



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de chimie

MÉMOIRE DE MASTER

Sciences de la matière
Chimie
Chimie pharmaceutique

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Said Asma et Djouadi Djihane

Effets des solvants d'extraction sur la composition chimique de deux fruits de l'hiver : *Citrus sinensis* et *Citrus limon*

Jury :

Dr. Kribaa oumkaltoum	MC	Université de Biskra	président
Dr. Laraoui Habiba	MC	Université de Biskra	Examineur
Dr. BOUBAKRI Chérifa	MC	Université de Biskra	Encadreur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Nous tenons tout d'abord remercier ALLAH de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme ce présent travail

Nos sincères remerciements à Docteur Boubékri Chérifa, qui nous a guidé dans ce travail, Nous tenons ici, à lui témoigner toute notre reconnaissance pour le suivi, les conseils et les directives dont elle n'a omis, à tout moment de nous faire part

Nous remercions également tous les ingénieurs du laboratoire pédagogique de l'Université de Biskra, pour leurs aides techniques et leur disponibilité

Nous tenons à remercier vivement les membres de jury qui ont bien accepté d'examiner le présent mémoire

Nous tenons également à exprimer nos vifs remerciements à tous nos amis, L'ensemble des enseignements ayant contribué de près ou de loin à notre formation.

Dédicaces

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions je dédie ce travail à ma source de mon bonheur mes chers parents

Sans eux je n'ai pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études.

À mes adorables sœurs :Imen ,Hana et Sarah.

À mes neveux :Amir et Anis .

À ma nièce : Dalia.

À mes chères copines :Djihane , Chahinez.

Au quels je souhaite une très bonne continuation Et réussite dans la vie

À ma chère binôme Asma, ma douce sœur qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire et qui m'a encouragé pendant tous les moments je t'aime beaucoup ma chère Et tous mes amis sans aucune exception.

Djihane

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions je dédie ce travail à ma source de mon bonheur mes chers parents Sans eux je n'ai pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études.

À mes adorables sœurs : Manel, khawla, imen

À mes chers frères : siraj, mohamed, mouez

À mes chers copines : djihen, chahinaz.

Au quels je souhaite une très bonne continuation Et réussite dans la vie

À ma chère binôme Djihen, ma douce sœur qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire et qui m'a encouragé pendant tous les moments je t'aime beaucoup ma chère Et tous mes amis sans aucune exception.

ASMA

ملخص

يمثل هذا العمل البحثي الدراسة النوعية والكمية حول الحمضيات المزروعة في منطقة بلدية، الطرق المستخدمة هي اختبارات الكشف عن المركبات الفعالة و المركبات الثانوية باستعمال المواد الكيميائية التي تركز على ظهور أو اختفاء اللون وتأثير مذيب الإستخلاص على التركيبة الكيميائية لهذين الفاكهتين. الإختبار اللوني لفولن – سيوكالتو استعمل من أجل تكميم كمية الفينولات الكلية، طريقة ثلاثي كلوريد الألومنيوم لتحديد كمية الفلافونويدات الكلية وطريقة أسيتات الصوديوم لتحديد كمية الفلافونولات الكلية. تم تقييم الفعالية المضادة باستعمال اختبار الجذر الحر DPPH . النتائج كانت جد معتبرة.

الكلمات المفتاحية : الحمضيات، اختبار الكشف الأولي، الإستخلاص، البوليفينولات الكلية، الفلافونيدات الكلية، الفلافونولات الكلية، DPPH ، الفعالية المضادة للأكسدة.

Résumé

Ce travail de recherche représente une étude qualitative et quantitative sur les agrumes cultivées dans la région de Blida, Les méthodes utilisées sont : les tests de criblage phytochimique sur les métabolites secondaires en utilisant les réactifs chimiques, qui sont basé sur l'apparition ou la disparition de la couleur et l'effet du solvant d'extraction sur la composition chimique de ces deux fruits. Le test colorimétrique de Folin-Ciocalteu a été utilisé pour quantifier les polyphénols totaux, la méthode du trichlorure d'aluminium pour quantifier les flavonoïdes totaux et la méthode d'acétate de sodium pour quantifier les flavonols totaux. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test du radical libre DPPH. Les résultats ont été très significatifs.

Mots clés : Agrumes, criblage phytochimique , extraction, polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux, DPPH, activité antioxydante.

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
ملخص	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des symboles.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	
Chapitre I : Généralités sur les agrumes	1
Introduction	1
I.1 Historique.....	1
I.2 Définition des agrumes	2
I.2.1. Orange	3
I.2.1.1. Classification	3
I.2.2 Citron	4
I.2.2.1. Classification	4
I.3. Origine et diffusion.....	4
I.4 Structure.....	5
I.4.1 Oranges	5
I.4.2 Citron.	5
I.5. Description morphologique et physiologique	6
I.6. Diversité des agrumes.....	6
I.7. Composition Chimique	7
I.7.1. Oranges	7
I.7.2 Citron	8
I.8. Les agrumes dans le monde	9
I.9 En Algérie	10
I.10 L'utilisation des agrumes	10
I.10.1. Utilisation et effets thérapeutiques des fruits de genre Citrus.....	10
I.10.3. Huiles essentielles.....	12
I.10.4. Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques	12

I.10.4.1. Domaines d'application et intérêt phytothérapie	12
I.11. Les antioxydants des citrus	13
I.11.1. Définition	13
I.11.1.1. Selon l'origine.....	13
I.11.1.2 Selon leur mode d'action.....	14
I.11.2. Radicaux libres	14
I.11.2.1. Définition.....	14
I.11.2.2. Formation des radicaux libres.....	14
I.11.3. Caroténoïdes	15
I.11.4. L'acide ascorbique	16
Chapitre II : Principales classes des métabolites secondaires	17
Introduction	17
II.1 Définition.....	17
II.2 Classification des métabolites secondaires.....	17
II.2.1. Composés phénoliques :	18
II.2.1.1. Définition	18
II.2.1.2. Localisation	18
II.2.1.3. Rôle et intérêt des composés phénolique	18
II.2.1.4. Principales classes des composés phénoliques.....	19
II.2.1.4.1. Acides phénoliques	19
II.2.1.4.2. Flavonoïdes	20
II.2.1.4.3. Tannins.	22
II.2.1.4.4. Coumarines.....	23
II.2.1.4.5. Saponines	25
II.2.2. Alcaloïdes	26
II.2.2.1. Classification des alcaloïdes	27
II.2.2.2. Propriétés thérapeutiques des alcaloïdes.....	28
II.2.3. Terpènes et stérols	28
II.2.3.1. Terpènes	28
II.2.3.1.1. Classification des terpènes	29
II.2.3.2. Stérols	30

II.2.3.3. Intérêts des terpènes et des stérols	31
II.2.4. Huiles essentielles	32
II.2.4.1 Huile essentiel des agrumes	32
II.2.4.2 Composition chimique	33
II.2.4.3 Répartition et localisation	35
II.2.4.4. Domaines d'application et intérêt phytothérapie.....	37
II.2.4.5. Toxicité des huiles essentielles	37
II.2.4.6. Méthodes d'extraction	38
II.2.4.6.1 Extraction par hydrodistillation :	38
Chapitre III: Matériels et méthodes.....	40
III.1.Matériels.....	40
III.1.1. Matière végétale	40
III.1.2. Echantillonnage :.....	41
III.1.3. Réactifs chimiques	41
III.1.4 Matériels du laboratoire.....	41
III.1.5. Appareillage.....	42
III.2.Méthodes	42
III.2.1. Criblage phytochimique	42
III.2.1.1. Préparation des extraits.....	42
III.2.1.2.Test Phytochimiques	42
II.2.2. Extraction et dosage des composes phénoliques.....	44
II.2.2.1.Extraction par maceration	44
III.2.2.2. Détermination du rendement d'extraction :.....	45
III.2.2.3. Quantification des composés phénoliques :.....	46
III.2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test DPPH :	51
III.2.3. Extraction des huiles essentielles des citrus par hydrodistillation	52
Chapitre IV : Résultats et discussion.....	55
IV.1. Criblage phytochimique :.....	55
IV.1.1.Criblage phytochimique pour les extraits du citron et des oranges dans les quatre solvants.....	55
IV.2. Rendement de l'extraction par macération	57
IV.3. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	58

IV.3.1. Teneurs en polyphénol totaux.....	58
IV.3.2. Teneurs en flavonoïdes totaux.....	61
IV.3.3. Teneurs en flavonols totaux.....	63
Interprétation des résultats	66
IV. 3.4 Evaluation de l'activité antioxydante	66
IV.3.4.1Méthode chimique :.....	66
Conclusion générale	69
Bibliographie.....	
Annexes	

Liste des abbreviations

Abs : Absorbance

F.A.O: Food and Agriculture Organization.

UV-VIS : Ultra-violet visible

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

I : Inhibition

HES :Huile essentielle

Liste des symboles

Al : Aluminium

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

C : Carbone

CH₃CH₂OH : Ethanol

CHCl₃ : Chloroforme

C₂H₃NaO₂ : Acétate de sodium

C₂H₄O₂ : Acide acétique

C₅H₈ : Isoprène

C₆H₁₄ : Hexane

cm : Centimètre

FeCl₃ : Chlorure ferrique

g : Gramme

H : Hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

H₂O : Eau

H₂SO₄ : Acide sulfurique

Kg : kilogramme

mg : milligramme

mg EAG/g : Milligramme équivalent de l'acide gallique par gramme

mg EQ/g : Milligramme équivalent de quercétine par gramme

mg ER/g : Milligramme équivalent de rutine par gramme

ml : Millilitre

Liste des symboles

mm : Millimètre

NaOH : Hydroxyde de sodium

nm : Nanomètre

μl : Microlitre

R % : Rendement en pourcentage

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1 : Origine géographique et diffusion des agrumes dans le monde.	2
Figure I.2 : Feuilles, fleurs et fruits d'oranger..	3
Figure I.3 : Feuilles, fleurs et fruits de citron.....	4
Figure I.4 : Coupe transversale schématique d'une orange (a) et détails (b).....	5
Figure I.5 : Citron jaune en coupe transversale et citron jaune entier.	6
Figure I.6 : Les agrumes dans le monde.	9
Figure I.7 : Principales espèces d'agrumes en Algérie.	10

Chapitre II

Figure II.1 : Structure chimique de quelques acides phénoliques.....	19
Figure II.2 : Structure de base des flavonoides.	20
Figure II.3 : Tanins condensés	22
Figure II.4 : Tanins galliques	23
Figure II.5 : Tanins élagiques	23
Figure II.6 : Structure de coumarine simple.	24
Figure II.7 : Exemples de coumarine complexe .a) Furanocoumarine, b) Pyranocoumarine. .	24
Figure II.8 : Structures des saponines. (a) Ginsenoside, (b) Diosgenin, (c) Gymnemagenin...	25
Figure II.9 : Structure de quelques alcaloïdes vrais.	27
Figure II.10 : Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.	27
Figure II.11 : Exemple des proto-alcaloïdes	28
Figure II.12 : Structure de la molécule d'isoprène	29
Figure II.13 : Classification des composés terpéniques	29
Figure II.14 : Quelques exemples de stéroïdes.	31
Figure II.15 : Les composés majoritaires de l'huile essentielle de citrus.	34
Figure II.16 : Quelque exemple de Les structures rencontrées dans les huiles essentielles. ...	35
Figure II.17 : Coupe transversale de l'épicarpe d'une orange.	36
Figure II.18 : Poche sécrétrice dans le fruit du citronnier, <i>Citrus limon</i> , Famille Rutacées, coupe transversale x 25. Sous le microscope photonique.....	36

Figure II.19 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation.....39

Chapitre III

Figure III.1 : Orange et citron.....40

Figure III.2 : Protocole d'extraction par macération de l'orange et du citron.....45

Figure III.3 : Protocole de dosage des polyphénols totaux.....47

Figure III.4 : Réaction entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes.....48

Figure III.5 : Protocole de dosage des flavonoïdes totaux.....49

Figure III.6 : Protocole de dosage des flavonols totaux50

Figure III.7 : Structure chimique du radical libre DPPH.....51

Figure III.8 : Réduction du radical DPPH52

Figure III.9 : Montage de l'hydrodistillation54

Figure III.10 : Ampoule à décanter (séparation des phases).....54

Chapitre IV

Figure IV.1 : Rendement des extraits éthanoliques de l'orange et du citron.....58

Figure IV.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....59

Figure IV.3 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons
.....60

Figure IV.4 : Courbe d'étalonnage de la rutine.62

Figure IV.5 : Teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons
.....63

Figure IV.6 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....64

Figure IV.7 : Teneur en flavonols totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons
.....65

Figure IV.8 : Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait de
l'orange67

Figure IV.9 : Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait de
citron.....67

Figure IV.10 : Comparaison entre IC50 dans les différents extraits68

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 : Principaux composés d'orange.....	7
Tableau I.2 : Composition biochimique moyenne du citron.....	8
Tableau I.3 : Evaluation d'inhibition de l'orange	66

Chapitre II

Tableau II.1 : Structures des différentes classes des flavonoïdes	21
Tableau II.2 : Activités des composés phénoliques	26

Chapitre III

Tableau III.1 : Réactifs chimiques	41
Tableau III.2 : Matériels du laboratoire.....	41

Chapitre IV

Tableau IV.1 : Résultats des tests phytochimiques préliminaires des extraits des citrons.....	55
Tableau IV.2 : Résultats des tests phytochimiques préliminaires des extraits des oranges	56
Tableau IV.3 : Rendement des extraits d'éthanol des oranges et des citrons.....	57
Tableau IV.4 : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.....	59
Tableau IV.5 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits éthanoliques des oranges et des citrons	59
Tableau IV.6 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits d'éthanol de citron et orange..	60
Tableau IV.7 : Absorbances de la gamme de concentration de la rutine	61
Tableau IV.8 : Teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits éthanolique des oranges et des citrons	62
Tableau IV.9 : Teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits d'éthanol	63
Tableau IV.10 : Absorbances de la gamme de concentration de la quercétine	64
Tableau IV.11 : Teneur en flavonols totaux dans les extraits éthanolique des oranges et des citrons	65
Tableau IV.12 : Teneur en flavonols totaux dans les extraits d'éthanol.....	65

Liste des tableaux

Tableau IV.13 : Evaluation d'inhibition du citron	67
Tableau IV.14 : Valeurs des IC ₅₀ pour les extraits des oranges et des citrons	67



Introduction générale

Les agrumes de la famille des *Rutacées* sont les plus répandus dans le monde, ils représentent un secteur important dans le domaine d'agro-alimentaire. Ils offrent ainsi une grande étendue d'utilisation allant, de la consommation à l'état frais à la transformation en jus, confits ou liqueurs mais aussi à l'extraction de leurs essences à partir des écorces, qui sont composés essentiellement du limonène [1]. Pour des raisons économiques et écologiques, il est préférable pour l'extraction du limonène d'utiliser des sous produits de l'industrie des jus d'agrumes. L'Algérie compte parmi les pays producteurs et transformateurs d'agrumes notamment les oranges. La quantité d'oranges produite et celle transformée en jus et confitures par l'Algérie sont estimées respectivement à 415 et 22 mille tonnes durant la période allant de 2011 à 2012 [2].

L'industrie de fabrication des jus à partir des agrumes rejette annuellement des tonnages énormes des sous-produits qui peuvent constituer une source intéressante de matières premières pour la production du limonène, qui est le constituant majoritaire des huiles essentielles d'agrumes environ 95 % [3].

Les écorces d'agrumes sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leurs activités antioxydantes, thérapeutiques, antivirales, antifongiques et antibactériennes [4].

L'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique [5].

Notre travail de recherche concerne d'un côté une évaluation qualitative de la composition chimique de la plante en faisant un criblage phytochimique, et d'un autre côté une estimation quantitative des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavonols totaux contenus dans les extraits éthanoliques de la pulpe des *citrus* de région de Blida.

Ce travail de recherche est divisé en deux grandes parties : partie bibliographique et partie expérimentale.

La partie bibliographique de cette étude inclue deux chapitres :

Dans le premier chapitre, nous nous sommes intéressés à citer des connaissances bibliographiques concernant les agrumes et les propriétés antioxydantes.

Le deuxième chapitre a été consacré à une étude bibliographique sur les principales classes des métabolites secondaires, leur classification, propriétés chimiques, activités biologiques et leurs importances.

La partie expérimentale contient deux chapitres :

Le premier chapitre, est consacré aux matériel et méthodes utilisées dans le criblage phytochimique, solvants utilisés, méthode d'extraction, ainsi que les protocoles des dosages des différents composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavonols totaux) présents au niveau de la pulpe des *citrus* .

Le deuxième chapitre expérimental regroupe tous les résultats obtenus dans cette étude et leurs interprétations.

Chapitre I : Généralités sur les agrumes

Introduction

Les « *citrus* » plus communément appelés agrumes sont des fruits provenant des arbres de la famille des *rutacées*, ils ont presque la même structure qui est la suivante: L'écorce, partie non comestible du fruit ; la pulpe, partie comestible qui est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus [6].

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles.

Les agrumes sont des petits arbres ou *arbustes* de taille moyenne, cultivés dans l'ensemble des régions chaudes, tropicales et subtropicales. Ils sont originaires d'Inde, de Chine, d'Australie septentrionale et de la nouvelle Calédonie. Traditionnellement, ils ont été cultivés dans les jardins. Le terme agrume désigne les seules espèces utilitaires du genre *Citrus* et de deux genres voisins : *Fortunelles* et *Poncirus*, il s'applique aussi bien aux arbres qu'à leur fruit [7].

I.1 Historique

Le mot agrume provient de latin (*acrumen* = saveur) *acre* qui désignait dans l'antiquité, des arbres à des feuilles acides [8]. La culture des agrumes a commencé en Chine, Inde, Indochine, Indonésie (figure I.1). Le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Theophrastus en 310 avant J.-C. Les romains ont importé les oranges et les citrons de leur province comme un fruit couteux pour leurs banquettes. Les plantes qu'ils cultivaient à Rome ont survécu mais portaient peu de fruits.

Au 10^{ème} siècle, les conquérants arabes réintroduisent le cédrat en Europe et introduisent de nombreuses nouveautés telles que le citron et l'orange amère [9].

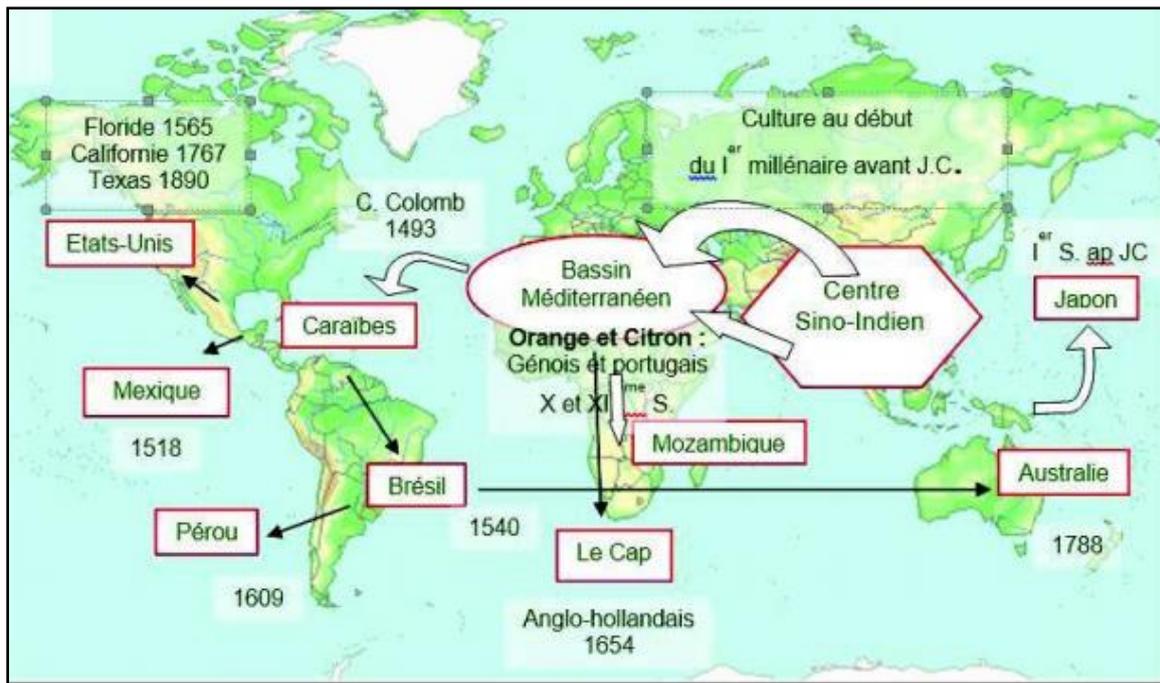


Figure I. 1 : Origine géographique et diffusion des agrumes dans le monde [10].

I.2 Définition des agrumes

Les agrumes sont des petits arbres ou *arbustes*, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence.

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orange sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou *flavedo* ou encore zeste en terme culinaire. La couche interne, blanche et spongieuse, est le mésocarpe ou *albédo*.

Ainsi, la pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine C. Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltés à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aisés à différencier

La pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine C. Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltés à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aisés à différencier sur le plan culinaire, la distinction des espèces *botaniques* est en revanche complexes, car les

différentes espèces s'hybrident très facilement et sont difficiles à fixer. Le genre *Citrus* ne contiendrait finalement pas plus de onze espèces [11].

I.2.1. Orange

L'oranger est un petit arbre ou *arbuste*, pouvant atteindre 10 à 15 m de hauteur environ (figure I.2). 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. 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 [12].

I.2.1.1. Classification

Taxonomiquement, les oranges douces appartiennent à :

- **Ordre :** *Sapindales*
- **Sous-ordre :** *Géraniineae*,
- **Classe :** *Dicotyledoneae*
- **Famille :** *Rutaceae*
- **Genre :** *Citrus*
- **Espèce :** *Citrus sinensis*



Figure I.2. Feuilles, fleurs et fruits d'oranger [13].

I.2.2 Citron

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 (figure. I.3). 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 [14].

I.2.2.1. Classification

Selon Padrini et al. (1996) la classification de citron est la suivante [15] :

- **Ordre** : *Sapindales*
- **Famille** : *Rutaceae*
- **Genre** : *Citrus*
- **Espèce** : *Citrus limon*



Figure I. 3 Feuilles, fleurs et fruits de citron.[15]

I.3. Origine et diffusion

Terme agrumes est d'origine Italienne, il dérive des latins *agrus* qui, autrefois, désignaient les plantes dont les fruits ont une saveur aigre comme l'ail ou les oignons. Mais avec le temps, sa signification évolua et il fut utilisé pour décrire un groupe de plantes de la famille des *Rutacées* qui comprend 3 genres : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella*. Le mot agrume s'applique aussi bien aux arbres qu'à leurs fruits [16]. Le problème posé par la détermination exacte du centre d'origine des agrumes se complique encore du fait que l'hybridation est très fréquente. Quoiqu'il soit de cette incertitude relative, quant aux limites exactes du centre d'origine des agrumes, il se situe dans le Sud-est asiatique. Les agrumes apparaissent dans le

bassin méditerranéen dès l'Antiquité. C'est à partir du bassin méditerranéen et grâce aux grandes découvertes que les agrumes furent largement diffusés. De là, ils ont été répandus selon trois voies principales citées par Jacquemond et Blondel [17].

- Vers l'Afrique de l'Est par les arabes.
- En Amérique centrale grâce à Christophe Colomb en 1493.
- Au Cap par les Anglo-hollandais en 1662.

I.4 Structure

Tous les fruits des *citrus* cultivés présentent la même structure anatomique. D'un point de vue *botanique* les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un *péricarpe* structuré en trois parties bien différenciées : *l'épicarpe* (*Flavédo*), *mésocarpe* (*Albédo*) et *l'endocarpe* (pulpe)

I.4.1 Oranges

L'orange est une baie particulière partagée en une dizaine de « *quartiers* ». Dans chaque quartier, les pépins se trouvent insérés près de l'axe (placentation axile). *L'épicarpe* (zeste) contient de nombreuses glandes à essences. Le *mésocarpe* blanc a une consistance spongieuse. *L'endocarpe* (épiderme interne d'un carpelle) est une fine peau qui entoure les quartiers et émet des poils succulents qui remplissent l'intérieur des *loges carpellaires* et constituent la partie charnue consommée (figure. I.4)

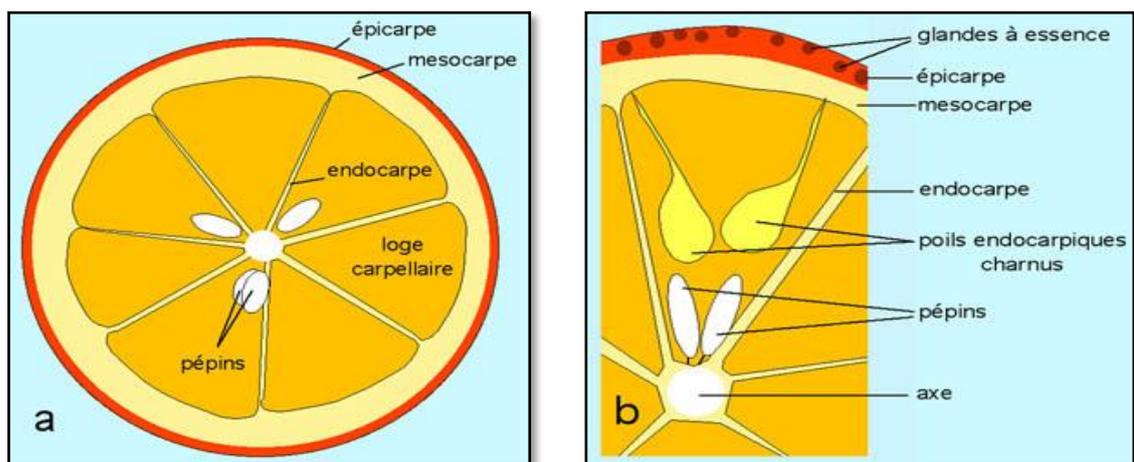


Figure I.4 : Coupe transversale schématique d'une orange (a) et détails (b)[18].

I.4.2 Citron.

Le citron est une baie (fruit charnu à pépins). Comme toutes les *Rutacées*, il porte le nom générique d'agrumes. Sa structure est semblable à celle des autres agrumes (orange, mandarine, pamplemousse, etc.). Pour plus de détails, voir « Orange » (figure. I.5).

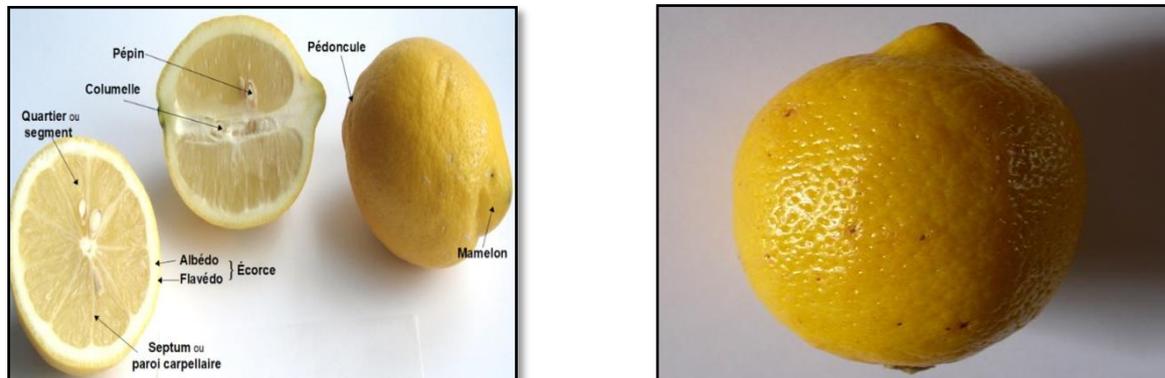


Figure.I.5 : Citron jaune en coupe transversale et citron jaune entier [19].

I.5. Description morphologique et physiologique

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique [20].

D'un point de vue *botanique*, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un *péricarpe* structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé *flavêdo*, le mésocarpe appelé *albêdo* et l'endocarpe (pulpe).

L'épicarpe est la surface périphérique du fruit. Il est coloré par des pigments caroténoïdes être présente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière.

I.6. Diversité des agrumes

A diversité du genre *Citrus* se concentre sur quatre entités taxonomiques à l'origine de la grande majorité des espèces cultivées : *Citrus maxima* (les pamplemoussiers), *reticulata* (les mandariniers), *C. medica* (les cédratiers) et les papeddas, regroupant plusieurs espèces. Les trois premières, qualifiées d'espèces ancestrales, ont évolué séparément dans trois zones géographiques distinctes (respectivement l'archipel Malaisien, le sud de la Chine et le nord-est de l'Inde). C'est lors de cette phase d'évolution séparée que les trois espèces ont acquis des caractéristiques spécifiques comme la taille et la couleur du fruit, la reproduction asexuée, la résistance à des contraintes environnementales et même la taille du génome (tout

en maintenant un nombre identique de 18 chromosomes). Plus tardivement dans l'évolution, des croisements sexués se sont produits dans les zones mixtes de peuplement et des formes hybrides interspécifiques, élevées au rang d'espèce, sont apparues : l'oranger (*C. sinensis*) et le bigaradier (*C. aurantium*), produits de croisements entre pamplemoussiers et mandariniers, le citronnier (*C. limon*), hybride de cédratier et de bigaradier et le limettier (*C. aurantifolia*) produit d'un croisement entre un papéda (*C. micrantha*) et un cédratier [21].

I.7. Composition Chimique

I.7.1. Oranges

Le tableau ci-dessous présente les principaux composés chimiques des oranges.

Tableau I. 1 principaux composés d'orange [22]

Minéraux et oligo-éléments	Potassium, Phosphore, Calcium, Magnésium, Sodium, Fer, Zinc, Cuivre, iode, Sélénium
Protéines	Acides aminés, Acide aspartique, Acide glutamique, Alanine, Arginine, Cystine...
Fibres	Une teneur de 2.4 % ,elles ont l'originalité d'être riche en pectine (environ 50%)
Glucides	Saccharose, Glucose, Fructose
Vitamines	Vitamine C, Vitamine E (tocophérols), Vitamine A et provitamine A, Vitamines hydrosolubles qui sont toutes des vitamines du groupe B (B6 ,B1 et B9, en particulier)
Lipides	Acides gras monoinsaturés, Acide gras polyinsaturés, Dont oméga 6, Dont oméga 3
Eau	85,97 g
Autres constituants	Stérols végétaux
Pigments	Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orangé pour les flavonoïdes et les caroténoïdes, Jaune pour les xanthophylles, rouge ou rouge violacé pour les anthocyanes

I.7.2 Citron

Citrus limon contient de nombreux composants chimiques, y compris les composés phénoliques (tel que les flavonoïdes dont les flavanones sont les plus abondants 90%, contenus dans la partie blanche de la peau du fruit), et d'autres éléments nutritifs et non nutritifs (vitamines, minéraux, fibres alimentaires, huiles essentielles et caroténoïdes) [23].

Le fruit présente une haute teneur en vitamine C et contient d'autres vitamines de groupe A et B (B1, B2, B3, B6 et B9) avec des petites quantités. La teneur en protéines est de 1.1g/100 g. Diverses substances minérales tel que Na (sodium), K (potassium), Ca (calcium), Cu (cuivre), Fe (fer), Mg (magnésium), Zn (zinc) et P (phosphore) ont été identifiées dans le citron dont le potassium est le minéral le plus abondant avec une valeur de 8600 mg/100g. Ces éléments jouent un rôle important dans les systèmes biologiques, sont essentiels pour la nutrition et largement utilisés dans le domaine de la médecine clinique.

La peau de citron contenait de la graisse brute (4,98%), fibre brute (15,18%). L'arôme de citron résulte de ces huiles essentielles abondantes dans les vacuoles de l'écorce, il s'agit d'un mélange de limonène, du *citral*, citronellal et des coumarines. L'acide citrique est l'acide organique le plus représenté dans le citron avec une quantité de 5–6 g/100 ml.[24]

Selon Souci et al. (1996) la composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais).

Tableau I.2. Composition biochimique moyenne du citron [24].

Composition	Teneur
Eau	90,20 g/100 g
Glucides	3.16/ 100g
Protéines	0,70 g/100g
Lipides	0,60 g/100g
Acides organiques	4,88 g/100g
Fibres alimentaires	0,50 g/100g
Les vitamines	51,26 mg/100g
Les minéraux	211,95 mg/100g
Apports énergétiques	36,48 K Calories

I.8. Les agrumes dans le monde

La production mondiale d'agrumes, toutes espèces confondues, s'élève à plus de 110 millions de tonnes par an, sur une superficie de 7,5 millions d'hectares environ. Les oranges représentent environ 60 % de la production totale d'agrumes. Les tangerines, mandarines, clémentines et *satsumas* comptent pour 23 % du volume mondial. Environ 13,7 millions de tonnes de citrons et de limes, ainsi que 4,4 millions de tonnes de pamplemousses et pomelos sont produites annuellement.

Les rendements moyens se situent entre 5,3 et 6,7 tonnes/an, mais les pays aux cultures plus intensives atteignent une moyenne nationale de 11 à 15,5 tonnes/an. Dans les régions les plus propices, les meilleurs producteurs parviennent à produire 20 à 26 tonnes/an. Le Brésil cultive un quart de la production mondiale d'agrumes dont 75 % sont transformés en jus. La Chine et les États-Unis sont également d'importants producteurs avec respectivement 17,6 et 11 millions de tonnes. Ensemble, le Brésil et les États-Unis représentent plus de 90 % de la production mondiale de jus d'orange. Environ 22 millions de tonnes d'agrumes sont produits dans la région méditerranéenne, principalement pour la consommation de fruits frais. L'Espagne, l'Italie, l'Égypte, la Turquie et la Grèce sont les principaux producteurs. Plus de 90 % de la production mondiale d'agrumes frais sont consommés dans le pays d'origine. La région méditerranéenne est le plus grand exportateur de fruits frais. Les principaux importateurs sont l'Allemagne, la France, les Pays-Bas et le Royaume-Uni (figure. I.6) [25].

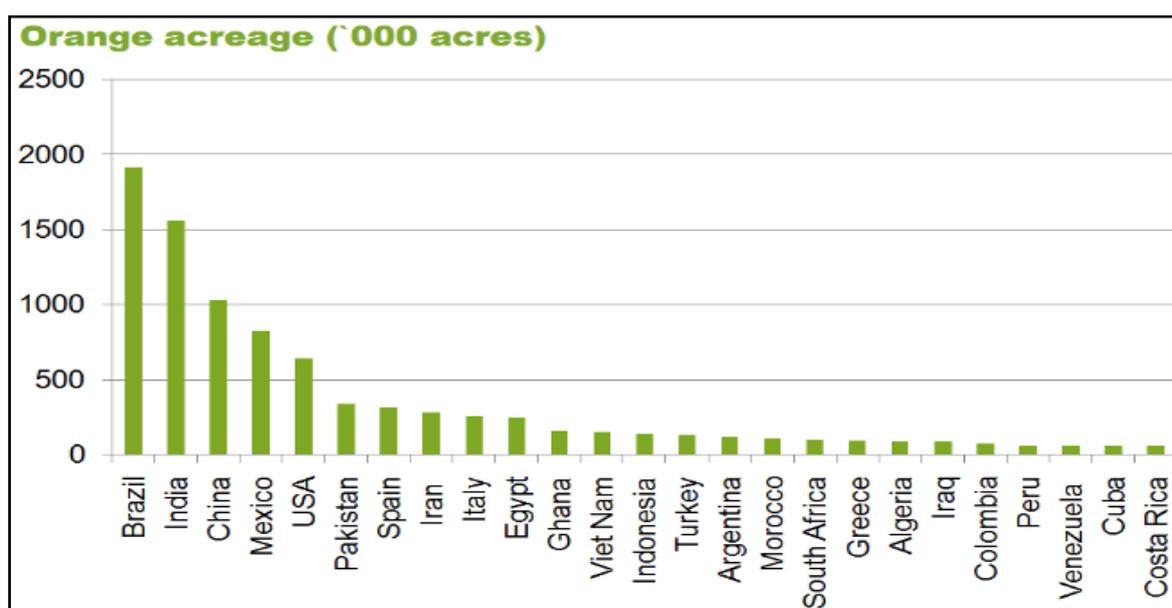


Figure I. 6 : Les agrumes dans le monde [26].

I.9 En Algérie

L'agrumiculture Algérienne est économiquement importante d'une part par contribution dans l'approvisionnement en fruit et d'autre part par sa participation potentielle dans l'exportation et par mobilisation de l'emploi direct [27]. Elle couvre une superficie de 63.589, ha avec une production de 16,7 tonnes en 2009 [28]. Ce potentiel est concentré sur une grande partie au centre de la Mitidja, qui représente 30% de la production totale des agrumes à l'Ouest dans la région de Rélizane ,Mostaganem ,Mascara et Telemcen , et à l'Est dans la région de Skikda et El-Taref (figure I.7) [29]. Le verger agrumicole regroupe l'ensemble d'espèces d'agrumes les organiers, les mandariniers, les citronniers et les pomelos [30].

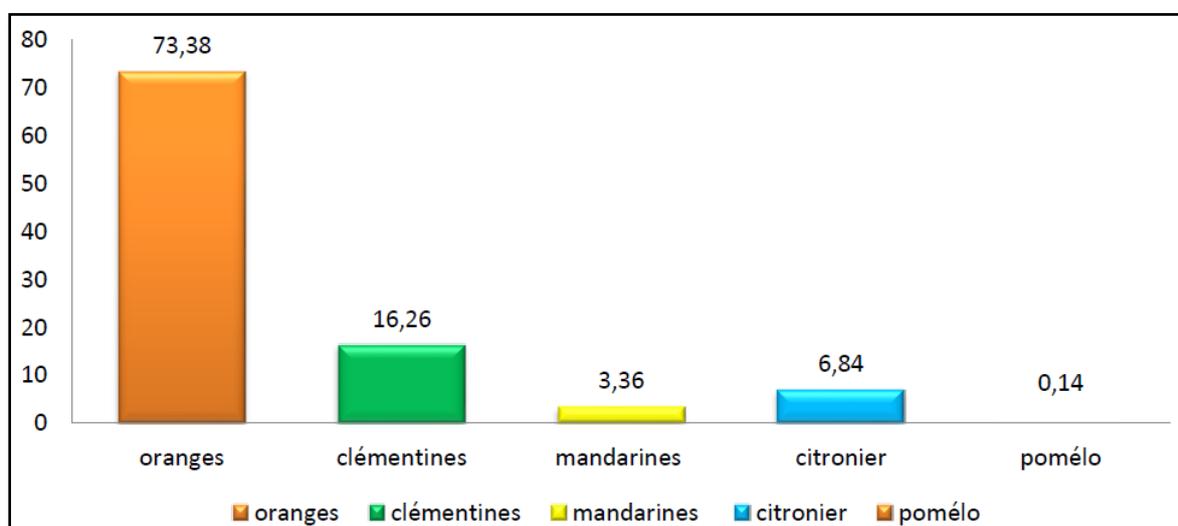


Figure I.7 : Principales espèces d'agrumes en Algérie [30].

Ainsi la superficie agrumicole de la wilaya de Blida est de 16,583 ha assurant une production de 2.487.792 qx. La plupart de ces vergers se localisent à Boufarik, Mouzaia, Oued eleulleuig à Larbaa.

I.10 L'utilisation des agrumes

I.10.1. Utilisation et effets thérapeutiques des fruits de genre Citrus

Les *Citrus* contiennent des quantités élevées de composés qui ont des effets bénéfiques pour la santé, y compris les polyphénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les tocophérols [31]. Ils ont une valeur très importante dans la médecine traditionnelle et pour la fabrication des produits comestibles [32]. Comme ils présentent plusieurs activités

biologiques, telles que l'activité antioxydantes, antimicrobienne, antibiotique, antiseptique, antiviral, anti-inflammatoire et anticancéreuse [33].

Grâce aux caroténoïdes qui vont stimuler la production de cellules osseuses et stimuler l'absorption du calcium, l'orange est excellente pour vos os. La pulpe d'orange fraîche est utilisée pour traiter les maladies de la peau telle que : L'acné, soin de visage [34]. Abaissement de la pression artérielle, traiter l'obésité [35].

I.10.2. Utilisation alimentaire

Dans la cuisine algérienne, les écorces fraîches ou sous forme de poudre de *Citrus sinensis* sont utilisées pour aromatiser le thé et pour la préparation de certains plats traditionnels ou gâteaux

Les fibres des écorces d'agrumes sont naturellement associées avec des composés bioactifs (composés phénoliques, vitamine C) ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles multiples. Plusieurs études ont porté sur l'extraction des fibres des écorces d'agrumes pour les utiliser dans la formulation des aliments diététiques [36]. La pectine commerciale est extraite dans la plupart des cas des agrumes (le pamplemousse, le citron et l'orange) et aussi des pommes [37]. La pectine est utilisée en industries agroalimentaires grâce à son pouvoir épaississant, texturant mais aussi pour son pouvoir gélifiant et stabilisant. La pectine est utilisée dans plusieurs formulations (produits laitiers, préparations à base de fruits, crèmes glacés, produits à base émulsionnée, confiture et gelées) [38].

Grâce à leur pouvoir adsorbant de l'eau, les fibres consommées gonflent dans l'estomac et l'intestin et jouent le rôle de coupe-faim en procurant une sensation de satiété. Les fibres insolubles facilitent le transit intestinal, tandis que les fibres solubles favorisent la croissance de la flore intestinale et améliorent par la suite la digestion. La consommation des fibres réduit le risque des maladies cardiovasculaires, du cancer du côlon et de l'obésité.

Les fibres des écorces d'agrumes acquièrent ainsi toutes les vertus des probiotiques et ont des applications potentielles en alimentation fonctionnelle [39].

I.10.3. Huiles essentielles

Les écorces d'agrumes sont riches en huiles essentielles qui sont localisées dans des glandes situées dans le *flavédo*. Ces huiles essentielles sont extraites à partir des écorces par une simple pression à froid ou bien simultanément avec l'extraction du jus.

En effet, les huiles essentielles d'agrumes peuvent être extraites à froid. Ces huiles sont ensuite entraînées par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'huile se forme [40].

Les huiles essentielles des écorces d'agrumes peuvent aussi être extraites par la distillation à la vapeur ou l'hydro-distillation [41].

I.10.4. Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques

Les extraits naturels des écorces sont également l'un des intrants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et autres produits cosmétiques. De plus, les écorces d'agrumes sont riches en limonène, qui est employé dans la formulation de solvants industriels mais aussi comme solvant biologique [42]. Le linalol et le citral extraits des écorces de pamplemousse et d'orange douce ont des effets antibactériens contre *Campylobacter Jejuni*, *E. coli*, *L.Monocytogenes* Et *Bacillus Cereus*. Le *citral* est un composé actif aussi contre le *Penicillium digitatum* et *Aspergillus Niger*. Pour ces raisons, les huiles essentielles peuvent être utilisées comme une alternative aux fongicides synthétiques [43].

I.10.4.1. Domaines d'application et intérêt phytothérapie

Les huiles essentielles de *citrus* sont utilisées pour la préparation des parfums, des savons, désodorisants, des bougies parfumées. En industrie alimentaires comme aromatisants, en aromathérapie, elles sont utilisées pour traiter l'insomnie, l'anxiété et aussi pour calmer les palpitations. L'huile essentielle de citron est employée comme désaltérant et possède des propriétés antimicrobiennes, stimulantes, stomachiques, diurétiques [44].

I.11. Les antioxydants des citrus

I.11.1. Définition

Les agrumes sont importants en raison de leurs propriétés nutritionnelles et antioxydantes. Les antioxydants les plus connus sont les caroténoïdes (surtout le β -carotène), l'acide ascorbique, les tocophérols (vitamine E) et les poly phénols. Ces derniers incluent les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques [45].

Les antioxydants sont des composés qui peuvent atténuer, inhiber ou prévenir l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif [46].

Les antioxydants sont classés selon différents critères :

- **Leurs origines** : naturelles, synthétiques.
- **Leur mode d'action** : primaires ou secondaires.

I.11.1.1. Selon l'origine

* Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétique (artificiels) sont généralement des composés phénoliques d'origine pétrochimique comme le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA) ou encore les gallates. Certaines études ont montré que des extraits de chêne sont plus efficaces que le BHT pour protéger l'huile de *colza* de l'oxydation par le dioxygène. Cependant, ces extraits, peu solubles dans l'huile, ne peuvent pas y être incorporés en quantités suffisantes pour que la protection soit durable. Il a semblé opportun d'augmenter cette solubilité en greffant chimiquement une chaîne aliphatique aux tanins sans altérer leur activité antioxydante. Modification chimique d'antioxydants pour les rendre lipophiles. Application aux tanins [47].

* Antioxydants naturels

Ils incluent des espèces chimiques différentes (composés phénoliques, vitamines, etc.) qui sont d'origine végétale pour la plupart [48].

I.11.1.2 Selon leur mode d'action

* Les antioxydants primaires

Sont naturellement produits par notre organisme. Ces enzymes antioxydantes endogènes constituent notre plus puissant système de défense contre les radicaux libres et les réactions inflammatoires associées. Il en existe seulement trois : la SuperOxyde Dismutase (SOD), la Catalase (CAT), et la Glutathion Peroxydase (GPx).

* Les antioxydants secondaires

Quant à eux, sont apportés uniquement par l'alimentation. Ce sont les vitamines C et E, les minéraux (sélénium, zinc, cuivre, manganèse), les caroténoïdes et les flavonoïdes. Les réserves d'antioxydants pouvant rapidement s'appauvrir, une supplémentation en antioxydants primaires et secondaires devient indispensable [49].

I.11.2. Radicaux libres

I.11.2.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, possédant un ou plusieurs électrons non appariés (électron célibataire). La tendance des électrons non appariés à interagir avec les autres molécules ou atomes voisins, pour former des liaisons covalentes, procure aux radicaux libres une très grande instabilité [50].

I.11.2.2. Formation des radicaux libres

✓ Réaction d'oxydoréduction

Les radicaux libres les plus courants possèdent un seul électron célibataire. Ils peuvent être formés depuis une espèce radicalaire qui subit une réaction d'oxydoréduction. Il y a alors perte ou gain d'électron.



Le signe « • » représente l'électron célibataire. Un des exemples les plus connus est la réaction de Fenton qui fait réagir le fer ferreux et le peroxyde d'hydrogène :



✓ Rupture homolytique

La production de radicaux libres peut se faire également par rupture homolytique d'une liaison covalente, ce qui entraîne la formation de deux entités ayant chacune un électron célibataire.



La rupture homolytique est le partage symétrique du doublet de valence commun, par opposition à la rupture hétérolytique qui donne naissance à des ions de charge opposée. Celle-ci intervient le plus communément en phase gazeuse ou en phase liquide pour les molécules ayant des liaisons peu polarisées. La molécule de dioxygène est représentative de ce type de rupture. L'énergie de liaison qui relie les deux atomes d'oxygène (150 kJ mol⁻¹) est relativement faible par rapport à la liaison carbone-carbone (346 kJ mol⁻¹). Cette liaison étant fragile, elle est plus apte à subir une rupture homolytique [51].

I.11.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels synthétisés par les plantes et les microorganismes. Dans l'alimentation humaine, les fruits et les légumes sont la source majoritaire de ces composés et sont présents comme des micro-composés responsables de leur couleur jaune, orange ou rouge [52]. Ces composés sont des précurseurs de la vitamine A, donnant aux aliments une saveur agréable. De nature lipidique, solubles dans les solvants organiques (acétone, alcool), sensibles à la lumière, au chauffage, aux acides et dans quelques cas aux bases, et protègent contre les UV [53]. Le squelette de base des caroténoïdes comprend 40 atomes de carbone formé de 8 unités d'isoprène. Les différents caroténoïdes sont dérivés par des modifications de la structure de base par cyclisation des groupes terminaux et par l'introduction des fonctions oxygénées qui leur confèrent leur couleur caractéristique et leurs propriétés antioxydantes [53].

I.11.4 . L'acide ascorbique

L'acide ascorbique ou vitamine C ($C_6H_8O_6$) est un élément hydrosoluble important pour la nutrition humaine, fournie par les fruits et les végétaux [54]. Sa teneur dans le miel est faible. La vitamine C est utilisée comme un additif alimentaire grâce à sa capacité antioxydante [55]. C'est un composé instable, sa dégradation dépend de plusieurs facteurs comme l'oxygène, la température et la durée de stockage.

Chapitre II : Principales classes des métabolites secondaires

Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées [56]. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [57].

II.1 Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ce sont des produits à structure chimique souvent complexe, ils sont très dispersés et très différents selon le type d'espèce [58]. Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores et dans les relations entre la plante et son environnement [59].

Ces molécules biologiques ne sont pas par définition nécessaires et vitales pour la cellule ou l'organisme mais elles ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes. Elles sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce des plantes et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique [60].

II.2 Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faibles quantités, il en existe plus de 200000 qui sont classées, selon leur apparence chimique, en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires et les composés phénoliques. Nous citerons ci-dessous quelques importants groupes photochimiques, source de molécules biologiquement actives et regroupés en trois classes principales :

*Les composés aromatiques (Les composés phénoliques, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate).

*Les composés azotés.

*Les trapénoïdes et les stéroïdes.

- La catégorie des **hétérosides**, constituée de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Ces glycosylations affectent largement leurs propriétés biochimiques (dont l'extraction dans différents solvants) mais également leurs effets biologiques (toxicité, propriétés pharmacologiques).
- les molécules désignées sous le terme de « **composés mixtes** » ou « **composés d'origine mixte** », qui correspondent à des condensations de molécules provenant des catégories citées plus haut. Mais souvent, les composés mixtes peuvent être rattachés à l'une des catégories précédentes [60].

II.2.1. Composés phénoliques :

II.2.1.1. Définition

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir, cependant l'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, ester, hétérosides ...).

II.2.1.2. Localisation

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) [61]. Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisin ...etc [62].

II.2.1.3. Rôle et intérêt des composées phénolique

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits. Ces composés sont réputés aussi pour leur caractère antioxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs

maladies [63]. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses [64].

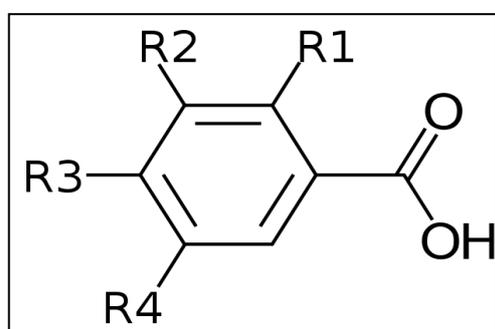
II.2.1.4. Principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues [65]. Ces composés peuvent être regroupés en plusieurs catégories qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation etc.) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides généralement) [66].

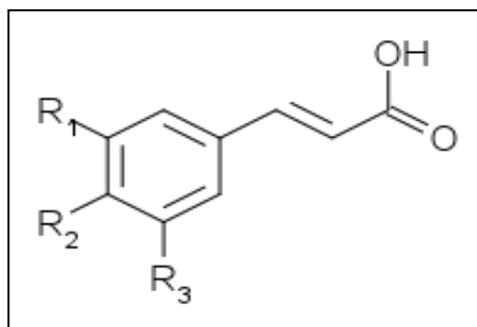
On distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les saponines ...etc [67].

II.2.1.4.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des substances phytochimiques ayant au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxy-phénolique. La dénomination générale d'acides phénoliques englobe les formes les plus simples des composés phénoliques qui se séparent en deux grands groupes distincts : les acides hydroxybenzoïques qui sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure en C6-C1, ils sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'ester ou d'hétérosides ; et les acides hydroxycinnamiques qui dérivent de l'acide cinnamique et possèdent une structure en C6- C3 [68,69] .



Acide hydroxybenzoïque



Acide hydroxycinnamique

Figure II. 1 Structure chimique de quelques acides phénoliques.

II.2.1.4.2. Flavonoïdes

Le terme « flavonoïde du grec flavus, (jaune) en latin» est le nom générique qui désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [70]. Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides [71].

Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base [72]. Avec un squelette à quinze atomes de carbones qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6- C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. la (figure II.2) représente la structure de base des flavonoïdes. Les flavonoïdes possèdent plusieurs activités biologiques intéressantes telles que l'activité antimicrobienne [75], antifongique [74], anti inflammatoire et une activité contre la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique. La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C. Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (tableau II.1) : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et aurones.

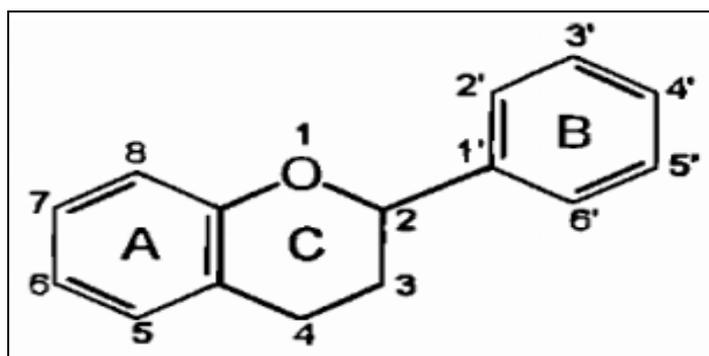
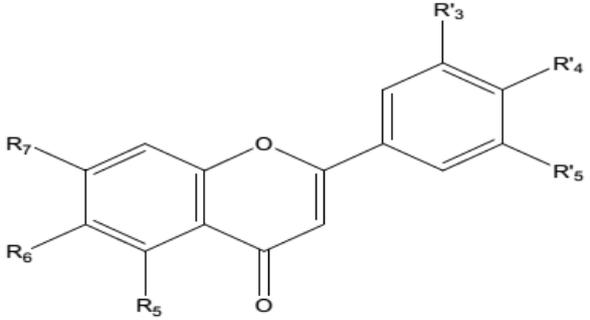
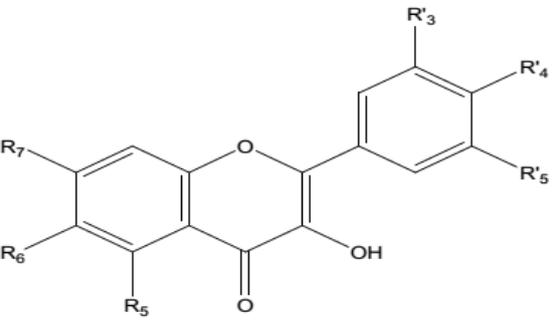
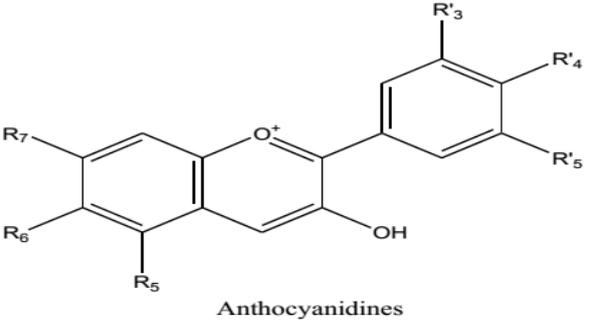
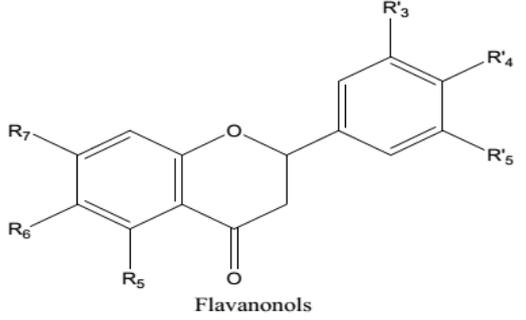
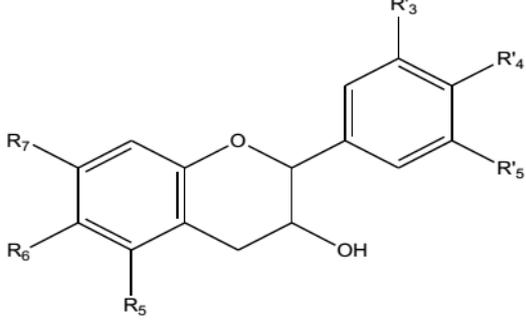
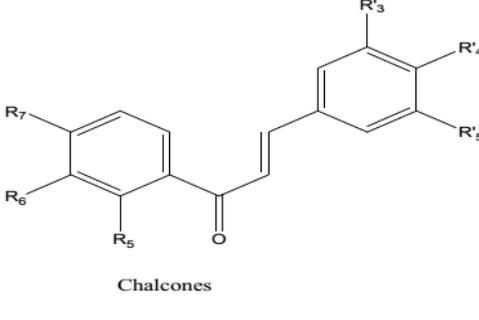
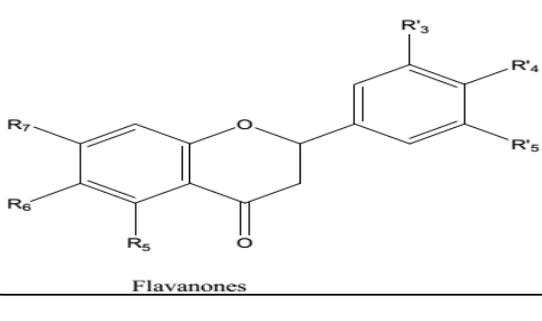


Figure II. 2 : Structure de base des flavonoïdes.

* Classification des flavonoïdes

Tableau II. 1. Structures des différentes classes des flavonoïdes [76].

 <p style="text-align: center;">Flavones</p>	 <p style="text-align: center;">Flavonols</p>
 <p style="text-align: center;">Anthocyanidines</p>	 <p style="text-align: center;">Flavanonols</p>
 <p style="text-align: center;">Flavan-3-ols ou catéchines</p>	 <p style="text-align: center;">Chalcones</p>
 <p style="text-align: center;">Flavanones</p>	

II.2.1.4.3. Tannins.

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux, autrement dit, transformer une peau en cuir [77]. Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique, leur degré d'oxydation [78] et leur saveur astringente mais ayant en commun la propriété de tanner la peau. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 g/mol [79].

* Structure et classification

On distingue, habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique:

Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères) [80].

Les tanins saponifiables ou hydrolysables : esters d'acides phénols et de glucose [81].

* les tanins condensés

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou procyanidoliques, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique.

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (figure. II.3) [82].

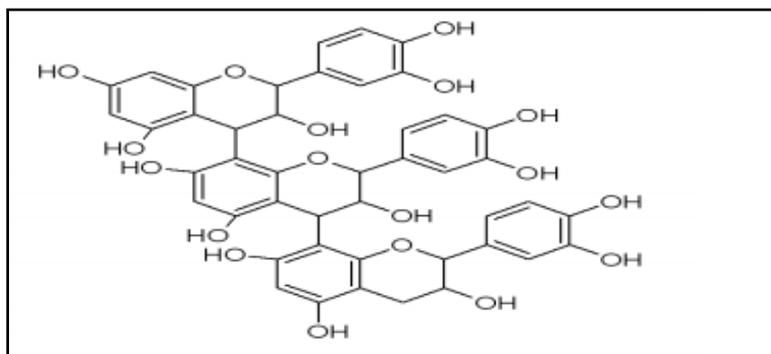


Figure II. 3 tanins condensés.

*** Tanins saponifiables ou hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénols, ou de dérivés d'acides phénols (Figure II.4); la molécule glucidique est, en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. Ces tanins, en raison de leurs nombreux groupements OH, se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales [83].

Ces tanins sont de deux types :

- Les tanins galliques qui sont des esters d'oses (glucose) et d'acides galliques (figure II.4).
- Les tanins éllagiques qui sont des esters d'oses et d'acides éllagiques (figure II.5).

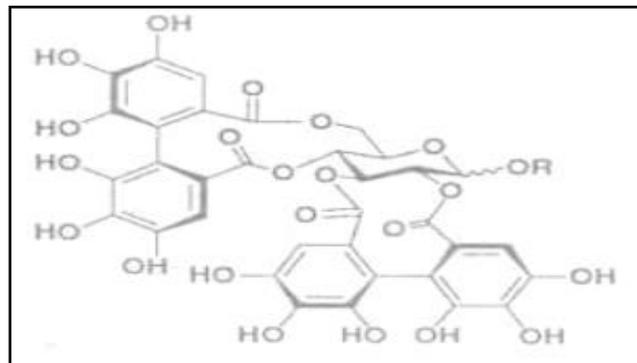


Figure II. 4 : Tanins galliques.

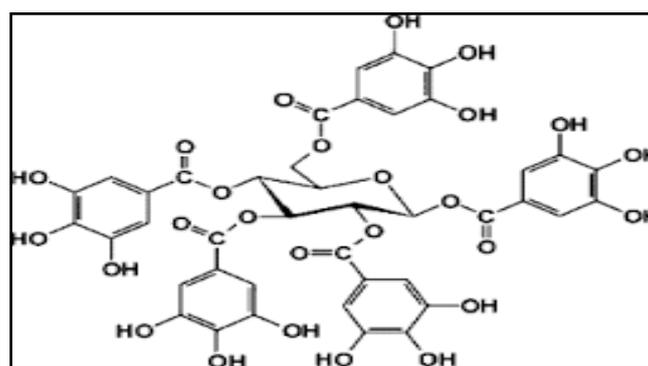


Figure II. 5 : Tanins éllagiques.

II.2.1.4.4. Coumarines

Ces composés constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. Ces composés se trouvent

dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Plus de mille structures de coumarines ont été décrites et les plus simples d'entre elles sont largement distribuées dans le règne végétal, avec une abondance remarquable au sein des angiospermes [84]. Les familles les plus riches en coumarines sont : les légumineuses, les rutacées, les apiécées et les thyméléacées. Elles sont présentes dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les graines [85,86].

*** Structure chimique et classification**

Les coumarines sont caractérisées par une structure qui comporte un noyau benzo (2H)-1-pyrone, résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique C-2 [87,88]. Toutefois leurs structures restent très diverses et peuvent être classés en deux grands groupes. Coumarines simples (figure. II.6) et Coumarines complexes (figure. II.7) où un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzo- α -pyrone [90].

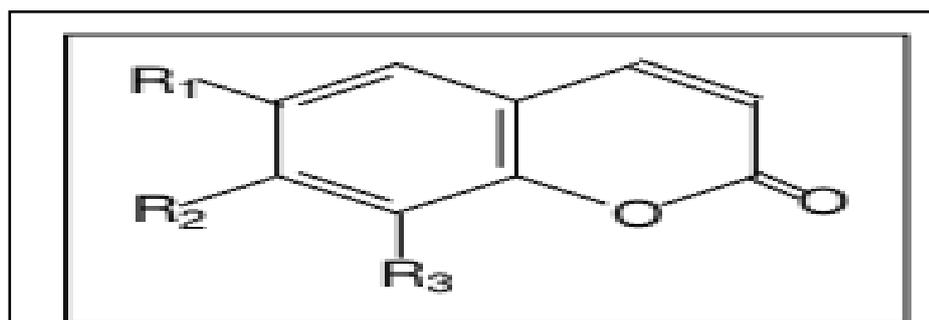


Figure II. 6 : structure de coumarine simple.

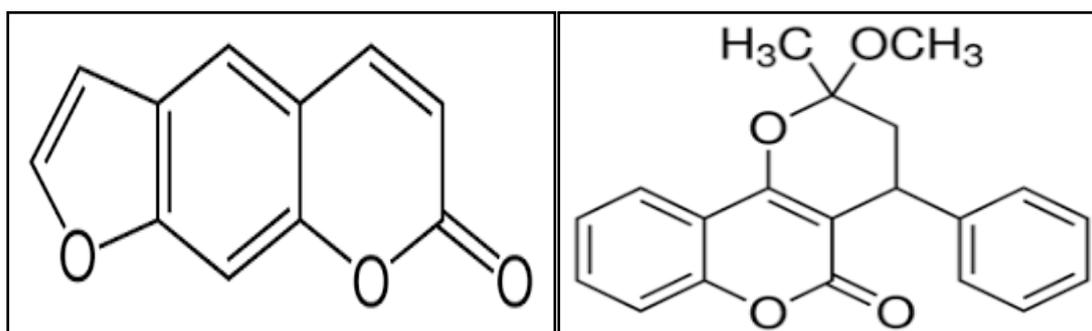


Figure II. 7 : exemples de coumarine complexe .a) furanocoumarine b)pyranocoumarine.

II.2.1.4.5. Saponines

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires, abondamment trouvés dans certaines familles du règne végétal. Ils sont principalement produits par les plantes supérieures, mais aussi par des animaux marins inférieurs et quelques bactéries. Leur nom provient du latin "*sapo*" signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. Ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé qui se composent d'une partie lipophile, l'aglycone (ou génine) et d'une partie hydrophile osidique. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse [91,92].

* Structure chimique et classification

Au niveau structural, les saponines (figure II.8) sont des molécules composées de deux entités : une génine (appelée aussi aglycone) et une fraction glycoside. La partie aglycone (sapogénine) est constituée d'un noyau stéroïdique ou triterpénique [93].

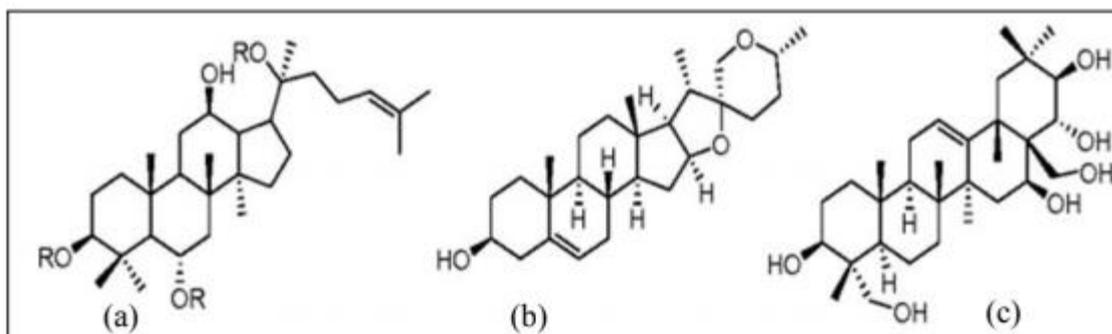


Figure II.8 : Structures des saponines. (a) Ginsenoside, (b) Diosgenin, (c) Gymnemagenin

Tableau II.2. Activités des composés phénoliques [94].

Polyphénols	Activités
Acides Phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires Antioedémateuses
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

II.2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés, hétérocycliques et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [95]. Leurs noms se terminent toujours par «-ine». Ils présentent des réactions communes de précipitation par lesquelles ils sont détectés (capacité de se combiner avec des métaux). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent l'un des plus grands groupes de près de 10000 à 12000 structures [96].

II.2.2.1. Classification des alcaloïdes

Parmi les nombreux systèmes proposés pour la classification des alcaloïdes, on peut citer, selon leur biogénèse et la position de l'azote, celui qui regroupe les alcaloïdes en trois classes [97,98]. On distingue généralement :

- alcaloïdes vrais.
- pseudo-alcaloïdes.
- proto-alcaloïdes.

*Alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes qui sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (figure .II.9) [99].

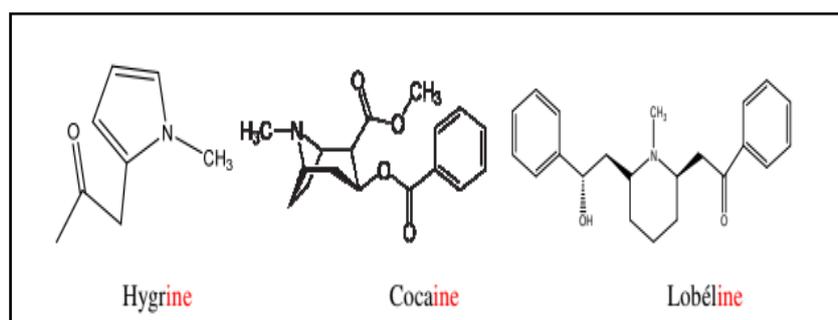


Figure II. 9 : Structure de quelques alcaloïdes vrais.

* Pseudo-alcaloïdes

Ce sont des composés dont le squelette carboné de base ne dérive pas d'acide aminé. Il s'agit d'alcaloïdes aromatiques qui sont, dans la majorité des cas, des isoterpénoïdes comme la capsaïcine. La caféïne et la noréphédrine sont aussi des pseudo- alcaloïdes (figure II.10).

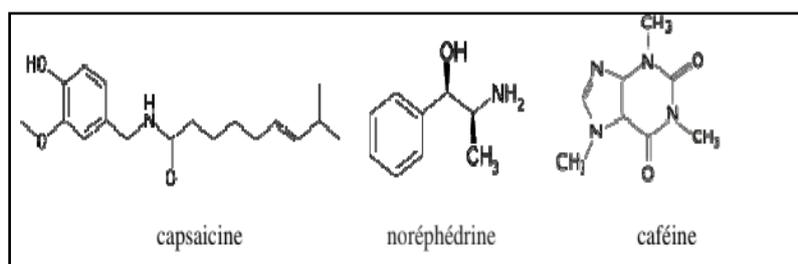


Figure II.10 : Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.

* Proto-alcaloïdes

Ce sont des amines simples qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine), certains s'associent à des résidus terpéniques, exemple: alcaloïdes indoliques monoterpéniques (utilisés contre le cancer) (figure II.11).

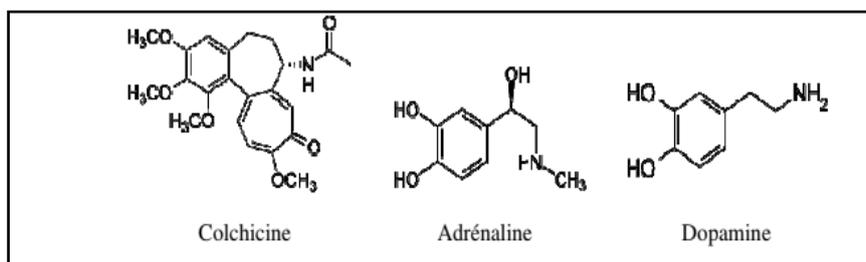


Figure II.11 : Exemple des proto-alcaloïdes

II.2.2.2. Propriétés thérapeutiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leur activité pharmacologique qui s'exerce dans des domaines variés. Au niveau du système nerveux central, ce sont des dépresseurs (morphine) ou des stimulants (caféine) On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'anti-tumoraux (vinblastine), d'antipaludique (quinine) [100].

Ces différentes activités (et d'autres) conduisent à une utilisation pharmaceutique des plantes à alcaloïdes. D'une manière générale, les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques très variées ainsi que par leur toxicité [101].

II.2.3. Terpènes et stérols

II.2.3.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure, soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est (C₅H_x)_n dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs de (1-8) sauf dans les polyterpènes où il peut atteindre plus de 100 (caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C₅H₈ (Figure II.12). Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le

squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc....) [102]. Ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Ils sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même par les animaux [103].

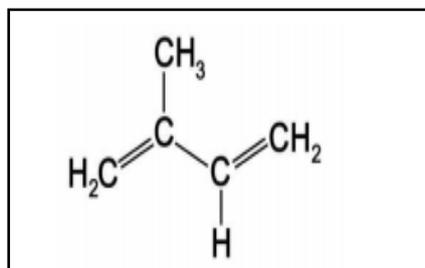


Figure II.12 : Structure de la molécule d'isoprène.

II.2.3.1.1. Classification des terpènes

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement répandu et d'un intérêt chimique considérable. Bien que de structures très diverses, ils ont un caractère commun : ils peuvent être virtuellement déconnectés en unités isopréniques. De ce fait, la classification des terpénoïdes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène, ce qui donne des : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes comme indiqué sur la (figure II.13) [103,104].

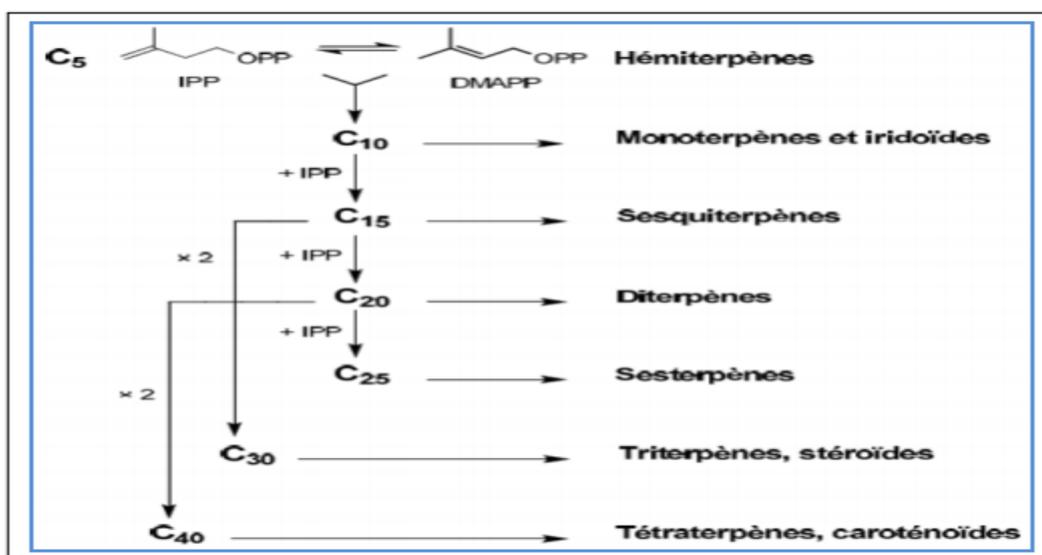


Figure II.13 : Classification des composés terpéniques.

II.2.3.2. Stérols

Les stérols possèdent une structure chimique proche de celle du cholestérol. Cette proximité permet à ces derniers de tromper l'organisme permettant ainsi de limiter le passage du cholestérol de l'intestin vers le sang. Ce sont des substances naturelles stéroïdiques caractérisées par un noyau polycyclique portant une fonction alcool [100].

Ces stérols sont classés comme suit :

Selon l'IUPAC, les stéroïdes incluent tous les lipides possédant un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) ou dérivant de celui-ci [103]. Cette définition ne catégorise pas les différents types de stéroïdes. Toutefois, l'IUPAC précise que les « stérols sont des stéroïdes » se caractérisant par la présence d'un groupe hydroxyl -OH sur le carbone C3 et comme exemple, le cholestérol (figure II.14).

En revanche, pour plusieurs biochimistes, les « stérols » constituent une catégorie à part entière incluant les stéroïdes, ainsi que cinq autres sous-classes [105].

- **Les stérols et dérivés** : cholestérol, phytostérol et stérides .
- **Les stéroïdes** : œstrogènes, androgènes, gluco- et minéralocorticoïdes .
- **Les sécostéroïdes** : vitamine D.
- Les stéroïdes conjugués.
- Les hopanoïdes.

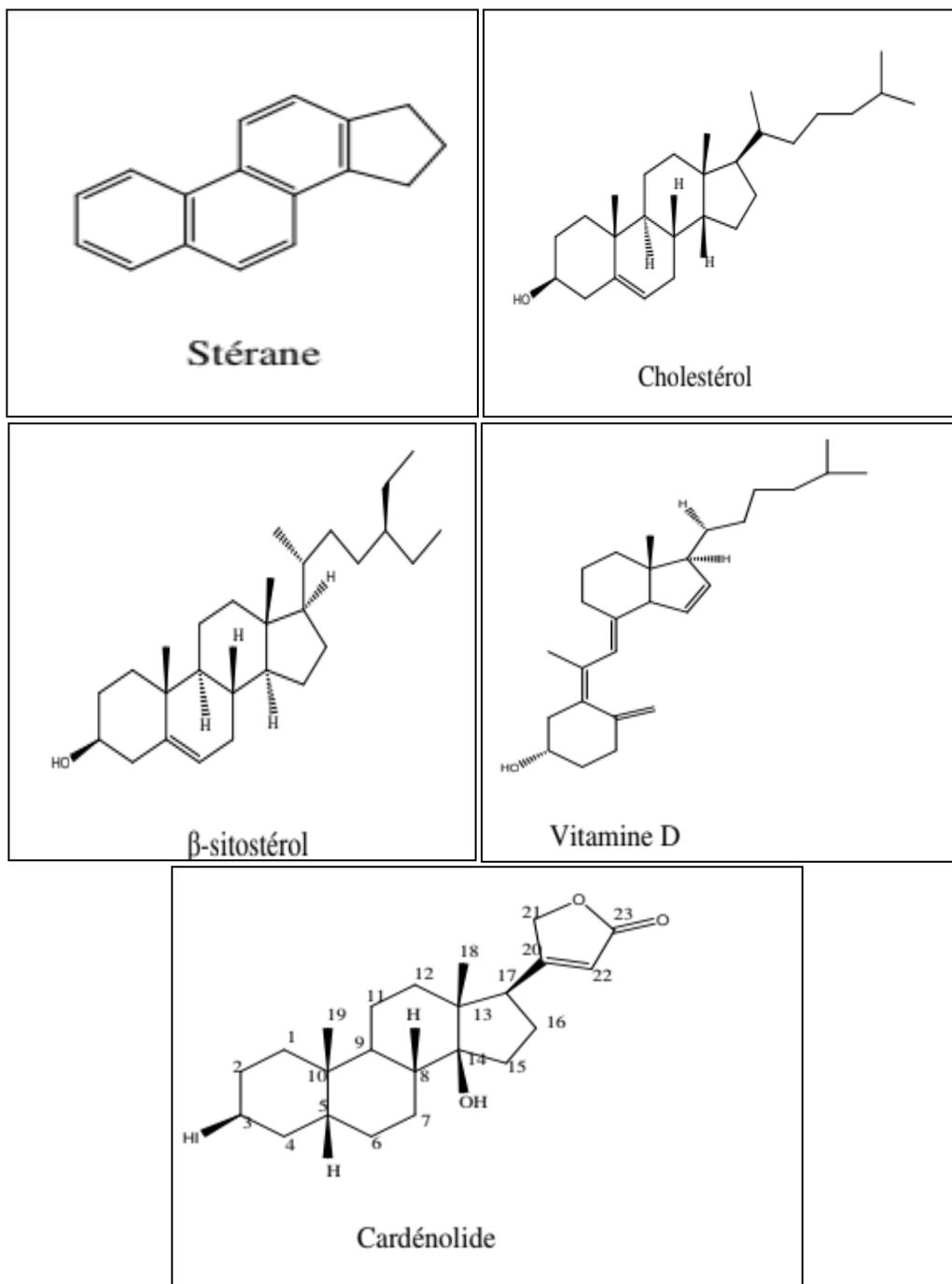


Figure II.14 : Quelques exemples de stéroïdes.

II.2.3.3. Intérêts des terpènes et des stérols

Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques et antibactériennes. Le mécanisme des terpénoïdes n'est pas bien connu mais, il pourrait induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile [80].

Les triterpènes font un groupe de produits naturels de première importance dans les terpènes. Ils sont responsables d'une multitude d'activités biologiques : cytotatique, antivirale, insecticide, anti-inflammatoire, molluscicide et analgésique [106] .

Le β -sitostérol appartient à la famille des stérols végétaux ou phytostérols, composés naturels présents dans toutes les plantes. Le β -sitostérol est comparable au cholestérol. Il peut aider à réduire le taux de cholestérol en limitant la quantité de cholestérol qui peut entrer dans le corps. Le β -sitostérol est également reconnu pour son activité anti-inflammatoire [107].

Les stérols sont des constituants de membranes cellulaires qui jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire [100,108].

II.2.4. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composants liquides et hautement volatiles des plantes marqués par une odeur forte et caractéristique, les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) de ces composants. Les HES ne contiennent pas de corps gras (lipides). Elles sont obtenues par distillation par la vapeur d'eau et sont plus ou moins modifiées au cours de la préparation [109].

II.2.4.1 Huile essentiel des agrumes

Les huiles essentielles constituées principalement des métabolites secondaires lipophiles volatils tels que les hydrocarbures (terpènes et sesquiterpènes) et les composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, phénols, éthers, esters, lactones et éthers phénoliques). Ils sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer à 80 % de l'huile, tandis que d'autres composants sont présentés seulement comme trace [110].

De nombreux facteurs influents sur la composition des huiles essentielles, les facteurs environnementaux en particulier (propriétés du sol, approvisionnement en eau, lumière du soleil, température) ont un effet important sur la qualité et la quantité de la composition.

Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances

volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus [111].

II.2.4.2 Composition chimique

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature de sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction. Les huiles essentielles sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés terpéniques et aromatiques variés [112].

***Les terpènes**

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone dans leur squelette. Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes, les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes, les diterpènes, formés de quatre isoprènes. Les tétraterpènes huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ou n le nombre d'entité isoprène peut-être de 9 à 30[113].

Les monoterpènes (C 10) : sont les composés majeurs des huiles essentielles avec des teneurs comprises entre 89,8 % et 99,08%. Le limonène est en général le composé le plus abondant, et d'autres composants monoterpéniques comme myrcène, α -pinène, α -thujène, β -pinène, α -terpinène, β -terpinène, p-cymène...etc

Les sesquiterpènes (C 15): ce sont des terpènes en (C 15) présents en faible quantité dans les plantes, sauf dans le bois des arbres.

Les diterpènes (C 20) : molécules assez rares dans les huiles essentielles, et présentes en faibles quantités (cypres, thuya, mélèze).

. Les triterpènes (C 30): leur présence est aléatoire dans les huiles essentielles. Car, plus la molécule contient un nombre important de carbones, plus elle est « lourde » et donc plus il est difficile de l'extraire par distillation à la vapeur d'eau. Les triterpènes font souvent partie des structures epicuticulaires des plantes aromatiques [114].

- Phénols et terpénols (Monoterpénols (C 10) Sesquiterpénols (C 15) et Diterpénols (C20)) molécules possédant une fonction alcool.
- Aldéhydes : il existe des aldéhydes terpéniques et des aldéhydes aromatiques.
- Lactones : esters intramoléculaire non aromatiques très actifs, non toxiques, à l'état de traces dans les huiles essentielles.
- Coumarines : ce sont des esters intramoléculaires aromatiques, très souvent présentés dans les essences, en particulier les essences de Citrus. Toujours en faible concentration dans les huiles essentielles.
- Phtalides : famille chimique apparentée aux coumarines, d'odeur puissante et caractéristique.
- Composés azotés : ce sont des composés peu courants au sein des huiles essentielles.
- Les composés soufrés : ces composés se rencontrent souvent à l'état de traces dans les huiles essentielles.
- Les acides, les esters, cétones, oxydes terpéniques, éthers.[115]

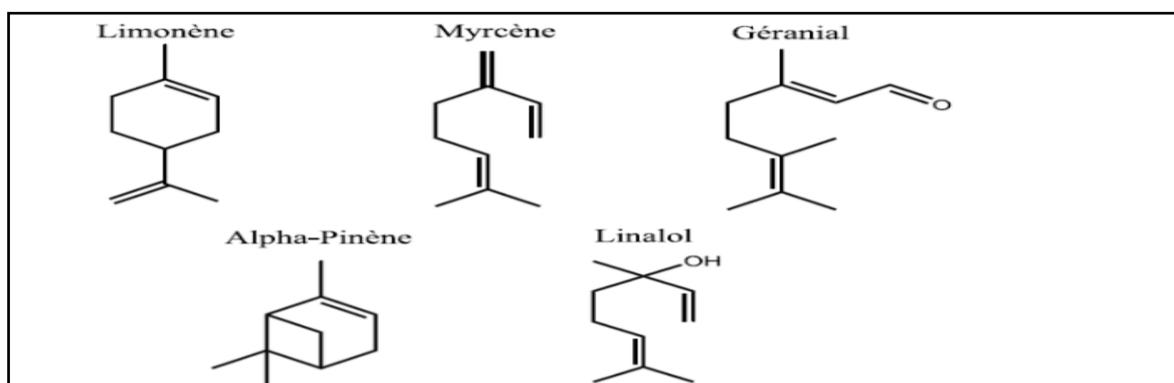


Figure II. 15 : Les composés majoritaires de l'huile essentielle de citrus.[116]

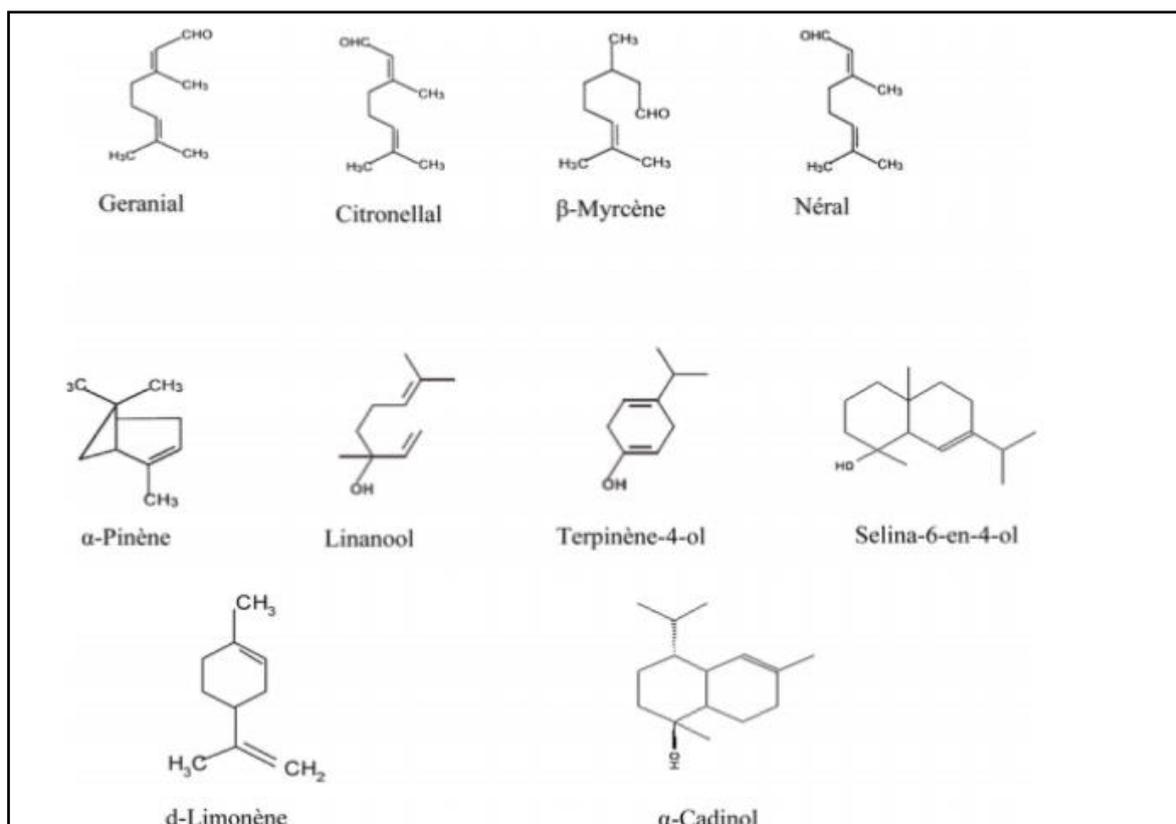


Figure II. 16 : Quelque exemple de Les structures rencontrées dans les huiles essentielles.

II.2.4.3 Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont biosynthétisées par des plantes odorantes dites aromatiques comme métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (*Lamiaceae*), les poches sécrétrices (*Myrtaceae*) et les canaux sécréteurs (*Apiaceae*). Ces structures sont impliquées dans le stockage des huiles et sont également dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini, qui diffère selon l'organe végétal en question [117].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule (Figure II.17). Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs. Elles peuvent être stockées dans tous les organes des végétaux : fleurs, feuilles, écorces, racines, rhizomes, fruits, bois et graines [80,118,119].



Figure II. 17 : Coupe transversale de l'épicerpe d'une orange [120].

Les huiles essentielles sont élaborées et stockées dans des poches shizolysigènes (figure II.17) [100]. Ces poches sécrétrices sont localisées dans tous les organes végétaux des Citrus : l'écorce, les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits (*le flavedo*) et les graines. Les cellules, entourant la poche, se divisent et s'organisent pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne (figure II.18) [120].



Figure II. 18 : Poche sécrétrice dans le fruit du citronnier, *Citrus limon*, famille *Rutacées*. Coupe transversale x 25. Sous le microscope photonique .[120]

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus des plantes et recouvertes d'une cuticule. Ces huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles: les conifères, les *rutacées*, les *ombellifères*, les *myrtacées*, les *lamiacées*, *Asteraceae*, *Apiaceae* et les *poacées*. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleurées (lavande,

menthe...) mais on en trouve aussi dans les racines ou rhizomes (vétiver,gingembre), dans les écorces (cannelle), le bois (camphrier), les fruits (poivres) et les graines (Muscade).Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines[121,122,123].

II.2.4.4. Domaines d'application et intérêt phytothérapie

Les huiles essentielles de *citrus* sont utilisées pour la préparation des parfums, des savons, désodorisants, des bougies parfumées. En industrie alimentaires comme aromatisants, en aromathérapie, elles sont utilisées pour traiter l'insomnie, l'anxiété et aussi pour calmer les palpitations. L'huile essentielle de citron est employée comme désaltérant et possède des propriétés antimicrobiennes, stimulantes, stomatiques et diurétiques.

- Contre les troubles nerveux.
- Contre les maladies infectieuses antivirale et antiseptique, et bactéricide.
- Désinfection de l'air, purifiant , anti-stress et ralentit le système cardiaque.
- Contre les problèmes de poids, détox, stimulant du foie.
- Contre le vieillissement prématuré, relaxante , sédative.
- Soins de la peau antirides ,tonique.

Les huiles essentielles des Citrus deviennent un des principaux produits de commercialisation internationale [124]. Ces essences peuvent être commercialisées et utilisées pour leurs activités biologiques : pouvoir antioxydant, pouvoir antiseptique, antibactériennes et antifongiques ; Comme on dit : à ces niveaux de qualité, correspondent des niveaux de prix différents. Cependant du point de vue commercial, les huiles essentielles de *Citrus* présentent une importance économique considérable, leur prix varie en fonction du procédé utilisé pour l'extraction, de l'origine et de la qualité et comme elles sont assez courantes, elles ne coutent pas cher [125, 126.127]. Les couts de production dépendent essentiellement des charges (prix de l'énergie, des intrants nécessaires à la culture, taux d'intérêt, charges foncières, coût de la main-d'œuvre, etc.).

II.2.4.5. Toxicité des huiles essentielles

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé présentant une toxicité par voie orale avec des doses létales à 50% (DL 50) supérieures à 5 g/kg, peut provoquer des effets néphrotoxiques, hépatotoxiques,

neurotoxiques...etc, et peut entraîner une insuffisance rénale chez l'enfant à doses élevées [128].

L'usage des huiles essentielles en application locale, en parfumerie ou en cosmétique, peut générer des irritations et des allergies. Les essences d'agrumes (pamplemousse, citron...etc) sont photo-sensibilisantes par des réactions épidermiques après exposition au soleil [129].

L'utilisation des huiles essentielles doit s'accompagner de nombreuses précautions. La plupart des composés d'une huile essentielle sont lipophiles et sont donc rapidement absorbés, quel que soit la voie d'administration. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la dangerosité d'une huile essentielle comme la teneur en molécules toxiques, la manière d'appliquer l'huile essentielle, le dosage ou encore la durée de l'application. Il convient donc de tester une huile essentielle avant toute utilisation. De plus, il convient de ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur les muqueuses (nez, yeux...etc), ce type d'application nécessite une dilution systématique de l'huile essentielle. Elle est déconseillée aux femmes enceintes et aux femmes qui allaitent [130].

II.2.4.6. Méthodes d'extraction

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux procédés, basés sur des techniques anciennes à savoir, la distillation, l'expression, l'enfleurage ou l'incision. Cependant, d'autres méthodes récentes sont apparues ces dernières années comme l'extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons. Toutefois, la distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre [131].

II.2.4.6.1 Extraction par hydrodistillation :

Dans le cas de l'hydrodistillation qui est la méthode la plus utilisée, la composition du produit obtenu, le plus souvent, est différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs de la plante. Cela est dû à la labilité des constituants des HES. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters par exemple mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations...etc [100].

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme le climat, le sol, et les conditions de croissance influence sur la qualité et la concentration des composés dans les huiles essentielles, et par conséquent la concentration des composés dans les huiles essentielles, et leur pouvoirs thérapeutique (Figure II.19) [132].

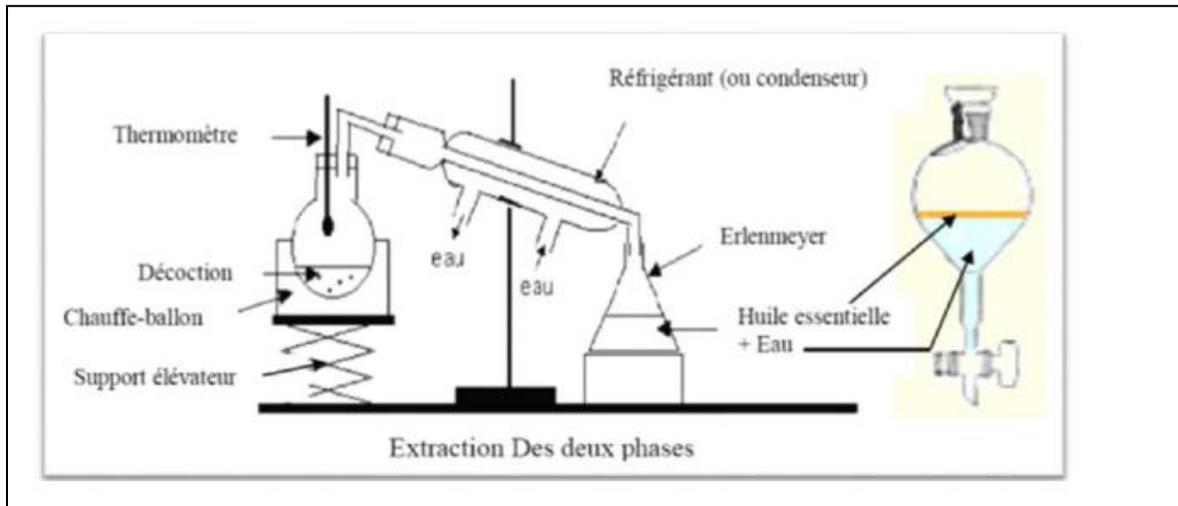


Figure II. 19 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation [133].

Chapitre III: Matériels et méthodes

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire pédagogique de chimie de la faculté des Sciences exactes et sciences de la nature et vie, département des sciences de la matière, de l'université de Biskra.

- **Objectif général :**

Etude comparative entre deux agrumes qui représentent des fruits de l'hiver *citrus* limon et *citrus sinensis* qui sont cultivé à Blida.

- **Objectifs spécifiques :**

- ✓ Caractérisation qualitative des métabolites secondaires qui existent dans l'orange et le citron en effectuant un criblage phytochimique.

- ✓ Extraction par macération et étude de l'effet de solvant (solvant polaire et apolaire).

- ✓ Etude quantitative des différents extraits obtenus par quantification des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavonols totaux par dosage colorimétrique.

III.1. Matériels

III.1.1. Matière végétale

Dans ce travail de recherche, les agrumes utilisés sont l'orange et le citron.



Figure III. 1 : Orange et citron.(Auteurs,2021).

III.1.2. Echantillonnage :

- Pulpe de l'orange.
- Pulpe du citron.

III.1.3. Réactifs chimiques

Une série de produits chimiques ont été utilisés pour la réalisation de ce travail de recherche. Ils sont représentés dans le tableau III.1 :

Tableau III. 1 : Réactifs chimiques

Réactifs chimiques	
Hexane	Eau distillée
Ethanol	Acétone
Réactif de dragendorf	Réactif de Mayer
Liqueur de Fehling	Acide chlorhydrique(HCl)
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Magnésium
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	Chlorure de fer(FeCl ₃)
Acide acétique(C ₂ H ₄ O ₂)	Chloroforme (CHCl ₃)
Anhydride acétique	Rutine
Acide gallique	Chlorure d'aluminium
Carbonate de sodium	Quercétine
Réactif de Folin-Ciocalteu	Acétate de sodium

III.1.4 Matériels du laboratoire

Le matériel du laboratoire utilisé est représenté en différentes verreries et outils. Ils sont représentés dans le tableau III.2 :

Tableau III. 2 : Matériels du laboratoire

Matériels du laboratoire	
Éprouvette graduée	Porte-tubes à essai
Béchers	Papier filtre
Entonnoirs	Papier aluminium
Erlenmeyers	Parafilm
Tubes à essai	Spatule
Fiole jaugée	Creuset
Micropipette	Bain marie

III.1.5. Appareillage

Les appareils utilisés dans cette recherche sont :

- Plaque chauffante.
- Evaporateur rotatif.
- Etuve.
- Spectrophotomètre UV-visible.

III.2.Méthodes

III.2.1. Criblage phytochimique

C'est une technique qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Elles se basent sur des réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence ou l'absence des substances chimiques [134].

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, tannins), les saponosides, les coumarines, les terpènes et stérole ...etc.

III.2.1.1. Préparation des extraits

On prépare quatre récipients afin de mettre séparément dans chacun 50 ml des solvants suivants : eau, hexane, acétone et éthanol. On fait introduire séparément la quantité pesée de chaque échantillon, on laisse macérer à température ambiante pendant 2 heures. Après filtration avec papier Wattman n° 3, on obtient quatre extraits pour chaque échantillon.

III.2.1.2. Test Phytochimiques

* Recherche des flavonoïdes

▪ Test 1 (Test de Shinoda)

A 5 ml d'extrait à tester, on ajoute, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acides chlorhydrique (HCl), l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

On prend 1ml de chaque extrait, on ajoute quelque goutte de soude (NaOH). L'apparition d'une couleur brun-jaunâtre indique la présence de flavonoïdes [135].

***Recherche des tannins**

On prend 1ml de chaque extrait, on ajoute 2 ml d'eau distillée et quelque goutte de chlorure ferrique(FeCl_3) diluée à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins [136].

***Recherche des coumarines**

On prend 2ml de chaque filtrat, on ajoute 3ml de NaOH à 10%, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence des coumarines [137].

***Recherche des saponines**

A 1 ml de l'extrait aqueux, on a ajouté quelques gouttes d'eau distillée dans un tube à essai. La solution a été agitée vigoureusement et l'apparition d'une mousse persistante stable pendant 2 min indique la présence des saponines [138].

***Recherche des sucres réducteurs :**

On ajoute quelque goutte de la liqueur de Fehling à 1ml d'extrait puis on chauffe les tubes contenant les mélanges au bain marie à 40° C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'une couleur rouge brique [135].

***.Recherche des glycosides**

On fait introduire 1ml du chaque filtrat dans un tube à essai et on ajoute 0.4 ml d'acide acétique, on ajoute une goutte de chlorure ferrique (FeCl_3) et quelques gouttes de l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré. L'apparition d'une coloration anneau marron indique la présence des glycosides [135].

***Recherche des stérols et terpènes**

▪ **Test 1**

On ajoute 1 ml d'anhydride acétique à 1ml de chaque filtrat, par la suite on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann). L'apparition d'un anneau rouge indique la présence des triterpènes, et l'apparition d'une couleur verte indique la présence de stérols [137,135].

- **Test 2**

On ajoute 2 ml de chloroforme (CHCl_3) et quelques gouttes d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1 ml de chaque filtrat (réaction de Salkowski). L'apparition d'une couleur rouge écarlate dans la couche inférieure du filtrat indique la présence de stérols [135].

***Recherche des alcaloïdes**

- **Test 1**

On prend 1 ml de chaque filtrat, on ajoute à chaque tube quelques gouttes de réactif de dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge-orangé indique la présence des alcaloïdes [135].

- **Test 2**

On prend 1 ml de chaque filtrat, on ajoute quelques gouttes de réactif de Mayer. L'apparition d'une couleur blanc-jaunâtre indique la présence des alcaloïdes [135].

II.2.2. Extraction et dosage des composés phénoliques

II.2.2.1. Extraction par macération

- **Principe**

La macération est une méthode traditionnelle couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Dans cette méthode on utilise des quantités considérables de solvants. En plus, elle se déroule à température ambiante, ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules [139,140].

- **Mode opératoire :**

200 g de la pulpe de l'orange et citron sont mises à macérer séparément dans des béchers, en utilisant un solvant polaire (éthanol), pendant 24 heures à température ambiante, cette étape est répétée trois fois. La filtration est réalisée sur papier filtre. Le filtrat de chaque échantillon est versé dans un ballon (solvant plus matières solubilisées) et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température qui ne dépasse pas $60\text{ }^\circ\text{C}$ pour éliminer tout le solvant (éthanol). Enfin, pour chaque échantillon, on a obtenu un extrait sec à analyser qu'on a pesé avec soin afin de quantifier la masse, le protocole d'extraction est résumé dans la figure III.2.

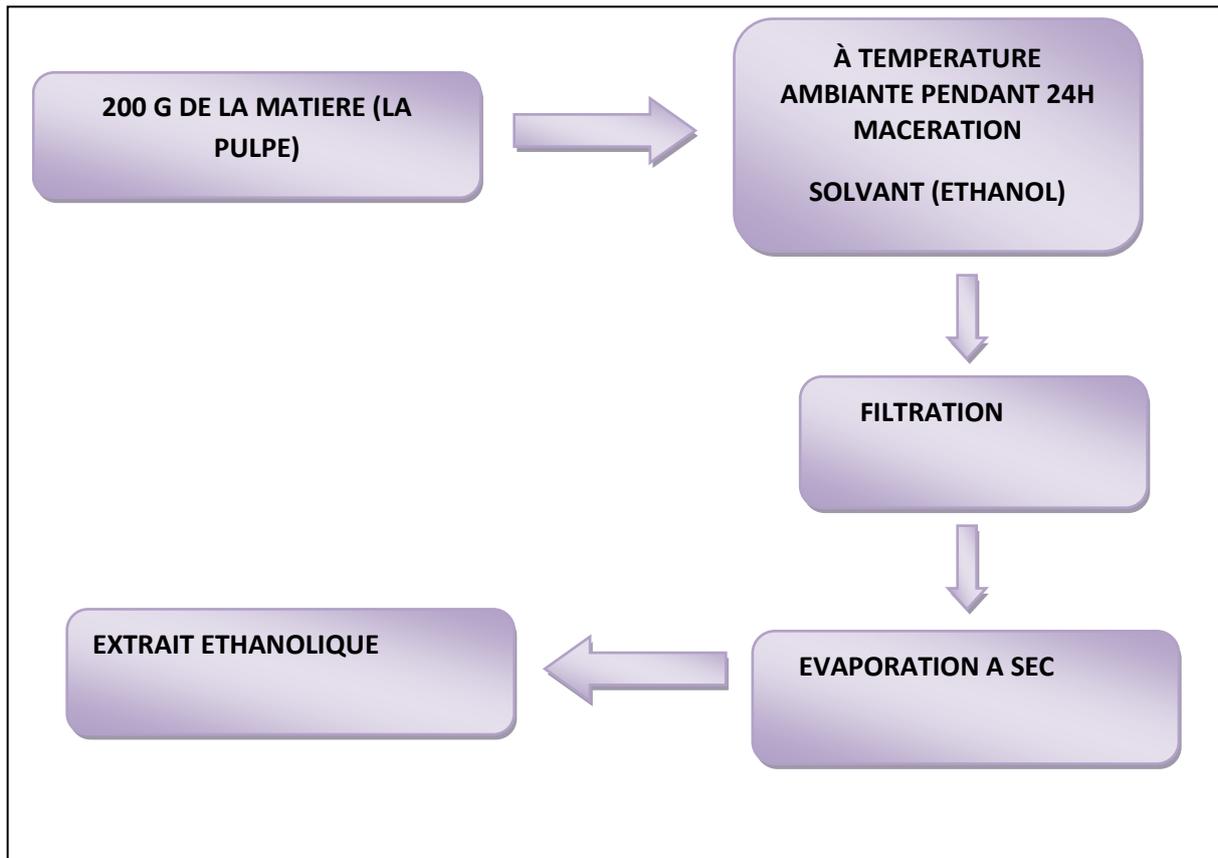


Figure III.2 : Protocole d'extraction par macération des oranges et des citrons

III.2.2.2. Détermination du rendement d'extraction :

Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R (\%) = [M_1 / M_0] \times 100$$

R % : Rendement des extraits.

M₁ : Masse de l'extrait sec obtenu exprimée en g.

M₀ : Masse initial de l'organe de la plante exprimée en g.

III.2.2.3. Quantification des composés phénoliques :

La détermination des composés phénoliques : polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavonols totaux présents dans les la pulpe d'orange et de citron étudiée a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible.

*** Dosage des polyphénols totaux :**

▪ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [141]. Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique.

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleu constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [142].

▪ Protocole :

Le protocole utilisé (figure. III.3) est basé sur celui décrit par Singleton et al. en y apportant quelques modifications. Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200 µl de chaque extrait a été ajouté, avec un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois, et 800 µl d'une solution de carbonate de sodium à 7,5 %. Les tubes ont été agités et conservés pendant 30 min à l'obscurité (annexe V). L'absorbance est lue à 765 nm. Chaque lecture est répétée trois fois. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0,03 à 0,3 mg/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g) [141].

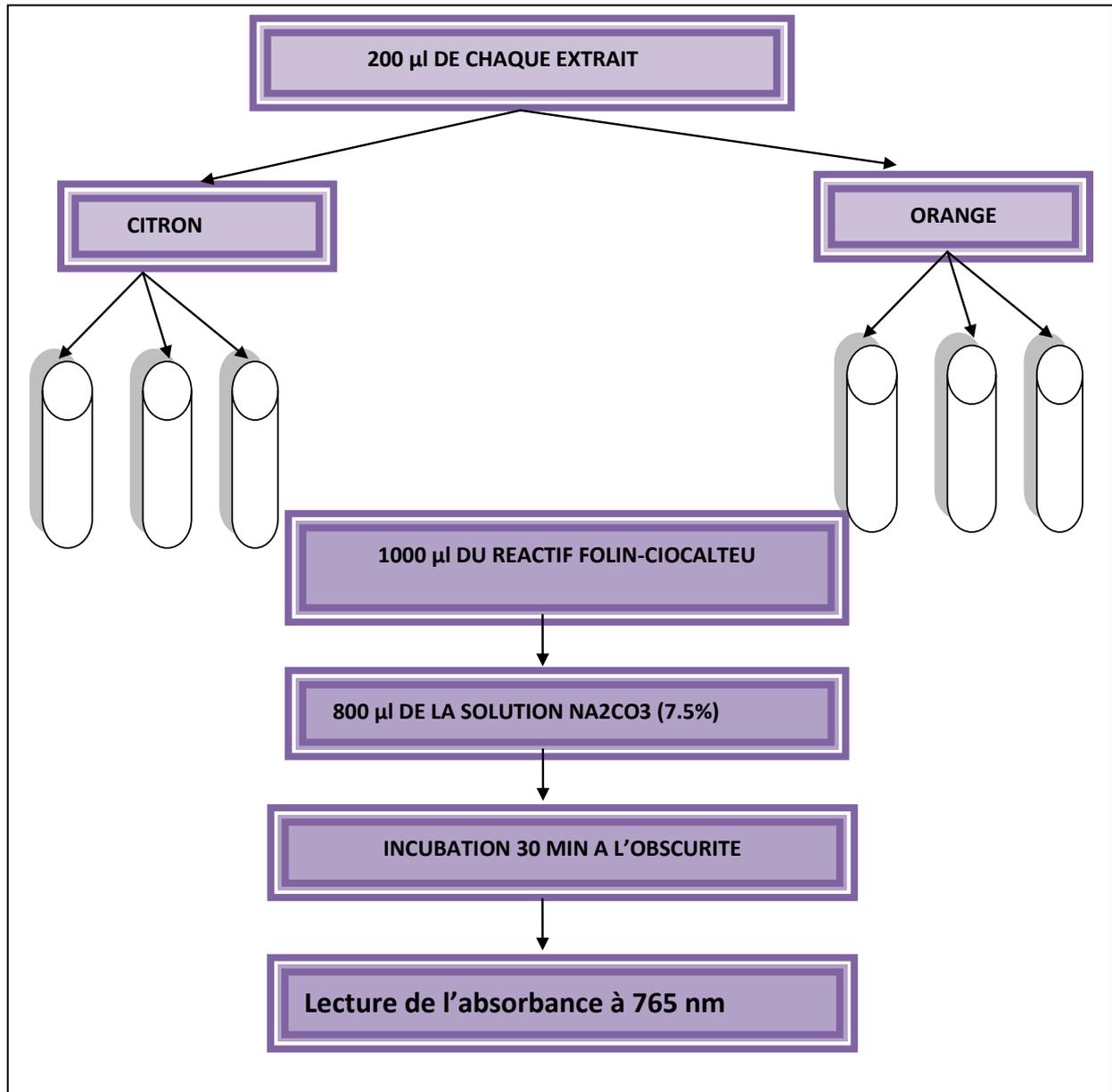


Figure III. 3 : Protocole de dosage des polyphénols totaux.

*Dosage des flavonoïdes totaux

- **Principe**

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) cité par Djeridane et al. est utilisé pour quantifier le contenu en flavonoïdes dans nos extraits [143].

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (-OH) libre, en position 5 qui est susceptible de former avec son groupement -CO et le chlorure d'aluminium un complexe coloré. L'apparition de la couleur jaune indique la formation de ce complexe.

Ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons. La formule du complexe entre le chlorure d'aluminium et le composé phénolique est présentée par la figure ci-dessous (figure III.4) [144].

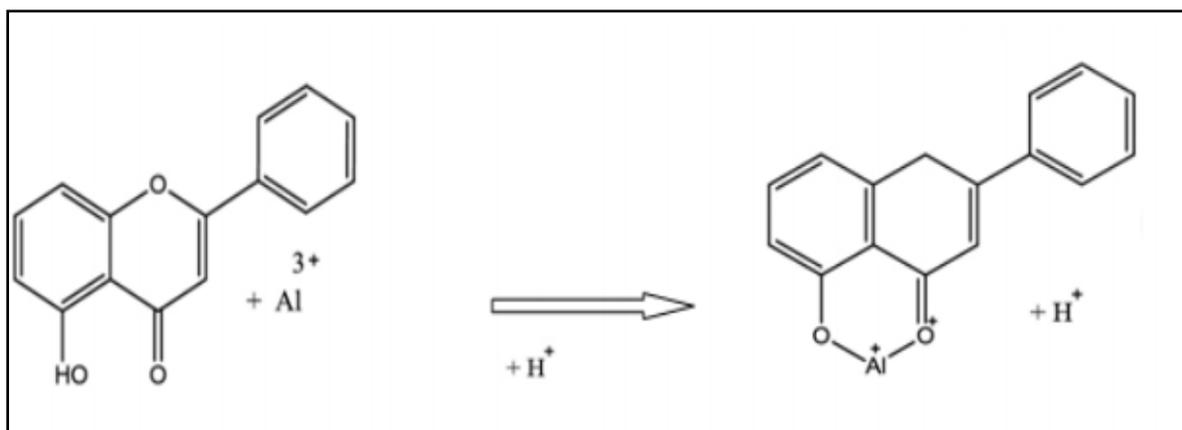


Figure III.4 : Réaction entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes

Ce dernier présente une absorption maximale à 420 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'échantillon.

Protocole

0.5 ml de chaque extrait ou standard (préparé dans l'éthanol) sont ajoutés à 0.5 ml de la solution d'AlCl₃ (2 % préparé dans l'éthanol). Après une heure d'incubation à l'obscurité (annexe VI), l'absorbance a été mesurée à $\lambda = 420$ nm (figure). Chaque lecture est répétée trois fois.

La quantification des flavonoïdes totaux a été établie en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisé par un standard étalon qui est la rutine, préparé à différentes concentrations de 0.01 à 0.1 mg/ml dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de rutine par gramme de matière sèche (mg ER/g).

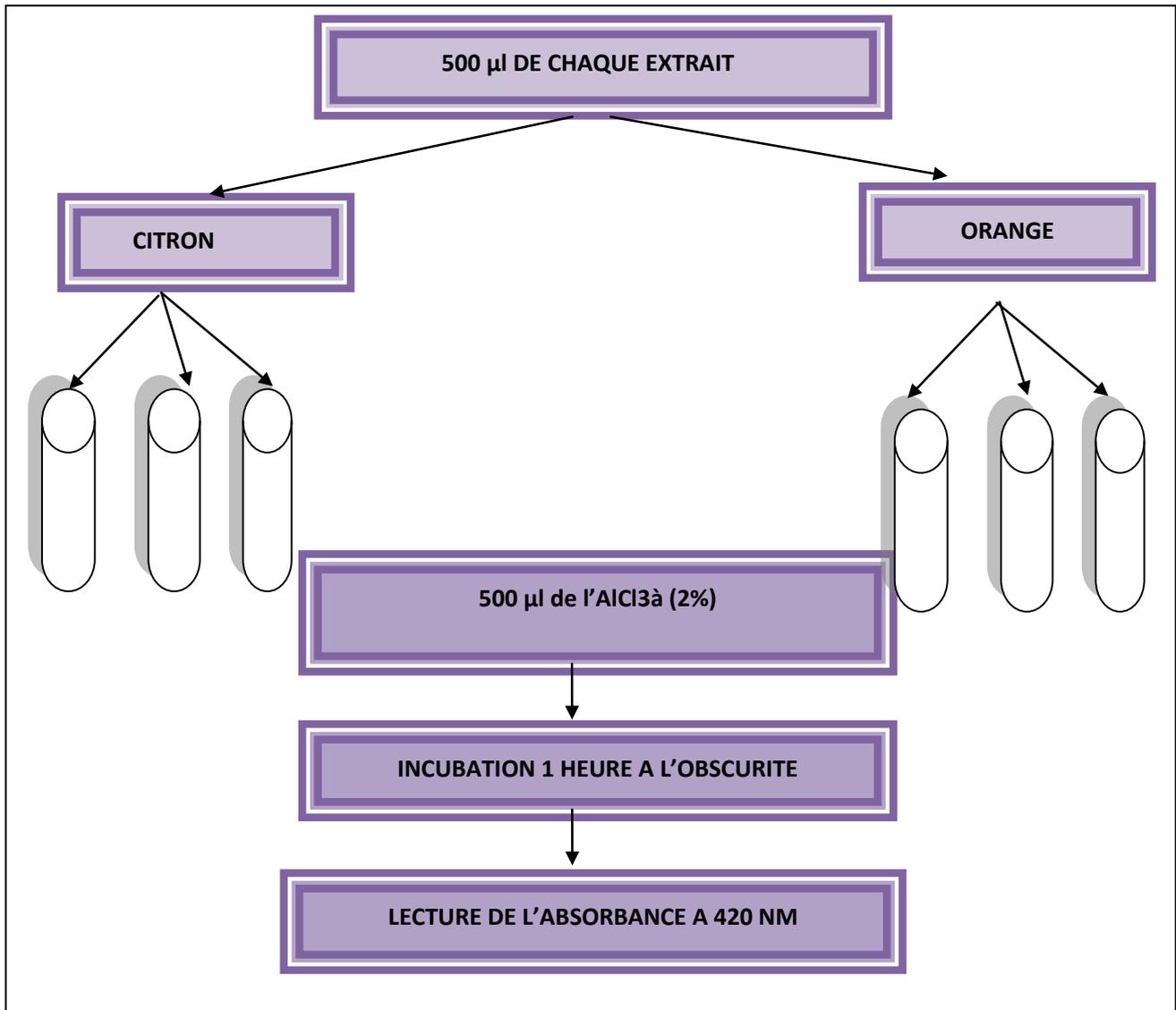


Figure III.5 : Protocole de dosage des flavonoïdes totaux.

***Dosage des flavonols totaux :**

La méthode d'acétate de sodium est utilisée pour le dosage des flavonols totaux, avec quelque modification [145].

▪ **Protocole**

On ajoute 1 ml d'une solution d' AlCl_3 (2%) et 1.5 ml d'acétate de sodium (50 g/l) pour 1 ml de chaque extrait, l'incubation se fait pendant 2 heures et demie à l'obscurité. L'apparition

de couleur jaune foncé indique la présence des flavonols (annexe VII). L'absorbance de chaque solution a été mesurée à $\lambda = 440 \text{ nm}$.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine à différentes concentrations (0.01 à 0.1 mg/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g). Ce protocole est résumé dans la figure suivante :

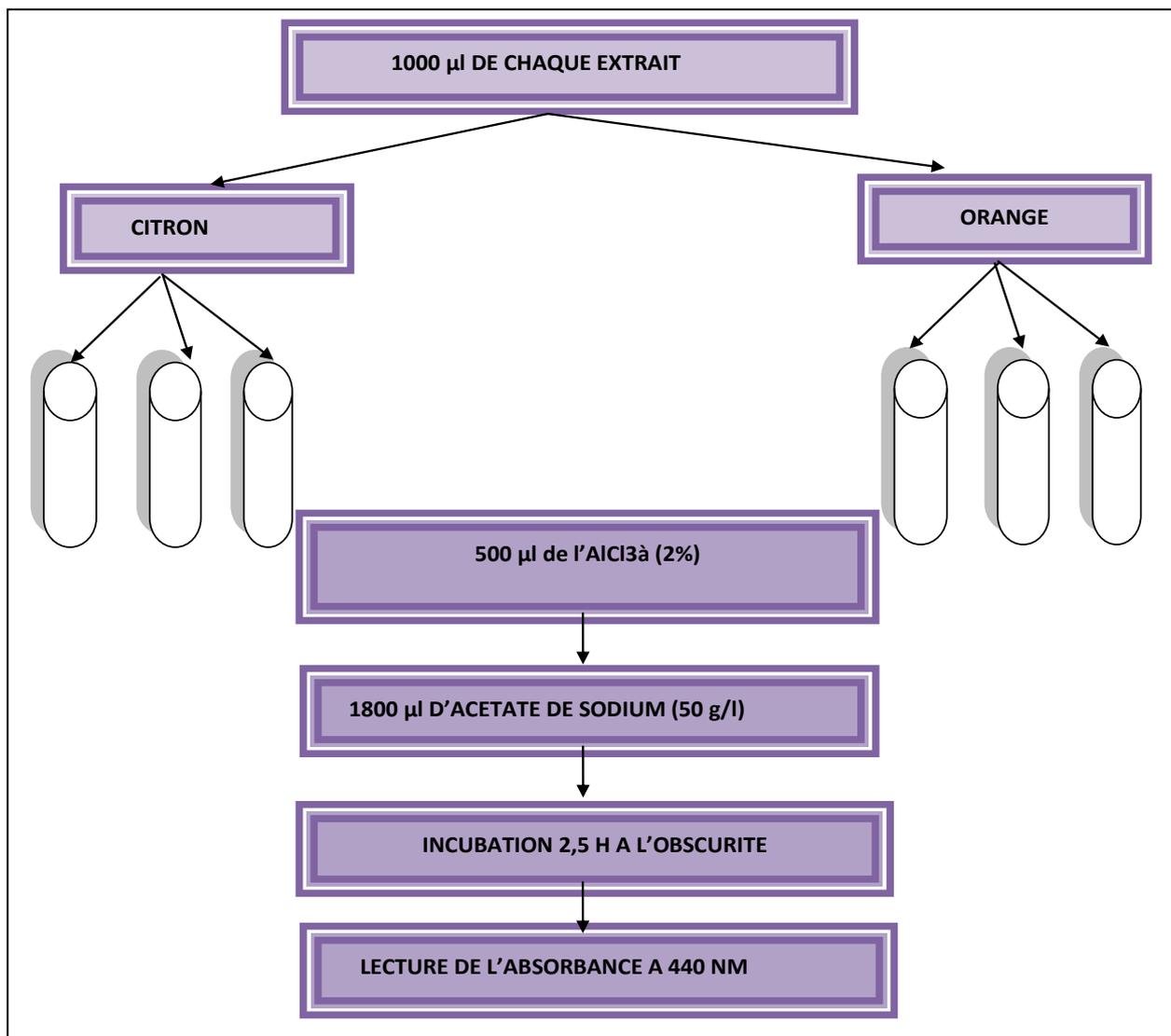


Figure III.6 : Protocole de dosage des flavonols totaux.

III.2.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test DPPH :

*Le radical stable DPPH :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm [146]. Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [147,148]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (figure III.7). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire [149].

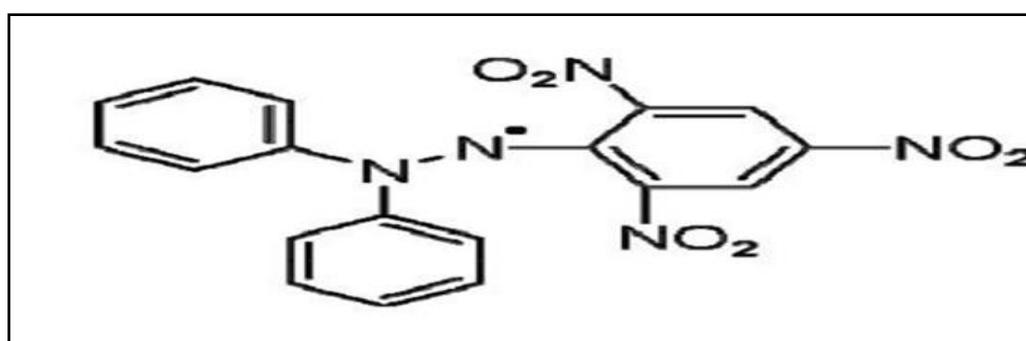


Figure III.7 : Structure chimique du radical libre DPPH [149].

*Mode opératoire :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Seung-Cheol [150].

Un volume de 1.5ml de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1.5 ml de la solution méthanolique du DPPH (2mg/ml) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 1.5ml d'éthanol avec 1.5ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

*** Principe de la méthode :**

Réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits [1]. Le DPPH est initialement violé, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques [152].

Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm. Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (figure III.8)[153].

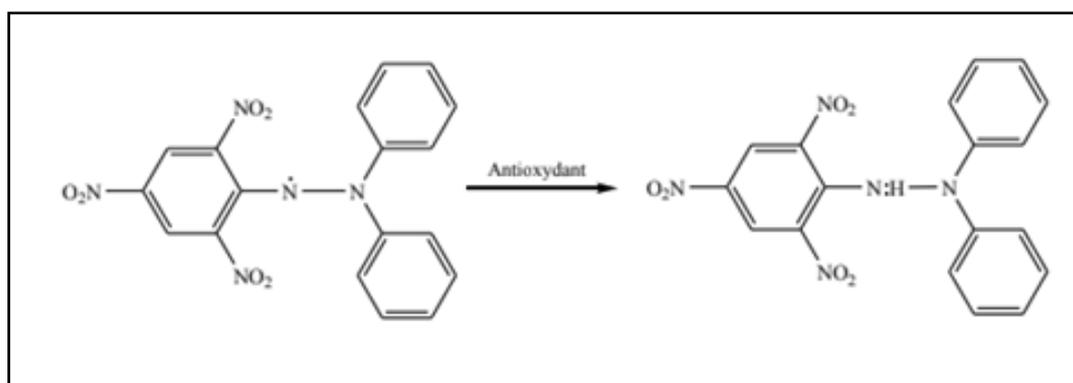


Figure III. 8 Réduction du radical DPPH.

III.2.3. Extraction des huiles essentielles des citrus par hydrodistillation

***Hydrodistillation**

Le principe de l'hydrodistillation (figure III.9) correspond à une distillation hétérogène où la matière végétale est immergée dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les cellules libèrent leurs contenus aromatiques qui seront entraînés par la vapeur d'eau en passant par un refroidisseur. Une fois

condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle.

*** Matériel végétal**

❖ Mode Opérateur

- Les fruits ont été soigneusement lavés, séchés et épluchés à l'aide d'un économe (en évitant d'inclure l'albédo). Les écorces sont coupées en petits morceaux d'environ 1cm² maximum.
- La quantité du zeste obtenu sont laisser à sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière, on a obtenu 30g de zeste sec.
- On a introduit le zeste sec des écorces d'orange et 150 ml d'eau distillée dans un ballon tricol, sans oublier l'ajout de quelques grains de pierres ponce.
- Après on a réalisé le montage d'hydrodistillation, chauffage jusqu' à l'apparition d'une couche huileuse sur le distillat.
- On a versé le distillat dans une ampoule à décanter et on a ajouté la solution saturé en NaCl : c'est le relargage (figure III.10) ; la solubilité de l'huile essentielle étant moins importante dans l'eau salée que dans l'eau .
- On a recueilli la phase organique ; phase supérieure.
- On a fait l'extraction de la phase organique de la phase aqueuse avec 3 fois 5ml de l'éthanol.
- On a séché la phase organique en utilisant le sulfate de magnésium, ensuite filtration.
- Finalement, évaporation de l'éthanol à l'aide d'un évaporateur rotatif.



Figure III. 9 Montage de l'hydrodistillation.



Figure III. 10 l'ampoule à décanter (séparation des phases).

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Criblage phytochimique :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés, qui existent dans la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques.

IV.1.1. Criblage phytochimique pour les extraits du citron et des oranges dans les quatre solvants

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur la pulpe d'orange et citron macérés dans l'eau, l'éthanol, l'hexane et l'acétone sont rassemblés dans le tableau suivant :

- **Extraits des citrons**

Tableau IV.1 : Résultats des tests phytochimiques préliminaires des extraits de citron

Solvants / Tests		L'eau	Ethanol	Hexan	Acétone
Flavonoïdes	Shinoda	-	-	-	-
	NaOH	+	++	-	++
Tanins		-	-	-	-
Coumarine		+	+	-	+
Saponines		-	-	-	-
Sucres réducteurs		-	-	-	-
Glycosides		+	+	-	-
Térpènes et stéroles	Libermann Burchard	-	-	-	+
	Salkowski	-	-	-	+
Alcaloïdes	Dragendrof	+	++	+++	++

	Mayer	++	++	+	-
--	-------	----	----	---	---

❖ **Interprétation des résultats :**

On a utilisé deux tests différents pour la détection des flavonoïdes dans les extraits de citron , qui sont le test de Shinoda et le test de NaOH, les résultats indique la présence des flavonoïdes dans les extraits de l'eau et éthanol et acétone ,et l'absence des tanins dans tous les extraits et la présence de coumarine dans les extraits de l'acétone et l'éthanol et l'eau ,et l'absence des saponines et les sucres réducteurs dans tous les extraits, la présence des glycosides dans les extraits de l'eau et éthanol , pour la détection des stérols on a utilisé deux tests différents qui sont le test de Libermann Burchard et le test de Salkowski, les résultats indique la présence des stérols dans les extraits de l'acétone. Pour la détection des alcaloïdes on a utilisé le test de Dragendrof, et le test de Mayer, les résultats indique la présence des alcaloïdes dans tous les extraits dans le test1 , et la présence des alcaloïdes dans tous les extraits sauf dans l'extrait de l'acétone .

• **Extraits des oranges**

Tableau IV. 2: Résultats des tests phytochimiques préliminaires des extraits des oranges

Solvants		L'eau	Ethanol	Hexane	Acétone
Testes					
Flavonoïdes	Shinoda	-	-	-	+
	NaOH	-	+	+	-
Tanins		-	-	-	-
Coumarine		-	+++	-	++
Saponines		-	-	-	-
Sucres réducteurs		-	-	-	-
Glycosides		+	++	-	+++
Terpènes et stérols	Libermann Burchard	-	-	-	-

	Salkowski	-	++	-	+
Alcaloïdes	Dragendrof	+++	+	+++	+
	Mayer	-	+	+	+

Interprétation des résultats :

On a utilisé deux tests différents pour la détection des flavonoïdes dans les extraits de orange , qui sont le test de Shinoda et le test de NaOH, les résultats indique la présence des flavonoïdes dans les extraits de acétone, hexane, éthanol ,et l'absence des tanins dans tous les extraits ,et la présence de coumarine dans les extraits de l'acétone et l'éthanol ,et l'absence des saponines et les sucres réducteurs dans tous les extraits ,la présence des glycosides dans les extraits de l'eau et éthanol , acétone .pour la détection des stérols on a utilisé deux tests différents qui sont le test de Libermann Burchard et le test de Salkowski,les résultats indique la présence des stérols dans les extraits de l'éthanol et l'acétone, pour la détection des alcaloïdes on a utilisé le test de Dragendrof, et le test de mayer, la présence des alcaloïdes dans tous les extraits pour le teste de 1 et la présence des alcaloïdes dans tous les extraits l'exception de l'eau dans le test 2.

IV.2. Rendement de l'extraction par macération

Les extraits ont été préparés par macération, en utilisant un solvant polaire qui est l'éthanol

Tableau IV. 3 Rendement des extraits d'éthanol des oranges et citrons

Echantillon	Masse initiale(g)	Masse final (g)	Rendements (%)
Orange	152.6g	11.8g	7.33
Citron	112.4g	8.5g	7.56

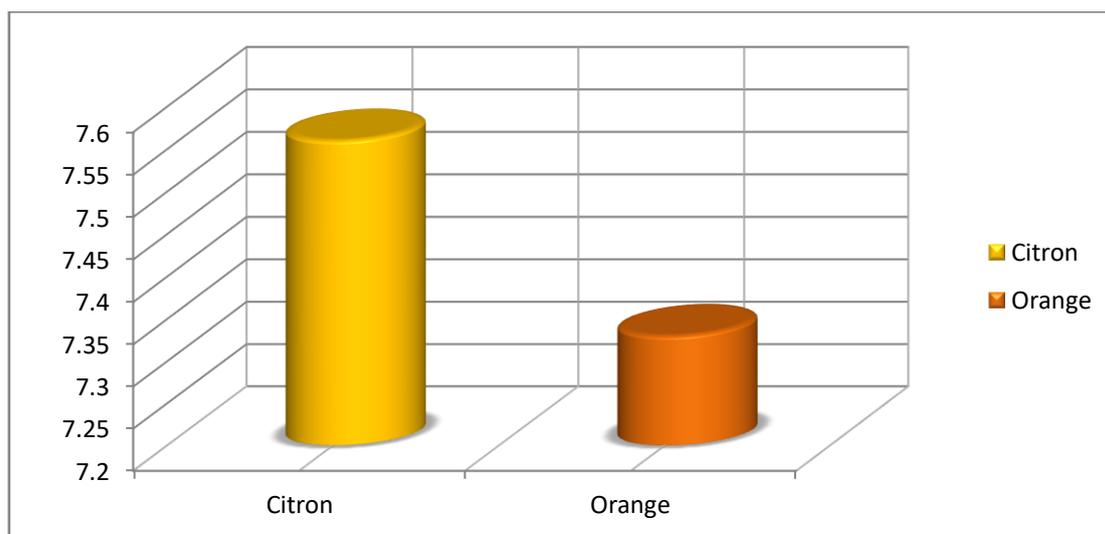


Figure IV. 1 Rendement des extraits d'éthanol de l'orange et citron.

Interprétation des résultats

Les extraits de l'éthanol : les valeurs de rendement d'extraction entre orange et citron sont presque les mêmes. La valeur de rendement de citron (7.56%) un peu élevée que la valeur de l'orange (7.33%).

IV.3. Analyse quantitative des composés phénoliques

IV.3.1. Teneurs en polyphénol totaux

La teneur en polyphénols totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et des nourritures. L'acide gallique est le standard employé le plus souvent dans cette méthode. En utilisant un graduant de concentration allant de 0.03 à 0.3 (mg/ml), pour l'acide gallique, on obtient les valeurs des absorbances correspondantes (tableau IV.4) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, les résultats obtenus sont représentés par une courbe d'étalonnage (figure IV.2). L'équation linéaire obtenue à partir de cette courbe est : $Y=9.337 X-0.114$, où Y représente l'absorbance et X représente la concentration. La valeur de $R^2 = 0.993$.

Tableau IV. 4 Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique

Concentration (mg/ml)	0.3	0.27	0.2 4	0.21	0.18	0.15	0.12	0.09	0.06	0.03
Absorbance (765nm)	2.5 60	2.344	2.1 65	2.482	1.623	1.290	1.062	0.619	0.379	0.100

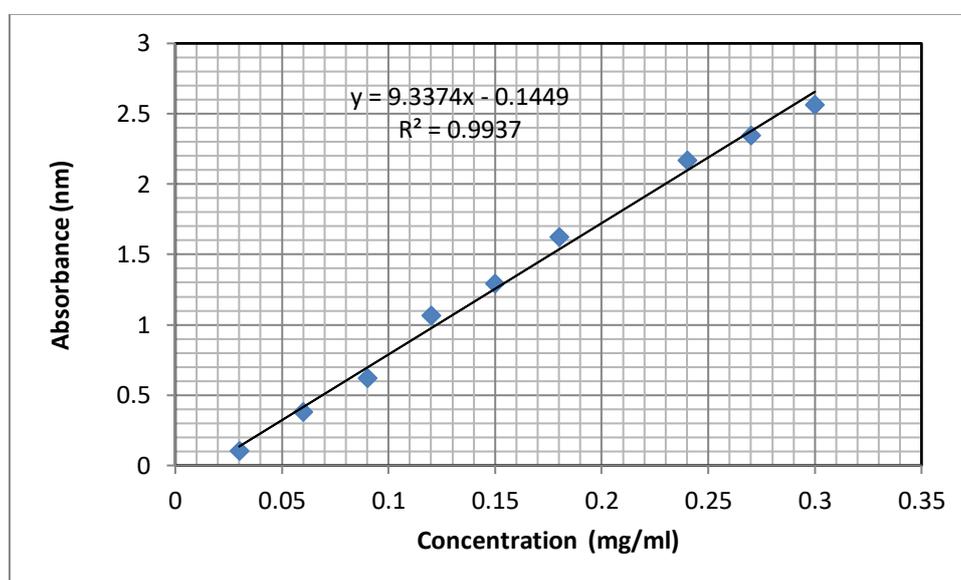


Figure IV. 2 courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau IV. 5 Teneur en polyphénols totaux dans les extraits éthanoliques des oranges et citrons

Echantillon	Citron			Orange		
Concentration (mg/ml)	1	1	1	1	1	1
Absorbance moyenne (nm)	0.119			0.089		
Polyphénols Totaux (mg,ER/g)	28.16			24.95		

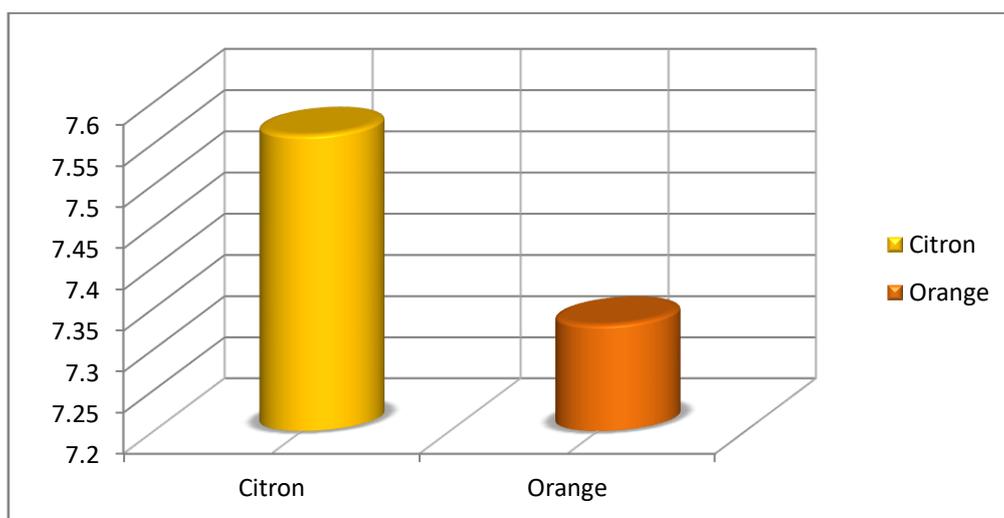


Figure IV. 3 Teneur en polyphénols totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons.

Les concentrations des polyphénols totaux des extraits d'éthanol est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($Y=9.337 X-0.144$). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les échantillons de la pulpe de l'orange et de citron. Chaque essai a été répété trois fois ainsi que, chaque valeur reportée dans les tableaux suivants est une moyenne (tableau IV.5) La (figure IV.3) représentent ces résultats.

Tableau IV. 6 Teneur en polyphénols totaux dans les extraits d'éthanol de citron et orange

Echantillon	Poly-phénols totaux en mg EAG/g d'extraits
Citron	28.16± 0.0055076
Orange	24.95± 0.0196723

Interprétation des résultats :

Il est très clair de constater d'après les résultats obtenus, que tous les extraits testés, contiennent des polyphénols mais avec des teneurs différentes.

- La teneur en polyphénols totaux est variables selon l'échantillon, on peut constater que d'après les résultats présentés par la (figure IV.3) que la teneur la plus élevée en polyphénols totaux revient à l'extrait de citron (28.16 ± 0.0055076 mg EAG/g) suivi par l'extrait de l'orange (24.95 ± 0.0196723 mg EAG/g).

IV.3.2. Teneurs en flavonoïdes totaux

La teneur en polyphénols totaux a été estimée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), la rutine a été utilisé comme standard, elle est employée le plus souvent dans cette méthode. En utilisant un graduant de concentration allant de 0.01 à 0.1 (mg/mL), pour la rutine, on obtient les valeurs des absorbances correspondantes (tableau IV.7) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, les résultats obtenus sont représentés par une courbe d'étalonnage (figure IV.4). L'équation linéaire obtenue à partir de cette courbe est : $Y=35.98X-257$, où Y représente l'absorbance et X représente la concentration. La valeur de $R^2 = 0.990$

Tableau IV. 7 Absorbances de la gamme de concentration de la rutine.

Concentration (mg /ml)	0.1	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
Absorbance (420nm)	2.918	2.950	2.733	2.203	1.948	1.366	1.314	0.816	0.390	0.161

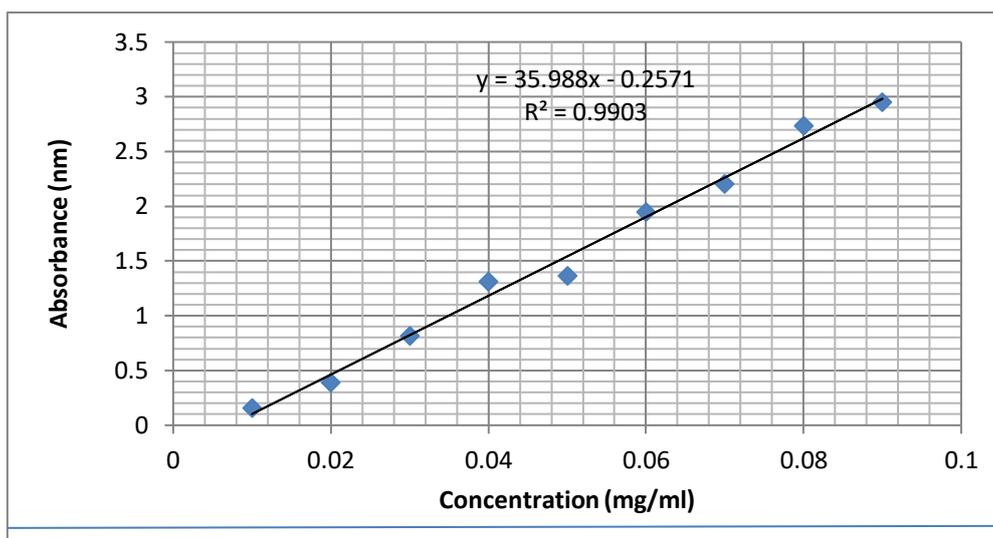


Figure IV. 4 : Courbe d'étalonnage de la rutine.

Les concentrations des flavonoïdes totaux des extraits d'éthanol est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la rutine ($Y = 35.98X - 257$). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de la rutine par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des flavonoïdes totaux contenus dans les échantillons de citron et orange . Chaque essai a été répété trois fois ainsi que, chaque valeur reportée dans les tableaux suivants est une moyenne (tableau IV.8) La figure (IV.5) représentent ces résultats.

Tableau IV. 8 Teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons

Echantillon	Citron			Orange		
Concentration (mg/ml)	1	1	1	1	1	1
Absorbance moyenne (nm)	0.0513			0.0206		
Flavonoïdes totaux (mg ER/g)	8.56			7.71		

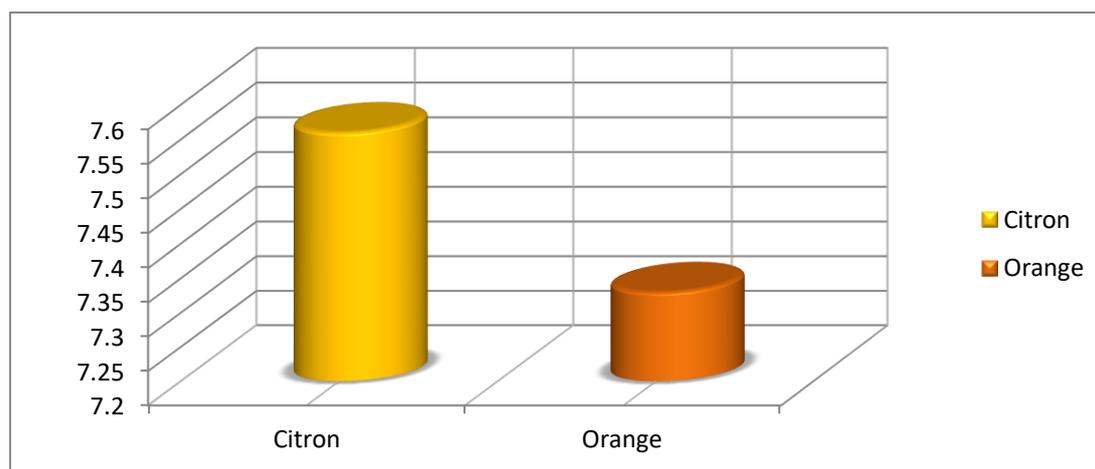


Figure IV. 5 Teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons.

Tableau IV. 9 Teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits d'éthanol

Echantillon	Flavonoïdes totaux en mg ER/g d'extrait
Citron	8.56±0.0464794
Orange	7.71±0.0075056

Interprétation des résultats :

Il est très clair de constater d'après les résultats obtenus, que tous les extraits testés, contiennent des flavonoïdes mais avec des teneurs différentes.

- La teneur en flavonoïdes totaux est variables selon l'échantillon, on peut constater que d'après les résultats présentés par la figure (IV.5) que la teneurs la plus élevée en flavonoïdes totaux revient à l'extrait de citron (8.56 ± 0.0075056 mg EAG/g) suivi par l'extrait de l'orange (7.71 ± 0.0464794 mg EAG/g).

IV.3.3. Teneurs en flavonols totaux

La teneur en flavonols totaux a été estimée par la méthode d'acétate de sodium, la quercétine a été utilisé comme standard. En utilisant un graduant de concentration allant de 0.01 à 0.1 (mg/ml), pour la quercétine, on obtient les valeurs des absorbances correspondantes (tableau IV.10) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, les résultats obtenus sont représentés par une courbe d'étalonnage (figure IV.6). L'équation linéaire obtenue à partir de cette courbe

est : $Y = 31.36X - 0.362$, où Y représente l'absorbance et X représente la concentration. La valeur de $R^2 = 0.990$.

Tableau IV. 10 : Absorbances de la gamme de concentration de la quercétine.

Concentration n (mg /ml)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
Absorbance (440nm)	0.034	0.208	0.65	0.730	1.209	1.458	1.852	2.287	2.509	2.683

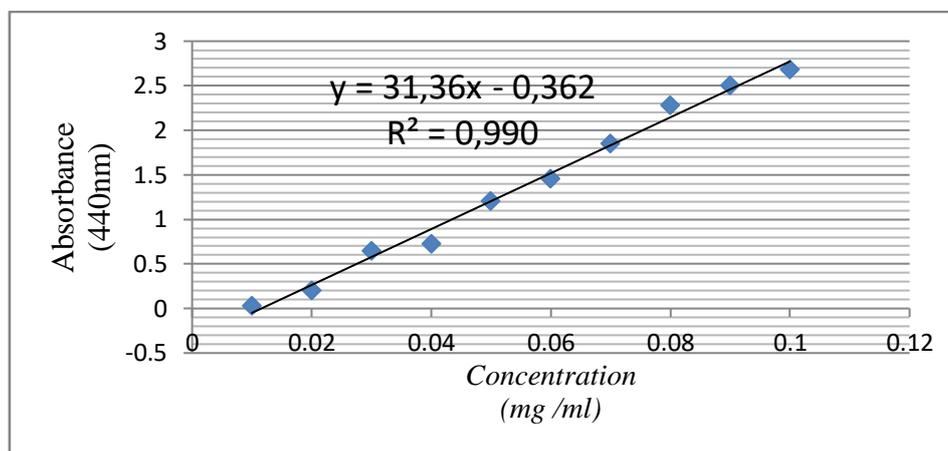


Figure IV. 6 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les concentrations des flavonols totaux des extraits d'éthanol est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine ($Y = 31.36X - 3.086$). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de la quercétine par un gramme de l'extrait (mg EQ/g d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des flavonols totaux contenus dans les échantillons de la pulpe d'orange et citron. Chaque essai a été répété trois fois ainsi que, chaque valeur reportée dans les tableaux suivants est une moyenne (tableau IV.11), la figure (IV.7) représentent ces résultats.

Tableau IV. 11 Teneur en flavonols totaux dans les extraits éthanolique des oranges et citrons

Echantillon	Citron			Orange		
Concentration (mg/ml)	1	1	1	1	1	1
Absorbance moyenne (nm)	0.619			1.163		
Flavonols totaux (mg EQ/g)	30			40		

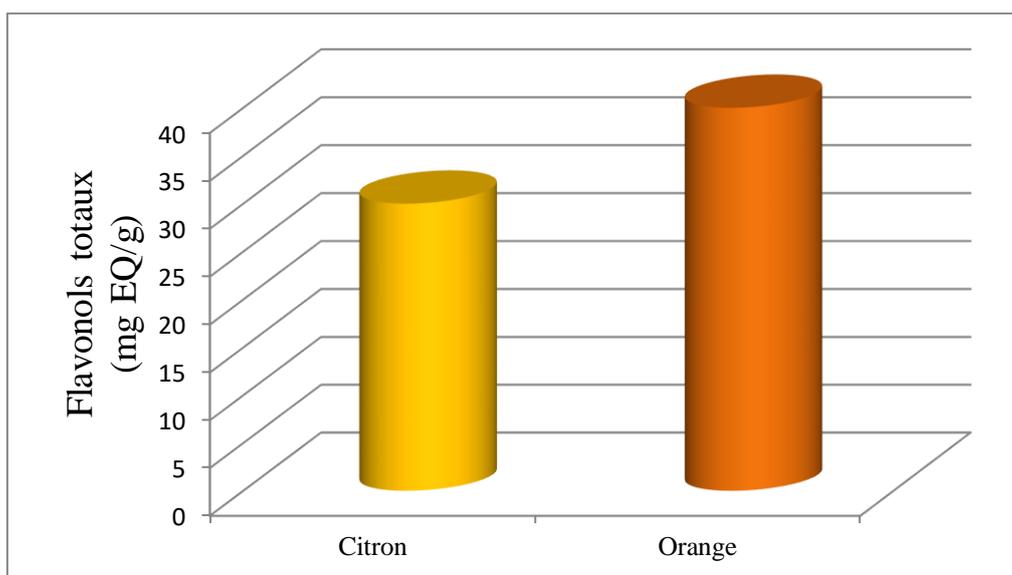


Figure IV. 7 : Teneur en flavonols totaux dans les extraits éthanolique des Oranges et Citrons

Tableau IV. 12 Teneur en flavonols totaux dans les extraits d'éthanol

Echantillon	Flavonols totaux en mg EQ/g d'extrait
Citron	30±0.2909593
Orange	40±0.2558535

Interprétation des résultats

Il est très clair de constater d'après les résultats obtenus, que les extraits testés, contiennent des flavonols totaux mais avec des teneurs différentes.

La teneur en flavonols totaux est variables selon l'échantillon , on peut constater que d'après les résultats présentés par la figure (IV.7) que la teneurs la plus élevée en flavonols totaux revient à l'extrait de l'orange ($40 \pm 0.2558535 \text{ mgEQ/g}$) suivi par l'extrait de citron ($30 \pm 0.2909593 \text{ mgEQ/g}$).

IV. 3.4 Evaluation de l'activité antioxydante .

IV.3.4.1 Méthode chimique :

* Test du radical libre DPPH

L'activité anti radicalaire est calculée par la méthode du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), cette méthode est fréquemment utilisée pour sa simplicité. Elle est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés [148].

Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical. Le paramètre IC50 représente la concentration équivalente à 50% de DPPH perdu. Les résultats exprimés en IC50 qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC50 est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande [149].

* Orange :

Tableau I. 3 l'évaluation d'inhibition de l'orange

Concentration mg/ml	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01
I(%)	91.42	90.97	90.55	90.38	87.65	86.05	85.45	85.30	85.08

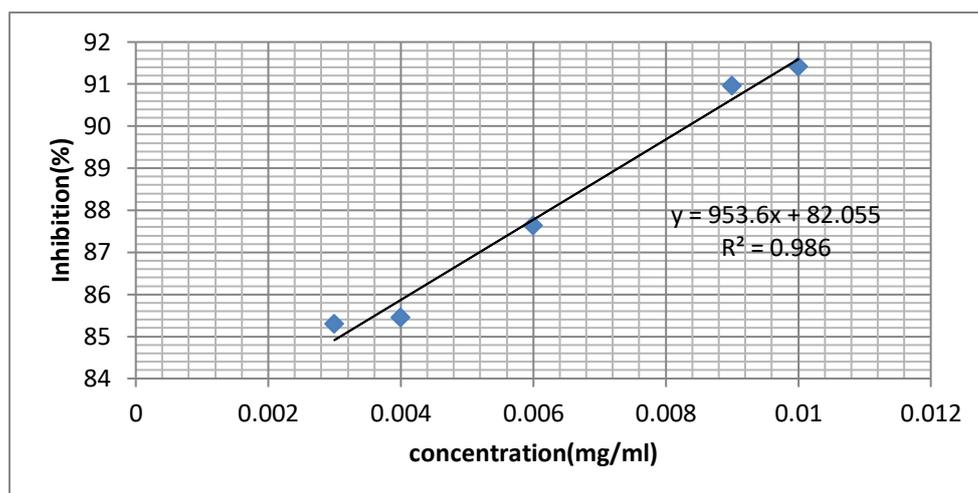


Figure IV. 8 Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait de l'orange.

* Citron :

Tableau IV. 13 L'évaluation d'inhibition du citron

Concentration mg/ml	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.010
I (%)	95.60	95.22	94.55	94.03	93.21	93.06	92.76	92.61	92.54

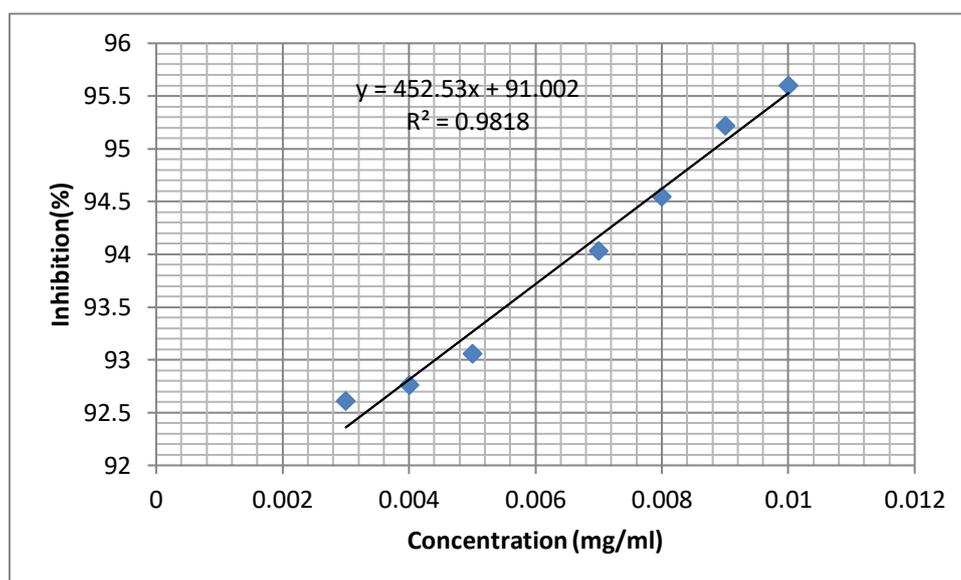


Figure IV. 9 Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait de citron.

Tableau IV. 14 Valeurs des IC₅₀ du DPPH pour les extraits

Extrait	Equation	IC ₅₀ (mg/ml)
Orange	Y=906.3x+82.62	0.03
Citron	Y=452.5x+91.00	0.009

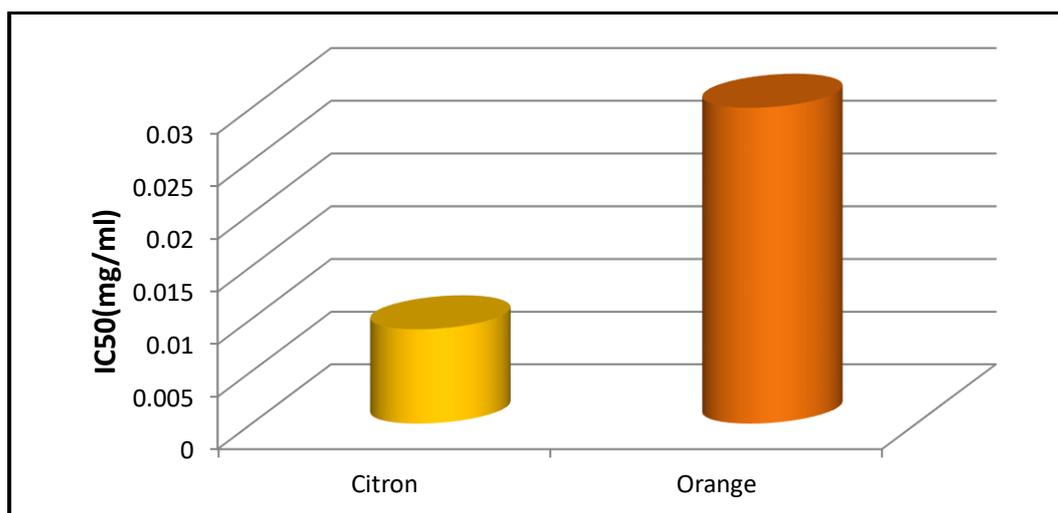


Figure IV. 10 Comparaison entre IC50 dans les différents extraits.

La figure (IV.10) montre que les valeurs des IC50 sont un peu différentes. L'extrait de citron présente le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (0.009 mg/ml), suivi par extrait de l'orange (0,03 mg/ml). Les agrumes qui contiennent une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peuvent jouer un rôle majeur dans l'inhibition antioxydante.

Conclusion générale

Ce travail de recherche avait pour objectif d'évaluer qualitativement et quantitativement de l'orange et citron de région de belida ,et nous nous sommes intéressés à l'étude des activités antioxydantes (activité anti radicalaire DPPH) et au dosage des (composés phénoliques, flavonoïdes , flavonols) contenus dans la pulpe d'orange et de citron. La méthode choisie pour l'extraction est la macération.

Le criblage phytochimique basé sur les tests spécifiques a permis de caractériser les groupes suivants : flavonoïdes, tanins, coumarines, alcaloïdes, terpènes et stérols, saponines et composés réducteur et les glycosides. Ces métabolites secondaires ont une grande valeur thérapeutique et médicinale vis-à-vis le stress environnemental ou oxydatif, en assurant des mécanismes de défenses aux agressions provoquant les maladies. La présence de ces composés dans la pulpe de citrus (orange et citron) et l'utilisation de solvants d'extraction de polarité différentes : eau, acétone, éthanol et hexane a donné des résultats très variables et très distinctes, d'après leur contenu et leur présence.

L'extraction par macération des différents citrus étudiées dans cette recherche, en utilisant solvants ; l'éthanol qui est polaire, nous a permis d'obtenir des rendements différents.. Par comparaison des différents extraits, le meilleur rendement revient successivement aux extrait éthanolique de citron et orange 7,56% et 7,33% , ces résultats confirment l'effet de solvant d'extraction.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et flavonols totaux dans les extraits analysés montre que tous les extraits sont riches en ces composés. Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, en utilisant la spectrophotométrie UV-Vis, et l'acide gallique comme standard. La teneur en polyphénols totaux la plus élevée revient à l'extrait éthanolique de citron (28,16 mg EAG/g) et la plus faible valeur revient à l'extrait éthanolique de l'orange (24,95 mg EAG/g).

Le dosage quantitatif des flavonoïdes totaux a été réalisé par la méthode de chlorure d'aluminium en utilisant la rutine comme standard. La teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux pour les extraits d'éthanol a été obtenu pour l'extrait de citron (8,56 mg ER/g) et la plus faible valeur revient à l'extrait de l'orange (7,71 mg ER/g).

Conclusion générale

La teneur en flavonols totaux a été réalisée selon la méthode d'acétate de sodium, et en utilisant la quercétine comme standard. Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique des fleurs représente la teneur la plus élevée de l'orange (40mg EQ/g) et la teneur la plus faible revient à l'extrait de citron (30 mg EQ/g).

On a aussi réaliser l'extraction des huiles essentielles par la montage de l'hydrodistillation ,on a obtenu une petite quantité de l' huile de citron et de l'orange ,malheureusement on a pas pu les analyses de ces dernier à cause de leurs quantité insuffisantes.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits analysés a été réalisé par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH en déterminant leur efficace (IC50) suivant ce paramètre, les extraits de la pulpe de citron (0.009 mg/ml) sont plus puissants que les extrait d'orange (0.03 mg/ml).

Bibliographie

- [1] **Rehman S.U., Hussein S., Nawaz H., Mushtaq A.M., Murtaza M.A., Rizvi A., 2007** : Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread, *Pakistanian Journal of Nutrition*. N°6, P : 558-561.
- [2] **FAO., 2012** : Citrus fruit Fresh and processed. Annual statistics.
- [3] **Rossi Y. E., Palacios S.M., 2013** : Fumigant toxicity of Citrus sinensis essential oil on *Muscadomestica L.* adults in the absence and presence of a inhibitor, *ActaTropica*. P : 450
- [4] **Bocco A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C.;1998**: Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Pell and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem*, vol(46). P: 21-23.
- [5] **Ramful D., Tarnus, E., Aruoma, O., Bourdon, E., & Bahorun, T., 2011** : Polyohénoles composition, vitamine C content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. *Food Research International*, Vol (44).P : 2088-2099.
- [6] **Spiegel Roy P., Goldschmidt E.E., 1996** : *Biology of Citrus*. 1ère édition. Edition Cambridge University Press. P : 239.
- [7] **PESSON P., & LOUVEAUX J., 1984** : pollinisation et production végétales INRA.
- [8] **Faucon M., 2015** : *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription*. Édition sang de la terre. Paris. P: 39-455.
- [9] **Bousbia N., 2011** : *Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires*. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P : 128
- [10] **Jacquelemond C., Mario H. ET Coord, 2013** : *Origine géographique et diffusion des agrumes dans le monde*.
- [11] **Bénédicte., & Michel B., 2011** : *Agrumes comment les choisir ET cultiver facilement*. Les éditions eugen ulmer. 8 rue Blanche. Paris, N° d'édition: 440-01.P :127.
- [12] **Loussert R., 1989** : *Les agrumes*.2.paris : production Edition Lavoisier. 157 p :12.
- [13] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Oranger>
- [14] **(Gollouin et Tonelli, 2013)**.
- [15] **Padrini F., Lucheroni M.T., 1996** : *Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies*. Paris.P :11-15- 61- 111.
-

[16] **Pesson P., & Louveau J., 1984** :Pollinisation et production végétale. Ed. INRA. Paris. P :637.

[17] **Jacquelemond C., & Blondel D., 1986** : Contribution à l'étude des porte-greffes d'agrumes, le *Poncirus trifoliata* (1ière partie). Rev. Fruit. Vol (41). N°5. P : 303-309.

[18]<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Marche/orange.htm#:~:text=Tous%20ces%20fruits%20ont%20une,la%20%22peau%22%20des%20quartiers.>

[19] <https://www.google.com/search?q=coupe+transvers.>

[20] **Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O.I., 2010**: Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*.Vol 278. P:75-87.

[21]<https://www.jardinsdefrance.org/lorigine-des-agrumes-leur-evolution-et-la-naissance-des-especes-cultivees.>

[22] <https://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-aliments/orange/composition>

[23] **González-Molina E., Domínguez-Perles., 2010** : Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 51: 327–345.

[24]**González-Molina et al., 2010; Guimaraes et al., 2010; Janati et al., 2012**

[25] <https://www.yara.fr/fertilisation/solutions-pour-cultures/agrumes/production-mondiale-agrumes/#:~:text=La%20production%20mondiale%20d'agrumes,la%20production>

[26] <https://www.google.com/search?q=Les+agrumes+dans+le+monde&sxsrf=ALeKk.>

[27] **Adamou, S., Bourenane N., Haddadi, F., Hamidouche , S., Sadoud, S., 2005** : Quel rôle pour les fermes-pilotes dans la prévention des ressources génétiques en Algérie. Série N°126. P : 25.

[28] **Bellabas, A., 2010** : Rapport de mission: Etude de base sur les agrumes en Algérie. Consultant Benzarga..La production agrumicole en recul dans la Mitidja: L'orange enpasse de perde son fief. Journal El-watanional.P :45

[29] **Baci L., 1995** : Les contraintes au développement du secteur des fruits et légumes en Algérie: faiblesse des rendements et opacité des marchés.INA El-Harrach, Alger. options méditerranéennes. Série N°4.P:266-277.

[30] **Chouaki S., Bessedik F., Chebouti A., Maamri F., & al ., 2006** : Deuxieme rapport sur l'état des ressources. Ed,INRAA P: 8-91.

[31] **Ercan B., & Ilhami G.U., 2011**: Polyphénol contents and in vitro antioxydant activites of lyophilised aqueous extract of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). Food Research International, Vol(44).P: 1482-1489.

- [32] **Choi S., Hee-chul K., Soo-youn K., & al., 2007:** Correlation between Flavonoid content and the no production inhibitory Activity of peel extracts from various citrus fruits. *Boil. Pharm. Bull.* Vol (4).P: 772-778.
- [33] **Del Rio J.A., Fuster, M. D., Gomez, P., Porras, I., Garcia-Lidon, A., & Ortuno, A., 2004:** Citrus limon a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food chem.*P 84-457-461.
- [34] **Valnet J., 2001:** La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot.P: 207-281.
- [35] **Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O., Bourdon, E., & Bahorun, T., 2011:** Polyohéol composition, vitamin C content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. *Food Research International*, Vol(44).P: 2088-2099.
- [36] **Fernandez-Lopez J., Fernandez Gines, & al ., 2004 :**Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Techology.* P :15-176-185.
- [37] **Wang X., Chen Q., & Lu X., 2014 :**Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids.*P : 38-129-137.
- [38] **Hawthorne S.B., Grabanski C.B., Martin E., Miller D.J., 2000 :** Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix, *Journal of Chromatography.*P : 892-421-433.
- [39] **Chau C.F., Huang Y.L., Lin C.Y., 2004 :** Investigation of the cholesterol-lowering action of insoluble fibre derived from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. *Food Chemistry.*Vol(87).P : 361-366.
- [40] **Dugo P., Mondello L., Lamonica G., Dugo G., 1997 :** Characterization of cold-pressed key and Persian lime oils by Gas chromatography, Gas Chromatography/Mass spectroscopy, high performance liquid chromatography, and physicochemical indices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol 46.P :3608-3616.
- [41] **Gamiz-Gracia L., Luque de Castro, M. D., 2000 :** Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta.* Vol (6). P : 1179-1185.
- [42] **Lohrasbi, M., Pourbafrani, M., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2010 :** Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource Technology.* Vol(101).P :7382-7388.
-

[43] **Tian Q., Miller E.G., Ahmad H., Tang L., Patil B.S., 2001** : Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer*.Vol(40).P :180-184.

[44] **Bardeau F., 2009** : Les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edition lanore.P :315.

[45] **Herberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Bertrais, S., Mennen, L., Malvy, D., Roussel, A.M.,Favier, A., Briançon, S., 2004** :The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Archives of Internal Medicine*Vol(21).P : 2335-234.

[46] **Kim D. k., Lee, C.Y., 2004** : Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.Vol 44.P: 253–273.

[47] <http://www.biotech-ecolo.net/antioxydants.html>

[48] **Berger M.M., 2005** : Canoxydatif damage betreatednutritionally clinical nutrition
Vol(24).P : 172-183

[49]<https://www.copmed.fr/fr/vitamines-mineraux-antioxydants-super-nutriments/322-resverasod.html>

[50] **Cheesman K., Slater H., 1993**: An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*. Vol (49). P: 481-493.

[51] **Gardes-Albert. M., Bonnefont-Rousselot. D., Abedinzadeh. Z., Jore. D., 2003** : Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*, N°277-278.P : 57- 64.

[52] **Mercadante A., Steak.,& Pfander H., 1998** : Carotenoids from guava (*psidiumguajava* l.): Isolation and structure elucidation. *journal of agricultural and foodchemistry*. P :145-151.

[53] **Britton G., 1983** :Carotenoids, flavonoids. in the biochemistry of natural pigments ed.cambridguniverstypress .P:123-126.

[54] **Lobreau-Callen, D., Marion, M-C., & Clément, V., 1999** : Les miels. Les techniques de l'ingénieur .P: 3-9.

[55] **Brudurlu H.S., Koca, N., & Karadeniz, F., 2006** : Degradation of vitamin C in

citrus juice concentrates during storage. Journal of Food Engineering.vol 74.P:211-216.

[56] **Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L., (2005) :** Les composés phénoliques des végétaux,P :203- 204.

[57] **Macheix J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C., (2005) :** Les composés phénoliques des végétaux. (Ed.) Presses polytechniques et universitaire romandes. P:1-32.

[58] **Lutge U., Kluge M., Bauer G., 2002 :** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris.P: 211.

[59] **Abderrazak M., & Joël R., 2007 :** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. ISBN 10: 2100506382.P:177.

[60] **Gravot A., 2008.** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.

[61] **Middleton E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., 2000 :** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev. Vol(52) .P: 673-839.

[62] **Martin S. ET Andriantsitohaina R., 2002 :** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie.Vol(51).P :304-315.

[63] **Boizot N., ET Charpentier.J.P., 2006 :** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. p : 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

[64] **Epifano F., Genovese S., Menghini L., & Curini. M., 2007:** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. Phytochemistry; Vol (68).p: 939-953.

[65] **Lugasi A ., Hovari J ., Sagi K.V ., & Biro L., 2003 :** The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. Acta. Biologica Szegedientis Vol(4). P: 119-125.

[66] **Dacosta Y., 2003 :** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris.P: 317.

[67] **Macheix J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. (Ed.) Presses polytechniques et universitaire romandes. P:1-32.

[68] **Wang S.Y., Wu J.H., Shyur L.F., Kuo Y.H. & Chang S.T., (2002).** Antioxydant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. Holzforschung. Vol(5) P: 487-492.

- [69] **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A. & Igic R., (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*. Vol(111) , P:925-929
- [70] **Bruneton J., 1999 :** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Paris.
- [71] **Ghestem A., Seguin E., Paris M., & Orecchioni A.M., 2001:** Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Ed TEC&DOC. Paris.P :225. (cited in Djemai ZoueglacheS, 2008).
- [72] **Ghedira K., 2005 :** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. Vol (4). P: 162-169.
- [73] **Graham T.L., 1998:** Flavonoids and flavonal glycoside metabolism in Arabidopsis.
- [74] **Schijlen E.G.W.M., Ric de Vos C.H., Van Tunen A.J. & Bovy A.G., 2004:** Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*. Vol (65), P: 2631–2648.
- [75] **De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T, 2006:** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*. P: 31-63.
- [76] (Source : **Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008: Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. Journal of Agricultural Sciences. Vol (4). P: 265 – 274.**)
- [77] **Hopkins., 2003 :** Physiologie végétale, 2^{ème} édition, Boeck. P: 276-280.
- [78] **Guignard J.L., 2000 :** Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées). *Biochimie végétale*. 2^{ème} Ed. Dunod. Paris.P : 40
- [79] **Merremia E (Convolvulacées) , ET Orophea E (Annonacées), 2000 :** Thèse de doctorat Lausanne. P : 241.
- [80] **Bruneton J., 1999 :** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Paris.
- [81] **Ghestem A., Seguin. E., Paris M., & Orecchioni A.M., 2001:** Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Ed TEC&DOC. Paris.P :275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008)
-

[82] **Peronny S., 2005** : La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lémur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle.

[83] **Derbel. S., & Ghedira K., 2005** : Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Phytothérapie et Nutrition. Vol(1).P: 28-34.

[84] **Iserin. P., 2001** : Larousse encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparations, soins. Larousse, Paris.

[85] **Deiana S., Gessa. CE., Palma. A., Premoli. A., Senette. C., 2003**: Influence of organic acids exuded by plants on the interaction of copper with the polysaccharidic component of the root mucilage. Organic Geochemistry. Vol (34). P: 607-651.

[86] **Booth., D.B., J.R. Karr., S. Schauman., C.P. Konrad., S.A. Morley., M.G. Larson., & S.J. Burges., 2004**: Reviving urban streams: land use, hydrology, biology, and human behavior. Journal of the American Water Resource Association, October. P: 1351-1364.

[87] **Harkati B., 2011** : Valorisation Et Identification Structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae : Scorzonera Undulata, Thèse de doctorat Université Mentouri .Constantine.

[88] **Lake, B. G., 1999** : Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. Food and Chemical Toxicology.Vol(4). P: 423-453.

[89] **Smyth T., Ramachandran. V. N., & Smyth. W. F., 2009**: A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. International Journal of Antimicrobial Agents.Vol(5). P: 421-426.

[90] **Floch F., Mauger, F., et Desmurs, J. R., 2002** : Coumarin in plants and fruits." Perfumer & flavorist. Vol(2). P:32-36.

[91] **Betina Bencharif Soumeya., 2014**: Isolement et caractérisation de saponosides extraits de deux plantes médicinales: *Cyclaen africanum*, *Zygophyllum cornutum*, et évaluation de leur activité anti-inflammatoire. Thèse de Doctorat en cotutelle Université de Constantine1.Université de Bourgogne.

[92] **Das T. K., Banerjee. D., Chakraborty. D., Pakhira. M. C., Shrivastava.B., Kuhad R C., 2012**: Saponin: Role in Animal system. Vet. World. Vol(4). P: 248-254.

[93] **Thakur M , Melzig. M., Fuchs. H., Weng A., 2011**: Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties.Vol (1). P: 19–29.

[94] **Babar A.M., Hahn E.J.,Paek K.Y., 2007**: Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. Molecules. Vol(12). P: 607-621

[95] **Zenk M.H., Juenger M., 2007:** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*. Vol(68). P: 2757-2772.

[96] **Stöckigt J., Sheludk. Y., Unger. M., Gerasimenko I., Warzecha. H. & Stöckigt. D., 2002:** High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoreticelectrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A*, Vol (1). P: 85-113.

[97] **Dehak K., 2013 :** Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Université Kasdi Merbah. Ouargla.

[98] **Beddou F., 2015:** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid.Tlemcen. Algérie.

[99] **Tadeusz Aniszewski., 2007:** Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, Elsevier.

[100] **Bruneton., 1993 :** Phytochimie et plantes médicinales; Paris, Pharmacognosie 2 édition, Techniques et documentation, Lavoisier. P : 200-274.

[101] **Bediaga M., 2011 :** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako.Mali.P : 10.

[102] **Malecky M., 2005 :** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. P : 9- 13-19- 20- 27.

[103] **Benaissa O., 2011 :** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri. Constantine. P : 63.

[104] **Loomis D., Croteau. R., 1980 :** Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) *The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function*. Academic Press, San Francisco. N°4.P: 364-410.

[105] **Fahy E., Subramaniam. S., Brown H.A., & al.,2005 :** A comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res*. vol(5).P:839-861

[106] **Fernandez, M. A., De las Heras, B.,& al ., 2001 :** New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene Iupeol. *J. Pharm. Pharmacol*. Vol (53). P :1533–1539.

- [107] **Nirmal, S. A., Pal, S. C., Mandal, S. C., Patil, A. N., 2012:** Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology*. Vol(20). P :219–222
- [108] **Rahal S., 2004 :** Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants, P:39-44.
- [109] **Figueredo. G., 2007 :** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, École Doctorale Des Sciences Fondamentales. P :13.
- [110] **Bousbia N., 2011 :** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. Thèse co-tutelle présentée pour obtenir le grade de docteur en sciences. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P :128.
- [111] **Sharopov F., Santhosh Braun, M., & al ., 2015:** Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods*. Vol(4).P: 645-653.
- [112] **Guignard J.L., 2000 :** Biochimie végétale, Masson, Paris.P :166
- [113] **Hernandez-Ochoa L.R., 2005 :** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné Solvant/ Actif. D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France
- [114] **Dongmo P.M.J., Kuate. J., Boyom. F.F., & al 2002 :** Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de citrus sur la croissance mycelienne de *phaeoramularia angolensis*. *Fruits*. Vol (2). P: 95-104.
- [115] **Faucon M., 2015 :** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris,P: 39-455.
- [116] **El-Akhal, F., et al.,2014:** Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco).
- [117] **Burt S., 2004:** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* .Vol(94). P :223-253.
- [118] **Hazzit., 2002:** Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol (30).P:189-203.
-

[119] **Anton., & Lobstein., 2005:** Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochemical Systematic and Ecology*. Vol (31). P:193-201.

[120] **Myriam Raymond., 2005 :** L'aromathérapie Chez Le Nourisson Et Le petit Enfant).

[121] **Rakotonanahary M., 2012 :** thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. P :16- 19-27-28

[122] **Oussala M., Caillet. S., Saucier. L., Lacroix. M, 2006 :** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat- *Meat Science*. Vol(73). P:236-244.

[123] **Laib I., 2011 :** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle.

[124] **Hüsnü C.B. & G. Buchbauer., 2015:** Handbook of essential oils: science, technology, and applications. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. N°02.

[125] **Verlet N., 1997 :** Les huiles essentielles, marchés tropicaux et méditerranéens, N°2690. P :1205-1210.

[126] **Ragonese C., & al., 2011:** Evaluation of a medium-polarity ionic liquid stationary phase in the analysis of flavor and fragrance compounds. *Analytical chemistry*, Vol (20). P :7947- 7954.

[127] **Samate A.D., 2009 :** Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone saharienne du burkina faso: valorisation.

[128] **Muther L., 2015 :** Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université d'Auvergne. P : 156.

[129] **Chavanne P., 2011 :** 200 remèdes au citron. Editions First Grund, Paris.P : 255.

[130] **Lakhdar L., 2015 :** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro. Thèse de doctorat. Université Mohammed V . Rebat. P :164.

[131] **Luque de Castro M. D., Jiménez-carmona,M., & al., 1999 :**P :18-708.

[132] **Mirmostafa. SA., Rasooli. I., 2002:** Antibacterial properties of thymus pubescens and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*. Vol(73).P : 244-250.

[133] **Lagunez –Rivera L., 2006 :** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique.

[134] **Hamidi A., 2013** : Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de magister, Chimie organique, Université Kasdi Merbah.Ourgla.P :111

[135] **Archana P., Samatha. T., Mahitha B., Ramaswamy. N., 2012** : Preliminary phytochemical screening from leaf and seed extracts of *Senna alata* L.Roxb-an Ethnomedicinal plant. Journal of pharmaceutical and biological research. Vol(3). P : 82- 85.

[136] **Ayoola G., Coker H., Adesegun S., Adepoju-Bello A., Obaweya K., Ezennia E., 2008**: Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. Journal ofpharmaceutical Research. Vol(7). P:27-50.

[137] **Savithramma N., Linga Rao M., & al ., 2011** : Screening of medicinal plantsfor secondary metabolites. Journal of Scientific Research. Vol(8). P : 580-58.

[138] **Maria R., Shirley M., & al., 2017** : Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterialactivity of thirteen native species from Guayas province Ecuador.J. King SaudUniv – Sci.

[139] **Spigno G., Faveri D.M., 2007**: Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. Journal of Food Engineering. Vol (78). P: 793-801.

[140] **Budic-Letoc I., Lovric T., Pezo I., Klujuzuric J.G.,2005**: Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. Food Technology and Biotechnology. Vol 43(1). P: 47-53.

[141] **Singleton V.L., Orthofer R.,Lamuella-Raventos R.M.,1999**:Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. Vol(299). P : 152.

[142] **Boizot N.,Charpentier J.P., 2006** : Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fustier. Le cahier des techniques de l'Inra.P : 79-82.

[143] **Djeridane A., Yousfi M.,& al ., 2006** : Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food chemistry. Vol(97). P : 654 660.

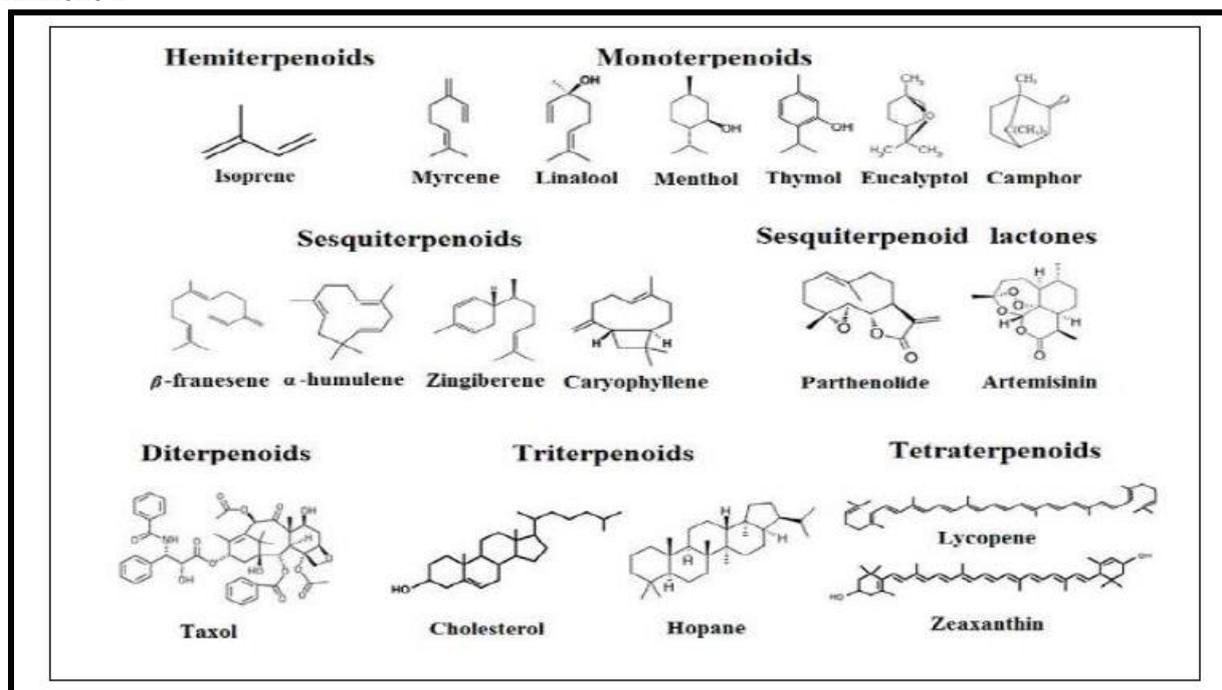
[144] **Ribéreau-Gayon P., 1968** : Les Composés phénoliques des végétaux : par Pascal RibéreauGayon.Dunod.

[145] **Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S., Vladimir-Knez E.I.C.S., 2004** : Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. Acta Pharm. Vol(54). P: 65-72.

- [146] **Wootton Beard, P. C., Moran A., & Ryan L., 2011:** Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International* Vol (44).P:217–224.
- [147] **Osman A. M., 2011:** Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH• and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol (412).P:473–478.
- [148] **Floegel A., Kim, D.O., Chung, S.-J., Koo, S. I. & Chun, O. K. (2011).** Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* vol (24).P:1043–1048.
- [149] **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* Vol (4).P :25-39.
- [150] **Seung-cheol L., Seok-Moo, J., So-Young, K., Dong-Ryul, K., Seong-Chun, J., Nam,K.C., ET Ahn, D.U. 2004:** Effet of Heat Treatment on the Antioxydant Activity of Extracts from Citrus Peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol (52).P : 3389-339.
- [151] **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*.Vol (42).P : 275–279
- [152] **Wu H., 2007:** Isolation and characterization of natural products from inger and *Allium Ursinum*. ProQuest Edition. p :28.
- [153] **Hadbaoui Z., (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah Ouargla. Algérie.
-

Annexes

Annexe I



Annexe I : Structure de quelques composés terpéniques.

Annexe II. Les réactifs utilisés pour le criblage phytochimique

▪ Solution de FeCl₃ (1%)

Chlorure de fer (III).....1g

Eau distillée.....100ml

▪ Réactif Dragendrof

✓ Solution A

Nitrate de bismuth.....1.7g

Acide tartrique concentré.....20g

Eau distillée.....100ml

✓ Solution B

Iodure de potassium.....10g

Eau distillée.....100ml

Le mélange est ensuite additionné de 10g d'acide tartrique et son volume est ramené à 100ml avec l'eau distillée.

▪ Réactif de Mayer

Chlorure de mercure.....1.36g

Iodure de potassium.....5g

Eau distillée.....30ml

Agiter jusqu'à dissolution puis ajouter : Eau distillée.....100ml

▪ **Dilution le réactif Folin-ciocalteu**

Folin-ciocalteu concentré.....1 ml
Eau distillée.....9ml

▪ **Solution de carbonate du sodium (7.5%)**

Carbonate du sodium.....7.5g
Eau distillée.....100ml

▪ **Solution de chlorure d'aluminium (2%)**

Chlorure d'aluminium.....2g
Ethanol100ml

▪ **Solution d'acétate de sodium (50g/L)**

Acétate de sodium.....25g
Eau distillée.....100ml

▪ **Dissolution les extraits**

(V) extrait +(V) éthanol

▪ **Solution de quercetine**

Quercetine.....5mg
Ethanol.....50ml

▪ **Solution de rutine**

Rutine.....5mg
Ethanol.....50ml

▪ **Solution d'acide gallique**

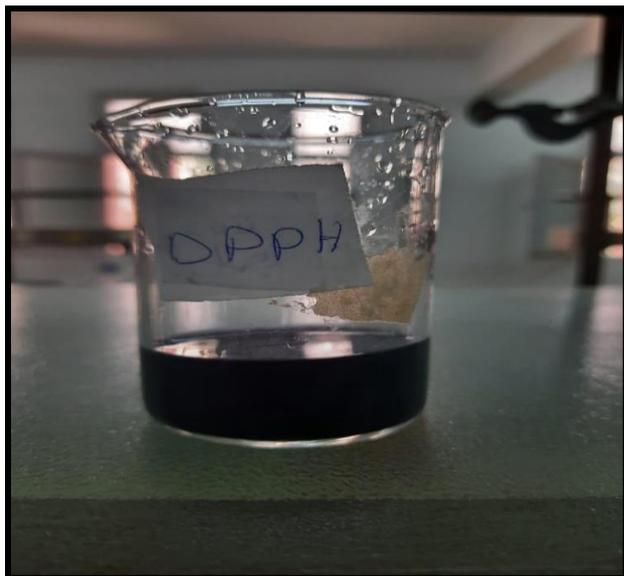
Acide gallique.....15mg
Ethanol.....40ml
Eau distillée.....10ml



L'acide gallique



Les solutions préparées

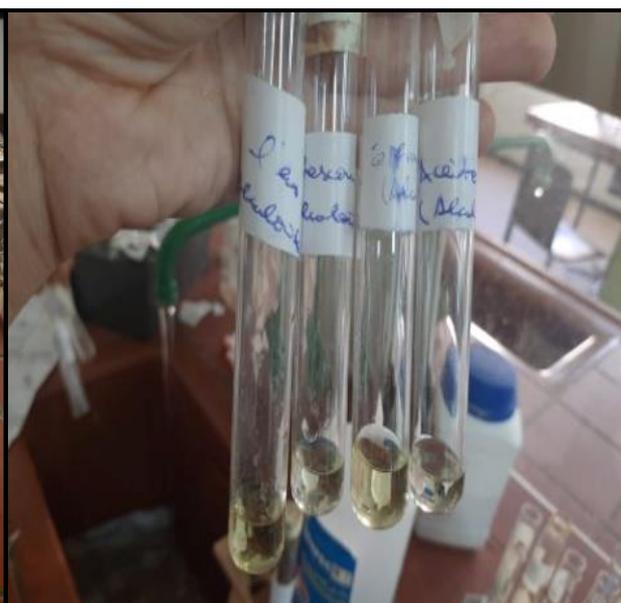


Réactif de DPPH



Réactif de dragendroff

Annexe III : Résultat du criblage phytochimique





Annexe IV :. Les Etapes de l'extraction



Etape 1 :Macération



étape 2 : Filtration



Annexe VI: appareils de laboratoire



plaque chauffante



Spectrophotomètre UV- VIS

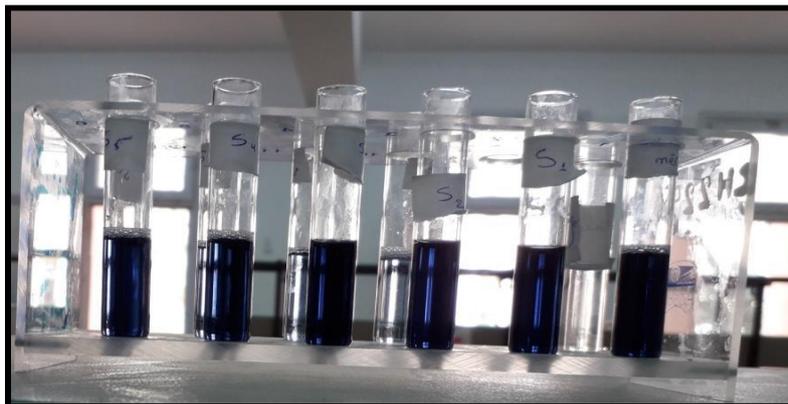


Balance électrique



Evaporateur rotatif

Annexe V



Dosage de polyphénols totaux

Annexe VI



Dosage de flavonoïdes totaux

Annexe VII



Dosage de flavonols totaux
