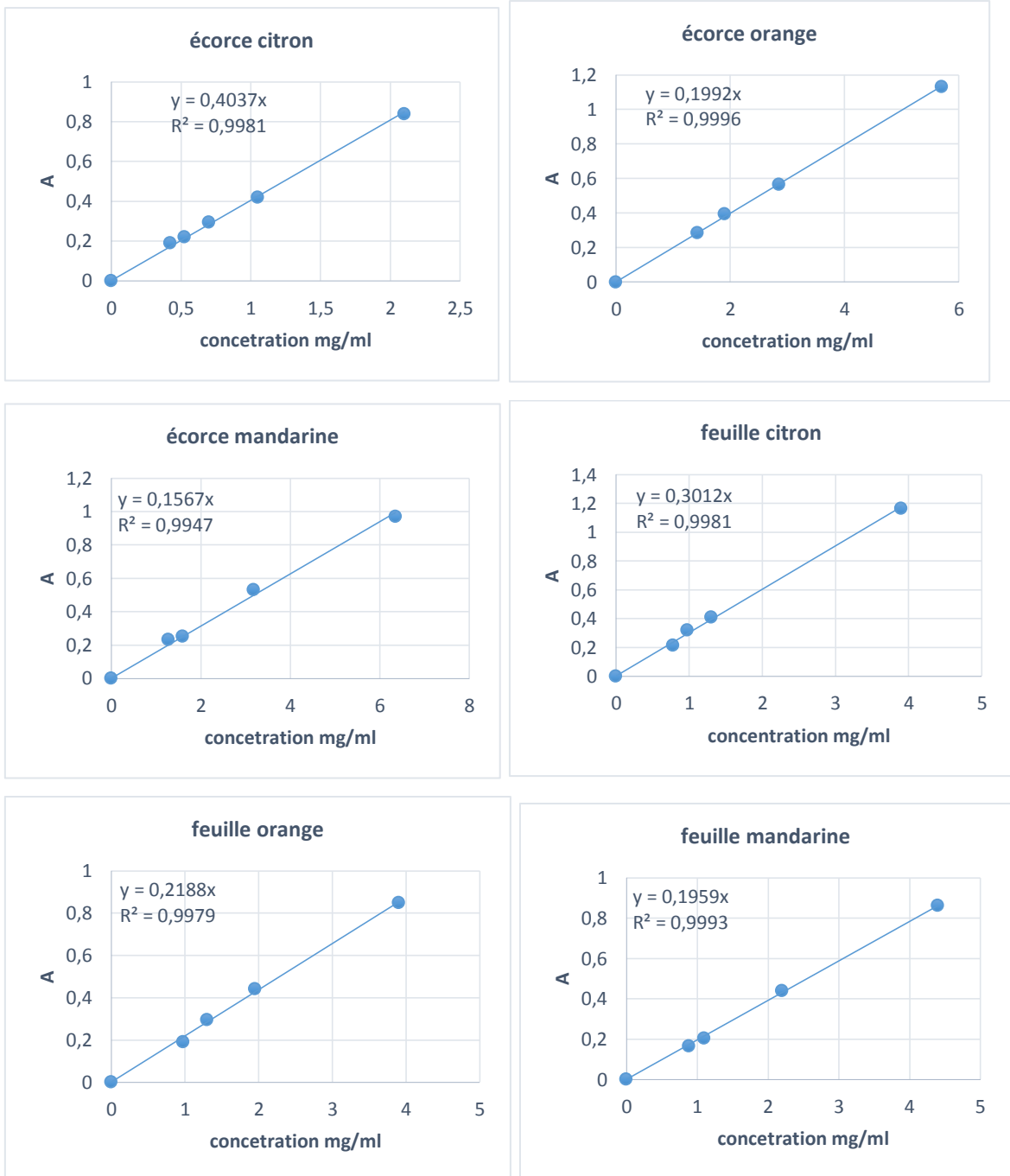
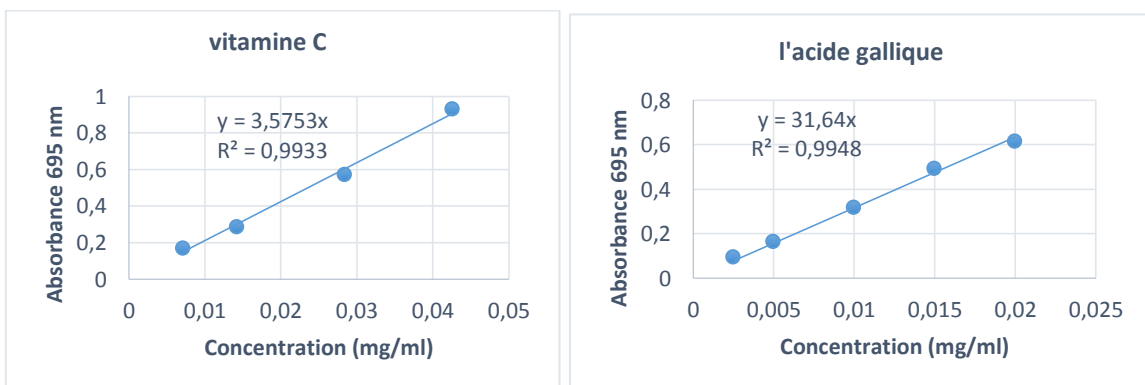


Figure 23. Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en phénols des extraits issus d'une extraction méthanol



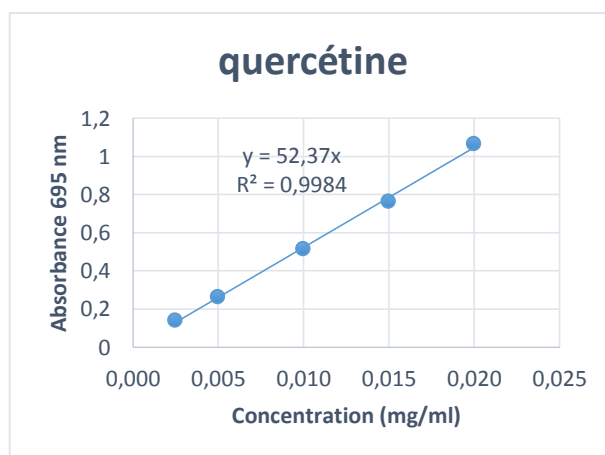


Figure 24. Courbes représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en antioxydants de référence.

L'activité antioxydante de nos extraits a été référée à celle de la vitamine C en termes d'équivalence. Donc, à partir des pentes tirées des graphes ci-dessus, nous avons calculé le paramètre VCEAC (Vitamin C Equivalent Antioxydant Capacity) pour chaque extrait (Tableau 07)

Tableau 07. Les valeurs Les VCEAC en (mg/mL) des différents extraits et les antioxydants standards

Nom de l'extrait	Nom de la plante	« VCEAC (mg/mL) »
Hexanique	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,04 ±0,004
	Feuilles	0,07±0,05
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,1±0,08
	Feuilles	0,1±0,08
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,8±0,002
	Feuilles	0,56±0,01
Dichlorométhane	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,01±0,04
	Feuilles	0,08±0,01
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,03±0,09
	Feuilles	0,75±0,03
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,04±0,004
	Feuilles	0,4±0,03
Acétate d'éthyle	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,1±0,009
	Feuilles	0,02±0,06
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,07±0,04
	Feuilles	0,03±0,01
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,28±0,02
	Feuilles	0,07±0,01

Ethanol	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	15,76±0,05
	Feuilles	27,34±0,03
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	2,15±0,007
	Feuilles	9,7±0,08
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	1,82±0,06
	Feuilles	15,89±0,01
Méthanolique	<i>Citrus limon</i>	
	Ecorce	0,11±0,02
	Feuilles	0,08±0,03
	<i>Citrus sinensis</i>	
	Ecorce	0,06±0,04
	Feuilles	0,06±0,05
	<i>Citrus reticulata</i>	
	Ecorce	0,04±0,04
	Feuilles	0,05±0,007
l'acide gallique		8,84±0,01
quercétine		14,74±0,02

Comme mentionné précédemment, nous avons déterminé le paramètre VCEAC pour les différents extraits. Ainsi, toutes les valeurs supérieures à un (1) indiquent une grande capacité antioxydante de nos fractions. D'après les résultats obtenus (Tableau 07), nous remarquons que l'ensemble des extraits éthanoliques montrent des activités antioxydantes importantes et dont les VCEAC varient globalement entre 1.82 à 15.89.

En analysant l'ensemble de nos résultats (Tableau 07) Nos résultats, montrent clairement que les feuilles de l'espèce *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* possèdent une grande capacité antioxydante comparable avec celui des écorces.

Dans le but de relier les activités antioxydantes qui ont été mises en évidence par le test du phosphomolybdate à la présence des composés phénoliques et flavonoïdes dans nos extraits. Nous avons essayé d'étudier les différentes corrélations possibles de nos extraits avec les différentes valeurs de VCEAC obtenues (Figures 25 et 26).

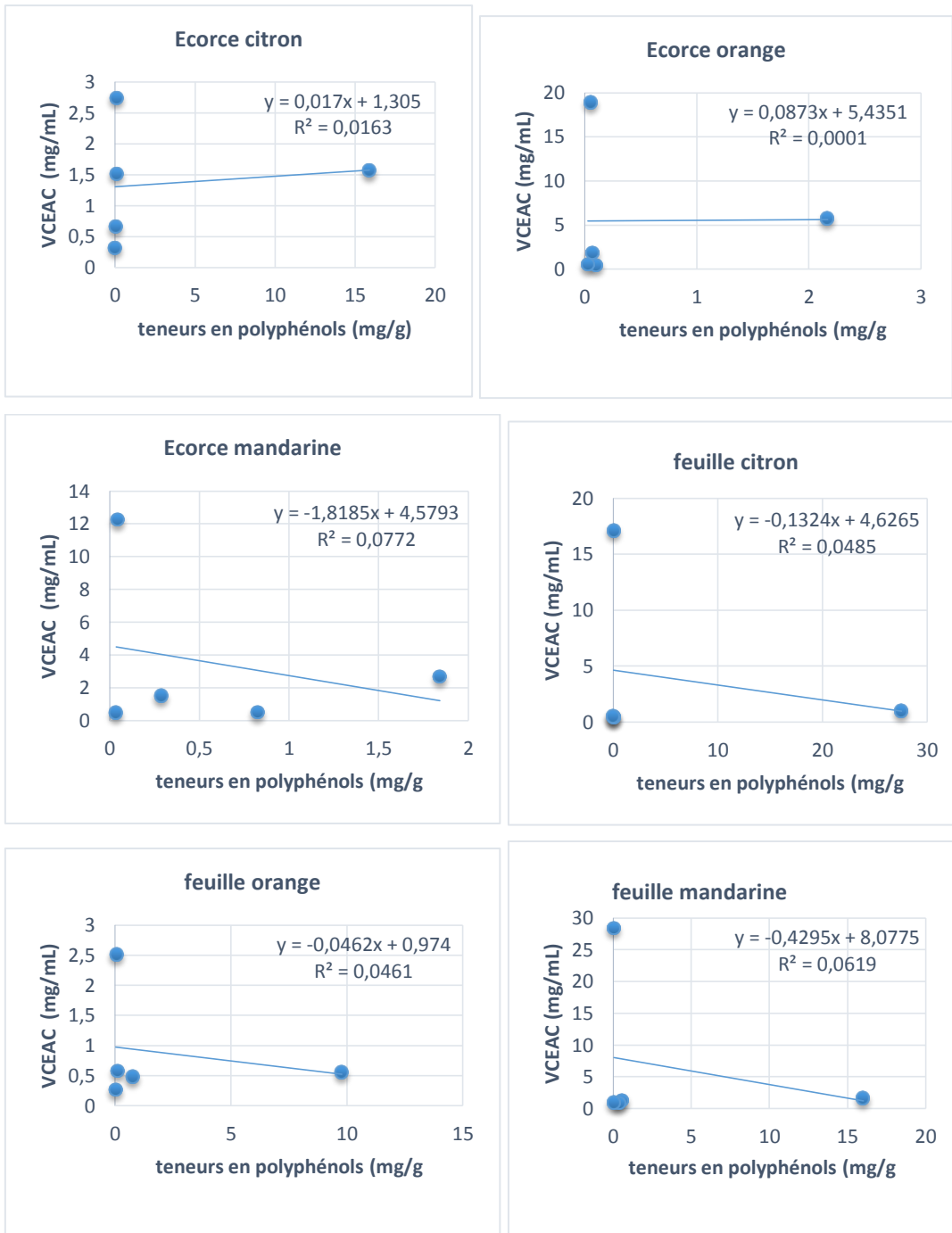


Figure 25. Variation des valeurs d’VCEAC en fonction des teneurs en polyphénols

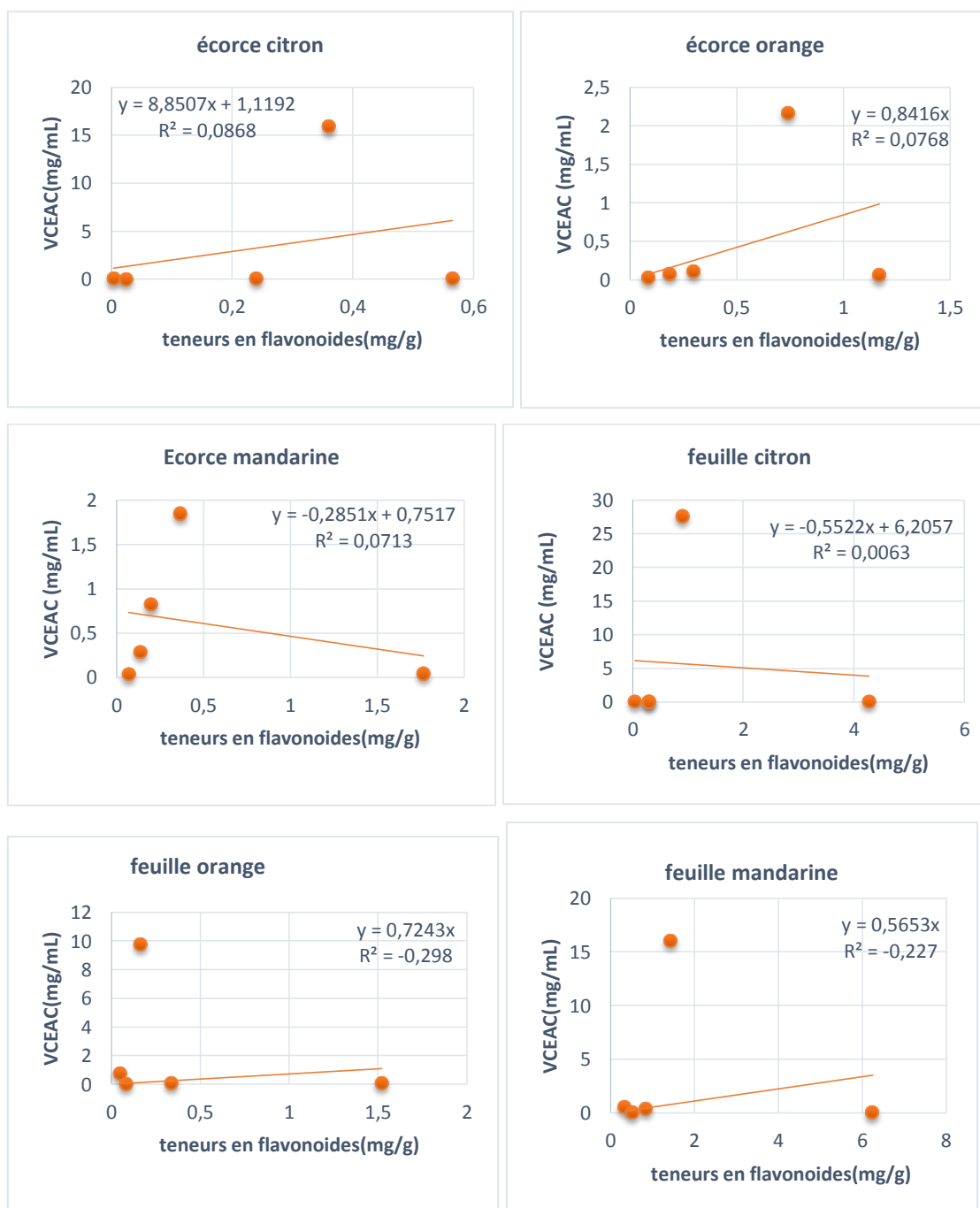


Figure 26. Variation des valeurs VCEAC en fonction des teneurs en flavonoïdes.

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent des faibles corrélations entre le pouvoir antioxydant et la quantité en phénols totaux et en flavonoïdes (Figures 25 et 26).

À travers notre étude de l'activité antioxydante *in vitro* sur les feuilles et les écorces de l'espèce *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*. Il nous a parus clairement, qu'une seule méthode ne peut pas suffire pour caractériser les propensions antioxydantes, et même ne peut pas donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante d'un extrait. Donc, l'utilisation de plus d'une méthode a été nécessaire pour permettre de mieux généraliser nos résultats. Au regard de ces résultats obtenus par les deux tests d'activités

antioxydantes, il nous paraît nettement que ceux-ci sont intéressants et intrigants. Et que les feuilles de l'espèce *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* représente activité antioxydantes importante en comparaison avec les écorces.

V. Conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie.

Les extraits naturels, représentent une source importante de substances et de composés bioactifs. À cet effet, par le présent travail l'étude des propriétés antioxydantes des extraits naturels des espèces *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* de la région de Laghouat a permis alors une initiation à l'évaluation des potentialités bioactives de ces espèces pour une étude chimique approfondie.

En premier lieu, différentes étapes d'extraction et de fractionnement (de différente polarité) impliquant l'utilisation de divers solvants ont été réalisées. Après extraction, nous avons quantifié la matière en phénols totaux, en flavonoïdes existant dans nos extraits. Les résultats montrent que notre plante est relativement riche en ces composés ; avec des teneurs qui varient de (0,26 et 28,36 mg GAE/g de la matière sèche et 0,004 et 6,25 mg EQ/g de la matière sèche.) pour les phénols totaux et les flavonoïdes respectivement.

Pour le test du DPPH, nous avons noté des valeurs d'EC50 comprises entre 0,51 mg/ml à 12,10 mg/ml, cette activité antioxydante vis-à-vis des radicaux DPPH. Ainsi, une forte activité antioxydante a été constatée par l'autre test avec des valeurs de VCEAC allant de 0,01 à 15,76 mg/ml du phosphomolybdate. Dans ces deux cas l'activité antioxydante, une corrélation négative entre l'activité antioxydante et la teneur en phénol totaux et flavonoïdes ont été établies dans ces deux tests.

Ce travail confirme de façon irréfutable les activités antioxydantes intéressantes des extraits phénoliques des trois espèces du genre *Citrus*. En plus, nous pouvons déduire de ce modeste travail que la polarité du solvant d'extraction influe principalement sur le rendement des extraits bruts ainsi que sur les teneurs en composés phénoliques totaux.

En perspectives, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur les écorces et les feuilles de *Citrus*. Il serait donc intéressant de pousser et approfondir ce travail par : L'étude d'autres espèces d'agrumes, des activités antibactériennes de *Citrus*, d'élargir la gamme des tests d'activités antioxydantes, de caractériser les composés phénoliques en utilisant des méthodes plus précises comme HPLC, LC-RMN pour identifier les composés bioactifs

A

Abd El-aal, H.A., Halaweish, F.T., 2009. Food Preservative Activity of Phénolique Compounds in orange peel extracts (*Citrus sinensis* L.). *Lucrări Științifice*. 53, 457- 464

Ahmad A, Shameem M, Husain Q. (2012). Relation of oxidant/antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma. *Ann. Thorac. Med.* 7, (4),226–232.

Albertini MV. 2016. Caractérisation biochimique et moléculaire des fruits d'agrumes. Modèle métabolique d'utilisation des acides organiques et des sucres, Université de Corse, 138p.

B

Bhat S. V., Nagasampagi B. A., et Sivakumar M. Chemistry of Natural Products. First Edition. 115pp

Boussoussa H. (2011). Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques des fleurs de *Rhanterium adpressum*. Thèse de magister. Université Amar telidji, Laghouat. 12 p.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris. 199-388 p.

C

C. Anthony., 2009. The internal and external use of medicinal plants, *Clinics in Dermatology*; 148–158 pp.

Castellucci A. (2010). Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de FolinCiocalteu. *Connaissance de la vigne et du vin*, 6, 405-413

D

Dewick P. M. (2001). Medicinal Natural Products. Wiley. 2nd Ed *Studies in Natural Products Chemistry*. Chapitre 6. 291p.

G

Gañan M., Martínez-Rodríguez A.J., et Carrascosa A. V. (2009). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*, *Food Control*. 739–742 pp.

Guimaraes, R., Barros, L., Barreira, J.C., Sousa, M.J., Carvalho, A.M. and Ferreira, I.C.F.R. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1): 99 – 106

H

Harris G.G., Brannan R.G. (2009). A preliminary evaluation of antioxidant compounds, reducing potential, and radical scavenging of pawpaw (*Asimina tribloba*) fruit pulp from different stages of ripeness. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 275–279

Hennebelle T. (2006). Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologique de Lille. France. 304 p.

Hesse M. (2002). Alkaloids – Nature's Curse or Blessing . 2 nd Ed . 413 p.

K

Katoh M., Matsune R., Nagase H., et Honda T. (2004). *Tetrahedron Lett.* 45, 6221.

Krishnaiah D., Sarbatly R., et Nithyanandam R. (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bio products processing*. 17p.

L

Langenheim J. H. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. 20: 1223-1280 p.

Li-ying N., Ji-hong W., Xiao-jun L., Fang C., Zheng-fu W., Guang-hua Z. et Xiaosong H. 2008. Physicochemical Characteristics of Orange Juice Samples From Seven cultivars. *Agricultural Sciences in China*. 7(1): 41-47.

M

Macheix J. J., Fleuriet A., et Allemand C. J., (2005). Les composés phénoliques des végétaux « un exemple de métabolites secondaires d'importance économique ». Ed Presse polytechniques et universitaires romandes. 6, 121 et 192 p.

Martin S., Andriantsitohaina R. 2002 Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. 51:304-315

Mazza G., Miniati E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. C Press Boca Raton. 12-18 p.

MEDDOUR A., YAHIA M., BENKIKI N., AYACHI A., 2013. Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa l. Lebanese Science Journal. Vol 14 (1): 52p.

N

Nicolas V. (1991). Huiles essentielles Production mondiale, échanges internationaux et évaluation des prix. 10^{ème} journée internationale des huiles essentielles. Actes, Ravista italiana Eppos. Numéro spécial 02/1992 : 534-539 p.

Nostro A., Germano M.P., d'Angelo V., et Cannatelli M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology. 379-384 p.

P

Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel 4, 25-39.

R

Rodriguez Vaquero M.J., Alberto M.R., et Manca de Nadra M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control. 93–101 p.

Ruan Z., Zhang L.L., et Lin Y.M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Activity of Syzygiumcumini leaves. *Molecules*. **13(10)**: 2545-2556 p.

S

Shimamura T., Zhao W., et Hu Z. (2007). Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Antiinfective Agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 57-62 p.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178

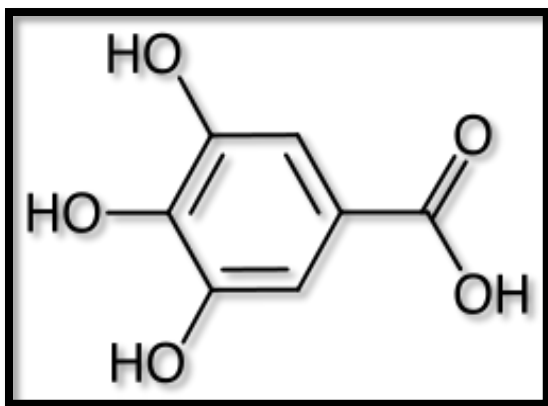
T

Tachakittirungrod S., Okonogi S., et Chowwanapoonpohn S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*. 381–388 p.

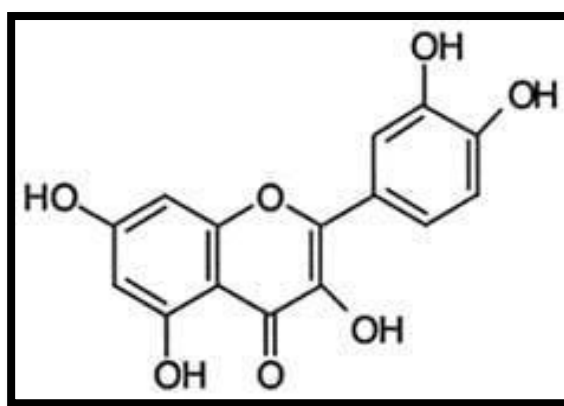
Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A., 2005. *Plantes aromatiques*. Ed. Tec et Doc-Lavoisier, Paris. Pp: 60: 79

V

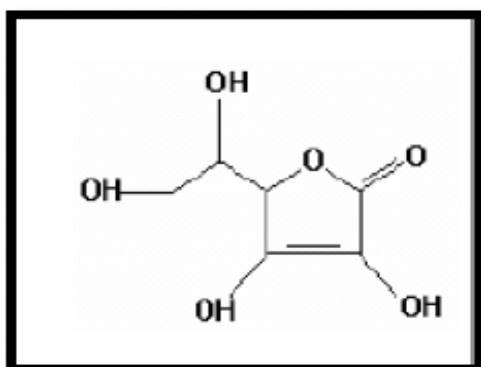
Van Vuuren S.F. (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 462–472 p.



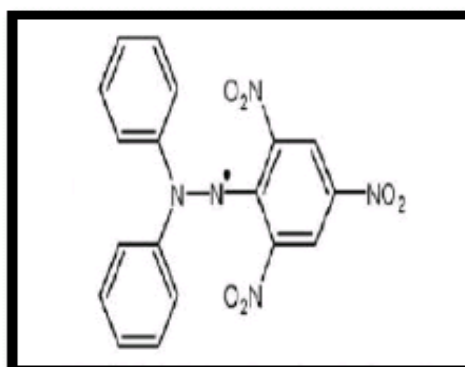
Acide gallique



quercétine



Vitamine C



DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Résumé

Les extraits naturels, issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques qui possèdent des capacités antioxydantes.

A cet effet, le présent travail a été consacré à la valorisation des extraits naturels de l'espèce *Citrus limon*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* par l'étude de son pouvoir antiradicalaire.

La première partie de ce travail, est consacrée à l'extraction des principes actifs en utilisant des différentes étapes d'extraction et de fractionnement (de différente polarité) impliquant divers procédés et solvants ont été réalisées.

La deuxième partie de cette étude, concerne l'extraction et la quantification des composés phénoliques, des flavonoïdes. Les résultats obtenus reflètent que les extraits méthanolique de ces espèces sont relativement riches en composés phénoliques. Dans la deuxième partie, nous avons évalué le pouvoir antiradicalaire et antioxydant de nos extraits phénoliques par le test du DPPH, le test du phosphomolybdate. Les résultats confirment que nos extraits possèdent des activités antioxydantes intéressantes.

A travers ces expériences, nous concluons que l'efficacité antioxydante n'est pas liée à une grande quantité de composés phénoliques, et par conséquent d'autres études sont alors nécessaires pour élucider les structures des composés phénoliques responsables de l'activité antioxydante.

Mots clés : *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, composés phénoliques, flavonoïdes, pouvoir antioxydant.

Summary

The natural extracts from medicinal plants contain a variety of phenolic compounds, which possess antioxidant capacities. For that purpose, the present work is dedicated to the evaluation of natural extracts of *Citrus limon*, *Citrus sinensis* and *Citrus reticulata* by the study of its antiradical power.

The first part of this work is devoted to the extraction of the active ingredients using different extraction and fractionation steps (of different polarity) involving various processes and solvents were carried out.

The second part of this study concerns the extraction and quantification of phenolic compounds, flavonoïds. Results show that methanolic extracts of *citrus* are relatively rich in total phenols. In the second part, we studied antioxidant and radical scavenging activities using DPPH radical scavenging, phosphomolybdenum. Results have shown that our extracts possess a potential antioxidant power.

Through these experiments, we conclude that the antioxidant efficiency is not related to the quantity of phenolic compounds, and consequently other studies are then necessary to determine the structures of phenolic compounds which are responsible for the antioxidant activity.

Key words: *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, phenolic compounds, flavonoïds, antioxidant activity.

ملخص

تحتوي المستخلصات الطبيعية للنباتات على مجموعات متنوعة من المركبات الفينولية التي تمتلك قدرات مضادات للأكسدة تحقيا لهذه الغاية. تم تكريس العمل الحالي لتثمين المستخلصات الطبيعية من النوع *Citrus limon*, *citrus sinensis*, *Citrus reticulata* يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج وتقدير المركبات الفينولية والفلافونويد. النتائج التي تم الحصول عليها تعكس أن المستخلصات الميثانولية من هذه الأنواع غنية نسبيا. بالمركبات الفينولية.

الجزء الثاني، قمنا بتقييم قوة مضادات الأكسدة من مستخلصات الفينول لدينا من خلال اختبار DPPH، واختبار phosphomolybdate. تؤكد النتائج أن مستخلصاتنا لها أنشطة مضادات للأكسدة مثيرة للاهتمام.

من خلال هذه التجارب، نخلص إلى أن فعالية مضادات الأكسدة لا ترتبط بكمية كبيرة من المركبات الفينولية، وبالتالي هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتوضيح بنى المركبات الفينولية المسؤولة عن النشاط المضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, المركبات الفينولية، الفلافونويد، الطاقة المضادة للأكسدة.

